

**Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II:
Molekulare Zellbiologie
des Zentrums für Experimentelle Medizin
des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf**

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

**Einfluss
von Cholesterin auf die Membranaffinität von Annexin 6
in frühen und späten Endosomen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Felix Schwartz
aus Hamburg

Hamburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 15.02.2005

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. St. Jäckle

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. W. Hampe

Inhaltsverzeichnis

1.)	Einleitung	1
1.1.	Lipoproteinstoffwechsel	1
1.2.	Rezeptorvermittelte Endozytose	1
1.2.1.	Vesikelbildung	2
1.2.2.	Endosomen	4
1.2.2.1.	Frühe Endosomen	5
1.2.2.2.	Späte Endosomen	6
1.3.	Regulation des endosomalen Membranverkehrs	6
1.3.1.	Vesikelfusionskomplexe	6
1.3.2.	Rab Proteine	7
1.3.3.	ARF Proteine	9
1.4.	Lipide in zellulären Membranen	9
1.4.1.	Cholesterin in endosomalen Membranen	10
1.4.2.	Aufnahme und intrazelluläre Verstoffwechslung von Cholesterin	11
1.5.	Annexine	11
1.5.1.	Familie der Annexine	11
1.5.2.	Annexin 6	12
1.5.3.	Regulation der Membranbindung von Annexinen	14
1.6.	Ziel der Arbeit	14
2.)	Material und Methoden	16
2.1.	Materialien	16
2.1.1.	Geräte	16
2.1.2.	Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3.	Chemikalien	18
2.1.4.	Zellkultur	20
2.1.5.	Antikörper	20

2.2. Methoden	21
2.2.1. Zellkultur	21
2.2.2. Ausplattieren von Zellen	22
2.2.3. Endosomenpräparation	22
2.2.4. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	24
2.2.5. Bestimmung der Cholesterinkonzentration mittels Amplex Red Cholesterol Assay Kit	24
2.2.6. SDS-Page zur Auftrennung von Proteinen	25
2.2.7. Western Blot	27
2.2.8. Immunfluoreszenzmikroskopie	28
3.) Ergebnisse	30
3.1. Cholesterinentzug reduziert die Bindung von Annexin 6 an Membranen ...	30
3.1.1. Digitonin reduziert die Membranaffinität von Annexin 6	30
3.1.2. Einfluss von Digitonin auf die Membranbindung von Annexin 6 in vivo	32
3.2. Die Anreicherung von Cholesterin in späten Endosomen stimuliert die Bindungsaffinität von Annexin 6	33
3.2.1. Etablierung der Cholesterinanreicherung in späten Endosomen nach Behandlung mit U18666A	34
3.2.2. Immunfluoreszenztechnische Darstellung der Cholesterinanreicherung in späten Endosomen	36
3.2.3. Membranbindungsstudien mit Annexin 6 an Membranen aus U18666A behandelten Zellen	37
3.3. In vitro Bindungsstudien mit bakteriell exprimiertem GST-Annexin 6 Fusionsprotein an U18666A behandelten Zellen	40
3.3.1. Erhöhte Bindungsaffinität von GST-Annexin 6 für U18666A behandelte späte Endosomen	40
3.3.2. Einfluss von Calcium auf die U18666A stimulierte Bindung von GST-Annexin 6 an späte Endosomen	41
3.4. Die U18666A induzierte Anreicherung von Cholesterin führt zur Translokation von Annexin 6 in späte Endosomen	43

3.4.1.	Kolokalisationsstudien an U18666A behandelten Zellen bestätigen die Translokation von Annexin 6 in cholesterinreiche späte Endosomen	43
3.5.	Vergleichende Analyse von Annexin 6 mit einem frühen endosomalen Marker (EEA1) in U18666A behandelten Zellen	45
4.)	Diskussion	47
4.1.	Calcium- und cholesterinabhängige Bindung von Annexin 6 an Membranen	47
4.1.1.	Cholesterinabhängige Bindung von Annexin 2 an Membranen	48
4.1.2.	Cholesterinabhängige Bindung von Annexin 6 an Membranen	49
4.1.3.	Vergleich der cholesterinabhängigen Bindung von Annexin 2 und Annexin 6 ...	52
4.2.	Charakterisierung der Bindung von Annexin 6 an späte Endosomen mittels Immunfluoreszenz	53
4.3.	Rolle der calcium- und cholesterinregulierten Bindung von Annexin 6 beim Targeting von LDL Cholesterin in späte Endosomen	54
4.4.	Klinische Relevanz der Annexine	56
4.4.1.	Potentielle Rolle von Annexin 6 im Lipidstoffwechsel	57
5.)	Zusammenfassung	58
6.)	Literaturverzeichnis	59
7.)	Danksagung	67
8.)	Lebenslauf	68
9.)	Erklärung	70

1. Einleitung

1.1 Lipoproteinstoffwechsel

Mit der Nahrung aufgenommene Fette werden in den im Verdauungstrakt gebildeten Chylomikronen zur Leber transportiert. Die Chylomikronen gelangen über die Lymphe in die Blutbahn, wo sie durch die endothelständige Lipoproteinlipase hydrolysiert werden. Die so entstandenen Chylomikronen-Remnants werden über den LDL (low density lipoprotein)-Rezeptor und das LRP (LDL-rezeptor related protein) in die Leber aufgenommen. Die Leber verstoffwechselt die aufgenommenen Lipide und baut diese in VLDL (very-low-density-lipoprotein) ein, die dann über die Blutbahn im Körper verteilt werden. VLDL wird ebenfalls durch die Lipoproteinlipase weiter aufgespalten, woraufhin die entstehenden VLDL Remnants entweder wieder in die Leber aufgenommen oder zu LDL (low-density-lipoprotein) hydrolysiert werden. LDL liefert Cholesterin über den LDL Rezeptor an alle Körperzellen (Beisiegel 1998). Diese wiederum geben überschüssiges Cholesterin über den SR-BI (scavenger receptor BI) an HDL (high-density-lipoprotein) ab, welches das Cholesterin wieder der Leber zuführt (sog. Reverser Cholesterol Transport, RCT) (Ji et al. 1997).

1.2 Rezeptorvermittelte Endozytose

Der Begriff der Endozytose beschreibt sämtliche Mechanismen, die Säugerzellen entwickelt haben, um kleine Moleküle, Makromoleküle und andere Partikel aufzunehmen und innerhalb des Zytoplasmas in spezielle Organellen zu transportieren. Er umfasst Phagozytose, Pinozytose, clathrinabhängige rezeptorvermittelte Endozytose und clathrinunabhängige Endozytose. Die Phagozytose und die clathrinabhängige rezeptorvermittelte Endozytose sind die am besten charakterisierten Aufnahmewege. Während die Phagozytose die Aufnahme großer Partikel beinhaltet und vor allem von spezialisierten Zellen wie Makrophagen durchgeführt wird, findet die rezeptorvermittelte Endozytose in allen kernhaltigen Wirbeltierzellen statt und spielt eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Prozessen. Sie ist u.a. beteiligt an der Aufnahme extrazellulärer Nährstoffe, der Regulation der Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche, der zellulären Cholesterinhomöostase, dem Aufrechterhalt der Zellpolarität und der Antigenpräsentation. Veränderungen von endozytotischen Prozessen spielen bei vielen verschiedenen

Krankheiten eine Rolle, z.B. bei der Atherosklerose oder dem Diabetes. Des Weiteren werden endozytotische Aufnahmewege von Krankheitserregern wie Viren, symbiotischen Mikroorganismen und Toxinen ausgenutzt, um in die Zelle zu gelangen (Mukherjee et al. 1997).

1.2.1. Vesikelbildung

Die während der Endozytose an der Plasmamembran gebildeten Coated Pits („umhüllte Gruben“) und Vesikel wurden erstmalig 1964 von Roth und Porter in Moskitooozyten beschrieben. Die korbartige Struktur der Hülle (coat) wurde von Kanaseki und Kadota 1969 entdeckt.

Einige Proteine, wie der LDL Rezeptor, sind in Coated Pits deutlich höher konzentriert (Anderson et al. 1977; Anderson et al. 1982), während andere Membranbestandteile, wie verschiedene Phospholipide und Glycosphingolipide, eine zufällige Verteilung in diesen Strukturen aufweisen (Pagano 1990; Dawodowicz 1993). Einige Moleküle werden speziell von den Coated Pits ausgeschlossen, wie z.B. das Influenza Haemagglutinin (HA) Protein (Roth et al. 1986). Die rezeptorvermittelte Endozytose von in Coated Pits konzentrierten Molekülen führt zu einer sehr effizienten Internalisierung dieser von der Plasmamembran. Clathrin-coated Pits machen etwa 2% der Plasmamembranoberfläche von Fibroblasten des Menschen (Anderson et al. 1977) und von Rattenhepatozyten aus (Carpentier et al. 1985). Auf den Fibroblasten waren 60-70% der LDL Rezeptoren der Zelloberfläche in Coated Pits lokalisiert, und die Verweildauer der Coated Pits an der Oberfläche betrug 1-2 min (Anderson et al. 1977).

Die Überführung („Targeting“) und Internalisierung der meisten Rezeptoren in Coated Pits resultiert aus Interaktionen von Erkennungs- oder Internalisationsmotiven in den zytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren mit intrazellulären Adapterproteinen (AP), die einen Teil des Clathrinmantels bilden (Schmid 1992; Kirchhausen 1993). Deletionsmutanten verschiedener Rezeptoren, denen der zytoplasmatische Abschnitt und damit die Internalisationsmotive fehlen, werden nur mit etwa 5-10% der Aufnahmegeschwindigkeit der intakten Rezeptoren internalisiert (Lehrman et al. 1985; Prywes et al. 1986; Rothenberger et al. 1987; Lobel et al. 1989; Miettinen et al. 1989). Dass spezifische Aminosäuresequenzen für die Lokalisation von Rezeptoren in Coated Pits verantwortlich sind, wurde zum ersten Mal an der Analyse der natürlich vorkommenden Mutante JD des LDL Rezeptors demonstriert, welche einen Defekt in der

rezeptorvermittelten LDL Endozytose verursacht, da in ihrem zytoplasmatischen Abschnitt ein Tyrosinrest durch einen Cysteinrest ersetzt wurde (Goldstein et al. 1985; Davis et al. 1987). Systematische Mutagenese des LDL Rezeptors deutete darauf hin, dass für die Lokalisation in Coated Pits Tyrosin oder eine andere aromatische Aminosäure in diesem Abschnitt benötigt wird (Davis et al. 1987). Der Vergleich von Sequenzen der LDL Rezeptoren verschiedener Spezies zeigte, dass die Aminosäuresequenz NPXY für das Targeting ausschlaggebend ist (Chen et al. 1990). Diese Aminosäuresequenz bildet im zytoplasmatischen Abschnitt des Rezeptors eine Schleifenstruktur aus (Collawn et al. 1990). Das Vorhandensein dieser Sekundärstruktur korreliert direkt mit der Effizienz der Endozytose der Rezeptoren in Fibroblasten (Bansal und Gierasch 1991).

Der Vorgang der Endozytose ist ein zu sättigender Prozess (Lund et al. 1990; Marks et al. 1996), wofür das Konkurrieren der Rezeptoren um die Proteine im Clathrinmantel, die für die Konzentrierung der Rezeptoren in den Coated Pits zuständig sind, verantwortlich ist. Clathrin ist aus drei leichten und drei schweren Ketten zusammengesetzt, die eine dreibeinige Konstruktion bilden, welche Triskelion genannt wird. Die Triskelions finden sich zu einer korbartigen, konvexen Rahmenstruktur aus Hexagonen und Pentagonen zusammen, die die Coated Pits auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran bilden (Schmid 1992; Kirchhausen 1993). Die Proteinzusammensetzung der Clathrinmäntel wurde intensiv studiert (Keen 1990). In Säugerzellen existieren vier Arten von APs: AP1 findet sich in den Coated Pits des TGN (trans-Golgi-network), AP2 in den Coated Pits der Plasmamembran und AP3 in spezialisierten Organellen, wie Pigmentgranula und synaptischen Vesiklen. Die Bedeutung von AP4 ist noch unbekannt (Ahle et al. 1988; Pearse 1988; Robinson 1992). Entsprechend ihrer Lokalisation binden bestimmte Rezeptoren an die entsprechenden APs. So binden der LDL Rezeptor (Pearse 1988) und die lysosomale saure Phosphatase (Sosa et al. 1993) an AP2 aber nicht an AP1, der kationenabhängige MPR (mannose-6-phosphate receptor) an AP1 aber nicht an AP2 (Sosa et al. 1993) und der CI-MPR (cation-independent MPR) sowohl an AP1 wie auch an AP2 (Glickman et al. 1989).

Unklar ist ob Coated Pits bereits existierende Strukturen sind, die Rezeptoren rekrutieren (Santini und Keen 1996), oder ob sie erst nach Rezeptoraggregation entstehen (Iacopetta et al. 1988; Miller et al. 1991). Beide Modelle scheinen möglich zu sein, da sich Transferrinrezeptoren vor der Aufnahme in bereits existierenden Coated Pits sammeln, während der Komplex aus EGF (epidermal growth factor) und EGF-Rezeptor zur Bildung neuer Membraneinbuchtungen führt (Hopkins et al. 1985). In einigen Fällen können die

Mantelproteine an der Plasmamembran ebene Strukturen bilden, die sich später wölben und so Einbuchtungen bilden (Heuser und Evans 1980). Der Mechanismus, durch den die Enden der Membranen der Coated Pits verschmelzen und die Coated Pits als Coated Vesicles abgelöst werden, ist noch nicht vollständig geklärt. Er ist ATP abhängig, da Zellen, denen ATP entzogen wurde, effizient Coated Pits bilden und Rezeptoren gruppieren, während das Ablösen der Vesikel blockiert ist (Schmid und Carter 1990). Dynamin ist eine GTPase, deren Rolle an der Vesikelablösung während der Endozytose überzeugend demonstriert werden konnte (Hinshaw und Schmid 1995; Takei et al. 1995; Vallee und Okamoto 1995). Dieses Protein bildet eine helikale Struktur aus und legt sich um den Hals sich bildender Vesikel, wodurch es ihnen bei der Ablösung von der Plasmamembran hilft. Des Weiteren ist zur Vesikelablösung ein Umbau des Zytoskeletts erforderlich. An der zytosolischen Seite der Plasmamembran bilden Spectrin, Aktin, Protein 4.1 und Ankyrin ein Netzwerk oligomerischer Komplexe (Bennett und Gilligan 1993; Beck und Nelson 1996). Spectrin, ein Tetramer aus zwei 260 kDa α - und zwei 225 kDa β -Ketten (Bennett 1990; Goodman et al. 1995), steht über Ankyrin mit verschiedenen Membranproteinen und über Protein 4.1 mit Aktinfilamenten in Verbindung (Byers und Branton 1985; Conboy 1993). Während der Ablösung des Vesikels findet eine Neuordnung des Spectrin-Aktin-Maschenwerks statt (Kamal et al. 1998). Der Umbau wird durch die cysteinabhängige Protease Calpain I vermittelt, welche die α - und β -Ketten des Spectrins spaltet, wodurch die Tetramerbildung und die Aktinbindung verhindert werden (Harris und Morrow 1990).

1.2.2. Endosomen

Nachdem die Rezeptoren und ihre Liganden über die Clathrin-coated Pits in die Zelle gebracht wurden werden die Vesikel von einem ATP abhängigen 70 kDa Enzym vom Clathrinmantel befreit (Braell et al. 1984; Rothman und Schmid 1986). Ab diesem Zeitpunkt können die neu gebildeten Vesikel als Endosomen bezeichnet werden.

Grob betrachtet kann man die endosomalen Organellen in frühe und späte Endosomen unterteilen. Frühe Endosomen sind all jene Organellen, welche am Rezeptorrecycling beteiligt sind. Aufgenommene Moleküle müssen Teile des Systems der frühen Endosomen durchwandern, um zu den späten Endosomen zu gelangen. Die späten Endosomen sind an der Aufschlüsselung von aufgenommenem Material beteiligt. Nach den späten Endosomen folgen die Lysosomen auf dem degradativen Weg, welche die Aufschlüsselung

aufgenommenen Materials vollenden und unverdauliches Material speichern (Mukherjee et al. 1997).

1.2.2.1. Frühe Endosomen

Die frühen Endosomen lassen sich weiter aufteilen in sortierende Endosomen oder CURLs (compartment of uncoupling of receptor and ligand) und das ERC (endocytic recycling compartment), welches von einigen Autoren auch als RRC (receptor recycling compartment) bezeichnet wird. Die sortierenden Endosomen werden ATP abhängig angesäuert (Tycko und Maxfield 1982; Al-Awqati 1986), wodurch einige Liganden, wie LDL, von ihrem Rezeptor dissoziieren. Die Liganden werden den späten Endosomen zugeführt, während die Rezeptoren wieder an die Plasmamembran transportiert werden, um erneut verwendet zu werden (Mukherjee et al. 1997). Dies wird durch die tubulovaskuläre Morphologie der sortierenden Endosomen ermöglicht. Die sortierenden Endosomen bestehen aus vesikulären Anteilen, die etwa einen Durchmesser von 250-400 nm haben und von denen 50-60 nm durchmessende und bis zu 4 µm lange Röhren ausgehen (Geuze et al. 1983; Gruenberg et al. 1989). Dieses Erscheinungsbild geht damit einher, dass 60-70% des Volumens in den vesikulären Anteilen zu finden ist, während die Röhren 50-80% der Oberfläche ausmachen (Marsh et al. 1986; Griffiths et al. 1989). Damit besteht eine einfache Grundlage zum Trennen von membranständigen Rezeptoren und löslichen Liganden.

Das ERC besteht aus einem tubulären System, das wahrscheinlich durch Abtrennung von Röhrenanteilen aus den sortierenden Endosomen entsteht, um membrangebundene Komponenten an die Plasmamembran zu transportieren (Mukherjee et al. 1997).

Für den Transport des Inhalts der sortierenden Endosomen zu den späten Endosomen gibt es zwei Modelle (Griffiths und Gruenberg 1991; Murphy 1991; Dunn und Maxfield 1992). Im Vesikel-Shuttle-Modell werden die sortierenden Endosomen als stabile Strukturen angesehen, von denen sich Vesikel ablösen, welche Material zu den späten Endosomen transportieren. Im Reifungsmodell werden komplette sortierende Endosomen entsprechend einer Reifung in späte Endosomen umgewandelt. Diverse Hinweise sprechen für das Reifungsmodell, u. a. die Tatsache, dass sich zwar Vesikel von den sortierenden Endosomen ablösen, diese aber zum ERC transportiert werden (Mukherjee et al. 1997). In diesem Modell reift das sortierende Endosom zum ECV (endosome carrier vesicle) heran (Gruenberg und Maxfield 1995), welches entlang der Mikrotubuli in Richtung des

Zellzentrums wandert, auf dem Weg durch die Aufnahme neuer Membranproteine seine Eigenschaften ändert und schließlich mit späten Endosomen verschmilzt (Gruenberg et al. 1989).

1.2.2.2. Späte Endosomen

Späte Endosomen ähneln in ihrer Größe den sortierenden Endosomen, weisen aber unter dem Elektronenmikroskop interne Membranen auf, weshalb sie in einigen Artikeln auch als MVBs (multivesicular bodies) bezeichnet werden. Es handelt sich dabei jedoch um Einstülpungen der Endosomenmembran und nicht um eigenständige Vesikel (van Deurs et al. 1993). In diesen Einstülpungen finden sich bestimmte Rezeptoren (Felder et al. 1990; Hopkins et al. 1990), und sie scheinen eine Rolle im Lipidkatabolismus zu spielen (van Echten und Sandhoff 1993; Sandhoff und Klein 1994). Späte Endosomen befinden sich in einem ständigen Austausch mit dem TGN, um neu synthetisierte lysosomale Enzyme vom TGN zu erhalten und bestimmte Rezeptoren, wie den MPR, zurück zum TGN zu transportieren (Kornfeld und Mellman 1989). Gewöhnlich sind späte Endosomen dichter am Zellzentrum zu finden als frühe Endosomen und sind mit dem an Mikrotubuli ausgerichteten Motor Dynein assoziiert (Aniento et al. 1993; Oda et al. 1995).

Der Transport des Inhalts der späten Endosomen zu den Lysosomen erfolgt durch Fusion von späten Endosomen und bereits existierenden Lysosomen (Mukherjee et al. 1997).

1.3. Regulation des endosomalen Membranverkehrs

Die Prozesse des endosomalen Membranverkehrs werden durch verschiedene membranassoziierte und membranintegrale Proteine geregelt.

1.3.1. Vesikelfusionskomplexe

Für die Verschmelzung vieler Arten von Vesikeln ist NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) notwendig (Graham und Emr 1991; Rodriguez et al. 1994). NSF ist ein zytoplasmatisches, aus vier 76 kDa Untereinheiten bestehendes Homotetramer (Block et al. 1988; Malhotra et al. 1988; Orci et al. 1989). Man nimmt an, dass es gemeinsam mit SNAPs (soluble NSF attachment proteins) einen allgemeinen Vesikelfusionskomplex bildet (Malhotra et al. 1988; Clary et al. 1990). In einem Modell, das erklärt, wie trotz

eines allgemeinen Fusionskomplexes gezieltes Targeting möglich ist, besitzt jede Vesikelart einen membranständigen v-SNARE (vesicle SNAP receptor), während die Zielmembran einen spezifischen t-SNARE (target SNAP receptor) besitzt. Diese SNAREs verbinden sich dann über einen Komplex mit NSF und SNAPs (Sollner et al. 1993).

Inzwischen geht man davon aus, dass SNARE Interaktionen nicht allein für das korrekte Targeting und Andocken von Transportvesikeln verantwortlich sein können. So konnte gezeigt werden, dass vom endoplasmatischen Retikulum ausgehende Vesikel auch in Abwesenheit von SNAREs am Golgiapparat andocken können (Cao et al. 1998). Anscheinend spielen Bindungsproteine („tethering proteins“) eine Schlüsselrolle beim Targeting und Andocken (Pfeffer 1999; Waters und Pfeffer 1999). Aus der Gruppe dieser Bindungsproteine sei an dieser Stelle nur EEA1 (early endosome antigen 1) genannt. EEA1 ist ein Effektor von Rab5 (s. 1.3.2.) und an der Fusion früher Endosomen beteiligt (Christoforidis et al. 1999).

1.3.2. Rab Proteine

Die Rab Proteine, eine Familie der niedrigmolekulargewichtigen GTPasen, sind an nahezu allen Arten des Membranverkehrs beteiligt (Simons und Zerial 1993; Pfeffer 1994; Fischer von Mollard et al. 1994; Stow 1995). Sie wechseln ständig zwischen den GDP gebundenen inaktiven und den GTP gebundenen aktiven Formen und zwischen dem Zytosol und Membranbindungen. Diese zyklische Aktivierung, Deaktivierung und Verschiebung wird durch mindestens drei Faktoren beeinflusst: GEPs (guanine nucleotide exchange proteins), GDIs (GDP dissociation inhibitors) und GAPs (GTPase-activating proteins) (Takai et al. 1996; Novick und Zerial 1997; Martinez und Goud 1998). Im Zytosol wird ein Rab Protein von einem GDI in der GDP gebundenen, inaktiven Form gehalten. Die GDP gebundene Form wird vom GDI durch einen noch unbekanntem Mechanismus gelöst, der mit dem Transport des Rab Proteins zu einem bestimmten Membrankompartiment gekoppelt ist (Soldati et al. 1994; Ullrich et al. 1994). Anschließend wird das Rab Protein durch ein GEP in die GTP gebundene Form umgewandelt. Die GTP gebundene Form reagiert dann mit einem oder mehreren Effektoren, woraufhin sie durch ein GAP in die GDP gebundene Form umgewandelt wird. Die an der Membran gebildete GDP gebundene Form bildet dann einen Komplex mit einem GDI und kehrt ins Zytosol zurück (Takai et al. 2001).

Verschiedene Mitglieder der Rab Familie sind mit verschiedenen Organellen assoziiert. Rab4 und Rab5 finden sich vor allem in frühen Endosomen (Gorvel et al. 1991; Bucci et

al. 1992; Daro et al. 1996), und Rab4 scheint vor allem an sortierenden Endosomen vorzukommen (Daro et al. 1996). Rab11 ist in CHO Zellen hauptsächlich mit dem ERC assoziiert, findet sich aber auch an anderen Organellen, wie dem Golgikomplex und dem TGN (Ullrich et al. 1996). Rab7 und Rab9 sind typischerweise in späten Endosomen, wobei Rab9 auch am TGN vorkommt (Lombardi et al. 1993; Riederer et al. 1994; Feng et al. 1995).

Die Kontrolle spezifischer Schritte im endozytotischen Verkehr durch einzelne Rab Proteine wird nach und nach charakterisiert. Rab5 reguliert die Fusion früher Endosomen (Gorvel et al. 1991). Expression von Rab5 Mutanten, die in der GTP gebundenen Form verharren, führt zur Ausbildung vergrößerter sortierender Endosomen, wie es zu erwarten wäre, wenn man die Endosomenfusion verstärkt unterstützte (Bucci et al. 1992; Stenmark et al. 1994). Rab4 scheint eine Rolle in schnellen Recyclingprozessen zu spielen (van der Sluijs et al. 1991; van der Sluijs et al. 1992). Rab7 könnte am Materialtransport von frühen zu späten Endosomen beteiligt sein und ist für die Motilität letzterer verantwortlich (Feng et al. 1995; Lebrand et al. 2002). Rab9 spielt beim Recycling des MPR von späten Endosomen zum TGN eine Rolle (Lombardi et al. 1993).

Die molekularen Mechanismen, mit denen Rab Proteine den Membranverkehr steuern, sind noch nicht vollständig verstanden worden. Rab Proteine müssen mit anderen Proteinen interagieren, um ihre Funktion ausführen zu können. Im Falle des Rab5 hat sich gezeigt, dass Rabaptin 5 als Effektor wirkt, der an die GTP gebundene Form von Rab5 bindet (Stenmark et al. 1995). Nachdem Rab5 von Rabaptin 5 aktiviert worden ist, rekrutiert es EEA1, welches auch zu den Effektoren von Rab5 gehört (Christoforidis et al. 1999; Simonsen et al. 1998; McBride et al. 1999). EEA1 könnte dabei als Bindungsprotein das Kernstück eines Bindungskomplexes bilden (Takai et al. 2001). Nach der Rekrutierung durch Rab5 und Rabaptin 5 bindet EEA1 über eine „FYVE Finger“ Domäne an Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat (PIP₃), mit dem es auf frühe Endosomen einwirkt (Christoforidis et al. 1999; Simonsen et al. 1998).

Zerial und Mitarbeiter zeigten, dass Rab4, Rab5 und Rab11 in frühen Endosomen an der Regulierung von drei verschiedenen Sorten spezieller Membrandomänen beteiligt sind: Eine Membrandomäne wird durch Rab5 reguliert, die zweite durch Rab4 und Rab5, die dritte durch Rab4 und Rab11. Diese Membrandomänen überlappen sich nur zeitweise und besitzen verschiedene biochemische und damit funktionelle Eigenschaften, die zur gerichteten Verteilung unterschiedlicher Materialien dienen könnten (Sönnichsen et al. 2000).

1.3.3. ARF Proteine

Im intrazellulären Membranverkehr wurden bisher drei Vesikelarten gut charakterisiert: Die bereits beschriebenen clathrinumhüllten Vesikel (s. 1.2.1.), sowie COP (coat protein) I- und COPII umhüllte Vesikel (Schmid und Damke 1995; Schekman und Orci 1996). COPI umhüllte Vesikel sind am Membranverkehr zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgiapparat, innerhalb des Golgiapparats und wahrscheinlich auch in Endosomen beteiligt (Lippincott-Schwartz et al. 1998; Bannykh und Balch 1998; Lowe und Kreis 1998). COPII umhüllte Vesikel für den Export von Molekülen aus dem endoplasmatischen Retikulum verantwortlich (Schekman und Orci 1996; Bannykh und Balch 1998; Barlowe 1998). Für die Rekrutierung der Komponenten der COP Hüllen an die Membranen spielen so genannte ARFs (ADP-ribosylation factors) eine entscheidende Rolle (Lippincott-Schwartz et al. 1998; Barlowe 1998). ARF Proteine sind außerdem an der Bindung der AP1 und AP3 Komponenten an Membranen beteiligt (Hirst und Robinson 1998). Im Gegensatz dazu läuft die clathrin- und AP2 abhängige Vesikelbildung an der Plasmamembran unabhängig von ARFs ab (Takai et al. 2001).

Bisher sind sechs ARF Proteine bekannt, von denen ARF1 am besten untersucht ist und zur Vesikelbildung am Golgiapparat beiträgt. ARF6 wird eine Rolle bei der Vesikelbildung an der Plasmamembran zugesprochen (D'Souza-Schorey et al. 1995; Radhakrishna und Donaldson 1997; D'Souza-Schorey et al. 1998; Altschuler und Ribeiro-Neto 1998; Zhang et al. 1998).

Ähnlich wie Rab Proteine durchlaufen ARFs einen GTP abhängigen Zyklus der von GEPs und GAPs, nicht aber von GDIs kontrolliert wird (Moss und Vaughan 1998; Jackson und Casanova 2000).

1.4. Lipide in zellulären Membranen

Für die korrekte Abwicklung intrazellulärer Prozesse sind unterschiedliche Lipidkompositionen in Membranen verschiedener Organellen essentiell. Die zellulären Membranen bestehen, wie von Singer und Nicolson 1972 im „fluid mosaic“ Modell dargestellt, aus Phospholipiddoppelschichten, in die Membranproteine beweglich eingebettet sind. Die Beweglichkeit wird dadurch gewährleistet, dass die Lipidbausteine in der Doppelmembran oberhalb eines jeweils spezifischen Schmelzpunktes frei beweglich sind. Dabei kann die Fluidität der Membran durch die Lipidkomposition verändert werden.

So haben z. B. Sphingolipide einen höheren Schmelzpunkt als Glycerolipide (Holthuis et al. 2001). Würden sich sämtliche Lipidbausteine der Membran frei vermischen, wäre die Lipidkomposition in allen Membranabschnitten innerhalb der Zelle gleich. Es gibt jedoch Unterschiede in der Zusammensetzung zwischen verschiedenen Membranabschnitten. So reichern sich z. B. Sphingomyelin und Phosphatidylserin (PS) im Vergleich zur Plasmamembran in endosomalen Membranen an (Urade et al. 1988). Dieses Phänomen kann teilweise durch die Fähigkeit der Lipiddoppelmembranen erklärt werden, sich selbst zu organisieren: Besteht eine Doppelmembran aus zwei Lipidbausteinen mit unterschiedlichen Schmelzpunkten, so liegt der Schmelzpunkt der Membran zwischen den Schmelzpunkten der beiden Bausteine, da sich die einzelnen Komponenten frei vermischen. Wenn aber Cholesterin in der Membran enthalten ist, verhindert es ab einer gewissen Konzentration diese Durchmischung, weshalb sich kristallisierte Membrandomänen von flüssigen Anteilen abgrenzen können (Holthuis et al. 2001). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Bildung von Lipid Rafts. Lipid Rafts sind laterale Lipidzusammenlagerungen in zellulären Membranen, welche mit Cholesterin und Sphingolipiden angereichert sind. Als eine Art Plattform für Rezeptoren und Komponenten von Signaltransduktionskaskaden sind sie mit GPI (glycosyl-phosphatidylinositol)-anchored proteins an der Zelloberfläche und mit Kinasen der src-Familie an der zytoplasmatischen Seite assoziiert. Lipid Rafts sind unlöslich in nichtionischen Detergentien und können somit als DIGs (detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membrane domains) isoliert werden (Parton und Simons 1995; Harder und Simons 1997; Brown und London 1998a; Brown und London 1998b).

1.4.1. Cholesterin in endosomalen Membranen

In eukaryotischen Zellen enthalten die Membranen des endoplasmatischen Retikulums am wenigsten Cholesterin, gefolgt vom Golgiapparat. Die Plasmamembran enthält mit 60-80% des zellulären Cholesterins den größten Anteil (Liscum und Munn 1999). Das ERC enthält ebenfalls einen hohen Cholesterinanteil (Hao et al. 2001), welcher für den korrekten Ablauf des Membranverkehrs essentiell ist, da die Verminderung des zellulären Cholesteringehalts zum veränderten Recycling von GPI-anchored proteins führt (Mayor et al. 1998). Über den Cholesteringehalt von späten Endosomen und Lysosomen ist wenig bekannt, aber unter normalen Umständen liegt er unterhalb des Cholesteringehalts im ERC (Liscum und Munn 1999; Hao et al. 2001).

1.4.2. Aufnahme und intrazelluläre Verstoffwechslung von Cholesterin

Cholesterin wird in Form von LDL via Endozytose in Zellen aufgenommen. Nach der Internalisierung werden LDL und LDL Rezeptor in sortierenden Endosomen voneinander getrennt. Während der LDL Rezeptor dem ERC zugeführt wird, wird LDL über die späten Endosomen den Lysosomen zugeführt (Mukherjee et al. 1997). Die den Hauptbestandteil des LDL ausmachenden Cholesterinester werden in späten Endosomen und Lysosomen zu freiem Cholesterin hydrolysiert. Anschließend wird Cholesterin aus späten Endosomen und Lysosomen ausgeschleust und über zytoplasmatische Trägerproteine zur Plasmamembran oder dem endoplasmatischen Retikulum transportiert (Maxfield und Wüstner 2002). Eine erhöhte Cholesterinzufuhr führt im endoplasmatischen Retikulum, dem Syntheseort endogenen Cholesterins, zum stärkeren Abbau von HMG (3-hydroxy-3-methylglutaryl)-CoA (coenzyme A)-Reduktase, dem Schlüsselenzym der Cholesterinsynthese (Blanchette-Mackie 2000). Auf erniedrigte Cholesterinkonzentrationen im endoplasmatischen Retikulum reagiert das SCAP (SREBP (sterol response element-binding protein) cleavage-activating protein) mit der Aktivierung proteolytischer Spaltung und Translokation eines Fragments von SREBP in den Zellkern, wo es unter anderem jene Gene beeinflusst, welche für die Cholesterinsynthese verantwortlich sind (Brown und Goldstein 1999).

1.5. Annexine

1.5.1. Familie der Annexine

Die Annexine sind eine Familie hoch konservierter Proteine, die ubiquitär vorkommen und sich durch zwei Eigenschaften auszeichnen: Erstens binden sie calciumabhängig an Phospholipide (Gerke und Moss 1997), zweitens enthalten sie die hoch konservierten so genannten Annexinrepeats, bestehend aus ca. 70 Aminosäuren (AS). Jedes Annexin ist aus zwei Domänen aufgebaut: N-terminal befindet sich ein variables Ende, C-terminal der konservierte Proteinkern, der aus vier Annexinrepeats besteht, welche zu einer dicht gepackten, leicht gebogenen Scheibe zusammengelagert sind, die als Membranbindungsmodul aufgefasst wird (Gerke und Moss 2002). Eine Ausnahme bildet Annexin 6, dessen Kerndomäne aus acht Annexinrepeats besteht (s. 1.5.2.). Die konvexe Seite der Kerndomäne enthält Calciumbindungsstellen vom Typ II und III (Weng et al. 1993) und ist der Membran zugewandt, wenn das Annexin an Phospholipide bindet. Die

konkave Seite ist der Membran abgewandt und steht Interaktionen mit dem N-terminalen Ende oder zytoplasmatischen Proteinen zur Verfügung (Gerke und Moss 2002).

Mehr als zehn Annexine in Säugetieren mit über 160 Isoformen in unterschiedlichsten Mitgliedern des Pflanzen- und Tierreichs sind bekannt (Gerke und Moss 2002; Morgan und Fernandez 1997), ohne dass jedoch die physiologische Rolle der einzelnen Annexine bekannt wäre (Raynal und Pollard 1994; Gerke und Moss 1997). Sie sind beteiligt an regulatorischen Prozessen des Membranverkehrs, an Ionenkanalaktivitäten, Koagulationsinhibition, Signaltransduktion, Zellmatrixorganisation und Membrandomänenorganisation (Raynal und Pollard 1994; Gerke und Moss 2002). Inzwischen gilt die Rolle der Annexine im Membranverkehr als eine ihrer Hauptfunktionen (Gerke und Moss 1997; Donnelly und Moss 1997). Die Annexine 1, 2, 4, 6, 7 und 13b wurden jeweils mit verschiedenen Schritten des intrazellulären, endosomalen Verkehrs in Verbindung gebracht (Creutz 1992; Futter et al. 1993; Emans et al. 1993; Tagoe et al. 1994; Jäckle et al. 1994; Mayorga et al. 1994; Fiedler et al. 1995; Lafont et al. 1998; Ortega et al. 1998; Donato und Russo-Marie 1999).

1.5.2. Annexin 6

Annexin 6 sticht aus der Familie der Annexine hervor, da es zwei Kerndomänen aus jeweils vier Annexinrepeats besitzt. Diese zwei Repeat-Tetraden sind durch eine kurze Linkersequenz verbunden, und es wird vermutet, dass Annexin 6 durch eine Tandemduplikation und Fusion einer einzelnen Tetrade entstanden sei (Smith et al. 1994; Smith und Moss 1994). Da die 5'-Tetrade am meisten Ähnlichkeit zu Annexin 5 aufweist, wurde Annexin 5 für den Vorläufer der Duplikation gehalten. Neuere Untersuchungen des Annexin 10 Gens führten aber zu einer anderen Erklärungsmöglichkeit für die Entstehung des Annexin 6: Zum einen besteht zwischen Annexin 10 und der 3'-Tetrade des Annexin 6 mehr Ähnlichkeit als zwischen den beiden Hälften des Annexin 6 untereinander, zum anderen ist eine ungewöhnliche einzelne Codondeletion zu Beginn des dritten Repeats sowohl in Annexin 10 als auch in der 3'-Tetrade des Annexin 6 zu finden. Diese und andere phylogenetische Daten weisen darauf hin, dass sich die beiden Annexine 5 und 10, welche auf den menschlichen Chromosomen 4q26 und 4q33 lokalisiert sind, verdoppelt haben und während der Evolution der Chordaten zu Annexin 6 verschmolzen sind (Morgan et al. 1999).

Die Bedeutung der zwei Kerndomänen im Annexin 6 Molekül ist noch nicht vollständig geklärt. Allerdings könnte Annexin 6 mit seinen zwei Membranbindungsmodulen bei der Vesikelfusion von Bedeutung sein, da gezeigt werden konnte, dass es Membranen sowohl parallel als auch antiparallel verbinden kann (Avila-Sakar et al. 2000).

Annexin 6 ist an der Plasmamembran von Rattenhepatozyten (Tagoe et al. 1994; Weinman et al. 1994), Erythrozyten (Bandorowicz et al. 1992) und Brustgewebe (Lavialle et al. 2000) lokalisiert. Es interagiert mit dem Aktinzytoskelett in Fibroblasten (Hosoya et al. 1992) und glatten Muskelzellen (Babiyhuk et al. 1999; Babiyhuk und Draeger 2000). In letzteren wird für Annexin 6 eine Funktion als Calciumsensor diskutiert. Des Weiteren wurde Annexin 6 in Phagosomen von J774 Makrophagen entdeckt (Desjardins et al. 1994). Hinweise für eine Rolle in endozytotischen Vorgängen sind die Anreicherung von Annexin 6 in Rattenleberendosomen (Tagoe et al. 1994; Jäckle et al. 1994), seine polarisierte Lokalisation in den apikalen Endosomen in Rattenhepatozyten (Ortega et al. 1998) und WIF-B Zellen (Pons et al. 2000) und die Kollokalisierung mit Igp120, einem prälysosomalen Marker, in NRK (normal rat kidney) Zellen (Pons et al. 2000). Außerdem bindet Annexin 6 an der Plasmamembran β -Spectrin. Das führt zur Rekrutierung einer calpainartigen Protease, die das aktincorticale Zytoskelett öffnet und damit die initialen Schritte der Endozytose erleichtert (Kamal et al. 1998; Lin et al. 1992). In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass Annexin 6 erforderlich für die Ausknospung von clathrinumhüllten Vesikeln ist. Im Falle der Hemmung der Annexin 6 abhängigen Vesikelausknospung sind Zellen zwar in der Lage, einen alternativen Weg zur Bildung endozytotischer Vesikel einzuschlagen, diese Vesikel wandern jedoch nicht entlang des regulären endozytotischen Weges und enden diffus in der Zelle verteilt (Kamal et al. 1998).

Im weiteren Verlauf des endosomalen Verkehrs scheint Annexin 6 vor allem in späten Endosomen von Bedeutung zu sein. Wie Ergebnisse der AG Grewal zeigten, führt die gleichzeitige Überexpression von Annexin 6 und dem LDL Rezeptor zur erhöhten Aufnahme und Akkumulation von LDL in späten Endosomen (Grewal et al. 2000). Das geht einher mit der Translokation von Annexin 6 in späte Endosomen. Die dominant negative Mutante $\text{anx6}_{\Delta 1-175}$ inhibiert die Degradation von LDL, was ebenfalls zu einer Akkumulation in späten Endosomen führt (Pons et al. 2001a). Somit spielt Annexin 6 beim LDL Targeting vermutlich erst eine Rolle an der Plasmamembran, später dann in frühen bzw. späten Endosomen.

1.5.3. Regulation der Membranbindung von Annexinen

Annexine binden calciumabhängig an anionische Phospholipide, und zwar mit absteigender Affinität an Phosphatidsäure, Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylinositol. Einige Annexine binden an neutrale Phospholipide wie Phosphatidylethanolamin, jedoch nicht an Phosphatidylcholin (PC) oder Sphingomyelin (Raynal und Pollard 1994). Die Calcium- und Phospholipidbindung der Annexine wird durch die hoch konservierte Kerndomäne bewerkstelligt. Jedes der je vier Annexinrepeats, die in einer Kerndomäne enthalten sind, bildet eine Domäne mit fünf α -Helices (A-E) (Avila-Sakar et al. 1998). Die Kerndomäne bildet eine leicht gebogene Scheibe. Auf der konvexen Seite dieser Scheibe werden zwischen den Helices A und B sowie D und E der Kerndomäne Typ II und Typ III Calciumbindungsstellen gebildet, an die gebunden Calcium als Brückenbaustein bei der Interaktion von Annexinen mit Phospholipiden fungiert (Huber et al. 1990; Wenig et al. 1993; Swairjo et al. 1995). Die spezifischen Verteilungsmuster der einzelnen Annexine legen nahe, dass die calciumabhängige Bindung an Phospholipide nicht als alleiniger Regulationsmechanismus angesehen werden kann (Babiychuk und Draeger 2000). Neben den Lipidkompositionen in den verschiedenen Membranen und den Proteinfaktoren, die an den verschiedenen Verteilungsmustern der Lipide in diesen Membranen beteiligt sind, wird als weiterer Regulationsmechanismus die pH abhängige Affinitätsänderung diskutiert (Golczak et al. 2001; Ayala-Sanmartin 2001). Während für Annexin 2 neben der calciumabhängigen Bindung eine cholesterinabhängige, calciumunabhängige Bindung beschrieben wurde (Harder et al. 1997; Jost et al. 1997; König und Gerke 2000; Ayala-Sanmartin 2001; Ayala-Sanmartin et al. 2001), wurde für Annexin 5 und Annexin 6 zumindest eine cholesterinabhängige Erhöhung der calciumabhängigen Membranbindung beobachtet (Ayala-Sanmartin 2001). Dies deutet darauf hin, dass neben Phospholipiden auch andere Lipide wie Cholesterin einen Einfluss auf die Lokalisation von Annexinen haben können.

1.6. Ziel der Arbeit

Frühere Arbeiten stellen vor allem die Rolle des Annexin 6 an der Plasmamembran heraus. Inzwischen sind aber auch Wechselwirkungen mit Cholesterin bekannt. Diese Wechselwirkungen beziehen sich sowohl auf die Membranbindung des Annexin 6 (s. 1.5.3.) als auch auf den intrazellulären Transport von LDL Cholesterin (s. 1.5.2.). Deshalb

sollte in dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, ob LDL Cholesterin bei Akkumulation in späten Endosomen für die Translokation von Annexin 6 dorthin verantwortlich bzw. daran beteiligt ist. Dazu musste ein Zellsystem etabliert werden, in welchem man den Einfluss von Cholesterin auf die Annexin 6 Bindung in späten Endosomen studieren kann. Des Weiteren mussten Bindungsassays etabliert werden, mit denen man die Bindung von Annexin 6 an Membranen studieren kann. Zuletzt sollten biochemische Assays und die Immunfluoreszenzmikroskopie etabliert werden, um die Lokalisation von Annexin 6 in cholesterinarmen und cholesterinreichen Membranen studieren zu können.

2.) Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Geräte	Hersteller
50 µl Spritze Microliter #705	Hamilton Bonaduz
Blottingkammer Trans-Blot Cell	Bio-rad
Feinwaage BP 410 S	Sartorius
Filmkammer 18 x 24 cm	Rego
Fluoreszenzmesser Fluorocount	Packard
Frigostat Kühlelement	Desaga
Gelelektrophoresesystem für große Gele	Hoefer Scientific Instruments
Gelelektrophoresesystem für Minigele (Mini-PROTEAN Cell)	Bio-rad
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf
Impulse Sealer 82163(S) TISH-200	TEW
Inkubator B5060 EC/CO ₂	Heraeus Instruments
Magnetrührer und Heizplatte IKAMAG RH	Janke&Kunkel IKA Labortechnik
Magnetrührstäbchen	Plastibrand
Mikroskop Labovert FS	Leitz
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss
Mikroskopkamera AxioCam	Zeiss
Mini-Dreher RM5	Assistent
Mini-Shaker Typ MSR (Modell Kühner)	B.Braun Melsungen
pH-Meter MP 220	Mettler Toledo
Pipettierhilfe Accu-Jet	Brand
Powersupply Power Pac 300	Bio-Rad
Präzisionspipetten	Eppendorf
Spectrophotometer	Hitachi
Vortexer VF2	Janke&Kunkel IKA Labortechnik

Wasserbad Typ 1083	GFL
Werkbank Typ LAF Vertikalstrom, steril	BDK
Zentrifuge Laborfuge 400R	Heraeus Instruments
Zentrifuge L7-55 Ultracentrifuge	Beckmann
Zentrifugenrotor SW 41	Beckmann
Zentrifuge TL-100 Ultracentrifuge	Beckmann

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
1,5 ml Röhrchen	Greiner
6-/ 12-well plate	NUNC
96-well plate	Packard
Deckgläschen 13 mmØ rund	Assistent
Einmalspritzen 1 ml	Becton Dickinson
Einmalspritzen 5 ml/ 10 ml	Braun
Falcon Zentrifugenröhrchen 15 ml/ 50 ml	Greiner
Filtersystem 500 ml	Corning
Gel-Blotting Papier GB 002	Schleicher&Schuell
Kanülen 24GA1 0,55 x 25 mm	Becton Dickinson
Küvetten 10 x 10 x 45 mm Halb-Mikro	Greiner
Objektträger	Marienfeld
Parafilm	American National Can
PD-10 Säule	Amersham
Petrischalen Cellstar 20 x 145 mmØ	Greiner
Pipetten 5 ml/ 10 ml/ 25 ml, steril	Becton Dickinson
Pipettenspitzen	Greiner
Protran Nitrocellulose Transfer	
Membrane	Schleicher&Schuell
Röntgenfilm Biomax MR 18 x 24 cm	Kodak
Spritzenvorsatzfilter 0,45 µm	Qualilab
Tubes 5 ml, 75 x 12 mmØ	Sarstedt
Ultra-Clear Centrifuge Tubes 11 x 34 mm	Beckmann
Zellschaber	Beckmann

Ultra-Clear Centrifuge Tubes 14 x 89 mm	NUNC
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Costar

2.1.3. Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Merck
Acrylamid-Bis-Fertiglösung 30%	Molecular Probes
Amplex Red Cholesterol Assay Kit	Merck
Antipain	Calbiochem
AP (Ammonium Persulfat)	Bio-Rad
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Merck
BSA (Bovine Serum Albumine) 2 mg/ ml	Pierce
CaCl ₂ (Calciumchlorid)	Merck
Chymostatin	Calbiochem
CuSO ₄ (Kupfersulfat)	Merck
Digitonin	Fluca
DMSO (Dimethyl Sulfoxide)	Sigma
ECL (enhanced chemiluminescence) detection reagent	Amersham
ECL Marker	Cell Signaling
ECL Marker Antikörper (HRP-konjugiert)	Cell Signaling
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid)	Sigma
Ethanol	Merck
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco
Filipin	Sigma
G418 Sulphat (Geneticin)	Gibco
L-Glutamin	Gibco
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
HCl (Salzsäure)	Merck
Imidazol	Sigma

Isobutanol	Merck
Kaliumtartrat	Merck
Leupeptin	Calbiochem
2-Mercaptoethanol	Serva
Methanol	Merck
Milchpulver (Non-Fat Dry Milk)	Bio-Rad
Mowiol	Calbiochem
NaCl	J.T.Baker
Na ₂ CO ₃ (Natriumbicarbonat)	Merck
NaOH (Natronlauge)	Merck
Nutrient Mixture F-12 (HAM)	Gibco
PBS (phosphate-buffered saline)	Gibco
Penicillin-Streptomycin	Gibco
Pepstatin A	Calbiochem
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma
Ponceaufärbelösung	Serva
PPD (Paraphenyldiamine)	Sigma
Rainbow Marker RPN 756	Amersham
Saponin	Sigma
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma
Silane (3-Aminopropyltriethoxy-Silane)	Sigma
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine)	Bio-Rad
Tris-base	Invitrogen
Trypsin-EDTA	Gibco
Tween	Merck
U18666A (3β-[2-(diethylamino)ethoxy]- androst-5-en-17-one)	Biomol

2.1.4. Zellkultur

Während der Versuche wurde mit CHO (Chinese Hamster Ovary)-Wildtypzellen (im Weiteren CHOwt genannt) und einer Annexin 6 überexprimierenden, G418 (Geneticin)-resistenten Zelllinie (im Folgenden CHOanx6) gearbeitet. Der CHOanx6 Klon war von der AG Grewal hergestellt worden und lag zu Beginn der Arbeit bereits vor.

Das Nährmedium der Zellen setzt sich folgendermaßen zusammen:

- 500 ml Nutrient Mixture F-12 (HAM)
- 50 ml (10%) FBS (Fetal Bovine Serum)
- 5 ml (1%) Penicillin-Streptomycin
- 5 ml (1%) L-Glutamin
- Dem Medium des CHOanx6 Klon wurde zusätzlich 1 mg/ ml G418 beigemischt (s. o.)

2.1.5. Antikörper

Western Blot

Folgende Antikörper wurden beim Western Blot als primäre Antikörper eingesetzt:

- Anti-Annexin 6 aus dem Schaf (Grewal et al. 2000); Verdünnung 1:100
- Anti-Annexin 2 H7 aus der Maus, monoclonal (Osborn et al. 1988); Verdünnung 1:1000
- Anti-Caveolin gesamt aus dem Kaninchen, polyclonal, bezogen von Transduction Laboratories, Cat.-No. C 13630-150; Verdünnung 1:10000

Die sekundären Antikörper wurden von Jackson Immuno Research Laboratories bezogen:

- RAS-PO (Rabbit Anti-Sheep Peroxidase conjugated): AffiniPure IgG Antikörper, Code-No. 313-035-045; Verdünnung 1:1000
- GAM-PO (Goat Anti-Mouse Peroxidase conjugated): AffiniPure IgG Antikörper, Code No. 115-035-146; Verdünnung 1:5000
- GAR-PO (Goat Anti-Rabbit Peroxidase conjugated): AffiniPure F(ab')₂ Fragment IgG Antikörper, Code No. 111-036-046; Verdünnung 1:1000

Immunfluoreszenz

Folgende Antikörper wurden bei der Immunfluoreszenz als primäre Antikörper eingesetzt:

- Anti-Annexin 6 aus dem Schaf (Grewal et al. 2000); Verdünnung 1:25
- Anti-GST-Annexin 6 aus dem Kaninchen, polyclonal (de Diego et al. 2002); Verdünnung 1:100
- Anti-EEA1, aus der Maus, bezogen von Transduction Laboratories, Cat.-No. E 41120; Verdünnung 1:100

Auch hier wurden die sekundären Antikörper von Jackson Immuno Research Laboratories bezogen:

- CyTM3-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey Anti-Sheep IgG, Code No. 713-166-147; Verdünnung 1:500
- CyTM2-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG, Code No. 711-226-152; Verdünnung 1:200
- CyTM3-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey Anti-Mouse IgG, Code No. 715-166-151; Verdünnung 1:500

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Sämtliche Arbeiten an lebenden Zellen wurden unter sterilen Bedingungen und mit Einwegmaterialien durchgeführt.

Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ gehalten. Nach drei bis vier Tagen war eine Zelldichte mit 70-80% Konfluenz erreicht, so dass ein Splitten der Zellen nötig war. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen eine Minute mit 20 ml PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden 5 ml Trypsin hinzu gegeben und eine Minute auf den Zellen belassen, um diese vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Um die Wirkung des Trypsins zu beenden, wurden nun 10 ml Medium dazugegeben. Von dieser Zellsuspension wurden 3 ml mit 12 ml Medium versetzt und in einer Zellkulturflasche in den Inkubator gelegt. Die verbleibenden 12 ml der Zellsuspension wurden zum Anlegen

weiterer Zellkulturflaschen oder zum Ausplattieren von Zellen verwendet. PBS, Trypsin und das Medium wurden vor der Behandlung der Zellen auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

2.2.2. Ausplattieren von Zellen

Um eine Endosomenpräparation vorzunehmen, waren 4- 6x 10⁷ Zellen von Nöten. Um die Zellzahl zu vergrößern, wurden Zellen auf 145 mmØ Petrischalen ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von 70-80% inkubiert, was i. d. R. zwei bis vier Tage dauerte.

Zum Ausplattieren wurden die Zellen gewaschen und trypsiniert, wie es unter Punkt 2.2.1. beschrieben ist. Von der dabei hergestellten Zellsuspension wurden ca. 4 ml pro Petrischale verwendet und das Volumen mit Medium auf 20 ml aufgefüllt.

2.2.3. Endosomenpräparation

Die für diese Arbeit interessanten Strukturen waren vor allem die Endosomen der Zellen. Um diese Endosomen bearbeiten zu können, mussten sie zuerst isoliert bzw. voneinander getrennt werden. Das ist möglich, da sich die verschiedenen Stadien der Endosomen in einem Dichtegradienten in unterschiedlichen Schichten sammeln (Gorvel et al. 1991).

Zur Vorbereitung wurden Zellen ausplattiert und geerntet, wenn die Petrischalen ausreichend bewachsen waren. Dazu wurde das Medium von den Petrischalen abgesaugt und die Zellen 1 min in 20 ml PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden die Petrischalen auf Eis gestellt, 9 ml HB (homogenization

<i>PIC</i>	
(Proteaseinhibitorcocktail):	
Antipain	10 mM
Chymostatin	10 mM
Leupeptin	10 mM
Pepstatin A	1 mM

buffer) hinzu gegeben und die Petrischale mit einem Zellschaber gründlich abgeschabt. Die entstandene Zellsuspension sämtlicher beernteter Petrischalen wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Anschließend wurde die Petrischale nochmals mit 3 ml HB abgeschabt und die 3 ml Zellsuspension in das Zentrifugenröhrchen gegeben. Nun wurde das Zentrifugenröhrchen 10 min bei 4°C mit 2200 rpm in der Laborfuge 400R zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml HB+PIC (s. Kasten S.8) aufgenommen. Dann wurde das aufgenommene Pellet 15-mal langsam in eine mit einer 24GA1 Kanüle bestückte 1 ml Spritze aufgenommen und ruckartig wieder hinausgepresst, um die Zellen zum Zerplatzen zu bringen. Ein Erfolg dieser Methode

konnte unter dem Mikroskop beobachtet werden: Während vor der Zellzerstörung ganze Zellen unter dem Mikroskop zu sehen waren, waren nach 15-maligem Aufziehen und hinauspressen nur noch Zellkerne zu erkennen. Das Zelllysate wurde nun 15 min bei 4°C mit 3400 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand vorsichtig abgenommen. Dieser Überstand, im Folgenden PNS (postnuclear supernatant) genannt, enthielt die endosomalen Membranen und die schweren Membranen der Plasmamembranen der zertrümmerten Zellen. Das Pellet wurde verworfen.

Um die Endosomenpräparation durchzuführen wurden 840 µl PNS in einem 14 x 89 mm Zentrifugenröhrchen (Ultra-Clear) mit 1160 µl 62%iger Sucroslösung gut durchmischt, um so eine Gesamtsucrosekonzentration von 40,2% zu erhalten.

Sämtlichen Sucroslösungen wurde 3 mM Imidazol hinzugefügt, der pH wurde auf 7,4 eingestellt und die Lösungen wurden steril filtriert; es wurde bei ca. 4°C bzw. auf Eis gearbeitet.

Die im ersten Schritt erhaltenen 2 ml Zelllysate enthaltender Sucroslösung wurden nun vorsichtig mit 3 ml 35%iger Sucroslösung überschichtet. Darüber wurden 2 ml 25%ige Sucroslösung geschichtet, und darüber 3 ml HB+PIC. Das Zentrifugenröhrchen wurde in einen Schwingkopf des vorgekühlten Beckmann SW41 swing out Rotors eingelassen und gegen ein Gegengewicht auf 0,002 g genau austariert. Dann wurden die Schwingköpfe in den Rotor eingehängt und 90 min bei 4°C und 35000 rpm zentrifugiert. Nach Beendigung des Laufs wurde der Rotor vorsichtig aus der Zentrifuge gehoben und die Zentrifugenröhrchen vorsichtig aus den Schwingköpfen gezogen. Nun wurden mit einer 1 ml Pipette die einzelnen Fraktionen von oben nach unten in kreisenden Bewegungen abgenommen. Bei den ersten Versuchen wurde ein von Dr. Jörg Heeren eigens konstruierter Fraktionierer verwendet, welcher die aus dem unten angestochenen Zentrifugenröhrchen fallenden Tropfen abzählt, weshalb die oberste Fraktion (HB) als Fraktion 10 bezeichnet wird, während die unterste (62%+PNS) als Fraktion 1 bezeichnet wird. Der Fraktionierer bereitete jedoch wegen der unterschiedlichen Fluidität der unterschiedlichen Sucrosekonzentrationen Probleme, weshalb er nicht wieder verwendet wurde.

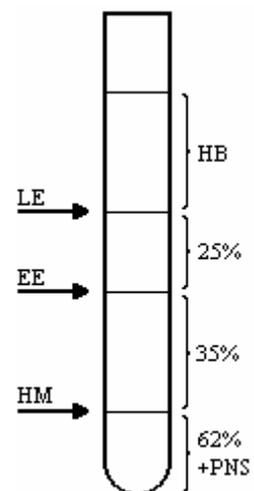


Abb. 2.1) Verteilung von Zellkompartimenten im Sucrosegradienten

Während der Zentrifugation sammeln sich die frühen und späten Endosomen und die schweren Membranen im Gradienten an den Trennschichten der unterschiedlichen

Sucrosekonzentrationen, wie in Abb.2.1) dargestellt (Grewal et al. 2000). Aufgrund dieser Verteilung konnte davon ausgegangen werden, dass die späten Endosomen in den Fraktionen 7-10, die frühen in den Fraktionen 4-6 und die schweren Membranen in den Fraktionen 1-3 zu finden wären, weshalb jeweils diese Fraktionen für Westernblotanalysen gepoolt wurden.

2.2.4. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry et al. (1951)

Lowrylösung:

97% Komponente A

(3% Na₂CO₃ in 0.15N NaOH)

1,5% Komponente B (2% Kaliumtartrat)

1,5% Komponente C (1% CuSO₄*5H₂O)

Je 20 µl der Proben wurden mit Aqua bidest auf 400 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und 1 ml einer frisch aus den drei Komponenten gemischten Lowrylösung (s. Kasten) dazugegeben.

Gleichzeitig wurde eine in 2 µg Schritten aufsteigende Eichreihe (0-30 µg) mit BSA in Aqua bidest angelegt, auch mit jeweils 400 µl Gesamtvolumen und 1 ml Lowrylösungszugabe. Proben und Eichreihe wurden jeweils im Doppelansatz gemessen. Nach gründlicher Durchmischung mit dem Vortexer wurden die Proben 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 125 µl zu gleichen Teilen mit Aqua bidest verdünnten Folins zu jeder Probe hinzu gegeben und wieder gevortext. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion der Proben im Spectrophometer bei 750 nm gemessen. Durch Mittelwertbildung wurde aus den Werten der Eichreihe ein Faktor ermittelt, mit dessen Hilfe die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt werden konnten.

2.2.5. Bestimmung der Cholesterinkonzentration mittels Amplex Red Cholesterol Assay Kit

Zur Cholesterinbestimmung der Endosomen wurden 50 µl der Proben mit 50 µl Reaktionsgemisch in den Kammern einer Packard 98-well plate vermischt. Das Reaktionsgemisch besteht aus dem Amplex Red Reaktionspuffer, dem HRP (Horse Radish Peroxidase, 1:100), Oxidase (1:500), Esterase (1:1000) und Amplex Red (1:67) beigemennt wurden. Mit Precinorm (Cholesteringehalt 1,7 mg/ ml) wurde eine Eichreihe von 1 µg, 2 µg, 4 µg, 8 µg und 16 µg in je 50 µl HB hergestellt. Eichreihe und Proben wurden in Doppelwerten gemessen. Nach Zugabe des Reaktionsgemisches wurde die 98-well plate luftdicht abgedeckt und unter Lichtausschluss 30 min bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die Extinktion bei 530 nm/ 570 nm gemessen. Ähnlich wie bei der Proteinbestimmung wurde die Cholesterinkonzentration der Proben rechnerisch ermittelt und auf die vorher ermittelte Proteinkonzentration der Proben genormt (μg Cholesterin/ mg Protein).

2.2.6. SDS-Page zur Auftrennung von Proteinen

Vorbereitung der Proben

In einigen Fällen wurden die Proben z.B. mit EDTA vorbehandelt, d.h. die benötigte Menge der Probe wurde 30 min mit EDTA bei 4°C im Mini-Dreher RM5 inkubiert, 1 h bei 45000 rpm in der Beckmann TL-100 zentrifugiert und das Pellet in HB resuspendiert.

Als Vorbereitung für die Gelelektrophorese wurden vier Teile der Proben mit einem Teil eines fünffach konzentrierten Probenpuffers (s. Kasten) versetzt, welcher während der folgenden Denaturierung zur Sprengung der Disulfidbrücken (2-Mercaptoethanol), zur Entfaltung der Proteine (SDS) und zur Beschwerung der Proben (Glycerol) führte. Dem

<i>5fach Probenpuffer (100ml):</i>	
0,5M Tris HCl pH 6,8	20 ml
SDS(10%)	20 ml
Glycerol	20 ml
Aqua bidest	30 ml
2-Mercaptoethanol (10%)	10 ml
Bromphenolblau	0,1 ml

Probenpuffer war außerdem 0,1%ig Bromphenolblau zugefügt, um eine sichtbare Lauffrontkontrolle während der Elektrophorese zu erhalten. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 96°C zwecks Denaturierung gekocht und bis zur Beladung des Gels auf Eis gelagert.

Als Molekulargewichtsstandard wurde der Rainbowmarker (1 μl RM + 2,5 μl Glycerol + 7 μl Aqua bidest) und der ECL Marker (3 μl ECL Marker + 7 μl Aqua bidest, 5 min bei 96°C gekocht, dann auf Eis) eingesetzt.

Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

Bei der Gelelektrophorese wird ein zweiphasiges Polyacrylamidgel mit den vorbehandelten Proben beladen und an eine Spannungsquelle angeschlossen. Die durch die Behandlung mit dem Probenpuffer negativ geladenen Proteine wandern durch das Gel in Richtung Anode. Dabei ist die Geschwindigkeit der Proteine abhängig von ihrer Größe. Kleine Proteine wandern schneller, große langsamer.

In der ersten, niedrigprozentigeren Phase des Gels (Sammelgel) wandern die Proteine annähernd gleich schnell. So erreichen sie gemeinsam die Trennschicht zwischen den

beiden Phasen. In der zweiten, höherprozentigen Phase (Trenngel) beginnt dann die Auftrennung der Proteine.

Es wurden hauptsächlich Minigele verwendet, wofür das Minigelsystem Mini-PROTEAN Cell von Bio-Rad benutzt wurde.

Nach gründlicher Reinigung der Glasplatten (1,5 mm Spacer) wurden diese zusammengesetzt und das 12,5%ige Trenngel (s. u.) gegossen. Beim Gießen des Trenngels wurde ein Abstand zum oberen Rand von ca. 1 cm belassen und anschließend Isobutanol auf die Geloberfläche gegeben. Nach vollständiger Polymerisierung des Trenngels wurde

10fach Laemmli Laufpuffer (4l):

Tris-base	120 g
Glycin	576 g
SDS	40 g
Aqua bidest	4000 ml
Mit HCl auf	pH 8,8

das Isobutanol abgegossen und mit Aqua bidest nachgespült. Nun wurde das 3,5%ige Sammelgel (s. u.) gegossen. Anschließend wurde der Taschenkamm (1,5 mm, 10 Taschen) in das nicht polymerisierte Sammelgel gesteckt. Nach vollständiger Polymerisierung des Sammelgels

wurde der Taschenkamm entfernt und die Taschen mit Laufpuffer (s. Kasten) gespült. Dann wurde das Gel in die Laufkammer überführt und dort mit den Proben beladen. Um das Überlaufen der Taschen beim Beladen zu vermeiden wurden die Proben mit einer 50 µl Spritze der Firma Hamilton eingefüllt. Die Spritze wurde nach jeder Beladung mit Laufpuffer gespült.

Nach vollständiger Beladung des Gels wurde das System bei 40 mA/ Gel für ca.70 min, bzw. bis zum Erreichen der Gelunterkante durch die Bromphenolblaufront, an die Spannungsquelle (Powersupply) angeschlossen.

Zusammensetzung der Gele:

Substanz:	3,5%	12,5%
Acrylamide-Bis 30%	2,4 ml	12,5 ml
Tris-base	0,5M pH 6,8 5 ml	1,5M pH8,8 7,5 ml
Aqua bidest	12,4 ml	9,3 ml
SDS 10%	0,2 ml	0,6 ml
AP 10%	0,3 ml	0,2 ml
TEMED	10 µl	10 µl

2.2.7. Western Blot

Der Western Blot dient dazu, die nach der Elektrophorese im Gel befindlichen Proteine durch anlegen einer Spannung auf eine Nitrozellulosemembran zu überführen, und sie dann mittels Antikörperbehandlung sichtbar zu machen.

Blottingpuffer:

Borsäure	15,46g
Aqua bidest	4000ml
(mit NaOH auf pH 9,0)	
Methanol	1000ml

Das die getrennten Proteine enthaltende Gel wurde auf Nitrozellulosemembran, zwischen Schwammplatten und Filterpapier, in die zum Minigelsystem gehörenden Sandwichplatten geklemmt und in die mit Blottingpuffer (s. Kasten) gefüllte und durch Eis gekühlte Blottingkammer überführt. Dann wurde für 90 min eine Spannung von 350 mA angelegt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran entlang der Gelränder zurechtgeschnitten und 5-10 min in Ponceaufärbelösung gefärbt. Danach wurde die Membran kurz in Aqua bidest gespült, in Frischhaltefolie eingeschlagen und fotokopiert. Anhand des Rainbowmarkers und der ponceaufgefärbten Banden wurde die Membran nun zwischen den Banden zerschnitten, auf denen man die zu färbenden Proteine erwartete (Annexin 6 68 kDa, Annexin 2 31 kDa, Caveolin 18-23 kDa). Um die Ponceaufärbung heraus zu waschen, wurden die Membranstreifen in PBS gewaschen. Dann wurden sie 45 min auf dem Mini-Shaker in Blocklösung (s. Kasten) geschwenkt, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Die Blocklösung wurde hinterher aufbewahrt, um damit die Zweitantikörperlösung anzusetzen.

Blocklösung:

PBS	100ml
Tween	0,1ml
Milchpulver	10g

Während des Blockvorgangs wurden die ersten Antikörper in entsprechender Verdünnung (s. 2.1.5.) in 5-15 ml 5% BSA und 0,1% Tween enthaltendem PBS angesetzt. Nach Beendigung des Blockens wurden die Membranstreifen kurz mit PBS abgespült und zusammen mit der Antikörperlösung in zurechtgeschnittenen Vernichtungsfolienstreifen mit dem Impulse Sealer eingeschweißt. Es folgte die Inkubation für 90 min bei Raumtemperatur auf dem Mini-Shaker oder über Nacht im Kühlraum auf dem Mini-Shaker. Anschließend wurden die Membranstreifen dreimal je 10 min in PBS 0,1% Tween gewaschen. Die AK-Lösungen wurden aus den Vernichtungsfolientüten abpipettiert und durch Spritzenvorsatzfilter in 15 ml Falcons sterilfiltriert, um sie bis zum nächsten Gebrauch bei 4°C zu lagern.

Während des Waschvorgangs wurden die zweiten Antikörperlösungen mit 5-15 ml der oben beschriebenen Blocklösung in entsprechender Verdünnung der Antikörper (s. 2.1.5.)

hergestellt. Zusätzlich wurde diesen Lösungen der ECL Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 hinzugefügt. Dann wurden die Membranstreifen mit diesen Lösungen wie schon mit den ersten Antikörperlösungen eingeschweißt und 60 min auf dem Mini-Shaker bei Raumtemperatur inkubiert. Hinterher folgten je drei Waschgänge a 5 min in PBS 0,3% Tween und drei Waschgänge a 5 min in 0,1% Tween. Danach wurden die Membranstreifen mehrfach kurz in PBS gewaschen, um das Tween herauszuspülen. Die zweite Antikörperlösung wurde verworfen.

Um die durch Antikörper detektierten Banden sichtbar zu machen, wurde die Methode der Autoradiographie angewendet. Dazu wurden die Membranstreifen mit Tesafilm an den Rändern wieder zusammengeklebt und in zurechtgeschnittenen Vernichtungsfolien in eine Filmkammer gelegt. Die nachfolgenden Schritte wurden in der Dunkelkammer durchgeführt. Es wurden die ECL detection reagent Lösungen laut Protokoll vermischt und das Gemisch auf den Membranstreifen verteilt. Die Filmkammer wurde für 1 min geschlossen. Anschließend wurden die Membranstreifen leicht trockengetupft und in einer neuen Vernichtungsfolie wieder in die Filmkammer gelegt. Ein Röntgenfilm wurde draufgelegt und für ca. 10 s belichtet. Dann wurde der Film entwickelt und entsprechend dem Ergebnis weitere Belichtungen vorgenommen.

2.2.8. Immunfluoreszenzmikroskopie

Um eine visuelle Kontrolle der Western Blot Ergebnisse zu erhalten, wurde die Immunfluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Dabei lässt man die Zellen auf Deckgläschen anwachsen, fixiert sie anschließend und inkubiert sie wieder in zwei Schritten mit Antikörpern, einem zur Markierung des zu untersuchenden Proteins und einem zur Sichtbarmachung unter dem Fluoreszenzmikroskop (CyTM2: Grün im Blaulicht; CyTM3: Rot im Grünlicht). Da die Lokalisation von Annexin 6 in Abhängigkeit von der Lokalisation des internalisierten Cholesterins untersucht werden sollte, wurde das Cholesterin mit Filipin detektiert, welches im UV Licht blau fluoresziert.

Damit die CHO Zellen auf den Deckgläschen anwachsen konnten mussten diese mit Silane beschichtet werden. Dazu wurden die Deckgläschen aufrecht in einem acetoneempfindlichen Ständer stehend 5 min in ein Silane Aceton Gemisch (1:50) gegeben und auf den Mini-Shaker gestellt. Dann folgte ein Waschgang in reinem Aceton für 5 min und zwei Waschgänge in Aqua bidest, ebenfalls 5 min auf dem Mini-Shaker.

Danach wurden die Deckgläschen an der Luft getrocknet und zur Sterilisierung für mindestens 4 h unter der sterilen Werkbank im UV Licht stehen gelassen.

Von den beschichteten Deckgläschen wurden je drei in ein well einer 6-well plate gegeben und mit ca. 1 ml Zellsuspension (s. 2.2.1.) und 1 ml Medium überschichtet. Die 6-well plate wurde in den Inkubator gestellt. Nach 1-3 Tagen war auf den Deckgläschen eine Konfluenz von 50-60% zu beobachten, wobei mikroskopisch kontrolliert wurde, dass sie nicht zu dicht bewachsen, da eine zu hohe Zelldichte die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie negativ beeinflussten. Die Deckgläschen wurden mit der bewachsenen Seite nach oben in eine 12-well plate mit 500 µl 8%igem PFA und 500 µl PBS pro well überführt und 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach folgten fünf Waschgänge a 5 min in PBS und ein Waschgang a 5 min in PBS mit 0,5% Glycin und 0,05% Saponin. Anschließend wurden die Deckgläschen in eine mit Aluminiumfolie umhüllte Plastiksachtel auf Parafilm gelegt und auf jedes 60 µl Blocklösung (PBS/ Glycin/ Saponin wie oben + 2% BSA) pipettiert. Während des folgenden 20 min dauernden Blockvorgangs bei Raumtemperatur wurden die ersten Antikörperlösungen mit Blocklösung gemäß ihrer Verdünnung (s. 2.1.5.) hergestellt und auf Eis gelagert.

Nach dem Blocken ließ man die Deckgläschen kurz abtropfen, pipettierte je 50 µl der ersten Antikörperlösung darauf und ließ sie in der Plastiksachtel 1 h im Inkubator inkubieren. Währenddessen wurde die zweite Antikörperlösung wie bereits die erste hergestellt, allerdings wurde hier Filipin in einer Verdünnung von 1:100 dazugegeben.

Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurden die Deckgläschen zweimal kurz in PBS getaucht und anschließend zweimal je 5 min in PBS/ Glycin/ Saponin gewaschen. Dann wurden je 50 µl der zweiten Antikörperlösung draufpipettiert und das Ganze 45 min in den Inkubator gestellt. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal je 5 min in PBS gewaschen und eingedeckelt. Dazu wurden 4 µl PPD/ Mowiol (1:10) auf einen Objektträger gegeben, ein Deckgläschen mit der bewachsenen Seite nach unten draufgelegt, kurz angetrocknet und mit Nagellack umrandet.

Die Bilder der Zellen wurden mit der AxioCam am Mikroskop Axiovert 100 aufgenommen. Dabei war zu beachten, dass das Filipin im UV Licht relativ schnell ausbleicht.

3.) Ergebnisse

3.1. Cholesterinzug reduziert die Bindung von Annexin 6 an Membranen

3.1.1. Digitonin reduziert die Membranaffinität von Annexin 6

Annexin 6 bindet calciumabhängig an negativ geladene Phospholipide, aber auch andere Faktoren, wie ein saurer pH-Wert oder LDL Akkumulation können die Membranbindungsaffinität des Annexin 6 beeinflussen (Ayala-Sanmartin 2001; Golczak et al. 2001). Die Annahme, dass Cholesterin das Membranbindungsverhalten des Annexin 6 beeinflussen könnte, wird gestärkt durch die Beobachtungen an einem anderen Mitglied der Annexinfamilie, dem Annexin 2, welches in frühen Endosomen zu finden ist und abhängig und unabhängig von Calcium an biologische Membranen bindet (Drust und Creutz 1991; Raynal et al. 1996; Harder et al. 1997; Jost et al. 1997; König und Gerke 2000; Ayala-Sanmartin 2001; Ayala-Sanmartin et al. 2001). Etwa 50% des an endosomale Membranen gebundenen Annexin 2 in BHK(baby hamster kidney)-Zellen ist calciumunabhängig gebunden (Harder et al. 1997; Jost et al. 1997; König und Gerke 2000). Dabei kann Annexin 2 durch Cholesterin sequestrierende Substanzen wie Filipin oder Digitonin von den Membranen gelöst werden (Harder et al. 1997; Jost et al. 1997).

Die LDL induzierte Translokation von Annexin 6 in späte Endosomen ließ auf einen Einfluss von LDL Cholesterin auf die Membranaffinität von Annexin 6 schließen (Grewal et al. 2000; de Diego et al. 2002). Deshalb wurde der Einfluss von Cholesterin auf die Membranaffinität von Annexin 6 untersucht. In vorangegangenen Experimenten waren postnukleäre Membranen aus CHO (chinese ovary hamster) Wildtypzellen (CHOwt) und Annexin 6 überexprimierenden CHO Zellen (CHOanx6) mit Digitonin behandelt worden, um den Membranen das Cholesterin zu entziehen, was jedoch zu keiner sichtbaren Änderung der Membranaffinität des Annexin 6 führte. Das entsprach den Beobachtungen von König und Gerke, die den Einfluss von Cholesterin auf das Bindungsverhalten von Annexin 2 nur an einem calciumunabhängigen Pool demonstrieren konnten (König und Gerke 2000). Deshalb wurde als Probe wie unter 2.2.3. beschrieben ein PNS (postnuclear supernatant) aus CHOanx6 Zellen hergestellt. Um einen eventuell vorhandenen calciumunabhängigen Pool des Annexin 6 zu identifizieren, wurde das PNS mit 50 mM EDTA vorbehandelt, damit sich die calciumabhängig bindenden Proteine von den Membranen lösen konnten, und anschließend zentrifugiert. Vom resuspendierten Pellet

wurden je 50 µl nicht weiter behandelt, erneut mit 50 mM EDTA, mit 5 µg/µl Digitonin und mit 50 mM EDTA gemeinsam mit 5 µg/µl Digitonin für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die Pellets wurden in je 50 µl HB resuspendiert. Je 10 µl der Überstände und Pellets wurden auf einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt, um mittels Western Blot die Verteilung von Annexin 6, Annexin 2 und Caveolin zu untersuchen (s. Abb. 3.1.). Annexin 2 und Caveolin dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle, da Annexin 2 calcium- und cholesterinabhängig an Membranen bindet und Caveolin resistent gegen die Inkubation der Membranen mit EDTA oder Digitonin ist (Jost et al. 1997; König und Gerke 2000).

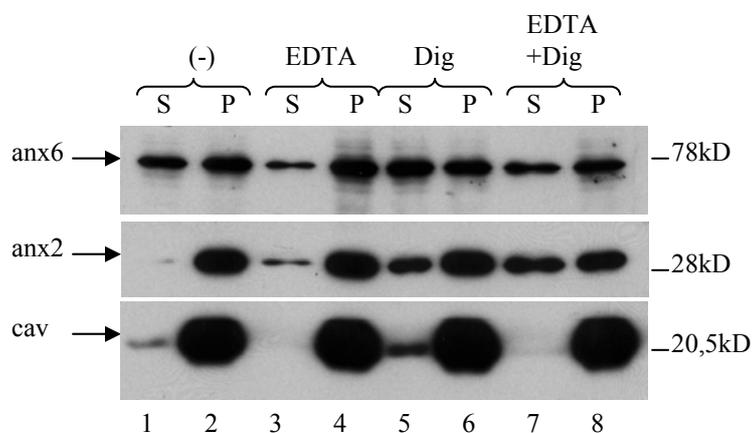


Abb. 3.1) **Wirkung von EDTA und Digitonin auf die Membranbindung des Annexin 6.** Ein PNS von $4-6 \times 10^7$ CHOanx6-Zellen wurde mit 50 mM EDTA 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde in HB resuspendiert und je 50 µl ohne Zusatz (Spuren 1 und 2), mit 50 mM EDTA (Spuren 3 und 4), mit 0,5 µg/µl Digitonin (Spuren 5 und 6) und mit 50 mM EDTA + 0,5 µg/µl Digitonin (Spuren 7 und 8) für 30min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Von den Überständen (S) und den in je 50 µl resuspendierten Pellets (P) wurden je 10 µl auf einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und mittels Western Blot auf die Verteilung von Annexin 6, Annexin 2 und Caveolin untersucht.

Nach der ersten EDTA-Behandlung war der calciumsensitive Annexinpool entfernt. Annexin 6 lag zu ca. 60-70% membrangebunden und zu 30-40% ungebunden vor, Annexin 2 war zu über 90% membrangebunden (s. Abb. 3.1., Spuren 1 und 2). Eine erneute Behandlung mit EDTA brachte kaum Änderung (s. Abb. 3.1., Spuren 3 und 4), was dafür spricht, dass auch Annexin 6 eine calciumunabhängige stabile Bindung an Membranen eingehen kann.

Die Behandlung mit Digitonin hingegen führte beim Annexin 2 zu einer deutlichen Senkung der Membranaffinität auf ca. 70-80%, und auch die Membranaffinität des Annexin 6 sank auf ca. 30-40% (s. Abb. 3.1., Spuren 5 und 6). Während eine gemeinsame Behandlung mit EDTA und Digitonin beim Annexin 6 keine weitere Affinitätssenkung bewirkte, sank die Affinität beim Annexin 2 weiter auf ca. 60-70% ab (s. Abb. 3.1., Spuren

7 und 8). Die Caveolinbanden blieben weitestgehend unverändert. Damit konnte zum ersten Mal die Existenz eines calciumunabhängigen Pools von Annexin-6-Proteinen identifiziert werden, der sensitiv für die Konzentration bzw. Verteilung von Cholesterin in der Membran ist.

Allerdings könnte die Überexpression von Annexin 6 zu einer Sättigung aller calciumabhängigen Annexin-6-Bindungsstellen geführt haben, so dass es zu einer unspezifischen und calciumunabhängigen Assoziation von weiteren Annexin 6 Proteinen hätte kommen können. Vielleicht galt die Cholesterinsensitivität nur für diese alternativ assoziierten Annexin 6 Proteine. Um die Existenz eines endogenen calciumunabhängigen, cholesterinsensitiven Pools von Annexin 6 zu überprüfen, wurde dieses Experiment zur Kontrolle mit CHOwt Zellen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dabei ließen sich die dargestellten Beobachtungen bestätigen. Man kann also daraus schließen, dass auch Annexin 6 sowohl calcium- wie auch cholesterinabhängig an Membranen bindet.

3.1.2. Einfluss von Digitonin auf die Membranbindung von Annexin 6 *in vivo*

Nachdem *in vitro* gezeigt werden konnte, dass die Membranaffinität von Annexin 6 durch den Entzug von Cholesterin aus den Membranen durch Digitonin gesenkt werden kann (s. 3.1.1.), sollte überprüft werden, ob Digitonin einen generellen Einfluss auf die Membranaffinität von Annexin 6 *in vivo* besitzt. Dazu wurden CHOanx6 Zellen 20 h mit 5-40 µg/ml Digitonin im Nährmedium inkubiert. Nach Herstellung des PNS und Zentrifugation wurden von den unbehandelten Überständen und Pellets je 10 µl auf einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und mittels Western Blot auf die Verteilung von Annexin 6, Annexin 2 und Caveolin untersucht (s. Abb. 3.2.).

Betrachtet man jeweils die zueinander gehörenden Überstände und Pellets (s. Abb. 3.2., Spuren 1 und 2, 3 und 4, 5 und 6, 7 und 8), so zeigt sich, dass auch mit zunehmender Digitoninkonzentration weder Annexin 6 (60-70% Membranbindung) noch Annexin 2 (70-80% Membranbindung) an Bindungsaffinität verliert. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass in diesem Experiment sämtliche Annexin-pools betrachtet wurden, also sowohl die calciumabhängigen, wie auch die calciumunabhängigen, da keine Behandlung mit EDTA erfolgte. Da der calciumunabhängige Pool von Annexin 6 nur ca. 10% des Gesamtannexins ausmacht (Ergebnis aus Experimenten der AG Grewal, Daten nicht gezeigt), ist eine Beurteilung dieses Pools in diesem Experiment nicht möglich.

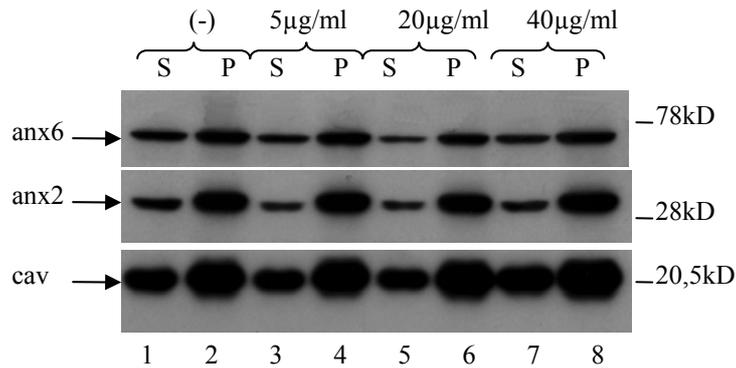


Abb. 3.2) **Einfluss von Digitonin auf die Membranbindung des Annexin 6 in vivo.** Je $4-6 \times 10^7$ CHOanx6 Zellen wurden 20 h ohne Digitonin (Spuren 1 und 2), mit 5 $\mu\text{g/ml}$ (Spuren 3 und 4), mit 20 $\mu\text{g/ml}$ (Spuren 5 und 6) und mit 40 $\mu\text{g/ml}$ Digitonin im Medium (Spuren 7 und 8) inkubiert. Das PNS wurde hergestellt, zentrifugiert und von Überständen (S) und resuspendierten Pellets (P) je 10 μl unbehandelt auf einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Verteilung von Annexin 6, Annexin 2 und Caveolin untersucht.

3.2. Die Anreicherung von Cholesterin in späten Endosomen stimuliert die Bindungsaffinität von Annexin 6

Wie in Abb. 3.1. gezeigt, ist es möglich, die Membranbindungsaffinität von Annexin 6 durch den Entzug von Cholesterin zu senken. Die daraus abgeleitete Abhängigkeit zwischen Cholesterinanteil in der Membran und Bindungsaffinität von Annexin 6 an der Membran sollte vielleicht dazu führen, dass eine Erhöhung des Cholesterinanteils in der Membran zu einer Erhöhung der Membranaffinität des Annexin 6 führt. In-vitro-Ergebnisse von Ayala-Sanmartin et al zeigten bereits eine Erhöhung der Membranaffinität von exogen zugeführtem Annexin 6 bei erhöhtem Cholesteringehalt in artifiziellen phospholipidhaltigen Vesikeln (Ayala-Sanmartin 2001). Gemeinsam mit den oben beschriebenen Experimenten ließe dies auf eine erhöhte Membranaffinität von Annexin 6 schließen. Eine detaillierte Analyse an biologischen Membranen fehlte jedoch noch. Also musste ein System etabliert werden, das es erlaubte, cholesterinreiche Membranen zu isolieren und deren Einfluss auf die Membranaffinität von Annexin 6 zu testen.

Die Inkubation von Zellen mit 3β -(2Diethylaminoethoxy)-androst-5-en-17-on (im Folgenden U18666A) führt zu einer Akkumulation von Cholesterin in späten Endosomen und Lysosomen (Liscum und Faust 1989). Der Phänotyp ähnelt dem von Niemann Pick Typ C (NPC) Fibroblasten, die einen Defekt beim Abtransport von Cholesterin aus späten Endosomen aufweisen und deshalb durch große cholesterinreiche, späte endosomale

Vesikel in Kernnähe charakterisiert sind (Liscum und Faust 1989). In einer detaillierten biochemischen Analyse der Wirkungsweise von U18666A konnten Liscum und Faust nachweisen, dass U18666A während der LDL Aufnahme die durch LDL Cholesterin hervorgerufene Stimulation der Cholesterinesterifizierung und Unterdrückung der HMG-CoA-Reduktase- und LDL Rezeptoraktivität in CHO Zellen blockiert. Nicht beeinflusst werden die LDL Rezeptorbindung, die LDL Internalisation sowie die lysosomale Hydrolyse von LDL Cholesterinestern. Das führt zu einer Akkumulation von Cholesterin in späten Endosomen und Lysosomen. Zwar wird auch die endogene Cholesterinsynthese durch U18666A gestört, aber die Aufnahme und Verstoffwechslung freien Cholesterins ist weiterhin möglich (Liscum und Faust 1989). Diese Tatsache sollte erlauben, das Bindungsverhalten von Annexin 6 an cholesterinbeladenen Membranen *in vivo* zu untersuchen.

3.2.1. Etablierung der Cholesterinanreicherung in späten Endosomen nach Behandlung mit U18666A

Bevor Bindungsstudien an mit U18666A behandelten Zellen durchgeführt werden konnten, musste das experimentelle System etabliert werden. Dazu wurden je $4-6 \times 10^7$ CHOanx6- und CHOwt Zellen 24h mit 2 $\mu\text{g/ml}$ U18666A im Medium inkubiert und anschließend das PNS hergestellt. Die Bestimmung des Cholesterins im PNS ergab einen Anstieg des Cholesterins um ca. 50%, wenn die Zellen mit U18666A behandelt worden waren (s. Abb. 3.3., schwarzer Balken) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (s. Abb., 3.3., grauer Balken). Um eine Verfälschung des Ergebnisses durch eine variierende Zellzahl zu vermeiden, wurde die Cholesterinkonzentration ins Verhältnis zur Proteinmenge im PNS gesetzt. Diese Bestimmung wurde für CHOanx6- und CHOwt Zellen durchgeführt (Daten für CHOwt nicht gezeigt), wobei sich die Ergebnisse entsprachen.

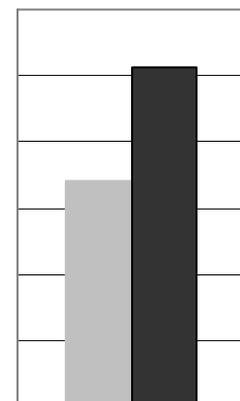


Abb. 3.3) **Cholesterin im PNS** von CHOanx6-Zellen ohne (■) und mit (■) U18666A-Behandlung (Erklärung s. Text)

Da bekannt war, dass das Cholesterin in späten Endosomen bzw. im prälysosomalen Kompartiment akkumuliert (Liscum und Faust 1989), wurde das PNS durch eine Endosomenpräparation (s. 2.2.3.) in die Membranbestandteile der Plasmamembran (heavy

membranes = HM), die frühen Endosomen (early endosomes = EE) und die späten Endosomen (late endosomes = LE) aufgeteilt.

Die Bestimmung des Cholesteringehalts im Verhältnis zur Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen ergab, wie erwartet, einen signifikanten Anstieg von Cholesterin in den späten Endosomen (LE, s. Abb. 3.4., Bild A/B, Fraktionen 7-10), sowohl in CHOwt- als auch in CHOanx6 Zellen.

In den frühen Endosomen (EE, s. Abb. 3.4., Bild A/B, Fraktionen 4-6) kam es nach der Behandlung mit U18666A zu keinem nennenswerten Anstieg der Cholesterinkonzentration, was dafür spricht, dass die Cholesterinakkumulation tatsächlich nur in den späten Endosomen stattfindet. Die niedrigen Cholesterinkonzentrationen in den Plasmamembranbestandteilen (HM, s. Abb. 3.4., Bild A/B, Fraktionen 1-3) ergeben sich vor allem durch den hohen Anteil an Membranproteinen in der Plasmamembran, da der dargestellte Cholesteringehalt zur Proteinkonzentration ins Verhältnis gesetzt wurde.

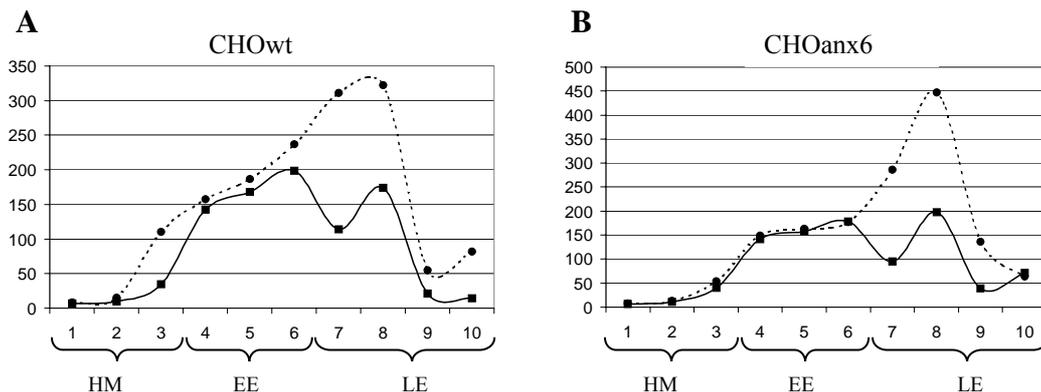


Abb. 3.4) **Anreicherung von Cholesterin in späten Endosomen nach U18666A-Behandlung.** Je $4-6 \times 10^7$ CHOwt-Zellen (A) und CHOanx6-Zellen (B) wurden 24h mit $2 \mu\text{g/ml}$ U18666A im Medium inkubiert. Anschließend wurden die PNS hergestellt und eine Endosomenpräparation durchgeführt. Die Grafiken zeigen die Cholesterinkonzentration in μg Cholesterin/mg Protein (y-Achse) in den Fraktionen (x-Achse) von unbehandelten (v, durchgezogene Linie) und mit U18666A behandelten Zellen (λ, unterbrochene Linie). Die Fraktionen 1-3 entsprechen jeweils den Plasmamembranbestandteilen (HM), die Fraktionen 4-6 den frühen Endosomen (EE) und die Fraktionen 7-10 den späten Endosomen (LE) (s.2.2.3.).

Um eine Vorstellung davon zu bekommen, in welchem Zeitfenster sich die Cholesterinakkumulation in den späten Endosomen abspielt, wurden jeweils $4-6 \times 10^7$ CHOwt- und CHOanx6 Zellen mit $2 \mu\text{g/ml}$ U18666A im Medium inkubiert und zu unterschiedlichen Zeiten geerntet. Anschließend wurde das PNS hergestellt und mittels Endosomenpräparation fraktioniert. Die Fraktionen wurden entsprechend der Verteilung im Sucrosegradienten gepoolt (s. 2.3.3.), und die Cholesterinverteilung in den frühen und

späten Endosomen wurde verglichen (s. Abb. 3.5., A). Dabei zeigte sich, dass nach dem kürzesten gewählten Zeitintervall, nämlich 6h, schon der größte Teil der Akkumulation des Cholesterins in den späten Endosomen stattgefunden hatte (s. Abb. 3.5., A, unterbrochene Linie, Daten für CHOwt nicht gezeigt), während es in den frühen Endosomen, wie erwartet, zu keinem signifikanten Anstieg der Cholesterinkonzentration kam (s. Abb. 3.5., A, durchgezogene Linie, Daten für CHOwt nicht gezeigt). Deshalb wurde das Experiment nochmals durchgeführt, wobei die Zeitintervalle kürzer gewählt wurden (s. Abb. 3.5., B, C).

Während die Cholesterinakkumulation in CHOanx6 Zellen schon nach 3h weitestgehend abgeschlossen war (s. Abb. 3.5., B, unterbrochene Linie), erreichte sie in CHOwt Zellen erst nach über 6h ihr Maximum (s. Abb. 3.5., C, unterbrochene Linie). Aus diesem Grund wurden die Inkubationen der Zellen mit U18666A in den folgenden Experimenten über Nacht durchgeführt, da so gewährleistet werden konnte, dass die maximale Cholesterinakkumulation stattgefunden hatte.

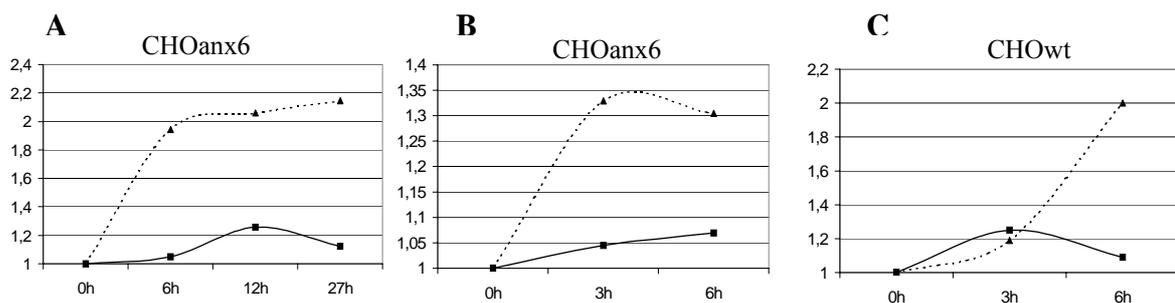


Abb. 3.5) **Kinetik der U18666A-induzierten Cholesterinanreicherung.** Je $4-6 \times 10^7$ CHOanx6- und CHOwt-Zellen wurden mit $2 \mu\text{g/ml}$ U18666A im Medium inkubiert und zu unterschiedlichen Zeiten geerntet. Es folgte die PNS-Herstellung und Endosomenpräparation. Die Fraktionen wurden gepoolt (s. 2.2.3.), so dass die Änderung des Cholesteringehalts (y-Achse) gegen die Zeit (x-Achse) in frühen Endosomen (□, durchgezogene Linie) und späten Endosomen (▲, unterbrochene Linie) verglichen werden konnte.

3.2.2. Immunfluoreszenztechnische Darstellung der Cholesterinanreicherung in späten Endosomen

Nachdem die vorangegangenen Experimente die U18666A stimulierte Anreicherung des Cholesterins in späten Endosomen bestätigt hatten, sollte dieser Effekt mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nachgeprüft werden. Dazu wurden CHOanx6- und CHOwt Zellen auf Deckgläschen ausplattiert (s. 2.2.8.), 5h mit $2 \mu\text{g/ml}$ U18666A inkubiert, fixiert und mit $10 \mu\text{g/ml}$ Filipin inkubiert, da Filipin an Cholesterin bindet und im UV-Licht

fluoresziert, wodurch die Cholesterinverteilung in den Zellen sichtbar gemacht werden konnte (s. Abb. 3.6.). Durch den Cholesterinanteil in der Plasmamembran war diese unter dem Fluoreszenzmikroskop gut zu erkennen (s. Abb. 3.6., ungestielte Pfeile), ebenso wie der Zellkern (S. Abb. 3.6., N). Ansonsten waren in den unbehandelten Zellen vereinzelt Cholesterinansammlungen zu sehen (s. Abb. 3.6., A, gestielte Pfeile), bei denen es sich wahrscheinlich um frühe Endosomen handelte, da sie diffus in der Zelle verteilt waren. Die mit U18666A behandelten Zellen zeigten deutlich mehr Filipinfärbung, was für einen höheren Cholesteringehalt spricht (s. Abb. 3.6., B, gestielte Pfeile). Diese Cholesterinansammlungen waren um den Zellkern gruppiert. Das wiederum entspricht der Lokalisation der späten Endosomen, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei diesen Cholesterinansammlungen um cholesterinbeladene späte Endosomen handelt.

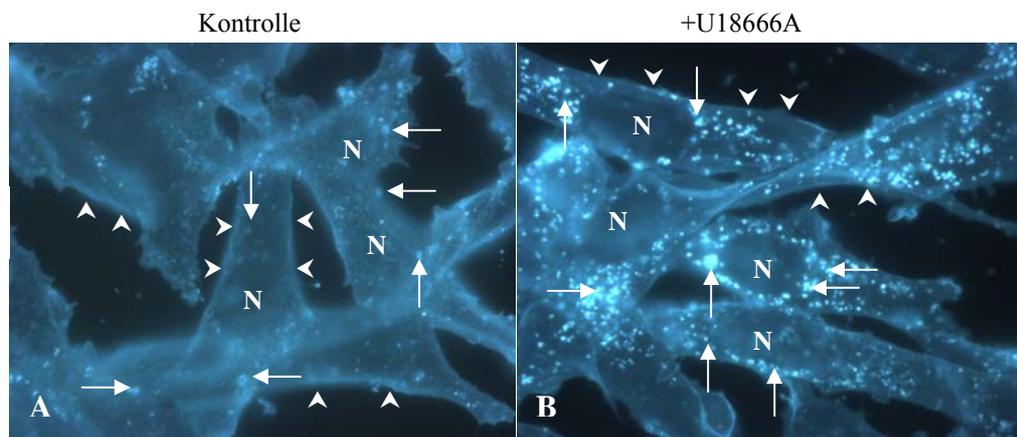


Abb. 3.6) **Cholesterinanreicherung in CHO-Zellen nach U18666A-Behandlung.** CHOwt-Zellen wurden auf Deckgläschen ausplattiert und unbehandelt (A) oder 5 h mit 2 $\mu\text{g/ml}$ U18666A inkubiert (B) mit PFA fixiert, permeabilisiert und 1 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Filipin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit gleicher Belichtungszeit fotografiert. In Bild A erkennt man die Plasmamembran (ungestielte Pfeile), den Nucleus (N) und vereinzelt, verteilt liegende Cholesterinansammlungen innerhalb der Zelle (gestielte Pfeile), bei denen es sich wahrscheinlich um frühe Endosomen handelt. In Bild B erkennt man ebenfalls Plasmamembran (ungestielte Pfeile) und Nucleus (N). Zusätzlich jedoch erkennt man auch erheblich mehr Cholesterinansammlungen (gestielte Pfeile), welche sich vor allem in Zellkernnähe befinden, was der Lokalisation später Endosomen entspricht. Experimente mit CHOanx6-Zellen ergaben entsprechende Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

3.2.3. Membranbindungsstudien mit Annexin 6 an Membranen aus U18666A behandelten Zellen

Die Etablierung der Cholesterinanreicherung in späten Endosomen ermöglichte nun das Studium der cholesterinabhängigen Membranbindung von Annexin 6. Zuerst sollte mittels Western Blot untersucht werden, ob Annexin 6 eine erhöhte Membranbindungsaffinität für

cholesterinreiche Membranen besitzt. Deshalb wurden CHOanx6 Zellen über Nacht mit 2 $\mu\text{g/ml}$ U18666A im Medium inkubiert und anschließend das PNS hergestellt. Nach der Endosomenpräparation wurden die Fraktionen der frühen und späten Endosomen gepoolt und die Membranen aus je 100 μl abzentrifugiert. Die Membranpellets wurden resuspendiert. Von den Überständen und den resuspendierten Pellets wurden je 10 μl auf einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt. Im Anschluss daran wurde die Verteilung von Annexin 6, Annexin 2 und Caveolin in den frühen und späten Endosomen mittels Western Blot analysiert (s. Abb. 3.7.).

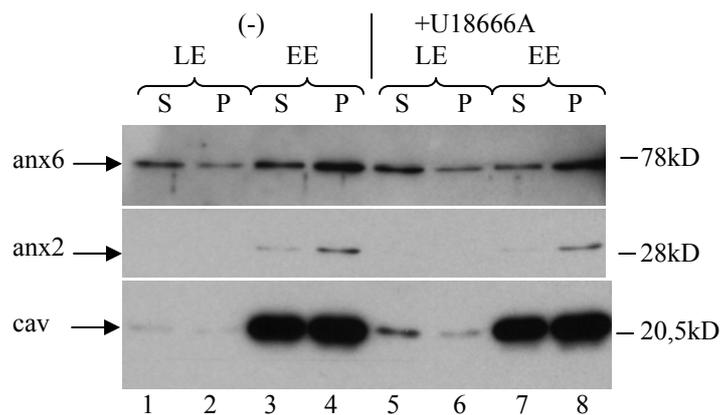


Abb. 3.7) **Anreicherung von Annexin 6 in späten Endosomen nach U18666A-Behandlung.** Je $4-6 \times 10^7$ CHOanx6 Zellen wurden über Nacht unbehandelt belassen oder mit 2 $\mu\text{g/ml}$ U18666A im Medium inkubiert, woraufhin das PNS hergestellt wurde. Nach der Endosomenpräparation wurden die Fraktionen der frühen und späten Endosomen gepoolt und die Membranen aus je 100 μl abzentrifugiert. Anschließend wurden die Membranpellets resuspendiert. Von den Überständen und den resuspendierten Pellets wurden je 10 μl auf einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und mittels Western Blot auf die Verteilung von Annexin 6, Annexin 2 und Caveolin untersucht.

Sowohl vor wie auch nach der Behandlung mit U18666A befand sich der größte Teil des Annexin 6 in den frühen Endosomen und dort zu 60-70% in den Membranpellets (s. Abb. 3.7., vgl. Spuren 1 und 2 mit 3 und 4 bzw. 5 und 6 mit 7 und 8). In den späten Endosomen befand sich der geringere Teil des Annexin 6, mit einer Membranbindung von ca. 40%. Da in den späten Endosomen mehr Annexin 6 im Überstand als im Membranpellet zu finden war, musste davon ausgegangen werden, dass Annexin 6 hier eine lockrere oder dynamischere Membranbindung aufwies als in den frühen Endosomen, die jedoch stark genug war, um diesen Teil des Annexin 6 während der Endosomenpräparation in den Fraktionen der späten Endosomen zu halten. Vergleicht man nun die Summe aus Annexin 6 im Überstand und Pellet in den späten Endosomen (s. Abb. 3.7., vgl. Spuren 1 und 2 mit 5 und 6) so fällt auf, dass nach der Behandlung mit U18666A trotz der weiterhin reduzierten Membranaffinität insgesamt mehr Annexin 6 in den späten Endosomen war als ohne Behandlung. Gleichzeitig war in der Summe ein leichter Rückgang der Menge an

Annexin 6 in den frühen Endosomen zu erkennen (s. Abb. 3.7., vgl. Spuren 3 und 4 mit 7 und 8).

Um die Summe der Annexin-6-Proteine besser analysieren zu können, wurde das Experiment wiederholt, ohne die Membranen durch Zentrifugation anzureichern (s. Abb. 3.8.). Die Wiederholung des Experimentes ohne Zentrifugation zeigt deutlich, dass sich nach der Behandlung mit U18666A mehr Annexin 6 in den späten Endosomen befand (s. Abb. 3.8., vgl. Spur 2 mit Spur 4). Dies deutet auf eine U18666A induzierte Translokation von Annexin 6 aus frühen Endosomen in späte Endosomen hin.

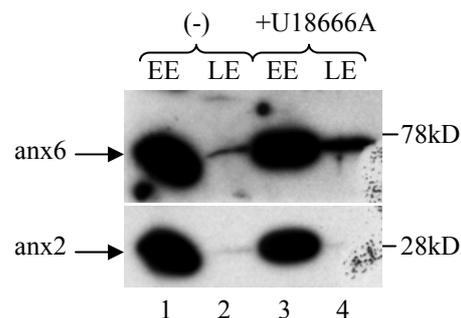


Abb. 3.8) **Anreicherung von Annexin 6 in späten Endosomen nach U18666A-Behandlung.** Von je $4-6 \times 10^7$ unbehandelten und über Nacht mit $2 \mu\text{g/ml}$ U18666A im Medium inkubierten CHOanx6-Zellen wurde das PNS hergestellt. Nach der Endosomenpräparation wurden die Fraktionen der frühen und späten Endosomen gepoolt und je $40 \mu\text{l}$ auf einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Verteilung von Annexin 6 und Annexin 2 untersucht.

Auf die Verteilung von Annexin 2 (s. Abb. 3.7. und 3.8.) zeigte U18666A keine Wirkung. In den Spuren 5 und 6 in der Abb. 3.7. ist eine Erhöhung der Caveolinkonzentration zu erkennen, ein Befund, der so nicht immer in U18666A behandelten Zellen vorkommt (de Diego et al. 2001). Caveolin bindet an Cholesterin in Membranen, spielt eine Rolle bei der Aufnahme und Verteilung von Cholesterin in der Zelle, und eine Überexpression in BHK-Zellen führt ebenfalls zu einer Akkumulation von Cholesterin in späten Endosomen. Dieser Effekt lässt sich durch Kombination von Caveolinüberexpression und U18666A Inkubation sogar noch beschleunigen (Pol et al. 2001). Die Inkubation mit U18666A könnte also zu einer Translokation eines gewissen Anteils des Caveolins geführt haben, die durch die von uns verwendeten Caveolinantikörper, die sich durch eine hohe Affinität auszeichnen, registriert werden konnte. Für ein besseres Verständnis dieser Vorgänge müssen in Zukunft noch weiterführende Experimente durchgeführt werden.

3.3. In vitro Bindungsstudien mit bakteriell exprimiertem GST-Annexin 6 Fusionsprotein an U18666A behandelten Zellen

3.3.1. Erhöhte Bindungsaffinität von GST-Annexin 6 für U18666A behandelte späte Endosomen

Die bisher dargestellten Experimente deuten darauf hin, dass Annexin 6 entweder membranassoziiert von frühen zu späten Endosomen gelangt, oder aus einem anderen Pool, z.B. einem cytosolischen, rekrutiert wird. Deshalb sollte in diesem Teil der Arbeit überprüft werden, ob rekombinantes Annexin 6 eine veränderte Bindungsaffinität für frühe und späte Endosomen aus U18666A behandelten Zellen besitzt. Um dies zu testen, wurden aus U18666A behandelten und unbehandelten CHOwt Zellen die frühen und späten Endosomen isoliert. Je 100 µl der frühen und späten Endosomen wurden 30 min mit 3 µg rekombinantes GST-Annexin 6 Fusionsprotein inkubiert (Pons et al 2001a; Pons et al. 2001b). Anschließend wurden die Proben zentrifugiert, die Membranpellets resuspendiert und die Menge des membranassoziierten GST-Annexin 6 mittels Western Blot bestimmt (s. Abb. 3.9.).

Es zeigte sich, dass GST-Annexin 6 gut an unbehandelte frühe Endosomen bindet (s. Abb. 3.9., Spur 2). Die Bindung an unbehandelte späte Endosomen war jedoch schlecht (s. Abb. 3.9., Spur 4). Nach der Behandlung mit U18666A war die Bindung an frühe Endosomen mit der Bindung an unbehandelte frühe Endosomen vergleichbar (s. Abb. 3.9., vgl. Spur 2 mit Spur 6), was darauf hindeutet, dass U18666A keine Veränderung der Affinität von GST-Annexin 6 für frühe Endosomen bewirkt. Die Affinität für späte Endosomen wurde durch die Behandlung mit U18666A jedoch stark erhöht (s. Abb. 3.9., vgl. Spur 4 und Spur 8). Die erhöhte Cholesterinkonzentration in den Membranen der späten Endosomen führte also zu einer besseren Bindung von GST-Annexin 6.

Beim Vergleich der Bindungsaffinität von Annexin 2 für frühe Endosomen fiel auf, dass die Behandlung mit U18666A auch hier keinen Effekt zeigte (s. Abb. 3.9., vgl. Spur 2 mit Spur 6). In den unbehandelten späten Endosomen war kein Annexin 2 nachweisbar (s. Abb. 3.9., Spur 3 und 4), und in den mit U18666A behandelten späten Endosomen war nur sehr wenig Annexin 2 zu erkennen (s. Abb. 3.9., Spur 8). Das spricht dafür, dass es sich bei dieser Beobachtung um einen für Annexin 6 spezifischen Effekt handelt.

Parallel zu diesen Experimenten wurde die gleiche Prozedur mit CHOanx6 Zellen durchgeführt und entsprechende Ergebnisse erzielt (Daten nicht gezeigt).

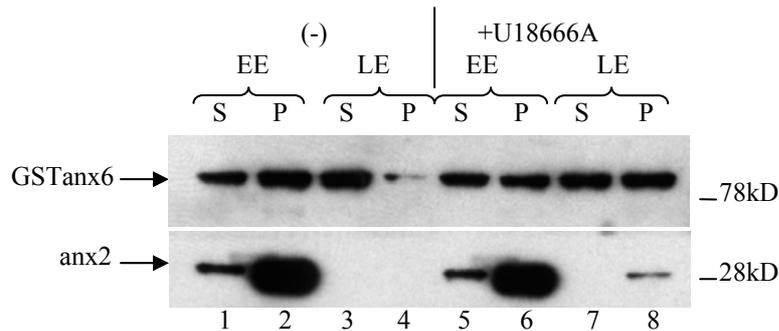


Abb. 3.9) **Cholesterin stimuliert die Bindung von GST-Annexin 6 an späte Endosomen.** Von je $4-6 \times 10^7$ unbehandelten und über Nacht mit $2 \mu\text{g/ml}$ U18666A im Medium inkubierten CHOwt-Zellen wurde das PNS hergestellt. Nach der Endosomenpräparation wurden die Fraktionen der frühen und späten Endosomen gepoolt und je $100 \mu\text{l}$ 30 min mit je $3 \mu\text{g}$ GST-Annexin 6 inkubiert. Anschließend wurden die Proben 1 h bei 45000 rpm zentrifugiert und die Membranpellets resuspendiert. Je $32 \mu\text{l}$ wurden auf einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und mittels Western Blot auf die Verteilung von Annexin 6 und Annexin 2 untersucht.

3.3.2. Einfluss von Calcium auf die U18666A stimulierte Bindung von GST-Annexin 6 an späte Endosomen

Nachdem gezeigt worden war, dass sich die Membranaffinität von Annexin 6 durch eine Erhöhung des Cholesterinanteils in der Membran verstärken ließ, stellte sich die Frage, ob diese cholesterinabhängige Bindung auch durch Calcium zu beeinflussen war, oder ob die Zunahme der Membranaffinität ein calciumunabhängiger Prozess war. Um dies zu überprüfen, wurden je $4-6 \times 10^7$ CHOwt Zellen und CHOanx6 Zellen unbehandelt belassen und über Nacht mit $2 \mu\text{g/ml}$ U18666A im Medium inkubiert und das PNS hergestellt. Nach der Endosomenpräparation wurden die Fraktionen der späten Endosomen gepoolt und je $100 \mu\text{l}$ 30 min mit je $3 \mu\text{g}$ GST-Annexin 6 inkubiert. Die so hergestellten Proben wurden mit aufsteigenden Calciumkonzentrationen versetzt und anschließend zentrifugiert. Von den Überständen und den resuspendierten Membranpellets wurden je $32 \mu\text{l}$ auf einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und mittels Western Blot auf die Verteilung von GST-Annexin 6, Annexin 2 und Caveolin untersucht (s. Abb. 3.10).

In den späten Endosomen der CHOwt Zellen und der CHOanx6 Zellen ohne Calciumzusatz zeigte sich sowohl mit wie auch ohne Behandlung mit U18666A eine Membranbindung des GST-Annexin 6 von 50-60% (s. Abb. 3.10., A/B, Spuren 1 und 2). Daran änderte sich auch nichts, nachdem 500 nM Calcium hinzugefügt wurden (s. Abb. 3.10., A/B, Spuren 3 und 4). Auch bei einer Calciumkonzentration von $5 \mu\text{M}$ kam es zu keiner Affinitätssteigerung in den unbehandelten späten Endosomen, wohingegen in den

mit U18666A behandelten späten Endosomen eine deutliche Affinitätssteigerung zu erkennen war (s. Abb. 3.10., A/B, vgl. Spuren 5 und 6 unbehandelt/behandelt). Bei einer Calciumkonzentration von $50\mu\text{M}$ kam es auch in den unbehandelten späten Endosomen zu einer Affinitätszunahme, und in den behandelten späten Endosomen nahm die Membranaffinität des GST-Annexin 6 sogar noch zu (s. Abb. 3.10., A/B, Spuren 7 und 8). Die Verteilung von Annexin 2 und Caveolin blieb in diesem Experiment unverändert. Die Verstärkung der Membranaffinität des GST-Annexin 6 durch die Erhöhung des Cholesterins in den Membranen und die Erhöhung der Calciumkonzentration weist darauf hin, dass Calcium auch bei der cholesterinabhängigen Bindung des Annexin 6 eine wichtige Rolle spielt.

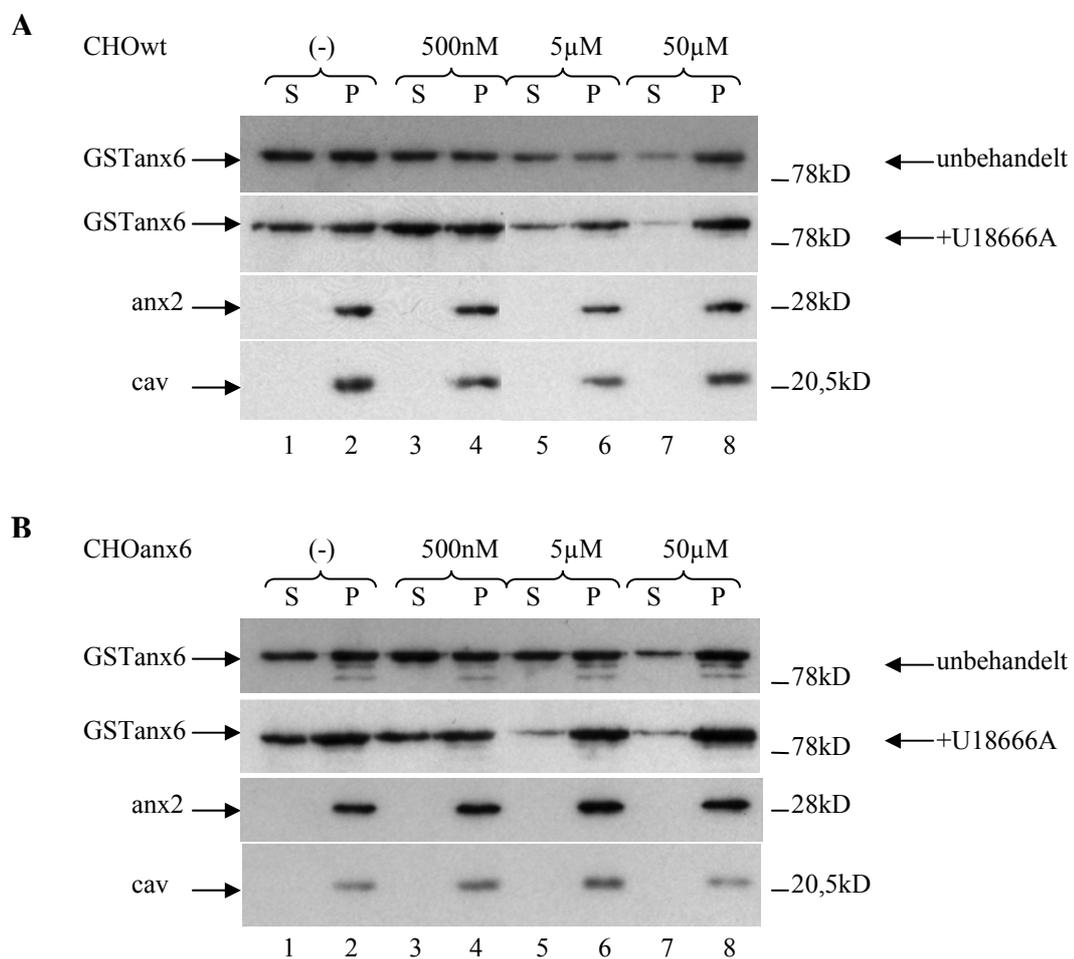


Abb. 3.10) **Calcium verstärkt die cholesterinabhängige Bindung von GST-Annexin 6 an späten Endosomen.** Von je $4-6 \times 10^7$ unbehandelten und über Nacht mit $2\mu\text{g/ml}$ U18666A im Medium inkubierten CHOwt-Zellen (A) und CHOanx6-Zellen (B) wurde das PNS hergestellt. Nach der Endosomenpräparation wurden die Fraktionen der späten Endosomen gepoolt und je $100\mu\text{l}$ 30 min mit je $3\mu\text{g}$ GST-Annexin 6 und Calcium (500 nM , Spuren 3 und 4, $5\mu\text{M}$, Spuren 5 und 6, und $50\mu\text{M}$, Spuren 7 und 8) inkubiert. Anschließend wurden die Proben 1 h bei 45000 rpm zentrifugiert und die Membranpellets resuspendiert. Je $32\mu\text{l}$ wurden auf einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und mittels Western Blot auf die Verteilung von GST-Annexin 6, Annexin 2 und Caveolin untersucht. Die Bandenverteilung für Annexin 2 und Caveolin war mit und ohne U18666A identisch.

3.4. Die U18666A induzierte Anreicherung von Cholesterin führt zur Translokation von Annexin 6 in späte Endosomen

3.4.1. Kolokalisationsstudien an U18666A behandelten Zellen bestätigen die Translokation von Annexin 6 in cholesterinreiche späte Endosomen

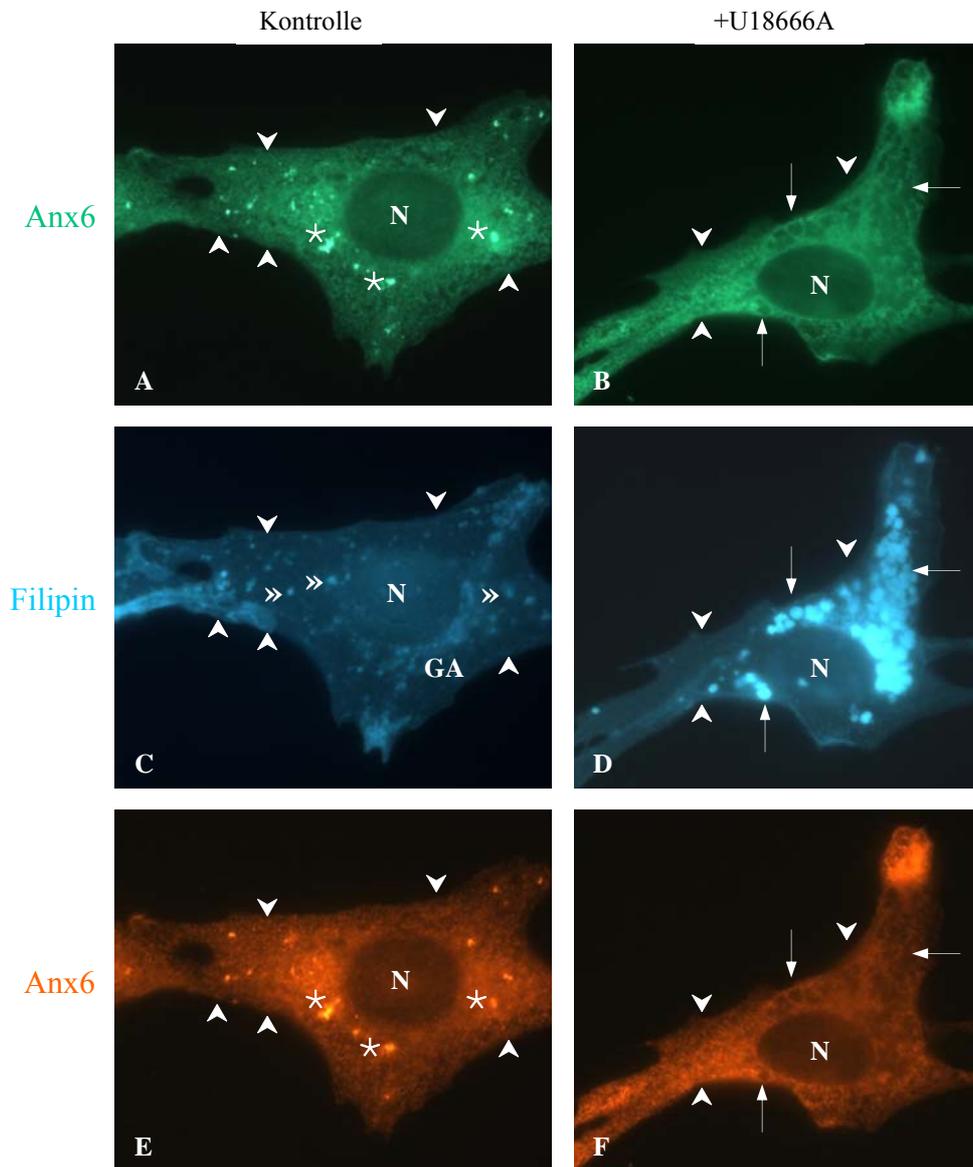


Abb. 3.11) **Kolokalisation von Annexin 6 und cholesterinreichen späten Endosomen.** CHOanx6-Zellen wurden auf Deckgläschen herangezüchtet und unbehandelt belassen bzw. über Nacht mit 2 µg/ml U18666A im Medium inkubiert. Anschließend wurden sie fixiert, permeabilisiert und mit Anti-Annexin 6 (A, B), Filipin (C, D) und Anti-GST-Annexin 6 (E, F) markiert. Die Bilder A, C und E bzw. B, D und F zeigen jeweils dieselbe Zelle. Die gestielten Pfeile deuten auf einige der filipinmarkierten cholesterinreichen späten Endosomen, welche von markiertem Annexin 6 umgeben sind (B, D, F). N markiert jeweils den Zellkern. In Bild C ist der Golgiapparat (GA) und einige frühe Endosomen (ungestielte Doppelpfeile) zu erkennen. Die ungestielten Pfeile markieren die Plasmamembran. Die mit Sternen markierten Aufhellungen (A, E) sind Artefakte.

Nachdem mit den oben beschriebenen biochemischen Analysen gezeigt werden konnte, dass sich das Cholesterin in CHO Zellen nach U18666A Behandlung in den späten Endosomen anreichert und dass dort ebenfalls eine größere Menge Annexin 6 nachzuweisen ist, sollten beide Effekte parallel mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellt werden. Zu diesem Zweck wurden auf Deckgläschen herangewachsene CHOwt- und CHOanx6 Zellen über Nacht mit 2 µg/ml U18666A inkubiert, fixiert und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern und Filipin inkubiert. Die CHOanx6 Zellen eigneten sich, um eine Kolo-kalisation von Cholesterin und Annexin 6 zu zeigen (s. Abb. 3.11.), die CHOwt Zellen enthielten so wenig endogenes Annexin 6, dass die Aufnahmen nicht geeignet waren, um hier gezeigt zu werden.

Die Filipinfärbung der unbehandelten Zellen ließ deutlich die Plasmamembran (s. Abb. 3.11., C, ungestielte Pfeile), den Zellkern (s. Abb. 3.11., C, N), den Golgiapparat (s. Abb. 3.11., C, GA) und einige frühe Endosomen (s. Abb. 3.11., C, ungestielte Doppelpfeile) erkennen. In den Antikörperfärbungen der unbehandelten Zellen erkannte man den Zellkern (s. Abb. 3.11., A/E, N), die Plasmamembran (s. Abb. 3.11., A/E, ungestielte Pfeile) und eine homogene Annexin-6-Verteilung (s. Abb. 3.11., A, grün bzw. E, rot). Dabei ließ sich die Verteilung des Annexin 6 mit den zwei unterschiedlichen Antikörpern identisch darstellen.

Nach der Behandlung mit U18666A erkannte man in der Filipinfärbung wieder den Zellkern (s. Abb. 3.11., D, N), die Plasmamembran (s. Abb. 3.11., D, ungestielte Pfeile) und die cholesterinbeladenen späten Endosomen um den Zellkern (s. Abb. 3.11., D, gestielte Pfeile). Frühe Endosomen waren nicht mehr zu erkennen. Die Antikörperfärbung der mit U18666A behandelten Zellen ließ ebenfalls den Zellkern und die Plasmamembran erkennen (s. Abb. 3.11., B/F, N bzw. ungestielte Pfeile). Das durch Antikörper markierte Annexin 6 war diesen Zellen aber netzartig angeordnet, wobei die Aussparungen in der Färbung der Lokalisation der cholesterinbeladenen späten Endosomen entsprach (s. Abb. 3.11., B/F, gestielte Pfeile). Dieses netzartige Erscheinungsbild könnte eine Anlagerung des Annexin 6 an cholesterinreiche späte Endosomen darstellen.

3.5. Vergleichende Analyse von Annexin 6 mit einem frühen endosomalen Marker (EEA1) in U18666A behandelten Zellen

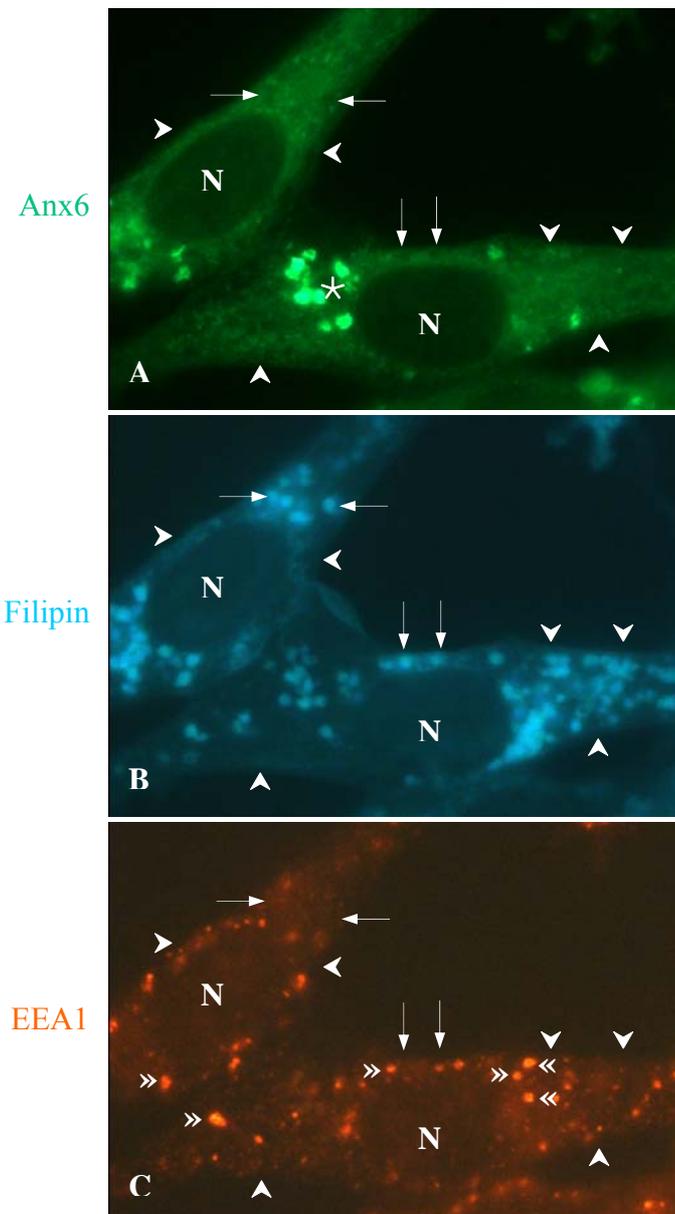


Abb. 3.12) **Keine Kolo-kalisation für EEA1 und cholesterinreiche Strukturen.** CHOanx6-Zellen wurden auf Deckgläschen herangezuehtet und ueber Nacht mit 2 µg/ml U18666A im Medium inkubiert. Anschließend wurden sie fixiert, permeabilisiert und mit Anti-GST-Annexin 6 (A), Filipin (B) und Anti-EEA1 (C) markiert. A, B und C zeigen dieselben Zellen. Die gestielten Pfeile markieren vier Stellen, an denen die in 3.4. beschriebene Kolo-kalisation in A und B zu erkennen ist. In C sind dieselben Stellen durch Pfeile markiert. Man erkennt weiterhin den Zellkern (N) und die Plasmamembran (ungestielte Pfeile). Die Aufhellungen um den Stern in Bild A sind Artefakte. Die ungestielten Doppelpfeile in Bild C markieren fruehe Endosomen.

In den unter 3.4. gezeigten Bildern stellte sich die Kolo-kalisation von Annexin 6 und cholesterinbeladenen spaeten Endosomen durch Aussparungen der Annexin 6 Markierung an den Stellen, wo sich cholesterinreiche Strukturen befanden dar. Die Lokalisation von fruehen Endosomen in dieser Zelle war jedoch vollkomeun klar. Die starke Akkumulation von Cholesterin koennte zu einer erhoehten Konzentration von spaeten Endosomen gefuehrt und die fruehen Endosomen verdraengt haben. Um dies zu ueberpruefen,

wurden den in 3.4. gezeigten Aufnahmen entsprechende Aufnahmen mit einem Marker für frühe Endosomen EEA1 (early endosome antigen 1) gemacht und die Lokalisation von Annexin 6 und EEA1 verglichen (s. Abb. 3.12.). EEA1 ist an der Regulation des Membranverkehrs in frühen Endosomen beteiligt und kann als für frühe Endosomen spezifischer Marker verwendet werden (Mu et al. 1995).

An den durch gestielte Pfeile in den Bildern A-C der Abb. 3.12. markierten Stellen erkannte man die scheinbare Assoziation von Annexin 6 mit cholesterinreichen späten Endosomen. Wieder zeigten sich in der Anti-GST-Annexin-6-Färbung Aussparungen, die den cholesterinreichen Strukturen in der Filipinfärbung entsprachen (s. Abb. 3.12., A/B, gestielte Pfeile). Vergleich man dagegen die entsprechenden Stellen in der EEA1-Färbung, so fanden sich dort weder Aussparungen noch Signalverstärkungen (s. Abb. 3.12, C, gestielte Pfeile). Stattdessen waren durch EEA1 markierte frühe Endosomen zu erkennen, die eine typische Verteilung zeigten (s. Abb. 3.12, C, ungestielte Doppelpfeile).

Die fehlende Kolo-kalisation von Annexin 6 und frühen Endosomen lässt vermuten, dass U18666A zu einer Assoziation von Annexin 6 mit späten Endosomen führt und die Annexin-6-Konzentration in frühen Endosomen reduziert.

4.) Diskussion

4.1. Calcium- und cholesterinabhängige Bindung von Annexinen an Membranen

Allen Annexinen gemeinsam ist ihr calciumabhängiges Bindungsvermögen an anionische Phospholipide, und zwar mit absteigender Affinität an Phosphatidsäure, Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylinositol. Einige Annexine binden an neutrale Phospholipide wie Phosphatidylethanolamin, jedoch nicht an Phosphatidylcholin (PC) oder Sphingomyelin (Raynal und Pollard 1994). Die Calcium- und Phospholipidbindung der Annexine wird durch die hoch konservierte Kerndomäne bewerkstelligt. Die Kerndomäne bildet dabei eine leicht gebogene Scheibe. Auf der konvexen Seite dieser Scheibe werden zwischen den Helices A und B sowie D und E der Kerndomäne Typ II und Typ III Calciumbindungsstellen gebildet, an die gebunden Calcium als Brückenbaustein bei der Interaktion von Annexinen mit Phospholipiden fungiert (Huber et al. 1990; Wenig et al. 1993; Swairjo et al. 1995). Diese Phospholipide kommen in sämtlichen biologischen Membranen vor. Da die einzelnen Annexine aber einem jeweils spezifischen Verteilungsmuster unterliegen und nicht gleichmäßig über die ganze Zelle verteilt sind, kann die calciumabhängige Bindung an Phospholipide nicht als alleiniger Regulationsmechanismus angesehen werden (Babiychuk und Draeger 2000). So sind sicherlich die Lipidkompositionen in den verschiedenen Membranen und die Faktoren, die für die verschiedenen Verteilungsmustern der Lipide in diesen Membranen verantwortlich sind, regulatorisch beteiligt (s. u.). Als weiterer Regulationsmechanismus wird die pH abhängige Affinitätsänderung diskutiert (Ayala-Sanmartin 2001; Golczak et al. 2001a).

Während für Annexin 2 neben der calciumabhängigen Bindung eine cholesterinabhängige, calciumunabhängige Bindung beschrieben wurde (Harder et al. 1997; Jost et al. 1997; König und Gerke 2000; Ayala-Sanmartin 2001; Ayala-Sanmartin et al. 2001), wurde für Annexin 5 und Annexin 6 zumindest eine cholesterinabhängige Erhöhung der calciumabhängigen Membranbindung beobachtet (Ayala-Sanmartin 2001). Dies deutet darauf hin, dass neben Phospholipiden auch andere Lipide wie Cholesterin einen Einfluss auf die Lokalisation von Annexinen haben können. Die in dieser Arbeit identifizierte cholesterinabhängige Bindung von Annexin 6 bestätigt diese Vermutung (s. 3.1.1.).

4.1.1. Cholesterinabhängige Bindung von Annexin 2 an Membranen

Die meisten der heutigen Erkenntnisse über das Bindungsverhalten der Annexine resultieren aus Studien an Annexin 2.

Annexin 2 ist vermutlich an sekretorischen und endozytotischen Vorgängen beteiligt und wird an der Plasmamembran und an frühen Endosomen gefunden (Sarafian et al. 1991; Emans et al. 1993; Harder und Gerke 1993). Es existiert in Zellen als Monomer, auch als p36 bezeichnet, und als Heterotetramer, welches aus zwei schweren Ketten, p36 Proteinen, und zwei leichten Ketten, p11 Proteinen aus der Familie der S100 Proteine, besteht. Beide Formen binden calciumabhängig an Membranen, wobei diese Bindung, unabhängig von der Bindung zu p11, durch den C-terminalen Kern von p36 (Seitenketten 30-338) reguliert wird (Glenney 1986; Johnsson et al. 1986; Drust und Creutz 1988). Für eine solche Bindung an Membranen ist es nötig, dass in der entsprechenden Membran anionische Phospholipide wie PS oder Phosphatidylinositol enthalten sind (Ayala-Sanmartin 2001; Ayala-Sanmartin et al. 2001). Die Calciumsensitivität dieser Bindung wird teilweise durch das N-terminale Ende der schweren p36 Kette (Seitenketten 1-29) reguliert, welches auch die Bindungsstellen für die leichte p11 Kette enthält (Seitenketten 1-14) (Becker et al. 1990; Johnsson et al. 1988).

Für die calciumunabhängige, cholesterinabhängige Bindungsfähigkeit des Annexin 2 ist ebenfalls das Vorhandensein des N-terminalen Endes (Seitenketten 15-24) nötig (Jost et al. 1997). Allerdings scheint das N-terminale Ende nicht direkt an der Membranbindung beteiligt zu sein, und Cholesterin selbst wurde bisher nicht als Bindungspartner für Annexin 2 angesehen, sondern PS (Ayala-Sanmartin 2001; Ayala-Sanmartin et al. 2001). Ayala-Sanmartin *et al.* stellten die These auf, dass Cholesterin die Formierung oder Stabilisierung PS reicher Mikrodomänen induziert, welche die Interaktion zwischen Annexin 2 und PS begünstigen würden. Da PS mit der C-terminalen Kerndomäne des Annexinmoleküls interagiert, wird für das für die cholesterinabhängige Bindung benötigte N-terminale Ende eine die Kerndomäne modulierende Interaktion mit derselben vorgeschlagen (Ayala-Sanmartin 2001; Ayala-Sanmartin et al. 2001).

Gruenberg und Mitarbeiter (Mayran et al. 2003) postulierten eine physische Interaktion von Annexin 2 mit Cholesterin. Nach ihren Daten ist Annexin 2 sogar an der Bildung cholesterinreicher Mikrodomänen in frühen Endosomen beteiligt und trägt so zur Änderung der Lipidkomposition in der Membran bei, was für die Bildung von

endosomalen Transportvesikeln (endosomal carrier vesicle, ECV) nötig ist. ECV sind das Bindeglied im Transport von frühen zu späten Endosomen.

Des Weiteren entdeckten Gruenberg und Mitarbeiter eine Verschiebung von Annexin 2 in späte Endosomen in NPC Fibroblasten und konnten dieses Phänomen mit U18666A nachvollziehen (Mayran et al. 2003, siehe auch 3.2.). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in CHO Zellen weisen jedoch keine Verschiebung von Annexin 2 in späte Endosomen auf. Der Grund dafür ist in der Verwendung verschiedener Zelltypen und der unterschiedlichen Inkubationsdauer der Zellen mit U18666A zu suchen. Gruenberg und Mitarbeiter inkubierten ihre Zellen über 16 Stunden, um entsprechende Ergebnisse zu erhalten. Da unsere Inkubationszeiten unter diesem Wert lagen, war es noch zu keiner ausreichenden Rekrutierung von Annexin 2 aus dem Zytosol gekommen.

4.1.2. Cholesterinabhängige Bindung von Annexin 6 an Membranen

Annexin 6 wurde erstmals an der Plasmamembran von Rattenhepatozyten (Tagoe et al. 1994; Weinman et al. 1994), Erythrozyten (Bandorowicz et al. 1992) und Brustgewebe (Lavialle et al. 2000) entdeckt. Ebenso interagiert Annexin 6 mit dem Aktinzytoskelett in Fibroblasten (Hosoya et al. 1992) und glatten Muskelzellen, in welchen es eventuell als Calciumsensor fungiert (Babiychuk et al. 1999; Babiychuk und Draeger 2000). Auch in Phagosomen von J774 Makrophagen wurde Annexin 6 entdeckt (Desjardins et al. 1994).

Die Anreicherung von Annexin 6 in Rattenleberendosomen (Jäckle et al. 1994; Tagoe et al. 1994), seine polarisierte Lokalisation in den apikalen Endosomen in Rattenhepatozyten (Ortega et al. 1998) und WIF-B Zellen (Pons et al. 2000) und die Kolo-kalisation mit Igp120, einem prälysosomalen Marker, in NRK (normal rat kidney) Zellen (Pons et al. 2000) weisen auf eine Rolle in endozytotischen Vorgängen für Annexin 6 hin. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung bestärkt, dass Annexin 6 an der Plasmamembran β -Spectrin bindet, was zur Rekrutierung einer calpainartigen Protease führt. Diese Ereigniskaskade scheint das aktincorticale Zytoskelett zu öffnen und damit die initialen Schritte der Endozytose zu erleichtern (Lin et al. 1992; Kamal et al. 1998).

Die Mechanismen, welche zu der spezifischen Verteilung von Annexin 6 in der Zelle führen, sind kaum erforscht. Als Mitglied der Annexinfamilie bindet Annexin 6 natürlich calciumabhängig an anionische Phospholipide. In Endosomen sind, verglichen mit der Plasmamembran, verhältnismäßig reich an Sphingomyelin und PS (Urade et al. 1988).

Letzteres würde eine Bindung von Annexinen generell unterstützen, trotzdem ist Annexin 6 nicht an allen Membranen zu finden, die PS enthalten.

Wie schon erwähnt ist eine cholesterininduzierte Begünstigung der calciumabhängigen Annexin 6 Bindung bekannt (Ayala-Sanmartin 2001). Zusätzlich wurde Annexin 6 in Assoziation mit Lipid Rafts beobachtet (Babiyuchuk und Draeger 2000; Orito et al. 2001). Lipid Rafts sind laterale Lipidzusammenlagerungen in zellulären Membranen, welche mit Cholesterin und Sphingolipiden angereichert sind. Als eine Art Plattform für Rezeptoren und Komponenten von Signaltransduktionskaskaden sind sie mit GPI-AP (glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins) an der Zelloberfläche und mit Kinasen der src-Familie an der zytoplasmatischen Seite assoziiert. Lipid Rafts sind unlöslich in nichtionischen Detergentien und können somit als DIGs (detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membrane domains) isoliert werden (Parton und Simons 1995; Harder und Simons 1997; Brown und London 1998a; Brown und London 1998b).

Für Annexin 2 und Annexin 6 wurde eine calciumabhängige Bindung an solche Lipid Rafts beschrieben. Diese Bindung an ist cholesterinabhängig oder zumindest durch Cholesterin beeinflusst, da sich ein Teil der gebundenen Annexine durch Cholesterinsequestrierung von den Lipid Rafts lösen lässt. Annexin 2 ist dabei an der Bildung der Lipid Rafts beteiligt (Babiyuchuk und Draeger 2000).

Arbeiten der AG Grewal ergaben, dass Annexin 6 Überexprimierung gemeinsam mit LDL Rezeptorüberexprimierung zu einer vermehrten LDL Aufnahme und einer ligandengebundenen Verschiebung von Annexin 6 in späte Endosomen führt (Grewal et al. 2000; Pons et al. 2001a). LDL gelangt nach der Endozytose über die frühen Endosomen in die späten Endosomen. Von dort gelangt Cholesterin als Hauptbestandteil des LDL über die Membranen der späten Endosomen zur Plasmamembran oder zum TGN (trans-Golgi-Network) (Chen et al. 2001). Das Cholesterin, welches die Membran der späten Endosomen passiert, führt zu einer Änderung der Lipidzusammensetzung der jeweiligen Membran, was in der Änderung der Membranaffinität für Annexin 6 nach LDL Akkumulation zum Ausdruck kommt (s. 3.3.-3.5.). Zusammen mit der Beobachtung, dass Annexin 6 in Verbindung mit der erhöhten LDL Aufnahme in späte Endosomen verschoben wird, führte zu der Annahme, dass das Cholesterin in der Endosomenmembran ein wesentlicher Faktor dieser Verschiebung sein könnte.

Die Frage, inwiefern Cholesterin die Membranbindung von Annexin 6 beeinflusst, führte zu den *in vitro* Versuchen mit Digitonin, in Anlehnung an die Tatsache, dass Annexin 2 durch die digitonininduzierte Cholesterinsequestrierung von Membranen gelöst werden

kann (Harder et al. 1997; Jost et al. 1997). Vorläufige Ergebnisse der AG Grewal deuteten zudem darauf hin, dass es einen Pool von Annexin 6 gibt, der nicht calciumabhängig ist. Das ließ sich durch die Behandlung von PNS mit EDTA bestätigen, welches ca. 90% des membrangebundenen Annexin 6 löste (Daten nicht gezeigt). Die verbleibenden 10% des membrangebundenen Annexin 6 erwiesen sich als cholesterinsensitiv, da sie durch eine digitonininduzierte Cholesterinsequestrierung von der Membran gelöst werden konnten (s. 3.1.1.). Damit wurde erstmals ein cholesterinsensitiver Annexin 6 Pool nachgewiesen. Die Stabilität der Bindung dieses Annexin 6 Pools an die Membranen auch nach mehrfacher EDTA Behandlung spricht für eine calciumunabhängige Bindung. Ob nun die Umverteilung des Cholesterins in der Membran eine direkte Interaktion von Annexin 6 mit Cholesterin inhibiert oder die Membrandomäne derart verändert, dass Annexin 6 nicht mehr binden kann bleibt noch herauszufinden.

Die *in vivo* Versuche mit Digitonin brachten keine nennenswerten Ergebnisse (3.1.2.), was darauf zurückzuführen sein wird, dass die volle Ausprägung des Digitonineffekts *in vitro* erst nach vorheriger EDTA Behandlung sichtbar wurde. Falls sich Digitonin *in vivo* auf die Membranaffinität von Annexin 6 auswirkt, wurde dieser Effekt in den entsprechenden Versuchen durch den calciumabhängigen Annexin 6 Pool verdeckt.

Da die digitonininduzierte Cholesterinsequestrierung zu einer schlechteren Membranbindung für Annexin 6 führte und im Umkehrschluss ein erhöhter Cholesteringehalt in Membranen zu einer besseren Membranbindung führen könnte, sollte versucht werden, endosomale Membranen *in vivo* mit Cholesterin anzureichern. Wie unter 3.2. beschrieben war es mit U18666A möglich, Cholesterin in späten Endosomen zu akkumulieren. Die Etablierung des Systems erwies sich als sehr effizient, da das im Medium enthaltene FCS ausreichend Lipoproteine und Cholesterin enthielt, um zu einer Akkumulation in späten Endosomen zu führen.

Die mit Hilfe der Western Blot Analysen gezeigte U18666A induzierte Translokation des Annexin 6 in die späten Endosomen (3.2.3.) könnte einem ähnlichen Mechanismus unterliegen haben, wie die LDL induzierte Translokation von Annexin 6 in späte Endosomen (Grewal et al. 2000). Da U18666A den Transport von Cholesterin aus den späten Endosomen inhibiert, herrschen ähnliche Bedingungen, wie bei der Internalisierung und Akkumulation von LDL in späten Endosomen. Ob nun das in die späten Endosomen translozierte Annexin 6 überhaupt durch den erhöhten Cholesterinanteil in den späten Endosomen dorthin verschoben wurde oder ob Annexin 6 das Cholesterin auf dem Weg der Internalisierung durch die endosomalen Kompartimente begleitet sollte durch die

Experimente überprüft werden, in denen GST-Annexin 6 nachträglich zu den isolierten späten Endosomen aus U18666A behandelten CHOwt Zellen hinzugefügt wurde (3.3.). Da sich auch hier eine deutliche Affinitätssteigerung des GST-Annexin 6 zu den Membranen der späten Endosomen nach U18666A Behandlung zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass die Translokation von Annexin 6 in späte Endosomen durch die erhöhte Bindungsaffinität von Annexin 6 für cholesterinreiche Membranen hervorgerufen wird. Somit könnte Annexin 6 aus dem Zytosol an späte Endosomen rekrutiert werden, anstatt den endosomalen Weg mitzuwandern.

Obwohl anfangs gezeigt werden konnte, dass die cholesterinabhängige Membranbindung des Annexin 6 auch calciumunabhängig funktioniert (3.1.), ließ sich durch Western Blot Analysen von Proben mit ansteigender Calciumkonzentration zeigen, dass sie trotzdem durch Calcium begünstigt wird (3.3.2.). Hier wird die Komplexität des Zusammenspiels von Calciumabhängigkeit und Cholesterinabhängigkeit der Membranbindung des Annexin 6 deutlich. Welche Domänen im Annexin 6 Molekül für diese Bindung verantwortlich sind, ob Cholesterin direkt mit Annexin 6 interagiert und ob es die gleichen oder ähnliche Mechanismen sind wie beim Annexin 2 bleibt durch nachfolgende Experimente herauszufinden.

4.1.3. Vergleich der cholesterinabhängigen Bindung von Annexin 2 und Annexin 6

Annexin 2 und Annexin 6 binden sowohl calciumabhängig an Membranen wie auch calciumunabhängig in Anwesenheit von Cholesterin. Es liegt aber auf der Hand, dass diese beiden Proteine intrazellulär weiteren komplexen Regulationsmechanismen unterliegen, zu welchen pH Wert und Zytoskelett gerechnet werden können. Gruenberg und Mitarbeiter stellten die Bedeutung von Annexin 2 bei der Bildung von ECV in frühen Endosomen dar und postulierten, dass Annexin 2 an der Formung oder Stabilisierung cholesterinreicher Mikrodomänen, ähnlich den Lipid Rafts, beteiligt sei, um so eine Änderung der Membranlipidkomposition zu bewirken und die Bildung von ECV zu ermöglichen (Mayran et al. 2003).

Annexin 6 ist am Membranverkehr in späten Endosomen beteiligt (Grewal et al. 2000; Pons et al. 2001a) und scheint schneller als Annexin 2 in cholesterinreichen späten Endosomen zu akkumulieren, wenn Zellen mit U18666A behandelt werden, was daran liegen könnte, dass die späten Endosomen eine Primärlokalisierung für Annexin 6 darstellen. Hierzu sollten vergleichende Analysen durchgeführt werden.

Auch in späten Endosomen existieren Lipid Raft artige Membrandomänen (Fivaz et al. 2002). Es wäre also durchaus denkbar, dass Annexin 6 in späten Endosomen, ähnlich wie Annexin 2 in frühen Endosomen, an der Modulation der Membranlipidkomposition beteiligt ist, um den geregelten Membranverkehr zu gewährleisten.

4.2. Charakterisierung der Bindung von Annexin 6 an späte Endosomen mittels Immunfluoreszenz

Durch Western Blot Analysen konnte die erhöhte Membranaffinität von Annexin 6 an cholesterinreichen späten Endosomen demonstriert werden. Um diese Ergebnisse auf eine zweite Art und Weise zu bestätigen wurde die Verteilung von Cholesterin und Annexin 6 in behandelten und unbehandelten Zellen mittels Immunfluoreszenz dargestellt (3.2., 3.4., 3.5.). Dabei zeigte vor allem die Anfärbung des intrazellulären Cholesterins eine dramatische Akkumulation des Cholesterins in Kernnähe nach U18666A Behandlung (3.2.2.).

Die CHOwt Zellen zeichnen sich durch einen vergleichsweise geringen Anteil endogenen Annexin 6 aus (Grewal et al. 2000; Pons et al. 2001a). Deshalb waren sie ungeeignet, um die Verteilung von Annexin 6 mittels Immunfluoreszenz darzustellen. Da sich die CHOanx6 Zellen in den vorherigen Experimenten (3.1. – 3.3.) in ihrem Verhalten nicht von den CHOwt Zellen unterschieden, gingen wir davon aus, dass wir sie als zuverlässiges Versuchsobjekt für die Immunfluoreszenzmikroskopie verwenden könnten.

In der Immunfluoreszenz zeigten die CHOanx6 Zellen nach der Markierung von Annexin 6 eine diffuse Zellfärbung, was auf einen hohen zytoplasmatischen Anteil von Annexin 6 Proteinen hinweist (Grewal et al. 2000, siehe auch 3.4., 3.5.). Dieser hohe Anteil an zytoplasmatischem Annexin 6 ließe sich dadurch erklären, dass das Expressionsniveau der CHOanx6 Zellen so hoch ist, dass nicht genügend freie Bindungsstellen für Annexin 6 zur Verfügung stehen, um sämtliches exprimiertes Annexin 6 unterzubringen, weshalb ein Großteil des Annexin 6 ins Zytoplasma ausweichen muss.

Die parallele Darstellung von Cholesterin und Annexin 6 ergab keine direkte Kolo-kalisation (3.4.). Das wäre der Fall gewesen, wenn die Akkumulation von Cholesterin in späten Endosomen zu einer Translokation von Annexin 6 in das Lumen der späten Endosomen führen würde. Annexin 6 kann in Endosomen und Lysosomen nachgewiesen werden, der Hauptanteil bindet jedoch von der zytoplasmatischen Seite der Endosomen (Cuervo et al. 2000; Golczak et al 2001b). Das lässt sich durch die durchgeführte

Immunfluoreszenz bestätigen, da das Fluoreszenzmuster des Annexin 6 in den mit U18666A behandelten Zellen eine netzartige Verteilung aufweist, deren Aussparungen den Positionen der cholesteringefüllten Endosomen entsprechen (s. Abb. 3.11., Abb. 3.12.). Dieses Verteilungsmuster entspricht dem Annexin 6, welches sich um die cholesterinbeladenen späten Endosomen herum angelagert hat.

Die zusätzliche Darstellung der Verteilung von EEA1 in U18666A behandelten Zellen (3.5.) bestätigt die Beobachtung, dass sich Annexin 6 vermehrt um cholesterinreiche späte Endosomen herum anlagert, da die durch EEA1 dargestellten frühen Endosomen keine Kolo-kalisation mit den cholesterinreichen Strukturen aufweisen und im netzförmigen Muster der Annexin 6 Verteilung keine Aussparungen an den Stellen zu finden sind, die den Lokalisationen der markierten frühen Endosomen entsprechen.

4.3. Rolle der calcium- und cholesterinregulierten Bindung von Annexin 6 beim Targeting von LDL Cholesterin in späte Endosomen

Es wird vermutet, dass Annexin 6 durch seine Interaktion mit Calpain und Spectrin an der Plasmamembran die Ausknospung clathrinumhüllter Vesikel ermöglicht (Watanabe et al. 1994; Kamal et al. 1998; Michaely et al. 1999). Außerdem wurde eine Assoziation von Annexin 6 und Dynamin, einer für das Abdocken von endozytotischen Vesikeln von der Plasmamembran essentiellen GTPase, in endozytotischen und transferrin-positiven Vesikeln beschrieben (Turpin et al. 1998). In vorangegangenen Arbeiten der AG Grewal wurde eine LDL induzierte Annexin 6 Verschiebung in späte Endosomen dargestellt (Grewal et al. 2000). Des Weiteren führte die Mikroinjektion einer dominant negativen Annexin 6 Mutante, welche sich durch den Verlust der calciumvermittelten Membranaffinität auszeichnet, nicht nur zu verminderter Endozytose von LDL, sondern auch zur Akkumulation großer LDL haltiger Vesikel in Kernnähe (Kamal et al. 1998; Pons et al. 2001a). Diese Tatsachen deuten darauf hin, dass die Interaktionen von Membranen und zytoskelettalen Bestandteilen mit Annexin 6 nicht nur an der Ausknospung von clathrinumhüllten Vesikeln an der Zellmembran beteiligt sind, sondern dass Annexin 6 den lysosomalen Weg endozytotischer Vesikel über zwischenzeitliche Kontakte mit zytoskelettalen Strukturen steuert.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass Annexin 6 sich nach der Ausknospung und Ablösung der endozytierten Vesikel von diesen löst und ins Zytoplasma diffundiert, um späten von dort an anderer Stelle rekrutiert zu werden. Dafür sprechen die calciumabhängige und

stressinduzierte Translokation von plasmamembranständigem Annexin 6 in das Zytoplasma (Hoyal et al. 1994) und die calciuminduzierte reversible Formation von Membran-Zytoskelett Komplexen in glatten Muskelzellen (Babiychuk et al. 1999).

Damit wäre aber noch nicht geklärt, wie Annexin 6 seine Zielmembran findet. Annexin 6 ist überwiegend mit sauren prälysosomalen Strukturen in polarisierten wie auch unpolarisierten Zellen assoziiert (Pons et al. 2000; Pons et al. 2001a). Das könnte auf eine pH Abhängigkeit der Annexin 6 Bindung an Endosomen hinweisen, wie Golczak *et al.* vorschlugen (Golczak et al. 2001b). Zwei KFERQ artige Pentapeptidsequenzen, welche vermutlich zytosolische Proteine dem chaperonvermittelten lysosomalen Abbauweg zuführen (Dice 1990), wurden innerhalb des Annexin 6 Moleküls gefunden (Positionen 81-85 Repeat 1 und Positionen 564-568 in Repeat 7) (Cuervo et al. 2000; Golczak et al. 2001b). Diese Signalsequenzen konnten mitverantwortlich dafür sein, dass Annexin 6 in einigen Zellen bevorzugt an späte Endosomen bindet. Da Annexin 6 im Ganzen und fragmentiert im Lumen von späten Endosomen gefunden wurde (Cuervo et al. 2000), könnte es die Fähigkeit besitzen, den intraluminalen pH über ein unbekanntes Molekül zu erkennen, wie es für ARF1 (ADP-ribosylation factor 1) angenommen wird (Gu und Gruenberg 2000), um dann an die Membran zu binden.

Da diese potentiellen KFERQ Sequenzen in α -helikalen Regionen lokalisiert sind, welche in der Kerndomäne verborgen sind, muss das Annexin 6 Molekül bis zu einem gewissen Grad entfaltet werden, damit es mit hsc73 (heat shock cognate protein, 73 kDa), dem Chaperon, welches für den Transport von Annexin 6 im anx6/hsc73 Komplex zu den späten Endosomen verantwortlich ist, interagieren kann (Avila-Sakar et al. 1998; Zanotti et al. 1998).

In zukünftigen Experimenten bleibt herauszufinden, ob eine solch artige chaperonvermittelte Führung die Bindung von Annexin 6 an späte Endosomen während der LDL Internalisation verursacht oder ob der intraluminale pH-Wert der späten Endosomen und PS reiche, durch Cholesterin in Membranen der späten Endosomen etablierte oder stabilisierte Mikrodomänen Signale darstellen, die zur Translokation von Annexin 6 in späte Endosomen führen.

4.4. Klinische Relevanz der Annexine

Die hoch konservierte Annexinstruktur und das Vorkommen der Annexine in einer Vielzahl von Spezies deuten auf eine wichtige Rolle der Annexine hin. Deshalb ist es verwunderlich, dass in der Humanmedizin noch keine Krankheit bekannt ist, an der eine Genmutation eines Annexins ursächlich wäre. Immerhin gibt es Beispiele, dass die Expression von bestimmten Annexinen bei speziellen Krankheitsbildern verändert sind. Diese Korrelationen wurden kürzlich als „Annexinopathien“ bezeichnet (Rand 2000).

Das erste Beispiel beschreibt Patienten mit der haemorrhagisch verlaufenden Form der Akuten Promyeloischen Leukämie (APL) mit der Translokation 15:17 (Menell et al. 1999). Einige dieser Patienten weisen eine erhöhte Expression von Annexin 2 auf. Nun dient Annexin 2 an der apikalen Oberfläche von Endothelzellen als Bindungsstelle für Plasminogen und tPA (tissue plasminogen activator), was zur Fibrinolyse und damit zum Schutz der Endothelzellen beiträgt. Die Überexpression von Annexin 2 führt bei den APL Patienten zu einer gesteigerten Fibrinolyse und damit zur Haemorrhagie. Das konnte bewiesen werden, da sich die leukämiezellinduzierte Fibrinolyse durch Anti-Annexin 2 Antikörper verhindern ließ, und andersherum eine Steigerung der Fibrinolyse in einer nicht fibrinolytischen APL Zelllinie durch Induzierung der Überexpression von Annexin 2 möglich war (Cesarman et al. 1994; Hajjar et al. 1994).

Ein zweites Beispiel beschreibt die Rolle von Annexin 5 bei Patientinnen mit dem sogenannten Antiphospholipidsyndrom (aPL), welches sich durch Antikörperbildung gegen anionische Phospholipide auszeichnet. Annexin 5 bildet einen kristallinen Schutzschild gegen koagulatorische Proteine, welche mit den anionischen Phospholipiden in Kontakt treten können. Das Syndrom manifestiert sich in vaskulären Thrombembolien oder wiederholten Spontanaborten. In den Plazentae dieser Patientinnen wurde eine verminderte Annexin 5 Konzentration festgestellt. Auch in Plazentae von Präeklampsiepatientinnen wurde eine verminderte Annexin 5 Konzentration gemessen (Rand 2000).

Für Annexin 6 ist noch keine derart direkte Beteiligung an Krankheitsprozessen bekannt. Trotzdem besitzt Annexin 6 ein gewisses Potential, an pathophysiologischen Vorgängen mitzuwirken, wie im Folgenden gezeigt werden soll.

4.4.1. Potentielle Rolle von Annexin 6 im Lipidstoffwechsel

Die bedeutende Rolle von Annexin 6 bei der Endozytose von LDL wurde in den vorherigen Punkten bereits dargestellt. Zwar ist alternativ zur regulären Endozytose, an der Annexin 6 beteiligt ist, eine Endozytosevesikelbildung ohne Annexin 6 möglich, diese Vesikel werden aber in der Zelle fehlgeleitet, und es kommt zur Akkumulation von LDL in großen, kernnahen Vesikeln, und die LDL Degradation bleibt aus (Kamal et al. 1998; Grewal et al. 2000). Ein ähnliches Bild zeigen Zellen, die mit U18666A behandelt wurden (Liscum und Faust 1989) und Zellen von NPC Patienten (Liscum und Faust 1989; Liscum 2000).

NPC ist eine autosomal-rezessiv vererbte Lipidspeicherkrankheit, die durch eine Mutation des NPC1 und/oder NPC2 Proteins, welches am Abtransport von Cholesterin aus späten Endosomen beteiligt ist, hervorgerufen wird und durch die Akkumulation von unverestertem Cholesterin in späten Endosomen charakterisiert ist (Liscum 2000).

Es wird vermutet, dass U18666A den Cholesterinfluss zwischen internen Pools verändert, und es gibt Hinweise darauf, dass das NPC1 Protein und U18666A an einem ähnlichen Punkt des Cholesterintransports ansetzen (Lange et al. 2000).

Wenn U18666A und die Mutation des NPC1 Proteins durch einen ähnlichen Mechanismus zu dem typischen Erscheinungsbild der betroffenen Zellen führen, wäre es interessant zu erfahren, ob die Wirkung der NPC1 Mutation auf die intrazelluläre Verteilung von Annexin 6 die gleiche ist, wie die des U18666A. Da Annexin 6 wahrscheinlich an regulatorischen Prozessen in späten Endosomen beteiligt ist, könnte es auch eine Rolle bei der NPC Krankheit spielen. Über mögliche Zusammenhänge in dieser Richtung gibt es bislang noch keine Erkenntnisse, aber falls ein Zusammenhang aufgedeckt werden sollte, könnte das zum Verständnis sowohl der NPC Krankheit wie auch der Funktion des Annexin 6 beitragen.

Auch wenn bisher noch keine primäre Verbindung zwischen Annexin 6 und einer möglichen Krankheit entdeckt wurde wird zunehmend deutlich, dass Annexin 6 bedeutende Funktionen im Stoffwechsel der Zelle ausübt. Vielleicht spielt Annexin 6 nur eine untergeordnete Rolle in verschiedenen Krankheitsprozessen, aber eventuell wird irgendwann im Annexin 6 ein fehlendes Puzzleteil im Gesamtbild einer längst bekannten Krankheit erkannt. Mit zunehmendem Verständnis der Funktionen von Annexin 6 könnten sich schließlich vielleicht sogar neue Therapieansätze ergeben, aber das ist heute rein spekulativ.

5.) Zusammenfassung

Bis heute ist die genaue Bedeutung von Annexin 6 unklar. Es ist an der Vesikelausknospung während der rezeptorvermittelten Endozytose beteiligt, und immer mehr Arbeiten bestätigen eine Bedeutung bei der Regulation des intrazellulären Membranverkehrs.

Bisher war bekannt, dass die Bindung von Annexin 6 an Membranen durch eine calciumabhängige Assoziation an Phospholipide reguliert wird. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass ein calciumunabhängig bindender Annexin 6 Pool besteht, dessen Bindungsaffinität durch die Cholesterinkonzentration in der Membran reguliert wird. Um dies darzustellen wurde das allgemeine Membranbindungsverhalten von Annexin 6 in CHOanx6- und zum Vergleich in CHOwt Zellen unter den Bedingungen des Cholesterinentzugs durch Digitonin und der Cholesterinanreicherung durch U18666A beobachtet, nachdem die cholesterinakkumulierende Wirkung von U18666A im Western Blot und in der Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen worden war. Anschließend konnte anhand der biochemischen und immunfluoreszenzmikroskopischen Analyse der aufgetrennten Zellkompartimente gezeigt werden, dass die Akkumulation des Cholesterins in den späten Endosomen auch zu einer Verschiebung von Annexin 6 in späte Endosomen führt, was auf einen erhöhten Cholesteringehalt in der Endosomenmembran zurückgeführt werden kann. Die immer deutlicher werdenden Wechselwirkungen zwischen Annexin 6 und Cholesterin erhärten den Verdacht, dass Annexin 6 neben seiner Bedeutung bei der Endozytose auch eine wichtige Rolle beim Targeting von LDL Cholesterin in späte Endosomen spielt.

6.) Literaturverzeichnis

- Ahle, S., Mann, A., Eichelsbacher, U., and Ungewickell, E. (1988). Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane. *EMBO J.* **7**, 919-929
- Al-Awqati, Q. (1986). Proton-translocating ATPases. *Annu. Rev. Cell Biol.* **2**, 179-199
- Altschuler, D. L., and Ribeiro-Neto, F. (1998). Mitogenic and oncogenic properties of the small G protein Rap1b. *PNAS* **95**, 7475-7479
- Anderson, R. G., Brown, M. S., and Goldstein J. L. (1977). Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* **10**, 351-64
- Anderson, R. G., Brown, M. S., Beisiegel, U., and Goldstein J. L. (1982). Surface distribution and recycling of the low density lipoprotein receptor as visualized with antireceptor antibodies. *J. Cell Biol.* **93**, 523-531
- Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G., and Gruenberg, J. (1993). Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes [published erratum appears in J Cell Biol 1994 Feb;124(3):397]. *J. Cell Biol.* **123**, 1373-1387
- Avila-Sakar, A. J., Creutz, C. E., and Kretsinger, R. H. (1998). Crystal structure of bovine annexin VI in a calcium-bound state. *Biochim. Biophys. Acta* **1387**, 103-116
- Avila-Sakar, A. J., Kretsinger, R. H., and Creutz, C. E. (2000). Membrane-bound 3D structures reveal the intrinsic flexibility of annexin VI. *J. Struct. Biol.* **130**, 54-62
- Ayala-Sanmartin, J. (2001). Cholesterol enhances phospholipid binding and aggregation of annexins by their core domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 72-79
- Ayala-Sanmartin, J., Henry, J. P., and Pradel, L. A. (2001). Cholesterol regulates membrane binding and aggregation by annexin 2 at submicromolar Ca²⁺ concentration. *Biochim. Biophys. Acta* **1510**, 18-28
- Babiychuk, E. B., Palstra, R.-J. T. S., Schaller, J., Kämpfer, U., and 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
- Babiychuk, E. B., and Draeger, A. (2000). Annexins in cell membrane dynamics: Ca²⁺-regulated association of lipid microdomains. *J. Cell Biol.* **150**, 1113-1123
- Bandorowicz, J., Pikula, S., and Sobota, A. (1992). Annexins IV (p32) and VI (p68) interact with erythrocyte membrane in a calcium-dependent manner. *Biochim. Biophys. Acta* **1105**, 201-206
- Bannykh, S. I., and Balch, W. E. (1998). Selective transport of cargo between the endoplasmic reticulum and Golgi compartments. *Histochem. Cell Biol.* **109**, 463-475
- Bansal, A., and Gierasch, L. M. (1991). The NPXY internalization signal of the LDL receptor adopts a reverse-turn conformation. *Cell* **67**, 1195-1201
- Barlowe, C. (1998). COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 67-76
- Beck, K. A., and Nelson, W. J. (1996). The spectrin-based membrane skeleton as a membrane protein-sorting machine. *Am J Physiol Cell Physiol* **270**, 1263-1270
- Becker, T., Weber, K., and 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. (1998). Lipoprotein Metabolism. *Eur. Heart J.* February 1; 19 Suppl A: A20-3.
- Bennett, V. (1990). Spectrin-based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm. *Physiol. Rev.* **70**, 1029-1065
- Bennett, V., and Gilligan, D. M. (1993). The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 27-66
- Blanchette-Mackie, E. J. (2000). Intracellular cholesterol trafficking: role of the NPC1 protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**, 171-183
- Block, M. R., Glick, B. S., Wilcox, C. A., Wieland, F. T., and Rothman, J. E. (1988). Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *PNAS* **85**, 7852-7856
- Braell, W. A., Schlossman, D. M., Schmid, S. L., and Rothman, J. E. (1984). Dissociation of clathrin coats coupled to the hydrolysis of ATP: role of an uncoating ATPase. *J. Cell Biol.* **99**, 734-741
- Brown, D. A., and London, E. (1998a). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 111-136
- Brown, D. A., and London, E. (1998b). Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membr. Biol.* **164**, 103-114
- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *PNAS* **96**, 11041-11048
- Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., and Zerial, M. (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**, 715-728
- Byers, T. J., and Branton, D. (1985). Visualization of the protein associations in the erythrocyte membrane skeleton. *PNAS* **82**, 6153-6157

- Cao, X., Ballew, N., and Charles, B. (1998). Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *EMBO J.* **17**, 2156-2165
- Carpentier, J. L., Brown, D., Iacopetta, B., and Orci, L. (1985). Detection of surface-bound ligands by freeze-fracture autoradiography. *J. Cell Biol.* **101**, 887-890
- Cesarman, G. M., Guevara, C. A., and Hajjar, K. A. (1994). An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA). II. Annexin II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation. *J. Biol. Chem.* **269**, 21198-21203
- Chen, W. J., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (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**, 3116-3123
- Chen, W., Sun, Y., Welch, C., Gorelik, A., Leventhal, A. R., Tabas, I., and Tall, A. R. (2001). Preferential ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux from late endosomes/lysosomes. *J. Biol. Chem.* **276**, 43564-43569
- Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D., and Zerial, M. (1999). The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* **397**, 621-625
- Clary, D. O., Griff, I. C., and Rothman, J. E. (1990). SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* **61**, 709-721
- Collawn, J. F., Stangel, M., Kuhn, L. A., Esekogwu, V., Jing, S. Q., Trowbridge, I. S., and Tainer, J. A. (1990). Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell* **63**, 1061-1072
- Conboy, J. G. (1993). Structure, function, and molecular genetics of erythroid membrane skeletal protein 4.1 in normal and abnormal red blood cells. *Semin. Hematol.* **30**, 58-73
- Creutz, C. E. (1992). The annexins and exocytosis. *Science* **258**, 924-931
- Cuervo, A. M., Gomes, A. V., Barnes, J. A., and Dice, J. F. (2000). Selective degradation of annexins by chaperone-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.* **275**, 33329-33335
- Daro, E., van der Sluijs, P., Galli, T., and Mellman, I. (1996). Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. *PNAS* **93**, 9559-9564
- Davis, C. G., Goldstein, J. L., Südhof, T. C., Anderson, R. G. W., Russell, D. W., and Brown, M. S. (1987). Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* **326**, 760-765
- Dawodowicz, E. A. (1993). Lipid sorting and trafficking in cells. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 495-498
- Desjardins, M., Celis, J. E., van Meer, G., Dieplinger, H., Jahraus, A., Griffiths, G., and Huber, L. A. (1994). Molecular characterization of phagosomes. *J. Biol. Chem.* **269**, 32194-32200
- Deurs, B. van, Holm, P. K., Kayser, L., Sandvig, K., and Hansen S. H. (1993). Multivesicular bodies in HEP-2 cells are maturing endosomes. *Eur. J. Cell Biol.* **61**, 208-224
- Dice, J. F. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 305-309
- Diego, I. de, Schwartz, F., Siegfried, H., Dauterstedt, P., Heeren, J., Beisiegel, U., Enrich, C., and Grewal, T. (2002). Cholesterol modulates the membrane binding and intracellular distribution of annexin 6. *J. Biol. Chem.* **277**, 32187-32194
- Donato, R., and Russo-Marie, F. (1999). The annexins: structure and functions. *Cell Calcium* **26**, 85-89
- Donnelly, S.R., and Moss, S. E. (1997). Annexins in the secretory pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**, 533-538
- Drust, D. S., and Creutz, C. E. (1988). Aggregation of chromaffine granules by calpactin at micromolar levels of calcium. *Nature* **331**, 88-91
- Drust, D. S., and Creutz, C. E. (1991). Differential subcellular distribution of p36 (the heavy chain of calpactin I) and other annexins in the adrenal medulla. *J. Neurochem.* **56**, 469-478
- D'Souza-Schorey, C., Li, G., Colombo, M. I., and Stahl, P. D. (1995). A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science* **267**, 1175-1178
- D'Souza-Schorey, C., van Donselaar, E., Hsu, V. W., Yang, C., Stahl, P. D., and Peters, P. J. (1998). ARF6 targets recycling vesicles to the plasma membrane: insights from an ultrastructural investigation. *J. Cell Biol.* **140**, 603-616
- Dunn, K. W., and Maxfield, F. R. (1992). Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *J. Cell Biol.* **117**, 301-310
- Echten, G. van, and Sandhoff, K. (1993). Ganglioside metabolism. Enzymology, Topology, and regulation. *J. Biol. Chem.* **268**, 5341-5344
- Emans, N., Gorvel, J. P., Walter, C., Gerke, V., Kellner, R., Griffiths, G., and Gruenberg, J. (1993). Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles. *J. Cell Biol.* **120**, 1357-1369
- Felder, S., Miller, K., Moehren, G., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Hopkins C. R. (1990). Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell* **61**, 623-634
- Feng, Y., Press, B., and Wandinger-Ness, A. (1995). Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J. Cell Biol.* **131**, 1435-1452

- Fiedler, K., Lafont, F., Parton, R. G., and 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
- Fischer von Mollard, G., Stahl, B., Li, C., Sudhof, T. C., and Jahn R. (1994). Rab proteins in regulated exocytosis. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 164-168
- Fivaz, M., Vilbois, F., Thurnheer, S., Pasquali, C., Abrami, L., Bickel, P. E., Parton, R. G., and van der Goot, F. G. (2002). Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins. *EMBO J.* **21**, 3242-3253
- Futter, C. E., Felder, S., Schlessinger, J., Ullrich, A., and Hopkins, C. R. (1993). Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol.* **120**, 77-83
- Gerke, V., and Moss, S. E. (1997). Annexins and membrane dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **1357**, 129-154
- Gerke, V., and Moss, S. E. (2002). Annexins: From structure to function. *Physiol. Rev.* **82**, 331-371
- Geuze, H. J., Slot, J. W., Strous, G. J., Lodish, H. F., and Schwartz, A. L. (1983). Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis. *Cell* **32**, 277-287
- Glenney, J. (1986). Phospholipid-depending Ca^{2+} binding by the 36-kDa tyrosine kinase substrate (calpactin) and its 33-kDa core. *J. Biol. Chem.* **261**, 7247-7252
- Glickman, J. N., Conibear, E., and Pearse, B. M. F. (1989). Specificity of binding of clathrin adaptors to signals on the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *EMBO J.* **8**, 1041-1047
- Golczak, M., Kicinski, A., Bandorowicz-Pikula, J., Buchet, R., Szewczyk, A., and Pikula, S. (2001a). Acidic pH-induced folding of annexin VI is a prerequisite for its insertion into lipid bilayers and formation of ion channels by the protein molecules. *FASEB J.* **6**, 1083-1085
- Golczak, M., Kirilenko, A., Bandorowicz-Pikula, J., and Pikula, S. (2001b). N- and C-terminal halves of human annexin VI differ in ability to form low pH-induced ion channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 785-791
- Goldstein, J. L., Brown, M. S., Anderson, R. G., Russell, D. W., and Schneider, W. J. (1985). Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 1-39
- Goodman, S. R., Zimmer, W. E., Clark, M. B., Zagon, I. S., Barker, J. E., and Bloom, M. L. (1995). Brain spectrin: of mice and men. *Brain Res. Bull.* **36**, 593-606
- Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M., and Gruenberg, J. (1991). Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**, 915-925
- Graham, T. R., and Emr, S. D. (1991). Compartmental organization of Golgi-specific protein modification and vacuolar protein sorting events defined in a yeast sec18 (NSF) mutant. *J. Cell Biol.* **114**, 207-218
- Grewal, T., Heeren, J., Mewawala, D., Schnitgerhans, T., Wendt, D., Salomon, G., Enrich, C., Beisiegel, U., and Jäckle, S. (2000). Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of low density lipoprotein to the prelysosomal compartment. *J. Biol. Chem.* **275**, 33806-33813
- Griffiths, G., Back, R., and Marsh M. (1989). A quantitative analysis of the endocytic pathway in baby hamster kidney cells. *J. Cell Biol.* **109**, 2703-2720
- Griffiths, G., and Gruenberg, J. (1991). The arguments for pre-existing early and late endosomes. *Trends Cell Biol.* **1**, 5-9
- Gruenberg, J., Griffiths, G., and Howell, K. E. (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
- Gruenberg, J., and Maxfield, F. R. (1995). Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 552-563
- Gu, F., and Gruenberg, J. (2000). ARF1 regulates pH-dependent COP functions in the early endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* **275**, 8154-8160
- Hajjar, K. A., Jacovina, A. T., and Chacko, J. (1994). An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J. Biol. Chem.* **269**, 21191-21197
- Hao, M., Lin, S. X., Karylowski, O. J., Wüstner, D., McGraw, T. E., and Maxfield, F. R. (2001). Vesicular and non-vesicular sterol transport in living cells. THE ENDOCYTIC RECYCLING COMPARTMENT IS A MAJOR STEROL STORAGE ORGANELLE. *J. Biol. Chem.* **277**, 609-617
- Harder, T., and Gerke, V. (1993). The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin IIp11(2) complex. *J. Cell Biol.* **123**, 1119-1132
- Harder, T., Kellner, R., Parton, R. G., and 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

- Harder, T., and Simons, K. (1997). Caveolae, DIGs, and the the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 534-542
- Harris, A. S., and Morrow, J. S. (1990). Calmodulin and Calcium-Dependent Protease I Coordinately Regulate the Interaction of Fodrin with Actin. *PNAS* **87**, 3009-3013
- Heuser, J., and Evans, L. (1980). Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **84**, 560-578
- Hinshaw, J. E., and Schmid, S. L. (1995). Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* **374**, 190-192
- Hirst, J., and Robinson, M. S. (1998). Clathrin and adaptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 173-193
- Holthuis, J. C. M., Pomorski, T., Raggars, R. J., Sprong, H., and van Meer, G. (2001). The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport. *Physiol Rev.* **81**, 1689-1723
- Hopkins, C. R., Miller, K., and Beardmore, J. M. (1985). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and epidermal growth factor receptors: a comparison of constitutive and ligand-induced uptake. *J. Cell Sci. Suppl.* **3**, 173-186
- Hopkins, C. R., Gibson, A., Shipman, M., and Miller K. (1990). Movement of internalized ligand-receptor complexes along a continuous endosomal reticulum. *Nature* **346**, 335-339
- Hosoya, H., Kobayashi, R., Tszkita, S., and 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
- Hoyal, C. R., Thomas, A. P., and Forman, H. J. (1994). Hyperperoxide-induced increases in intracellular calcium due to annexin VI translocation and inactivation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **271**, 29205-29210
- Huber, R., Schneider, M., Mayr, I., Römisch, J., and Paques, E.-P. (1990). The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 Å resolution. Implications for membrane binding and calcium channel activity. *FEBS Lett.* **275**, 15-21
- Iacopetta, B. J., Rothenberger, S., and Kuhn, L. C. (1988). A role for the cytoplasmic domain in transferrin receptor sorting and coated pit formation during endocytosis. *Cell* **54**, 485-489
- Jackson, C. L., and Casanova, J. E. (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol.* **10**, 60-67
- Jäckle, S., Beisiegel, U., Rinninger, F., Buck, F., Grigoleit, A., Block, A., Groger, I., Greten, H., and Windler, E. (1994). Annexin VI, a marker protein of hepatocytic endosomes. *J. Biol. Chem.* **269**, 1026-1032
- Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., de la Llera Moya, M., Phillips, M. C., Rothblat, G. H., Swaney, J. B., and Tall, A. R. (1997). Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* **272**, 20982-20985
- Johnsson, N., Vanderkerckhove, J., Van Damme, J., and Weber, K. (1986). Binding sites for calcium, lipid and p11 on p36, the substrate of retroviral tyrosine-specific protein kinases, *FEBS Lett.* **198**, 361-364
- Johnsson, N., Marriott, G., and 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
- Jost, M., Zeuschner, D., Seemann, J., Weber, K., and Gerke, V. (1997). Identification and characterization of a novel type of annexin-membrane interaction: Ca²⁺ is not required for the association of annexin II with early endosomes. *J. Cell Sci.* **110**, 221-228
- Kamal, A., Ying, Y., and Anderson, R. G. W. (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
- Kanaseki, T., and Kadota, K. (1969). The "vesicle in a basket". A morphological study of the coated vesicle isolated from the nerve endings of the guinea pig brain, with special reference to the mechanism of membrane movements. *J. Cell Biol.* **42**, 202-220
- Keen, J. H. (1990). Clathrin and associated assembly and disassembly proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 415-438
- Kirchhausen, T. (1993). Coated pits and coated vesicles – sorting it all out. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 182-188
- König, J., and Gerke, V. (2000). Modes of annexin-membrane interactions analyzed by employing chimeric annexin proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1498**, 174-180
- Kornfeld, S., and Mellman, I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 483-525
- Lafont, F., Lecat, S., Verkade, P., and Simons, K. (1998). Annexin XIIIb associates with lipid microdomains to function in apical delivery. *J. Cell Biol.* **142**, 1413-1427
- Lange, Y., Jin, Y., Rigney, M., and Steck, T. (2000). Cholesterol movement in Niemann-Pick Type C cells and in cells treated with amphiphiles

- Lavialle, F., Rainteau, D., Massey-Harroche, D., and Metz, F. (2000). Establishment of plasma membrane polarity in mammary epithelial cells correlates with changes in prolactin trafficking and in annexin VI recruitment to membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1464**, 83-94
- Lebrand, C., Corti, M., Goodson, H., Cosson, P., Cavalli, V., Mayran, N., Fauré, J., and Gruenberg, J. (2002). Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7. *EMBO J.* **21**, 1289-1300
- Lehrman, M. A., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Russell, D. W., and Schneider, W. J. (1985). Internalization-defective LDL receptors produced by genes with nonsense and frameshift mutations that truncate the cytoplasmic domain. *Cell* **41**, 735-743
- Lin, H. C., Südhof, T. C., and Anderson, R. G. W. (1992). Annexin VI is required for budding of clathrin-coated pits. *Cell* **70**, 283-291
- Lippincott-Schwartz, J., Cole, N. B., and Donaldson, J. G. (1998). Building a secretory apparatus: role of ARF1/COPI in Golgi biogenesis and maintenance. *Histochem. Cell Biol.* **109**, 449-462
- Liscum, L., and Faust, J. R. (1989). The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one. *J. Biol. Chem.* **264**, 11796-11806
- Liscum, L., and Munn, N. J. (1999). Intracellular cholesterol transport. *Biochim. Biophys. Acta* **1438**, 19-37
- Liscum, L. (2000). Niemann-Pick type C mutations cause lipid traffic jam. *Traffic* **1**, 218-225
- Lobel, P., Fujimoto, K., Ye, R. D., Griffiths, G., and 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, M. A., Goda, Y., Zerial, M., and Pfeffer, S. R. (1993). Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *EMBO J.* **12**, 677-682
- Lowe, M., and Kreis, T. E. (1998). Regulation of membrane traffic in animal cells by COPI. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 53-66
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis Farr, A., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275
- Lund, K. A., Opresko, L. K., Starbuck, C., Walsh, B. J., and Wiley, H. S. (1990). Quantitative analysis of the endocytic system involved in hormone-induced receptor internalization. *J. Biol. Chem.* **265**, 15713-15723
- Malhotra, V., Orci, L., Glick, B. S., Block, M. R., and Rothman, J. E. (1988). Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack. *Cell* **54**, 221-227
- Marks, M. S., Woodruff, L., Ohno, H., and Bonifacino, J. S. (1996). Protein targeting by tyrosine- and dileucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J. Cell Biol.* **135**, 341-354
- Marsh, M., Griffiths, G., Dean, G. E., Mellman, I., and Helenius, A. (1986). Three-dimensional structure of endosomes in BHK-21 cells. *PNAS* **83**, 2899-2903
- Martinez, O., and Goud, B. (1998). Rab proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 101-112
- Maxfield, F. R., and Wüstner, D. (2002). Intracellular cholesterol transport. *J. Clin. Invest.* **110**, 891-898
- Mayor, S., Sabharanjak, S., and Maxfield, F. R. (1998). Cholesterol-dependent retention of GPI-anchored proteins in endosomes. *EMBO J.* **17**, 4626-4638
- Mayorga, S., Beron, W., Sarrouf, M. N., Colombo, M. I., Creutz, C., and Stahl, P. D. (1994). Calcium-dependent fusion among endosomes. *J. Biol. Chem.* **269**, 30927-30934
- Mayran, N., Parton, R. G., and Gruenberg, J. (2003). Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. *EMBO J.* **22**, 3242-3253
- McBride, M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R., and Zerial, M. (1999). Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell* **98**, 377-386
- Menell, J. S., Cesarman, G. M., Jacovina, A. T., McLaughlin, M. A., Lev, E. A., and Hajjar, K. A. (1999). Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **340**, 994-1004
- Michaely, P., Kamal, A., Anderson, R. G. W., and Bennett, V. (1999). A requirement for ankyrin binding to clathrin during coated pit budding. *J. Biol. Chem.* **274**, 35908-35913
- Miettinen, H. M., Rose, J. K., and Mellman, I. (1989). Fc receptor isoforms exhibit distinct abilities for coated pit localization as a result of cytoplasmic domain heterogeneity. *Cell* **58**, 317-327
- Miller, K., Shipman, M., Trowbridge, I. S., and Hopkins, C. R. (1991). Transferrin receptors promote the formation of clathrin lattices. *Cell* **65**, 621-632
- Morgan, R. O., and Fernandez, M. P. (1997). Annexin gene structures and molecular evolutionary genetics. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**, 508-515
- Morgan, R. O., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Balsara, B. R., Testa, J. R., and Fernandez, M. P. (1999). Novel human and mouse annexin A10 are linked to the genome duplications during early chordate evolution. *Genomics* **60**, 40-49
- Moss, J., and Vaughan, M. (1998). Molecules in the ARF orbit. *J. Biol. Chem.* **273**, 21431-21434

- Mu, F.-T., Callaghan, J. M., Steele-Mortimer, O., Stenmark, H., Parton, R. G., Campbell, P. L., McCluskey, J., Yeo, J.-P., Tock, E. P. C., and Toh, B.-H. (1995). EEA1, an early endosome-associated protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 13503 - 13511
- Mukherjee, S., Ghosh, R. N., and Maxfield, F. R. (1997). Endocytosis. *Physiol. Rev.* **77**, 759-803.
- Murphy, R. F. (1991). Maturation models for endosome and lysosome biogenesis. *Trends Cell Biol.* **1**, 77-82
- Novick, P., and Zerial, M. (1997). The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 496-504
- Oda, H., Stockert, R. J., Collins, C., Wang, H., Novikoff, P. M., Satir, P., and Wolkoff, A. W. (1995). Interaction of the Microtubule Cytoskeleton with Endocytic Vesicles and Cytoplasmic Dynein in Cultured Rat Hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 15242-15249
- Orci, L., Malhotra, V., Amherdt, M., Serafini, T., and Rothman J. E. (1989). Dissection of a single round of vesicular transport: sequential intermediates for intercisternal movement in the Golgi stack. *Cell* **56**, 357-368
- Ortega, D., Pol, A., Biermer, M., Jäckle, S., and Enrich, C. (1998). Annexin VI defines an apical endocytic compartment in rat liver hepatocytes. *J. Cell Sci.* **111**, 261-269
- Orito, A., Kumanogoh, H., Yasaka, K., Sokawa, J., Hidaka, H., Sokawa, Y., and Maekawa, S. (2001). Calcium-dependent association of annexin VI, protein kinase C alpha, and neurocalcin alpha on the raft fraction derived from the synaptic plasma membrane of rat brain. *J. Neurosci. Res.* **64**, 235-241
- Osborn, M., Johnsson, N., Wehland, J., and Weber, K. (1988). The submembranous location of p11 and its interaction with the p36 substrate of pp60 src kinase in situ. *Exp. Cell Res.* **175**, 81-96
- Pagano, R. E. (1990). Lipid traffic in eukaryotic cells: mechanisms for intracellular transport and organelle-specific enrichment of lipids. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**, 652-663
- Parton, R. G., and Simons, K. (1995). Digging into caveolae. *Science* **269**, 1398-1399
- Pearse, B. M. F. (1988). Receptors compete for adaptors found in plasma membrane coated pits. *EMBO J.* **7**, 3331-3336
- Pfeffer, S. R. (1994). Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 522-526
- Pfeffer, S. R. (1999). Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat. Cell Biol.* **1**, E17-E22
- Pol, A., Luetterforst, R., Lindsay, M., Heino, S., Ikonen, E., and Parton, R. G. (2001). A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J. Cell Biol.* **152**, 1057-1070
- Pons, M., Ihrke, G., Koch, S., Biermer, M., Pol, A., Grewal, T., Jäckle, S., and 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., Schnittgerhans, T., Jäckle, S., and Enrich, C. (2001a). Evidence for the involvement of annexin 6 in the trafficking between the endocytic compartment and lysosomes. *Exp. Cell Res.* **269**, 13-22
- Pons, M., Tebar, F., Kirchhoff, M., Peiró, S., de Diego, I., Grewal, T., and Enrich, C. (2001b). Activation of raf-1 is defective in annexin 6 overexpressing chinese hamster ovary cells. *FEBS Lett.* **501**, 69-73
- Prywes, R., Livneh, E., Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1986). Mutations in the cytoplasmic domain of EGF receptor affect EGF binding and receptor internalization. *EMBO J.* **5**, 2179-2190
- Radhakrishna, H., and Donaldson, J. G. (1997). ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J. Cell Biol.* **139**, 49-61
- Rand, J. H. (2000). The annexinopathies: a new category of diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1498**, 169-173
- Raynal, P., and Pollard, H. B. (1994). Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1197**, 63-93 =18
- Raynal, P., Pollard, H. B., Cushman, S. W., and Guerre-Millo, M. (1996). Unique subcellular distribution of five annexins in resting and insulin-stimulated rat adipose cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**, 116-121
- Riederer, M. A., Soldati, T., Shapiro, A. D., Lin, J., and Pfeffer, S. R. (1994). Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* **125**, 573-582
- Robinson, M. S. (1992). Adaptins. *Trends Cell Biol.* **2**, 293-297
- Rodriguez, L., Stirling, C. J., and Woodman, P. G. (1994). Multiple N-ethylmaleimide-sensitive components are required for endosomal vesicle fusion. *Mol. Biol. Cell* **5**, 773-783
- Roth, T. F., and Porter, K. R. (1964). Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. *L. J. Cell Biol.* **20**, 313-332
- Roth, M. G., Doyle, C., Sambrook, J., and Gething M. J. (1986). Heterologous transmembrane and cytoplasmic domains direct functional chimeric influenza virus hemagglutinins into the endocytic pathway. *J. Cell Biol.* **102**, 1271-1283

- Rothenberger, S., Iacopetta, B. J., and Kuhn, L. C. (1987). Endocytosis of the transferrin receptor requires the cytoplasmic domain but not its phosphorylation site. *Cell* **49**, 423-431
- Rothman, J. E., and Schmid, S. L. (1986). Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. *Cell* **46**, 5-9
- Sandhoff, K., and Klein, A. (1994). Intracellular trafficking of glycosphingolipids: role of sphingolipid activator proteins in the topology of endocytosis and lysosomal digestion. *FEBS Lett.* **346**, 103-107
- Santini, F., and Keen, J. H. (1996). Endocytosis of activated receptors and clathrin-coated pit formation: deciphering the chicken or egg relationship. *J. Cell Biol.* **132**, 1025-1036
- Sarafian, T., Pradel, L. A., Henry, J. P., Aunis, D., and Bader, M. F. (1991). The participation of annexin II (calpactin I) in calcium-evoked exocytosis requires protein kinase C. *J. Cell Biol.* **114**, 1135-1147
- Schekman, R., and Orci, L. (1996). Coat proteins and vesicle budding. *Science* **271**, 1526-1533
- Schmid, S. L., and Carter, L. L. (1990). ATP is required for receptor-mediated endocytosis in intact cells. *J. Cell Biol.* **111**, 2307-2318
- Schmid, S. L. (1992). The mechanism of receptor-mediated endocytosis: more questions than answers. *Bioessays* **14**, 589-596
- Schmid, S. L., and Damke, H. (1995). Coated vesicles: a diversity of form and function. *FASEB J.* **9**, 1445-1453
- Simons, K., and Zerial, M. (1993). Rab proteins and the road maps for intracellular transport. *Neuron* **11**, 789-799
- Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J. M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B. H., Murphy, C., Zerial, M., and Stenmark, H. (1998). EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**, 494-498
- Singer, S.J., and Nicholson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731
- Sluijs, P. van der, Hull, M., Zahraoui, A., Tavittian, A., Goud, B., and Mellman, I. (1991). The small GTP-binding protein rab4 is associated with early endosomes. *PNAS* **88**, 6313-6317
- Sluijs, P. van der, Hull, M., Webster, P., Male, P., Goud, B., and Mellman, I. (1992). The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* **70**, 729-740
- Smith, P. D., Davies, A., Crumpton, M. J., and Moss, S. E. (1994). Structure of the human annexin VI gene. *PNAS* **91**, 2713-2717
- Smith, P. D., and Moss, S. E. (1994). Structural evolution of the annexin supergene family. *Trends Genet.* **10**, 241-246
- Sönnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J., and Zerial, M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of rab4, rab5, and rab11. *J. Cell Biol.* **149**, 901-914
- Soldati, T., Shapiro, A. D., Svejstrup, A. B., and Pfeffer, S. R. (1994). Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature* **369**, 76-78
- Sollner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J. E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318-324
- Sosa, M. A., Schmidt, B., von Figura, K., and Hille-Rehfeld, A. (1993). In vitro binding of plasma membrane-coated vesicle adaptors to the cytoplasmic domain of lysosomal acid phosphatase. *J. Biol. Chem.* **268**, 12537-12543
- Stenmark, H., Parton, R. G., Steele-Mortimer, O., Lutcke, A., Gruenberg, J., and Zerial, M. (1994). Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J.* **13**, 1287-1296
- Stenmark, H., Vitale, G., Ullrich, O., and Zerial, M. (1995). Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell* **83**, 423-432
- Stow, J. L. (1995). Regulation of vesicular transport by GTP-binding proteins. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **4**, 421-425
- Swairjo, M. A., Concha, N. O., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R., and Seaton, B. A. (1995). Ca(2+)-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 968-974
- Tagoe, C. E., Boustead, C. M., Higgins, S. J., and Walker, J. H. (1994). Characterization and immunolocalization of rat liver annexin VI. *Biochim. Biophys. Acta* **1192**, 272-280
- Takai, Y., Sasaki, T., Shirataki, H., and Nakanishi, H. (1996). Rab3A small GTP-binding protein in Ca(2+)-dependent exocytosis. *Genes. Cells* **1**, 615-632
- Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). Small GTP-Binding Proteins. *Physiol. Rev.* **81**, 153-208
- Takei, K., McPherson, P. S., Schmid, S. L., and de Camilli, P. (1995). Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTPγS in nerve terminals. *Nature* **374**, 186-190
- Turpin, E., Russo-Marie, F., Dubois, T., de Paillerets, C., Alfsen, A., and 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., and Maxfield, F. R. (1982). Rapid acidification of endocytic vesicles containing alpha 2-macroglobulin. *Cell* **28**, 643-651
- Ullrich, O., Horiuchi, H., Bucci, C., and Zerial, M. (1994). Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature* **368**, 157-160
- Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M., and Parton, R. G. (1996). Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell Biol.* **135**, 913-924
- Urade, R., Hayashi, Y., and Kito M. (1988). Endosomes differ from plasma membranes in the phospholipid molecular species composition. *Biochim. Biophys. Acta* **946**, 151-163
- Vallee, R. B., and Okamoto, P. M. (1995). The regulation of endocytosis: identifying dynamin's binding partners. *Trends Cell Biol.* **5**, 43-47
- Watanabe, T., Inui, M., Chen, B. Y., Iga, M., and Sobue, K. (1994). Annexin VI-binding proteins in brain. Interaction of annexin VI with a membrane skeletal protein, calpectin (brain spectrin or fodrin). *J. Biol. Chem.* **269**, 17656-17662
- Waters, M. G., and Pfeffer, S. R. (1999). Membrane tethering in intracellular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 453-459
- Weinman, J. S., Feinberg, J. M., Rainteau, D. P., Gaspera, B. D., and Weinman, S. J. (1994). Annexins in rat enterocyte and hepatocyte: an immunogold electron-microscope study. *Cell Tissue Res.* **278**, 389-397
- Weng, X., Luecke, H., Song, J. S., Kang, D. S., Kim, S., and Huber, R. (1993). Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution. *Protein Sci.* **2**, 448-458
- Zanotti, G., Malpeli, G., Gliubich, F., Folli, C., Stoppini, M., Olivi, L., Savoia, A., and Bern, R. (1998). Structure of the trigonal crystal form of bovine annexin IV. *Biochem. J.* **329**, 101-106
- Zhang, Q., Cox, D., Tseng, C.-C., Donaldson, J. G., and Greenberg, S. (1998). A requirement for ARF6 in Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Biol. Chem.* **273**, 19977-19981

7.) Danksagung

Ich bedanke mich besonders bei Frau Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel und Prof. Dr. Thomas Grewal für die Vergabe dieser Dissertationsarbeit und die intensive Betreuung und mentale Förderung, die zum Entstehen dieser Arbeit geführt hat. Ebenso bedanke ich mich bei sämtlichen Mitarbeitern um Frau Prof. Beisiegel, allen voran Walter Tauscher, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen und es mir ermöglichten, mich ins Team einzubringen.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinem Chemielehrer Dietrich Schröder, der es schaffte, mein Interesse für die Chemie zu wecken, und somit einen wesentlichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat.

Mein spezieller Dank gilt meinen Eltern Dr. Gisela Schwartz und Dr. R. Burkhardt Schwartz, die sich bei meiner Erziehung immer bemühten, mir alle Möglichkeiten offenzuhalten und mich derart prägten, dass ich heute sein kann, wer ich bin.

Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Zuletzt danke ich meiner langjährigen Lebenspartnerin Kathrin Brücker, die mir den letzten Schliff verpasst hat, und meiner Tochter Zora Schwartz, die Geduld und Verständnis für meine Abwesenheit während meiner Arbeit aufgebracht hat.

8.) Lebenslauf

Name: Felix Schwartz

Geburtsdaten: 29.01.1977 in Hamburg, als drittes von vier Kindern

Familienstand: unverheiratet, zwei Kinder

Eltern: Dr. R. Burkhardt Schwartz
OA Neurologie, Klinikum Itzehoe
Dr. Gisela Schwartz, geb. Kußmaul
Ärztin im Gesundheitsamt Itzehoe

Schulbildung

1983 – 1987 Grundschule Edendorf, Itzehoe
1987 – 1996 Kreisgymnasium Itzehoe
08.06.1996 Abitur

Wehrdienst

Juli 96 - April 97 Sanitätssoldat in der 3. Kompanie, Sanitätsbataillon 6

Studium

Okt. 97 – Sept. 99 Grundstudium an der EMAU Greifswald
21.09.1999 Physikum
Okt. 99 – dato Hauptstudium an der Universität Hamburg
22.03.2001 1. Staatsexamen
21.03.2003 2. Staatsexamen
27.10.03-26.09.04 PJ: 1. Drittel: Neurologie im UKE, Hamburg
2. Drittel: Innere Medizin im AK Barmbek, Hamburg
3. Drittel: Neurochirurgie im UKE, Hamburg
Chirurgie im KH Alten Eichen, Hamburg
3. Staatsexamen: voraussichtlich Nov. 2004

Praktika während des Studiums

Krankenpflege: Allgemein- und Unfallchirurgie und Psychiatrie

Famulaturen: Pädiatrie, Allgemeinmedizin, Pathologie, Neurochirurgie und Innere Medizin
Auslandsfamulatur in der Transplantationschirurgie in Budapest

Wissenschaftliche Tätigkeiten

Dissertation: „Einfluss von Cholesterin auf die Membranaffinität von Annexin 6 in frühen und späten Endosomen“
im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II:
Molekulare Zellbiologie
des Zentrums für Experimentelle Medizin
des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf
Doktormutter: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

Veröffentlichungen: de Diego, I., Schwartz, F., Siegfried, H., Dauterstedt, P., Heeren, J., Beisiegel, U., Enrich, C., and Grewal, T. (2002). Cholesterol modulates the membrane binding and intracellular distribution of annexin 6. *J. Biol. Chem.* **277**, 32187-32194

Sprachkenntnisse

Muttersprache: Deutsch
Fließend in Sprache und Schrift: Englisch
Grundkenntnisse: Französisch und Spanisch

Besondere Tätigkeiten / Auszeichnungen:

Tenorsolist im Gospel-Soul-Popchor des Kreisgymnasiums Itzehoe
Erhalt des Buchpreises 1996 für den besten Chemie-Abiturienten
Erstsemestertutor '98 - '99

Interessen:

EDV-Arbeiten
Sportliche Aktivitäten

9.) 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.

Felix Schwartz