

**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

Regulation der Bindung von Annexin 6 an endosomale Membranen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Paul Dauterstedt
aus Dresden

Hamburg, 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Endozytose und Regulation	1
1.1.1 Rezeptorvermittelte Endozytose	2
1.1.2 Rab-Proteine	5
1.1.3 SNARE-Proteine	8
1.2 Das endosomale System	9
1.2.1 Frühe Endosomen	10
1.2.2 Späte Endosomen	11
1.3 Lipide und Membrantransport	12
1.3.1 Lipoproteinstoffwechsel	13
1.3.2 Aufnahme und intrazellulärer Stoffwechsel von Cholesterin	16
1.3.3 Einfluss von Lipiden auf Membranen	18
1.3.4 Cholesterin in zellulären Membranen	19
1.3.5 Cholesterintransport aus dem spät-endozytotischen Kompartiment und seine klinische Relevanz	20
1.4 Annexine	23
1.4.1 Struktur	23
1.4.2 Lokalisation	25
1.4.3 Funktion	26
1.4.4 Annexin 6	26
1.4.5 Regulation der Membranbindung von Annexinen	30
1.5 Ziel der Arbeit	33
2. Material und Methoden	34
2.1 Material	34
2.1.1 Geräte	34
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	34
2.1.3 Chemikalien	35
2.1.4 Zellkultur	37
2.1.5 Antikörper	37

2.2 Methoden	38
2.2.1 Zellkultur.....	38
2.2.2 Ausplattieren von Zellen	38
2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	38
2.2.4 Transfektion von Zellen	39
2.2.5 Präparierung von Membranproteinen	39
2.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration	39
2.2.7 Fluorometrische Bestimmung der Cholesterin- konzentration	40
2.2.8 Subzelluläre Fraktionierung	40
2.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
2.2.10 Western-Blot.....	43
3. Ergebnisse	45
3.1 Calciumabhängige Bindung von Annexin 6 an Membranen von CHO-Zellen	45
3.2 Einfluss von Cholesterin auf die Bindung von Annexin 6 an Membranen	46
3.2.1 Einfluss von Filipin auf die Membranbindung von Annexin 6 in Gegenwart von Calcium.....	46
3.2.2 Einfluss von Filipin auf die Membranbindung von Annexin 6 in Abwesenheit von Calcium	52
3.2.3 Einfluss von Digitonin auf die Membranaffinität calciumabhängig bindender Annexin-6-Proteine.....	53
3.2.4 Einfluss von Digitonin auf die Membranbindung calciumunabhängig bindender Annexin-6-Proteine	55
3.2.5 Einfluss von Cholesterin auf die Membranbindung von Annexin 6 an frühen und späten Endosomen.....	58
3.2.6 Einfluss von Digitonin auf die Membranbindung von Annexin 6 in vivo	62
3.2.7 Zusammenfassung der von Filipin und Digitonin vermittelten Effekte auf das Bindungsverhalten von Annexin 6	63

3.3 Etablierung einer GFP-Anx6-exprimierenden CHO-Zell-	
linie zur Analyse der Membranaffinität von Annexin 6	64
3.3.1 GFP-Anx6 bindet an endosomale Membranen.....	66
4. Diskussion	68
4.1 Calcium- und cholesterinabhängiges Bindungsverhalten	
von Annexinen	68
4.1.1 Calciumabhängige Bindung von Annexinen	68
4.1.2 Cholesterinabhängige Bindung von Annexin 6 an	
Membranen.....	72
4.1.3 Cholesterinabhängige Bindung von Annexin 2 an	
Membranen.....	75
4.2 Funktion von Annexin 6 beim Targeting von LDL-	
Cholesterin in späten Endosomen	78
4.3 Funktion von Annexin 6 im Cholesterintransport aus	
dem spät-endozytotischen Kompartiment	80
4.4 Klinische Relevanz von Annexinen	81
4.4.1 Potentielle Rolle von Annexin 6 im Lipidstoffwechsel	82
5. Zusammenfassung	84
6. Abkürzungsverzeichnis	85
7. Literaturverzeichnis	88
8. Danksagung	98
9. Lebenslauf	99
10. Erklärung	100

1. Einleitung

1.1 Endozytose und Regulation

Die Zelle als kleinste Bau- und Funktionseinheit von Eukaryonten bedient sich bei der Aufnahme von extrazellulärem Material einer Vielzahl von Mechanismen, die unter dem Begriff Endozytose zusammengefasst worden sind (Mukherjee, Ghosh et al. 1997). Die Endozytose ist von fundamentaler Bedeutung in der Abfolge physiologischer Prozesse, z.B. bei der Aufnahme von Metaboliten, der zellulären Cholesterinhomöostase, der Antigenpräsentation, der Regulation der Zahl der Rezeptoren an der Zelloberfläche und der Beibehaltung der Zellpolarität. Des Weiteren sind noch pathogene Viren und Toxine zu nennen, die sich endozytotischer Transportwege bedienen.

Die verschiedenen Mechanismen der Endozytose werden in Phagozytose, Pinozytose, die clathrinunabhängige Endozytose und die rezeptorvermittelte Endozytose über Clathrin Coated Pits unterteilt (s. Abb. 1). Letzterer stellt den am besten charakterisierten Aufnahmeprozess dar und soll im Weiteren genauer betrachtet werden.

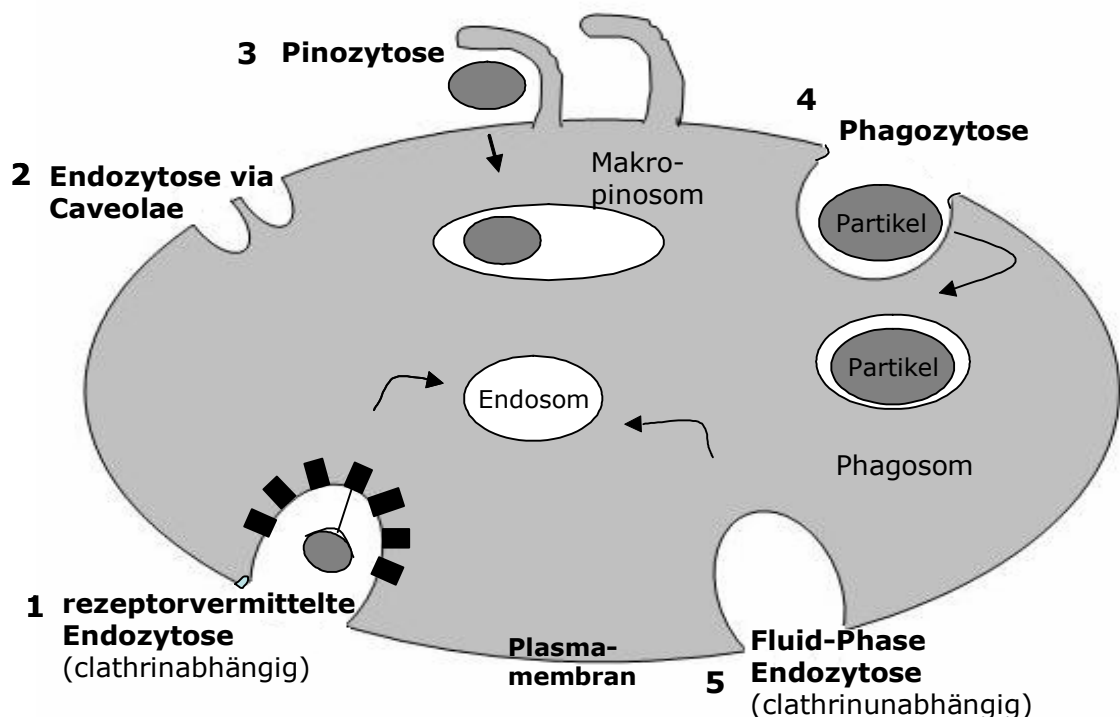


Abb. 1) **Mechanismen der Endozytose.** **1** Die rezeptorvermittelte Endozytose mittels clathrinumhüllter Membraninvasionen bzw. Vesikel ist am besten charakterisiert (s. 1.1.1). Die Mechanismen 2-5 erfolgen unabhängig von Clathrin und können über die Hälfte aller aufgenommenen Materialien liefern.

2 Caveolae sind 55-60 nm große Membraninvasionen an der Zelloberfläche, die auf der zytosmatischen Seite mit dem Protein Caveolin bemantelt sind. Unter gewissen Bedingungen lösen sich die Caveolae von der Plasmamembran ab. **3** Während der Pinozytose führen Membranausstülpungen zu

endozytotischen Kompartimenten (Makropinosomen), wenn das Ende der Ausstülpung wieder mit der Plasmamembran fusioniert. Dieser Mechanismus dient der unselektiven Aufnahme von kleineren bis mittelgroßen Partikeln. **4** Die Phagozytose dient der Aufnahme sehr großer Partikel und erfolgt in Abhängigkeit von Aktin. Moleküle oder Mikroorganismen werden entweder von Oberflächenproteinen direkt erkannt oder müssen zuvor opsoniert werden. **5** Bei der Fluid-Phase Endozytose erfolgt die unselektive Aufnahme gelösten Materials über Invaginationen nichtrezeptortragender Membranbereiche und der Bildung clathrinfreier Vesikel.

1.1.1 Rezeptorvermittelte Endozytose

Bei der rezeptorvermittelten Endozytose bindet ein Ligand an einen Rezeptor, der sich in Zellmembraninvaginationen, den Coated Pits, befindet. Diese Rezeptor-Liganden-Komplexe werden selektiv über die Coated Pits in das Zellinnere aufgenommen. Dabei ist die Internalisierung der Rezeptor-Liganden-Komplexe vor allem vom Anteil der Coated Pits an der Gesamtzelloberfläche und der Konzentriertheit der Rezeptoren in den Coated Pits abhängig. Zum Beispiel ist der gut untersuchte LDL (Low Density Lipoprotein)-Rezeptor konstitutiv in den Coated Pits konzentriert, während der EGF (Epidermal Growth Factor)-Rezeptor erst nach der Bindung des Liganden (EGF) in den Coated Pits konzentriert wird (Mukherjee, Ghosh et al. 1997). Internalisierungsmotive, die auf der zytoplasmatischen Seite der Rezeptoren sind, sorgen während der rezeptorvermittelten Endozytose für die Anreicherung der Rezeptoren in Coated Pits. Eine Mutation des LDL-Rezeptors (LDL-R), die mit einer defekten rezeptorvermittelten Endozytose von LDL einherging, zeigte, dass Tyrosin oder eine andere aromatische Aminosäure auf der zytoplasmatischen Rezeptorseite für die Lokalisierung in Coated Pits erforderlich sind. Für den LDL-R fand sich als Internalisierungsmotiv eine konservierte Aminosäuresequenz (NPXY; Asn-Pro-X-Tyr) (Davis, Goldstein et al. 1987). Ähnliche Internalisierungsmotive wurden in den zytosolischen Abschnitten anderer Rezeptoren gefunden, z.B. YXRF (Tyr-X-Arg-Phr) beim Transferrin-Rezeptor (Jing, Spencer et al. 1990; McGraw and Maxfield 1990). Die Interaktion dieser Internalisierungssequenzen mit AP-Komplexen (s. unten) vermittelt die selektive Anreicherung in Coated Pits (Mukherjee, Ghosh et al. 1997). Andere Internalisierungsmotive sind das ‚Di-Leucin‘ des CD4-Antigens, das mit AP2 interagiert und analog dem NPXY die Aufnahme des Rezeptor-Liganden vermittelt (Pelchen-Matthews, Armes et al. 1991; Marks, Woodruff et al. 1996).

Coated Pits sind korb förmige Membraneinstülpungen auf der Zelloberfläche, die an der zytoplasmatischen Seite von einem Proteingerüst ummantelt sind. Dieser

Mantel ist aus einem Gitterwerk von Pentagonen und Hexagonen aufgebaut, deren Grundstruktur von dem Protein Clathrin aufgrund seiner Proteinstruktur und seiner molekularen Anordnung gebildet wird. Die Proteinstruktur besteht aus drei spinnenförmig in einem Zentrum zusammenlaufenden Schenkeln, auch Triskelion genannt. Jeder Schenkel dieses Trimers wird aus zwei Untereinheiten, einer schweren Kette mit 190 kDa und einer leichten Kette mit 25 kDa, gebildet. Die antiparallele Interaktion zwischen den Schenkeln zweier Triskelions, deren Scheitelpunkte benachbart liegen, ermöglicht die typische gitterförmige Anordnung (Kirchhausen 2000).

In dem die Coated Pits umschließenden Gitterwerk sind weitere Proteine zu finden. Hervorzuheben davon sind die Adaptor-Proteine (AP-Komplexe), die für die selektive Anreicherung von membranverankerten Proteinen und Rezeptoren in den Coated Pits verantwortlich sind. Sie sind heterotetramerische Proteine der Größe von ~ 300 kDa und bestehen aus zwei großen Ketten (je ~ 100 kDa), einmal des α -Typs (α , γ , δ oder ϵ) und des β -Typs, sowie einer mittleren m -Kette (~ 50 kDa) und einer kleinen s -Kette (~ 20 kDa) (Kirchhausen 1999). Vier solcher Komplexe sind bisher bekannt: AP1 findet sich in Transportvesikeln, die den Transport vom Trans-Golgi-Apparat (TGN) zum endosomalen Kompartiment vermitteln; AP2 ist in sich ablösenden Coated Pits der Plasmamembran (PM) lokalisiert (Robinson and Pearse 1986; Ahle, Mann et al. 1988). AP3 assoziiert mit Endosomen (Dell'Angelica, Ohno et al. 1997; Hirst and Robinson 1998), während AP4 nur im TGN zu finden ist (Dell'Angelica, Mullins et al. 1999). Zwei Funktionen dieser AP-Komplexe stehen im Vordergrund. AP1 und AP2 interagieren direkt mit Clathrin und induzieren die Verkettung von Clathrinproteinen untereinander. Des Weiteren können AP-Komplexe Peptidsequenzen von membranverankerten Proteinen und Rezeptoren erkennen, um diese in Coated Pits zu rekrutieren (Kirchhausen 1999; Kirchhausen 2000). So hat AP2 auf die rezeptorvermittelte Endozytose von Liganden wie Transferrin, LDL oder den EGF direkten Einfluss. Der Transportprozess mittels Clathrin Coated Pits (CCPs) ist für den Großteil der durch die Zelle aufgenommenen Proteine und Lipide verantwortlich. Von der PM gelangen die Liganden entlang des endosomal-lysosomalen Weges ins Zellinnere. Alternativ vermitteln CCPs auch den Transport vom TGN zu endosomalen Kompartimenten. Der CCP-vermittelte Transport kann in mehrere Schritte unterteilt werden. Über die Rekrutierung von Clathrin-

Adaptor-Protein 2 (AP2) und Clathrin aus dem Zytosol an die PM (Initiation), der Verkettung von Clathrinmolekülen und der Bildung und Ausbreitung eines Clathrinnetzes an der zytosolischen Membranseite (Propagation) kommt es zu einer zunehmenden Membraninvagination. Die GTPase ARF6 hat bei dem Initiationsvorgang eine regulatorische Funktion (Krauss, Kinuta et al. 2003). Außerdem kommt es durch das Interagieren zwischen AP-Komplexen, Coat-Proteinen und zytosolischen Domänen von akzessorischen Proteinen zur selektiven Anreicherung der Rezeptoren und ihrer Liganden in den CCP. Durch die zunehmende Membrankrümmung ist letztlich das sich bildende Vesikel nur noch über einen schmalen Steg mit der PM verbunden. Hierbei sind zusätzliche Proteine wie Epsin, Endophyllin und Amphiphysin beteiligt (Ford, Mills et al. 2002). Das GTPase-Protein Dynamin sorgt für das Abschnüren (Budding) des Vesikels von der PM (Hinshaw and Schmid 1995; Hinshaw 2000). Dem folgen der Transport des Vesikels von der PM weg und das Entfernen des Clathrinmantels von dem Vesikel (Uncoating) durch ein 70 kDa ATP-abhängiges Enzym (Braell, Schlossman et al. 1984; Rothman and Schmid 1986). Die dadurch in das Zytosol abgegebenen Clathrinmoleküle, AP-Komplexe und anderen Proteine stehen nun wieder der Vesikelbildung an der PM zur Verfügung. Das Uncoating ist der letzte Schritt des Internalisierungs- und Abschnürungsprozesses, aus dem ein neu formiertes Endosom hervorgeht (Kirchhausen 1999; Kirchhausen 2000; Maxfield and McGraw 2004). Dieses Endosom wird nun auf endozytotischen Transportwegen zu intrazellulären Organellen transportiert. Dabei legen membranassoziierte Proteine in den Endosomen die anschließenden Kompartimente fest, mit denen das Endosom fusionieren muss. Hier sind die Mitglieder der Rab- und SNARE-Proteinfamilie von herausragender Bedeutung, welche im Weiteren genauer betrachtet werden.

1.1.2 Rab-Proteine

Das Transportgeschehen eines Vesikels kann unterteilt werden in die Formation eines Vesikels oder Tubulus, das Fortbewegen und Zuführen des Transport-Intermediate zum Zielkompartiment, das Andocken an die Zielmembran und die Fusion der beiden Lipiddoppelschichten (Zerial and McBride 2001). Andocken und Fusionieren von Vesikel- und Zielmembran bedürfen einer hohen Spezifität, um die Charakteristika der verschiedenen Zellorganellen und um einen geordneten intrazellulären Materialfluss zu wahren. Rab-Proteine und die ihnen assoziierten Moleküle, im Weiteren Effektoren genannt, sorgen beim Andocken für die Selektivität von Vesikel- und Zielmembran und koordinieren gemeinsam mit der SNARE-Maschinerie den gerichteten Vesikeltransport (Chen and Scheller 2001; Zerial and McBride 2001).

Rab-Proteine stellen eine große Gruppe an monomerischen kleinen GTPase-Proteinen dar, die der Ras-Superfamilie angehören. Beim Menschen sind über 60 Rab-Proteine bekannt und spiegeln damit die Komplexität Rab-regulierter Vorgänge wieder (Zerial and McBride 2001). Verschiedene Mitglieder der Rab-Proteine finden sich selektiv auf Organellen, womit sie die Organellidentität und die Spezifität der Transportprozesse festlegen.

Wie alle regulativen GTPasen können die Rab-Proteine in einer aktiven GTP-gebundenen oder in einer inaktiven GDP-gebundenen Form vorliegen. Dabei wird die Aktivität der Rab-Proteine durch verschiedene Faktoren beeinflusst (s. Abb. 2). In ihrer aktiven Form interagieren sie mit der Vesikelmembran und dissoziieren nach GTP-Hydrolyse von der Membran und liegen als inaktive Form frei im Zytosol, die mit dem GDP-Dissoziationsinhibitor (GDI) einen Komplex bilden (Soldati, Shapiro et al. 1994; Ullrich, Horiuchi et al. 1994). Der zytosolische GDI-Austauschfaktor (GDF) entfernt den GDI (Dirac-Svejstrup, Sumizawa et al. 1997) und ermöglicht ein erneutes Binden an ein Vesikel, das seiner Zielmembran zugeführt werden soll. Durch einen Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) erfolgen der GDP/GTP-Austausch und die Aktivierung des Rab-Proteins (Soldati, Shapiro et al. 1994; Ullrich, Horiuchi et al. 1994). Nach Andocken an und Fusion mit der Zielmembran wird die Aktivierungsphase durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP) beendet (Fukui, Sasaki et al. 1997).

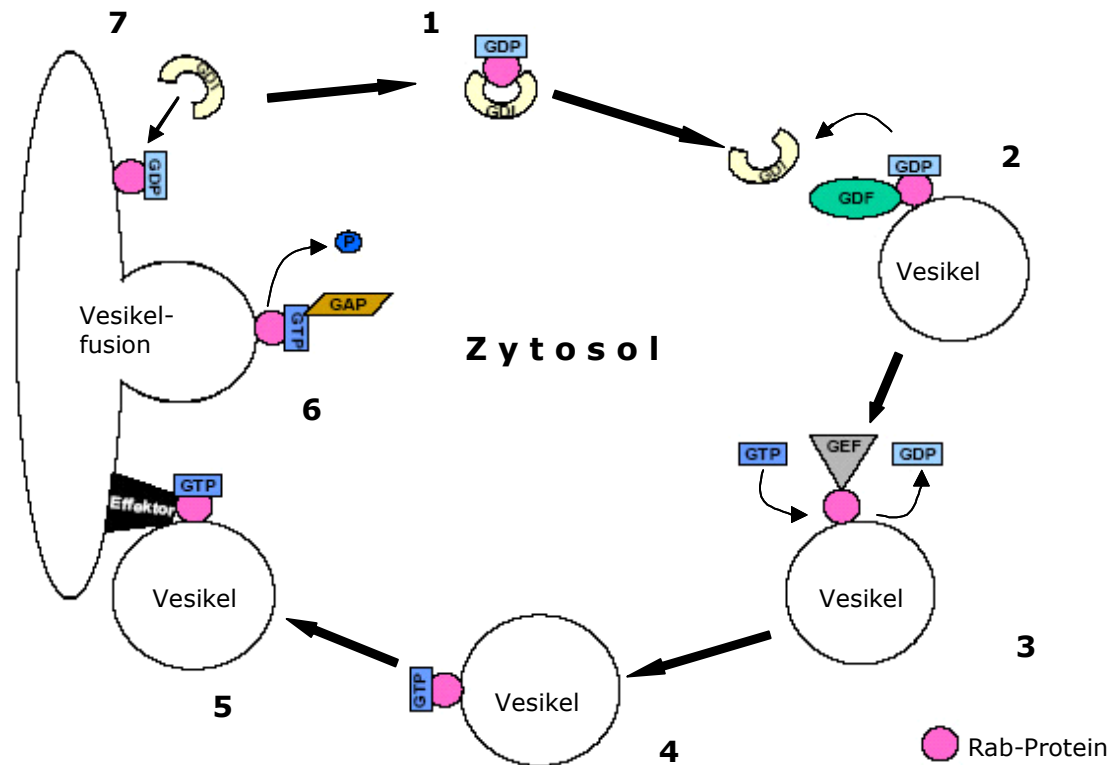


Abb. 2) **Zyklus der Rab-Proteine.** Das Rab-Protein ist als grauer Kreis dargestellt. **1** Inaktives GDP-gebundenes Rab-Protein wird im Zytosol durch den GDP-Dissoziationsinhibitor (GDI) stabilisiert. **2** Zur Bindung des Rab-GDP-Komplexes an die Membran eines ankommenden Vesikels wird der GDI durch den GDI-Austauschfaktor (GDF) entfernt. **3** Der Austausch von GDP durch GTP erfolgt durch den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF). **4** An der Vesikelmembran findet sich GTP-gebundenes Rab-Protein. **5** Die Rab-vermittelte Bindung des ankommenden Vesikels an die Akzeptormembran wird möglicherweise über einen Effektor vollzogen. **6** Die GTP-Hydrolyse wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP) vermittelt, die mit der Fusion der Vesikelmembran einhergeht. **7** Unter Beteiligung von GDI leitet die Dissoziation des Rab-GDP von der Membran einen weiteren Zyklus ein.

Das Protein Rab5 und seine Effektoren stellen eine der am besten untersuchten Gruppe innerhalb der Rab-Familie dar. Sie reguliert sowohl den CCP-vermittelten Transport von der PM zu den frühen Endosomen (Early Endosomes, EE) als auch die Fusion homotypischer, sortierender Endosomen (Sorting Endosomes, SE; siehe 1.2.1) (Gorvel, Chavier et al. 1991; Bucci, Parton et al. 1992).

Dem Rab5 wird jedoch bereits bei der Formierung eines Vesikels an der PM eine Funktion zugesprochen (Bucci, Parton et al. 1992; McLauchlan, Newell et al. 1998; Lanzetti, Rybin et al. 2000). Eine weitere Rolle konnte für Rab5 in der Vesikelbewegung entlang des Zytoskeletts nachgewiesen werden. Rab5 bewirkt zum einen das Anheften der EE an Mikrotubuli, zum anderen sorgt es für die Motilität entlang zellulärer Mikrofilamente (Echard, Jollivet et al. 1998; Nielsen, Severin et al. 1999).

Untersuchungen zur Rolle des Netzwerkes von Rab5 und seinen Effektoren während des Andockmechanismus an EE führten zur Annahme, dass sich unter dem Ablauf zahlreicher GTP-Hydrolysezyklen lokal an der EE-Membran die aktive Rab5-Form anreichert, begleitet von der Anhäufung von Effektoren (Zerial and McBride 2001). Unter diesen nimmt der Rabaptin-5-Rabex-5-Komplex eine zentrale Position ein, der Rab5 durch die GEF-Aktivität von Rabex-5 aktiviert (Horiuchi, Lippe et al. 1997). Das führt zur Bindung weiterer Rab-Effektoren (Stenmark, Vitale et al. 1995). In einem weiteren zentralen Schritt interagiert aktiviertes Rab5 mit der hVPS34-p150 Phosphoinositol-3-OH-Kinase (PI-3-K), koppelt damit die Phosphatidylinositol-3-Phosphat-(PtdIns-3-P)-Produktion mit Rab5-reichen Membrandomänen und sorgt für die Aufnahme und Rekrutierung der Rab5-FYVE-Effektoren Early Endosome Antigen 1 (EEA1) und Rabenosyn-5. EEA1 vermittelt direkt das Andocken an die EE (Christoforidis, McBride et al. 1999). Es ist ein coiled-coil Protein, das zwei strukturelle Elemente in seinem N- und C-Terminus enthält, die essentiell für den Andockmechanismus sind (Stenmark, Aasland et al. 1996; Simonsen, Lippe et al. 1998). Die FYVE-Finger Domäne bindet spezifisch an PtdIns-3-P (Stenmark and Aasland 1999; Lawe, Patki et al. 2000). In direkter Nachbarschaft dazu lokalisiert eine Rab5-Bindungsdomäne (Simonsen, Lippe et al. 1998). EEA1 könnte als Brückenelement zweier Rab5-besetzter Membranen dienen, da Rab5 für die Fusion zweier Membranen sowohl auf der Donor- als auch auf der Akzeptormembran erforderlich ist (Barbieri, Hoffenberg et al. 1998; Rubino, Miaczynska et al. 2000). EEA1 und wahrscheinlich auch Rabenosyn-5 assoziieren weitgehend an die EE und führen damit zu einer asymmetrischen Verteilung zwischen ankommenden Transportvesikel und seinem Zielorganell. Dies korreliert mit der asymmetrischen Aufteilung von hVPS34 (Christoforidis, Miaczynska et al. 1999). Die Bindung von EEA1 zu aktiviertem Rab5 über die N- und C-Termini-Bindungsdomänen ist nicht ausreichend für eine Membranrekrutierung. Weitere, bisher noch ungeklärte Mechanismen tragen zur Spezifität des endosomalen Transports bei (Nielsen, Christoforidis et al. 2000).

Wichtig ist die Rolle der Rab-Proteine als Determinanten für die Identität von Zellkompartimenten, die sich durch die unterschiedliche intrazelluläre Verteilung der Rab-Proteine und der damit verbundenen Ausbildung

kompartimentspezifischer Membrandomänen verdeutlichen lässt. Wie bereits oben beschrieben wirkt Rab5 während des Transports von der PM zu den EE. Rab4 lokalisiert auch zu EE, außerdem ist es im endosomalen rezyklierenden Kompartiment (ERC) zu finden. Rab4 scheint eine Rolle im Membranrecycling von EE zur PM zu haben, obwohl der exakte Wirkungsort von Rab4 noch unklar ist (Pfeffer 2001). Rab11, das an den Membranen des ERC und TGN lokalisiert, reguliert das Recycling zurück an die PM (Neufeld, Wastney et al. 1999; Cavalli, Corti et al. 2001). Unter anderem ist es in zahlreichen Sortierwegen erforderlich, die vom ERC ausgehen (Ellson, Gobert-Gosse et al. 2001; Oling, Bergsma-Schutter et al. 2001). Rab7 ist in den Transport von EE zum Kompartiment der späten Endosomen (Late Endosomes, LE) verwickelt (Feng, Press et al. 1995). Für das Recycling des Mannose-6-Phosphat (M-6-P)-Rezeptors von LE zum TGN konnte dem Protein Rab9 eine Funktion zugewiesen werden (Lombardi, Soldati et al. 1993).

1.1.3 SNARE-Proteine

Am Ende der Transportvorgänge eines Vesikels zu seinem Zielkompartiment steht die Fusion von Vesikelmembran und Zielmembran. Diese intrazellulären Membranfusionsereignisse werden durch die Familie der SNARE-Proteine (soluble NSF attachment protein receptor; NSF = N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein) vermittelt. Über 30 kompartimentspezifische SNARE-Proteine in Säugetierzellen sind mittlerweile bekannt (Chen and Scheller 2001). Die Proteine Syntaxin (STX1), SNAP-25 (25 kDa synaptosome-associated protein) und VAMP (vesicle-associated membrane proteine) wurden als erste SNAREs beschrieben (Bennett, Calakos et al. 1992; Oyler, Higgins et al. 1989; Trimble, Cowan et al. 1988). Sequenzhomologien identifizierten alle weiteren SNARE-Proteine als Mitglieder der Syntaxin-, der VAMP- oder der SNAP-25-Familie (Jahn and Sudhof 1999; Scales 2000).

SNAREs werden unterteilt in v-SNAREs (R-SNAREs) und t-SNAREs (Q-SNAREs) gemäß ihrer Lokalisation an Vesikel- oder Zielmembranen (Sollner, Bennett et al. 1993; Fasshauer, Sutton et al. 1998). Kennzeichen aller SNARE-Proteine ist eine konservierte, sich 7-fach wiederholende Aminosäuresequenz (coiled-coil), die die Interaktion von Ziel- und Vesikelmembran vermittelt (Chen and Scheller 2001). Syntaxin und SNAP-25 sind auf der Zielmembran lokalisiert, ihre coil-Strukturen interagieren mit der von VAMP, das auf der Membran des ankommenden Vesikels zu finden ist (SNARE core complex; SNARE-

Kernkomplex) (Hayashi et al. 1994; Pevsner et al. 1994; Fasshauer et al. 1998; Poirier et al. 1998; Yang et al. 1999). Die Formierung des SNARE-Kernkomplexes ist maßgeblich für das Fusionsereignis, da er die beiden Membranen in unmittelbare Nähe bringt, hydro- und elektrostatische Energiebarrieren überwindet und die beiden Lipiddoppelschichten schließlich entsprechend des Reißverschlussprinzips fusionieren lässt (Hanson, Roth et al. 1997; Lin and Scheller 1997).

Das Auseinanderfallen eines stabilen SNARE-Kernkomplexes in seine einzelnen Komponenten erfordert ATP und wird von der ATPase NSF (N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein) und dem Adaptor-Protein α -SNAP (soluble NSF attachment protein) vermittelt (Malhotra et al. 1988; Clary et al. 1990; Hohl et al. 1998; Yu et al. 1998; Rice and Brunger 1999). Dafür müssen nach dem Fusionieren der Lipiddoppelschichten NSF und α -SNAP aus dem Zytosol rekrutiert werden, was die Dissoziation des SNARE-Komplexes zur Folge hat. NSF stellt für diesen Vorgang durch Hydrolyse von ATP die nötige Energie bereit. Syntaxin, VAMP und SNAP-25 sind nun frei im Zytosol und stehen für weitere Fusionsereignisse zur Verfügung (Chen and Scheller 2001).

Die Rolle der SNARE-Maschinerie in der Spezifität des Membranverkehrs ist ungeklärt. Die SNARE-Maschinerie scheint nur Teilaspekte zur Spezifität intrazellulärer Transportvorgänge zu leisten. Und nur gemeinsam mit der Rab-Maschinerie scheint eine Spezifität kompartimentspezifischer Transportvorgänge möglich. Dabei scheinen direkte molekulare Interaktionen zwischen Rab-Effektoren und Komponenten der SNARE-Maschinerie die Spezifität der Fusion von Vesikel- und Zielmembran zu bestimmen (Zerial and McBride 2001).

1.2 Das endosomale System

Die endosomalen Kompartimente nehmen innerhalb der endozytotischen Transport- und Recyclingwege die zentrale Position ein. Die EE sorgen für die Trennung des Recyclingweges vom degradativen Weg, der im Weiteren von den LE und Lysosomen gebildet wird. Zur Erhaltung der Spezifität müssen sich diese Organellen in ihren Funktionen und Eigenschaften unterscheiden. Für die Abfolge der physiologischen Prozesse ist es daher von Bedeutung, dass die Spezifität der verschiedenen Organellen aufrechterhalten wird.

1.2.1 Frühe Endosomen

Unter dem Begriff der frühen Endosomen müssen zwei morphologisch und funktionell unterschiedliche endosomale Organellen gesehen werden: sortierende Endosomen (Sorting Endosomes, SE) und das endosmale rezyklierende Kompartiment (ERC) (Maxfield and McGraw 2004).

Das aus der rezeptorvermittelten Endozytose und nach dem Uncoating hervorgegangene Endosom fusioniert mit einem anderen Endosom oder mit bereits existierenden SE. Alle internalisierten Moleküle werden zu den SE transportiert, so dass sich in ihnen Moleküle befinden, die rezykliert (z.B. Transferrin) oder abgebaut (z.B. LDL) werden (Mukherjee, Ghosh et al. 1997). Wie ihr Name impliziert, sind sie für das Sortieren aller internalisierter Moleküle zuständig und führen diese ihrem korrekten Bestimmungsort zu: LE, ERC und die PM (Maxfield and McGraw 2004).

SE lokalisieren in der Zellperipherie, haben im Lumen ein pH von ~ 6 und sind von tubulär-vesikulärer Struktur.

Dieses endozytotische Organell stellt kein stabiles Kompartiment dar. SE können nur über einen Zeitraum von 5-10 Minuten mit Endosomen fusionieren, die von der Zellmembran stammen. Nach dieser Zeit stellen sie für ankommende Vesikel keine Zielmembran mehr dar, da sie ihren pH-Wert im Lumen absenken und saure Hydrolasen akkumulieren, wodurch sie die Eigenschaften von LE annehmen (Mukherjee, Ghosh et al. 1997; Gruenberg 2001; Maxfield and McGraw 2004).

Bafilomycin A1 als vakuolärer H^+ -ATPase-Inhibitor verlangsamt diese Progression der SE zu LE und dann zu Lysosomen (van Weert, Dunn et al. 1995; Aniento, Gu et al. 1996). Damit sind Änderungen des pH-Wertes möglicherweise für einige der Transformationen verantwortlich.

Als Konsequenz des niedrigen pH-Wertes lösen sich viele Liganden von ihren Rezeptoren. Neben der selektiven Anreicherung von Rezeptoren auf der Zellmembran über Coated Pits ist das pH-induzierte Entkoppeln von Ligand und Rezeptor ein weiterer Sortiermechanismus, dem die Morphologie der SE entgegenkommt. So werden die im Lumen gelösten Liganden im vesikulären Anteil der SE konzentriert (Maxfield and McGraw 2004).

Während dieses Reifeprozesses der SE mit Milieuan säuerung und Translokation in Richtung Zellzentrum kommt es zu einem effizienten

Recycling eines Großteils der Membranen und der darin verankerten Proteine, die von der PM stammen. Durch permanentes Ablösen der Tubuli von den SE bewegt sich ein Großteil der Membranen mit den darin befindlichen Lipiden und Proteinen in Richtung ERC (Dunn, McGraw et al. 1989). Übrig bleibt ein SE rein vesikulärer Struktur, das sich entlang der Mikrotubuli als Transport-Intermediate in Richtung LE bewegt (Gruenberg, Griffiths et al. 1989).

Membranassoziierte Recyclingmoleküle kehren entweder direkt oder über das ERC an die Zellmembran zurück. Dabei stellt das ERC ein stabiles Zellkompartiment dar, das aus einer Ansammlung von Membrantubuli besteht, deren morphologischen Eigenschaften auf eine Herkunft von den SE und deren Tubuli schließen lassen. Im ERC sind die Tubuli miteinander verbunden, an Mikrotubuli assoziiert und bilden ein Netzwerk. Ihr pH liegt bei ~6,5 (Mukherjee, Ghosh et al. 1997; Gruenberg 2001; Maxfield and McGraw 2004). Vom ERC werden die meisten Moleküle wieder der PM zugeführt. Es kann aber auch Proteine sortieren und diese anderen Bestimmungsorten zuordnen. So steht es zum Beispiel mit dem TGN in Kontakt (Maxfield and McGraw 2004).

1.2.2 Späte Endosomen

Die späten Endosomen (Late Endosomes, LE) sind nach den SE die erste Station für Moleküle, die der Degradation zugeführt werden. In ihrer Größe lassen sie sich mit SE vergleichen, zeigen aber in der Dünnschicht-Mikroskopie in ihrem Inneren vesikuläre Strukturen auf, die zu dem Beinamen Multivesicular Bodies (MVBs) führten und nach innen gerichtete Membran-invaginationen darstellen (van Deurs, Holm et al. 1993). In diesen einwärts gerichteten Membranen befinden sich Rezeptoren und Membranproteine, die entlang des degradativen Weges Lysosomen zugeführt werden sollen. Ein Recycling über das ERC wird so von transmembranösen Proteinen durch ein Akkumulieren in den internen Membranen verhindert. Diese internen Membranen werden von einer äußeren, limitierenden Membran umschlossen.

LE lokalisieren näher zum Zellzentrum als SE und stehen in einem intensiven Vesikelaustausch mit dem TGN. Dieser Vesikelaustausch dient vor allem dem Zyklieren der M-6-P-Rezeptoren (M-6-P-R), die die im TGN synthetisierten lysosomalen Hydrolasen und Lipasen den LE zuführen (Kornfeld and Mellman 1989). Ihr pH-Wert beträgt unter 6. Im Lumen gelöste Partikel (z.B. LDL) und in den internen Membranen akkumulierte Moleküle können nun hydrolytisch gespalten werden. Die interne Membran ist reich an Lysobisphosphatidsäure

(LBPA), die ein schwaches Substrat für die Phospholipase darstellt und damit gegenüber der Degradation resistent ist.

Lysosomen gehören nicht zu den LE, stellen ein hydrolasenreiches, saures (pH 5-5,5) und membranumgebenes Organell dar, in dem der Katabolismus internalisierter Moleküle stattfindet. Die Funktionen der lysosomalen Membran bestehen in der Aufrechterhaltung eines intralysosomalen sauren Milieus durch ATP-getriebene Protonenpumpen, dem selektiven Transport von Abbauprodukten in das Zytosol durch Transportproteine und dem Schutz zytosolischer Strukturen vor hydrolytischem Abbau. Sie sind in ihrer Morphologie sehr heterogen (Kornfeld and Mellman 1989).

1.3 Lipide und Membrantransport

Lipide sind hydrophob, im Wasser nicht oder nur schlecht löslich und lassen sich in hydrolysierbare und nichthydrolysierbare Lipide einteilen. Zu ersteren werden die einfachen Ester (Triglyzeride, Wachse, Sterolester), Phospholipide (Phosphatide, Sphingolipide) und Glykolipide (Cerebroside, Ganglioside) gezählt. Nichthydrolysierbare Lipide sind die Isoprenoide (Carotenoide: Vitamin A, E, K), Lipidalkohole (Alkanole, zyklische Sterole wie das Cholesterin und seine Vitamin- und Hormonderivate), Fettsäuren und ihre Derivate (Eicosanoide). Die wichtigsten Funktionen der verschiedenen Lipide werden im Folgenden kurz dargestellt.

Fettsäuren sind die wichtigsten Energieträger der Nahrung und in Form von Triglyzeriden die bedeutendste Energiereserve. Lipide gewährleisten thermische Isolation und Schutz durch Einlagerung in subkutane und organumschließende Gewebe. Gleichzeitig sind sie lebenswichtige Baustoffe: Phospholipide (PL), Glykolipide und Cholesterin bilden den Hauptbestandteil von Membranen und sorgen damit für die mechanische Ausbildung der Zellstruktur und der Zellkompartimente. Dabei ist vor allem die Etablierung von zellulären Organellen wie Zellkern, ER, TGN und Mitochondrien essentiell für die Aufrechterhaltung lebenswichtiger Funktionen. Die Ausbildung von Membranen ist die Basis für den Aufbau des elektrischen Membranpotentials. Einige Lipide dienen als Membrananker für Proteine, die dadurch an eine Membran gebunden werden. Lipide sind außerdem Kofaktoren von enzymatischen Reaktionen (Blutgerinnung, Elektronentransport) oder spielen eine Rolle im Sehprozess (Carotinoide). Steroide, Vitamine, Eicosanoide und

andere Derivate von PL haben zudem Signalfunktion und dienen als Hormone, Mediatoren und Second-Messengers.

1.3.1 Lipoproteinstoffwechsel

Durch ihre hydrophobischen Eigenschaften werden Triglyzeride, Cholesterin, Cholesterinester und andere Lipide im Blutplasma mit speziellen Transportvehikeln, den sogenannten Lipoproteinen, transportiert. Diese bestehen aus Lipiden und Transportproteinen, den Apolipoproteinen (Apoprotein).

Lipoproteine sind sphärische Partikel, in deren hydrophoben Kern sich Cholesterinester und Triglyzeride befinden und die von einer polaren Hülle aus amphiphilen PL, freiem Cholesterin und Apoproteinen umgeben sind. Die geladenen Phosphatgruppen der PL und die Hydroxylgruppen der Cholesterinmoleküle interagieren mit dem sie umgebenden wässrigen Milieu, die apolaren Fettsäuren der PL sowie die Sterolringe des Cholesterins orientieren sich zum Kern hin.

Die klassische Einteilung der Lipoproteine erfolgt nach ihrem Dichteverhalten in der Ultrazentrifugation in folgende Hauptgruppen: Chylomikronen (CM) als größte Partikel mit der geringsten Dichte dienen als Transporter exogen zugeführter Lipide. Ihnen folgen die Lipoproteine sehr geringer Dichte (Very Low Density Lipoproteins, VLDL) als Transporter endogener Lipide sowie die Lipoproteine mittlerer Dichte (Intermediate Density Lipoproteins, IDL) und geringer Dichte (Low Density Lipoproteins, LDL), die durch intravasale Modifikationen aus VLDL entstehen. Zuletzt kommen die Lipoproteine hoher Dichte (High Density Lipoproteins, HDL), denen als Lipoproteine für den reversen Cholesterintransport aus der Peripherie zurück zur Leber eine physiologisch entscheidende Aufgabe zukommt.

Die Apoproteine haben spezielle Funktionen bei der Entstehung, dem Transport und dem Metabolismus der Lipoproteine. Mit Ausnahme von Apoprotein A sind sie amphiphatische Proteine mit hydrophoben und hydrophilen Anteilen, die sowohl Lipidbindung als auch Wasserlöslichkeit vermitteln.

	Chylo- mikron	VLDL	IDL	LDL	HDL
Dichte (g/ml)	< 0,95	0,95- 1,006	1,006- 1,019	1,019- 1,063	1,063- 1,210
Durchmesser (nm)	75-1200	30-80	25-35	18-25	5-12
Bestandteile (% Trockengewicht)					
Protein	1-2	10	18	25	33
Triacylglycerin	83	50	31	10	8
Cholesterin und Cholesterinester	8	22	29	46	30
Phospholipide	7	18	22	22	29
Apoprotein - Zusammensetzung	A-I, A-II	B-100	B-100	B-100	A-I, A-II
	B-48	C-I, C-II, C-III	C-I, C-II, C-III		C-I, C-II, C-III
	C-I, C-II, C-III	E	E		D
	E				E
Klassifizierung durch Elektrophorese	Omega	Prä-beta	Zwischen beta und prä-beta	Beta	Alpha

Abb. 3) **Zusammensetzung der Lipoproteine beim Menschen** (aus Biochemistry von Goeffrey L. 1998).

Der Stoffwechsel der Lipoproteine verläuft über drei verschiedene Wege: einen exogenen Weg, einen endogenen Weg und den reversen Cholesterintransport.

Exogener Weg

Exogen zugeführte Lipide werden nach Aufnahme in den Enterozyten der Darmmukosa mit Apoprotein B-48 und Apoprotein A-I zu triglyzeridreichen CM zusammengesetzt. Im Gefäßsystem erfolgt durch Apoproteinaustausch mit HDL und hydrolytischer Spaltung der Triglyzeride durch die endothelständige Lipoproteinlipase (LPL) die Modifizierung der Partikel zu cholesterinreichen Chylomikronen-Remnants (Olivecrona, Liu et al. 1993; Hussain, Kanha et al. 1996; Mahley and Ji 1999; Merkel, Heeren et al. 2002). Hierbei werden abgespaltene freie Fettsäuren von fettsäureverwertendem Gewebe aufgenommen. Zur gleichen Zeit erhalten die CM Apoprotein C und Apoprotein E von den HDL-Partikeln. Die so entstandenen Chylomikronen-Remnants können nun durch den LDL-R und das LDL-Receptor-related-Protein (LRP) in die Leber aufgenommen werden (Beisiegel, Weber et al. 1989; Kowal, Herz et

al. 1989; Kowal, Herz et al. 1990; Beisiegel, Krapp et al. 1994; Beisiegel 1995; Rohlmann, Gotthardt et al. 1998).

Endogener Weg

In der Leber synthetisierte VLDL, als Transporter des endogenen Lipoproteinmetabolismus, enthalten neben Apoprotein C und Apoprotein E das Apoprotein B-100 (Fazio and Yao 1995). Durch LPL-vermittelte Hydrolyse entstehen in der Blutbahn aus den VLDL die VLDL-Remnants und daran anschließend IDL-Partikel. Die Prozessierung von IDL-Partikeln durch die hepatische Lipase führt zu LDL-Partikeln, die sich durch eine Anreicherung von Apoprotein B-100 und Cholesterinester (aus HDL) auszeichnen (s. unten: reverser Cholesterintransport) (Grosser, Schrecker et al. 1981; Rubinstein, Gibson et al. 1985). LDL versorgt die Peripherie mit Cholesterin und wird dort über den LDL-R aufgenommen. LDL-Partikel können aber auch mittels LDL-R und LRP-vermittelter Endozytose von der Leber internalisiert und metabolisiert werden.

Reverser Cholesterintransport

Die Leber ist als einziges Organ in der Lage, im Körper überschüssiges Cholesterin über die Gallensäure auszuschleiden. Der reverse Cholesterintransport beschreibt den Transfer überschüssigen Cholesterins aus den peripheren Geweben hin zur Leber durch die HDL-Partikel. Vorläufermoleküle der HDL werden von der Darmmukosa (Danielsen, Hansen et al. 1993) und der Leber hergestellt (Castle, Pape et al. 1991). HDL-Vorläufer, lipidarmes HDL und freies Apoprotein A-I nehmen PL und Cholesterin aus nichthepatischen, aber auch hepatischen Zellen auf (Oram and Yokoyama 1996). Bei diesem Lipidefflux aus peripheren Zellen spielt die Gruppe der ATP-Binding-Cassette (ABC)-Transporter eine entscheidende Rolle (Lawn, Wade et al. 1999; Rust, Rosier et al. 1999). Durch weitere Lipidaufnahme aus peripheren Zellen oder aus Apoprotein-B-enthaltenden Lipoproteinen, durch die Lecithin-Acyltransferase (LCAT) vermittelte Veresterung von Cholesterin sowie durch den Austausch von Apoproteinen mit anderen Lipoproteinklassen reifen die HDL-Vorläufer zu lipidreichen, sphärischen mit Apoprotein A-I versehenen HDL-Partikeln (von Eckardstein et al. 2001). Danach werden sie von der Leber über HDL-spezifische Rezeptoren wie den Scavenger Receptor

BI (SR-BI) aufgenommen (Krieger 1999; Curtiss 2000; Tall, Jiang et al. 2000; Trigatti and Rigotti 2000).

1.3.2 Aufnahme und intrazellulärer Stoffwechsel von Cholesterin

Die Aufnahme des Cholesterins durch die Zelle erfolgt über die rezeptorvermittelte Endozytose der cholesterinreichen LDL-Partikel. Das daraus hervorgegangene Transportvesikel wird zu den SE transportiert, wo die rezeptorgebundenen LDL-Partikel mittels pH-Senkung vom LDL-R abgekoppelt werden. Der LDL-R wird über die tubulären Strukturanteile der SE dem ERC zugeführt und unterliegt damit dem Rezeptorrecycling. Die LDL-Partikel befinden sich im Lumen vesikulärer SE-Abschnitte und werden den LE und Lysosomen zugeführt (s. 1.2.1; Mukherjee, Ghosh et al. 1997). Hier werden die den Hauptbestandteil der LDL-Partikel ausmachenden Cholesterinester und Apoproteine durch die lysosomalen Hydrolasen, sauren Lipasen (LAL) und Proteasen hydrolysiert und fermentiert. Anschließend wird der Großteil des freien Cholesterins zur PM und zum ER transportiert, wo eine Veresterung durch die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) stattfindet (Tabas 1995; Chang, Chang et al. 1997). Die Aktivität der ACAT wird durch den ansteigenden Spiegel an freiem Cholesterin stimuliert, die gebildeten Cholesterinester werden in zytosolischen Lipidtröpfchen gespeichert. Die Mobilisierung des Cholesterins aus den Esterverbindungen erfolgt durch die cAMP-aktivierte neutrale Cholesterinesterhydrolase (NCEH) (Brown, Ho et al. 1980; Bernard, Rodriguez et al. 1991). Freigesetztes Cholesterin wird wiederum zur Zellmembran transferiert, von wo aus es wieder zum ER transportiert und verestert werden kann. Der hieraus resultierende Zyklus wird durch extrazelluläre Cholesterinakzeptoren wie HDL in der Peripherie (s. 1.3.1 reverser Cholesterintransport) oder in der Leber und steroidbildenden Organen durch die Synthese von Cholesterinderivaten und/oder der Eliminierung über Gallensäuren unterbrochen (Bernard, Rodriguez et al. 1990). Des Weiteren wird diesem Zyklus Cholesterin durch die Neubildung von Membranen, Lipoproteinen, Steroiden und bioaktiver Derivate (Vitamine) entzogen. Zudem stellt das ER den Ort der Synthese von Cholesterin dar, zeichnet sich aber durch einen relativ niedrigen Cholesterinspiegel aus, so dass effektive Transportmechanismen für das Abtransportieren von Cholesterin angenommen werden (Maxfield and Wustner 2002).

Die zelluläre Konzentration an Cholesterin wird über Neusynthese, Aufnahme (Influx), Sekretion (Efflux), Veresterung sowie über Synthese und Sekretion von Lipoproteinen, Steroidhormonen und Gallensäuren reguliert. Ein Überschuss an zellulärem Cholesterin führt zur Repression in der Expression von Genen, die die zelluläre Cholesterinhomeostase regulieren (LDL-R, HMG-CoA-Reduktase, HMG-CoA-Synthase, Farnesyldiphosphat-Synthase und Squalen-Synthase) (Goldstein and Brown 1990; Ericsson, Jackson et al. 1996; Brown and Goldstein 1997; Guan, Dai et al. 1998; Blanchette-Mackie 2000).

Die Kontrolle der Expression von sterolregulierten Genen erfolgt über deren Promotoren, die sterolresponsive DNA-Bindungsmotive (Sterol Responsive Elements, SREs) enthalten. Spezifische sterolsensitive Transkriptionsfaktoren binden an diese Elemente und werden als SRE-bindende Proteine (SREBP) bezeichnet (Brown and Goldstein 1997). SREBP-Vorläuferproteine, die sich an der ER-Membran befinden, werden zuerst durch die sterolsensitive Protease prozessiert (Site-1-Protease) (Sakai, Duncan et al. 1996; Brown and Goldstein 1997; Sakai, Nohturfft et al. 1998; Sakai, Rawson et al. 1998). Durch eine zweite, sterolunabhängige Proteolyse (Site-2-Protease) verliert SREBP den Membrananker, es entsteht ein aktiviertes SREBP, das nun von der ER-Membran in den Zellkern gelangt (Sakai, Duncan et al. 1996; Rawson, Zelenski et al. 1997). Dort reguliert es dann die Expression SRE-responsiver Gene (Sudhof, Russell et al. 1987; Smith, Osborne et al. 1990).

Obwohl die Transportwege des intrazellulären Cholesterins recht gut untersucht sind, ist über die molekularen Mechanismen, die diesen Transport vermitteln, noch wenig bekannt. Derzeit werden drei grundlegende Mechanismen in Betracht gezogen. Cholesterin kann mittels Transportvesikel und Tubuli transportiert werden, die zudem andere Membranbestandteile von einem Organell zur Zielmembran mit sich führen. Dieser Prozess erfordert ATP, ist aber nicht durch die Cholesterinverteilung zwischen Donor- und Akzeptormembran beeinflusst (Maxfield and Wustner 2002).

Des Weiteren kann sich Cholesterin in signifikantem Ausmaß von der Membran lösen und mit Hilfe zytoplasmatischer Transportproteine im Zytosol diffundieren (Maxfield and Wustner 2002). Prototyp in der Familie solcher Lipid- und Steroltransporter ist das Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR/StarD1) (Stocco 2001). Bei einem Mitglied dieser Proteinfamilie, dem

StARD4, ist die Genexpression durch den zellulären Sterolspiegel reguliert (Soccio, Adams et al. 2002). Außerdem kann der Cholesterintransport durch den Kontakt zweier Membranen erfolgen. So liegt in vielen Zelltypen ein Teil des ER in enger Nachbarschaft zur PM (Putney 1999). Diese Anordnung könnte den schnellen Austausch zwischen zwei Membranen erleichtern, der möglicherweise von Transferproteinen unterstützt wird.

1.3.3 Einfluss von Lipiden auf Membranen

Mit den PL, Cholesterin und weiteren Lipiden können biologische Membranen vielfältige Lipidkompositionen aufweisen. Dies ist für die korrekte Abfolge intrazellulärer Prozesse in Membranen verschiedener Organellen essentiell. Allgemein bestehen Zellmembranen in Eukaryonten aus einer Lipiddoppelschicht, die sich primär aus PL und Cholesterin zusammensetzt (Spector and Yorek 1985). In dem 1972 von Singer und Nicolson beschriebenen „fluid mosaic model“ wird propagiert, dass die Lipide der Doppelschicht in einem dynamischen Zustand vorliegen (Singer and Nicolson 1972), in dem Proteine als Rezeptoren, Transporter und Enzyme beweglich eingebettet sind.

Würden sich jedoch sämtliche Lipidbausteine einer Membran frei vermischen, wäre die Spezifität von Zellkompartimenten nicht mehr gegeben und wichtige zelluläre Prozesse wären beeinträchtigt. So reichern sich z.B. Sphingomyelin und Phosphatidylserin im Vergleich zur PM in endosomalen Membranen an (Urade, Hayashi et al. 1988).

Dabei kommt es durch die unterschiedliche Mischbarkeit von Sphingolipiden, Glycerolipiden und Cholesterin zur Formierung von lateralen Lipidzusammenlagerungen in zellulären Membranen (Rietveld and Simons 1998), die als Mikrodomänen oder Lipid-Rafts bezeichnet sind. Daneben befinden sich cholesterinarme liquid-ungeordnete Phasen (Brown 1998; Brown and London 2000). Innerhalb der Lipid-Rafts findet sich neben dem Cholesterin eine hohe Konzentration von Sphingomyelin (Ahmed, Brown et al. 1997).

Lipid-Rafts sind unlöslich in nichtionischen Detergenzien und lassen sich somit als DIGs (detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membrane domains) isolieren. Sie erwerben spezifische Funktionen durch das Konzentrieren und Ausschließen von Membranproteinen. Als eine Art Plattform für Rezeptoren und Komponenten von Signaltransduktionskaskaden sind sie mit GPI (glycosyl-phosphatidylinositol)-verankerten Proteinen an der Zelloberfläche und mit vielen Signalproteinen, z.B. Kinasen der Ras- und der src-Familie, an

der zytoplasmatischen Seite assoziiert (Brown and London 1998; Brown 1998; Kurzchalia and Parton 1999; Simons and Toomre 2000). Caveolae sind eine spezifische Form von Lipid-Rafts, die Caveolin als essentielles Strukturprotein beinhalten (Scherer, Okamoto et al. 1996). Caveoline sind kleine ~20 kDa Proteine, von denen bisher drei Familienmitglieder identifiziert wurden. Sie besitzen eine konservierte hydrophobe Domäne aus 33 Aminosäuren, die die Bindung an Cholesterin und die Verankerung in der Membran ermöglicht. Die als Monomer im Zytoplasma vorliegenden Caveoline scheinen Aggregate aus mindestens 16-18 Caveolinproteinen zu bilden. Andere Strukturproteine stellen Flotillin und Mitglieder der Annexin-Proteinfamilie, Anx2 und Anx6, dar (Babiychuk and Draeger 2000; Fielding and Fielding 1997; Monier et al. 1996). Der Entzug von Cholesterin aus Lipid-Rafts führt zum Verlust von Caveolae und hat Auswirkungen auf Signaltransduktionswege in Lipid-Rafts. Gemeinsam mit den oben erwähnten Strukturproteinen stellt das Cholesterin die Ausbildung von Signalkomplexen in den Lipid-Rafts sicher und ist somit an der Regulation von spezifischen Signaltransduktionskaskaden beteiligt (Kurzchalia and Parton 1999).

1.3.4 Cholesterin in zellulären Membranen

Cholesterin ist für die Aufrechterhaltung der verschiedenen Protein- und Lipidkompositionen in den Membranen zellulärer Organellen essentiell. In eukaryotischen Zellen enthalten die Membranen des ER mit den geringsten Anteil an Cholesterin trotz der Tatsache, dass sie Ort der Synthese sind. Die PM enthält mit 60-80% den größten Anteil des zellulären Cholesterin (Liscum and Munn 1999). 30-40% der Lipidmoleküle der PM stellt Cholesterin dar (Maxfield and Wustner 2002). Das ERC weist ebenfalls einen hohen Cholesteringehalt auf (Hao, Lin et al. 2002). Über den Cholesteringehalt von LE und Lysosomen ist wenig bekannt, aber unter normalen Umständen liegt er unterhalb des Cholesterinsgehalts im ERC (Liscum and Munn 1999; Hao, Lin et al. 2002).

1.3.5 Cholesterintransport aus dem spät-endozytotischen Kompartiment und seine klinische Relevanz

Cholesterinreiches LDL wird nach der rezeptorvermittelten Aufnahme über die SE dem spät-endozytotischen Kompartiment (späte Endosomen und Lysosomen) zur Degradation zugeführt, aus dem freies Cholesterin subzellulär (PM, ER) verteilt wird. Dabei stellen LE keine einfache Zwischenstation entlang des degradativen Weges zu den Lysosomen dar. Vielmehr zeigt sich, dass LE mit ihren multivesikulären Strukturen als Sammel- und Verteilstation für freigesetztes LDL-Cholesterin eine wichtige Rolle im intrazellulären Cholesterintransport einnehmen. Die genauen Mechanismen des Cholesterintransports aus dem spät-endozytotischen Kompartiment sind nicht bekannt. Jedoch wurden Proteine beschrieben, die an spät-endosomale Membranen assoziieren und hier regulativ auf den Cholesterintransport wirken.

So wird die autosomal-rezessiv vererbte Tangier-Krankheit (Analphalipoproteinämie) durch Mutationen im ABCA1-Transporter verursacht, die zu einem intrazellulären Defekt im Lipidtransport führen. Tangier-Patienten haben keinen ABCA1-Transporter und zeigen eine reduzierte Synthese von Apoprotein A-I, eine fehlende oder sehr geringe HDL-Produktion mit Hypocholesterinämie und zellulären Cholesterinablagerungen vor allem im Monozyten-Makrophagen-System, womit sie ein erhöhtes Risiko für atherosklerotische Gefäßwandveränderungen haben. Tangier-Fibroblasten akkumulieren Cholesterin und Sphingomyelin in perinukleären, spät-endozytotischen Vesikeln, die in ihrer Motilität in Richtung Zelloberfläche beeinträchtigt sind (Neufeld et al. 2004). Ursprünglich wurde angenommen, dass der ABCA1-Transporter nur an der PM für den zellulären Cholesterinefflux auf HDL-Vorläufer und freies Apoprotein A-I (s. 1.3.1 reverser Cholesterintransport) verantwortlich ist. Neuere Arbeiten zeigen aber, dass ABCA1 auch an spät-endozytotischen Vesikeln lokalisiert und zwischen diesen Vesikeln und der PM wandert (Neufeld et al. 2001). In diesen Vesikeln scheint der ABCA1-Transporter Cholesterin und PL auf internalisiertes, lipidarmes Apoprotein A-I zu übertragen und somit für einen Apoprotein-A-I-vermittelten Cholesterinefflux zu sorgen (Heeren et al. 1999; Takahashi and Smith 1999; von Eckardstein et al. 2001; Neufeld et al. 2004). Dabei konkretisierten Wang et al., dass der ABCA1-vermittelte zelluläre Cholesterinefflux spezifisch auf lipidarmes Apoprotein A-I erfolgt. Die Interaktion von ABCA1 mit den HDL-

Unterklassen HDL-2 und HDL-3 ist nur gering (Wang et al. 2004). Wang und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass zwei andere Mitglieder der ABC-Transporterfamilie den zellulären Cholesterinefflux auf die beiden HDL-Hauptfraktionen HDL-2 und HDL-3 vermitteln. Sie beschrieben für ABCG1 und ABCG4 einen ABCA1-unabhängigen, zellulären Cholesterinefflux zu HDL (Wang et al. 2004). Durch den atheroprotektiven Effekt von HDL kommt diesen beiden ABCG-Transportern eine wichtige Rolle zu, weil der Großteil des plasmatischen HDL-2 und HDL-3 vermutlich von diesen beiden ABCG-Transportern gebildet wird. Die genaue Funktionsweise der beiden ABCG-Transporter ist noch unklar. Ein direktes Interagieren der ABCG-Transporter mit HDL wurde nicht beobachtet (Wang et al. 2004). Es wird für beide Transporter eine Verbesserung der Zugänglichkeit von Cholesterin an der PM für extrazelluläre Akzeptoren vorgeschlagen. Erstaunlicherweise stellt die PM nicht den primären Lokalisationsort für diese beiden ABCG-Transporter dar. ABCG1 wurde vorwiegend intrazellulär an perinukleären Strukturen (ER, TGN) detektiert und ist hier in intrazelluläre Transportprozesse von Lipiden verwickelt (Klucken et al. 2000; Venkateswaran et al. 2000). Dabei ist vor allem die Funktion von ABCG1 in der Cholesterinhomöostase von Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems hervorzuheben. Dafür spricht auch die vermehrte Expression von ABCG1 in LDL-beladenen Monozyten. Im Gegensatz dazu führt die Inhibition der ABCG1-Expression zu einem reduzierten Cholesterin- und Phospholipidefflux auf HDL-3 (Klucken et al. 2000; Lorkowski et al. 2001). Lorkowski et al. konnten darüber hinaus in der Immunfluoreszenzmikroskopie nachweisen, dass ABCG1 in Schaumzellen von atherosklerotischen Plaques zu finden ist. Zusammengefasst lässt sich damit eine Bedeutung von ABCG1 sowohl für den reversen Cholesterintransport als auch bei der Entstehung von Schaumzellen annehmen. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass es in Tangier-Patienten zu einer gesteigerten Expression von ABCG1 kommt (Lorkowski et al. 2001), die vermutlich für den restlichen Cholesterin- und Phospholipidefflux verantwortlich ist. Damit scheint ABCG1 für die Mobilisierung von Lipiden aus intrazellulären Organellen zu sorgen. Eine Lokalisation von ABCG1 zu Vesikeln des spät-endozytotischen Kompartiment wurde aber bisher nicht beschrieben.

Ähnlich den Tangier-Fibroblasten akkumulieren in Niemann-Pick-C-Zellen Cholesterin und Sphingolipide ebenfalls im spät-endozytotischen

Kompartiment (Liscum and Faust 1989; Liscum 2000). Ein Defekt im NPC1-codierenden Gen führt zu der Niemann-Pick-Typ-C-Krankheit (Sphingomyelinose), bei der es zu einem Expressions- bzw. Funktionsverlust des für diese Krankheit verantwortlichen Niemann-Pick-C-Protein-1 (NPC1) kommt. Die Krankheit ist bei autosomal-rezessivem Erbgang durch eine progressive neurologische Degeneration gekennzeichnet. NPC1 lokalisiert fast ausschließlich in spät-endosomalen und lysosomalen Membranen, wo es für den Transport von freigesetztem LDL-Cholesterin zu zellulären Organellen (PM und ER) sorgt (Neufeld et al. 1999; Zhang et al. 2001). Neben der Anhäufung von Cholesterin kommt es auch zur Speicherung von Sphingomyelin und Glykolipiden. Dies resultiert vermutlich aus der Kopplung des Transports dieser Lipide und des Cholesterins. NPC1 wurde vor allem in humanen Fibroblasten (Carstea et al. 1997) und Neuronen (Patel et al. 1999) nachgewiesen.

Neuere Arbeiten von Neufeld et al. deuten darauf hin, dass NPC1 gemeinsam mit ABCA1 in LE für die Beladung von internalisiertem Apoprotein A-I mit PL und Cholesterin verantwortlich ist (Neufeld et al. 2004).

Eine weitere Rolle im Cholesterintransport aus LE spielt das cholesterinbindende Protein MLN64, das mit einer transmembranen Domäne an der äußeren Membran von LE lokalisiert und vermutlich Cholesterin auf zytoplasmatische Akzeptoren überträgt. MLN64 besitzt eine von den StAR-Proteinen abgeleitete Lipidtransfer-Domäne (START-Domäne), die Cholesterin bindet (Alpy, Stoeckel et al. 2001). Alpy et al. zeigten auch, dass MLN64 an den gleichen Vesikeln des spät-endozytotischen Kompartiments assoziiert wie NPC1 und mit LBPA an den multivesikulären Strukturen der LE kolokalisiert. LBPA ist hoch angereichert in den internen Membranen der LE und hat eine wichtige Rolle in der Regulation des Cholesterintransports (Kobayashi et al. 1998; Kobayashi et al. 1999).

Außerdem ist bekannt, dass der Cholesterintransport aus dem spät-endozytotischen Kompartiment zum ER oder der PM durch Progesteron oder hydrophobische Amine wie U18666A, Imipramin oder Sphingandin inhibiert werden kann (Liscum and Munn 1999). So ist U18666A in der Lage, die Akkumulation von Cholesterin in Vesikeln des spät-endozytotischen Kompartiment von Niemann-Pick-C-Zellen zu imitieren (Liscum and Faust 1989). Der molekulare Wirkmechanismus der hydrophobischen Amine ist unklar. Lange et al. zeigten, dass das Protein NPC1 und U18666A an einem

ähnlichen Punkt des endosomalen Cholesterintransports ansetzen (Lange et al. 2000). Kobayashi et al. spekulieren, dass die Bindung der hydrophoben Amine zu negativ geladenen PL den Block im Cholesterintransport verursacht (Kobayashi et al. 1999). An den Vesikeln, in denen U18666A Cholesterin anreichert, ist MLN64 assoziiert (Alpy, Stoeckel et al. 2001). Ob U18666A zu einer Konzentrierung oder Reduzierung der oben genannten Faktoren im spät-endozytotischen Kompartiment führt, ist nicht bekannt. Jedoch konnte an Tangier- im Vergleich zu Wildtyp-Fibroblasten gezeigt werden, dass der ABCA1-Transporter und das NPC1-Protein in ihrer Wirkungsart miteinander agieren (Neufeld et al. 2001).

Die beschriebenen Beobachtungen zeigen, dass der Cholesterintransport aus LE und Lysosomen mit seinem Einfluss auf die intrazelluläre Cholesterin-homöostase hochreguliert sein muss. Frühere Arbeiten der AG Grewal zeigten interessanterweise, dass auch die Injektion einer dominant-negativen Annexin-6-Mutante in NRK-Zellen zu einer Inhibierung der LDL-Prozessierung im spät-endozytotischen Kompartiment und zu einer LDL-Anreicherung in großen endozytotischen Strukturen führte, die perinukleär lokalisierten (Pons, Grewal et al. 2001; s. 1.4.4 [2. Regulation des Targeting endosomaler Membranen zu Lysosomen durch Anx6]).

1.4 Annexine

Annexine stellen eine Familie hochkonservierter Proteine dar, die ubiquitär exprimiert werden und in bisher allen Zellen und Geweben gefunden wurden. Bisher sind über 10 verschiedene Mitglieder dieser Familie in Säugetieren identifiziert worden. Davon kommen einige in Isoformen vor (Gerke and Moss 1997; Morgan and Fernandez 1997).

Annexine zeichnen sich durch ihre calciumabhängige Bindung an negativ geladene PL aus. Diese wird durch konservierte Strukturelemente, den sogenannten Annexinrepeats vermittelt. Ein Strukturelement (Repeat) besteht aus 70-80 Aminosäuren.

1.4.1 Struktur

Jedes Annexin ist aus zwei Domänen aufgebaut: der variablen N-terminalen Kopfgruppe und dem konservierten C-terminalen Proteinkern (protein core, core domain, Kerndomäne), der aus vier Annexinrepeats besteht. Jedes der vier Annexinrepeats, die in der Kerndomäne enthalten sind, bildet eine

Domäne mit fünf α -Helices (A-E) (Avila-Sakar, Creutz et al. 1998). Annexin 6 (Anx6) bildet dabei eine Ausnahme unter den Annexinen, da dessen Proteinkern aus acht konservierten Strukturelementen aufgebaut ist (s. 1.4.4). Der Proteinkern formt eine α -helikale, dicht gepackte, leicht gewölbte Scheibe, die an ihrer konvexen Seite zwischen den Helices A und B sowie D und E Calciumbindungsstellen vom Typ II und Typ III enthält (Weng, Luecke et al. 1993). Diese konvexe Seite ist der Membran zugewandt und vermittelt die Membranbindung der Annexine. Das Binden von Calcium ermöglicht den Annexinen die Bindung an negativ geladene PL auf der zytosolischen Seite von Membranen.

Dabei ist die konkave Seite des Proteinkerns der Membran abgewandt und die N-terminale Gruppe kann dadurch mit zytoplasmatischen Proteinen interagieren (Gerke und Moss 2002).

Während der C-terminale Proteinkern für die Grundeigenschaften des Annexinproteins sorgt, scheint die N-terminale Kopfgruppe die funktionelle Spezifität eines Annexins festzulegen, die sich durch spezifische Proteininteraktionen und unterschiedliche posttranslationale Modifikationen kennzeichnet (Raynal and Pollard 1994). Der N-Terminus umfasst je nach Annexin 11-40 Aminosäuren. Dabei können N-Termini von Annexinen nicht nur mit anderen Proteinen interagieren, sondern auch die Struktur des C-terminalen Proteinkerns beeinflussen. Für Annexin 3 konnte durch den Austausch von Ala gegen Trp (Pos5) im N-Terminus eine erhöhte Affinität zu PL aufgezeigt werden (Hofmann, Raguene-Nicol et al. 2000). Ein weiteres Beispiel für die spezifische Funktion der N-terminalen Gruppe zeigt die Fusion der N-terminalen Domäne von Annexin 1 (Anx1) und dem C-terminalen Proteinkern von Annexin 5 (Anx5), die eine Anx1-abhängige Regulation von Anx5 ermöglicht (Andree, Willems et al. 1993).

In den beiden Proteinen Anx1 und Anx2 liefern die ersten 14 Aminosäuren der N-terminalen Gruppe durch Bildung amphipathischer α -Spiralen Bindungsstellen für Liganden der S100-Proteinfamilie (Becker, Weber et al. 1990; Mailliard, Haigler et al. 1996; Seemann, Weber et al. 1996). Anx2 bildet einen heterotetrameren Komplex, der aus einem S100A10-Dimer und zwei Anx2-Proteinen besteht. Über die calciumabhängige Membranbindung können zwei, an unterschiedlichen Vesikeln gebundene Anx2-Moleküle mit ihren Bindungsstellen für S100A10 über ein S100A10-Dimer einen Brückenmechanismus

zwischen zwei verschiedenen Lipiddoppelschichten erstellen (Gerke and Moss 1997; Rety, Sopkova et al. 1999; Lewit-Bentley, Rety et al. 2000; Rety, Osterloh et al. 2000). Ähnliches kann wohl für den Anx1-S100A11-Komplex angenommen werden. Das läßt darauf schliessen, dass Anx1 und Anx2 an Membranfusionen beteiligt sind.

Festzuhalten ist, dass die N-terminale Gruppe entscheidenden Einfluss auf die funktionelle Spezifität der Annexine nimmt. Wie diese Funktionen variieren können, spiegelt sich in den Lokalisationsorten wieder, die für Annexine beschrieben wurden (s. unten).

1.4.2 Lokalisation

Annexin	Lokalisation	Referenz
Annexin 1	Plasmamembran, frühe Endosomen spät-endosomales Kompartiment	Seemann, Weber et al. 1996 Futter, Felder et al. 1993
Annexin 2	Plasmamembran, frühe Endosomen Caveolae sekretorische Vesikel	Emans et al. 1993; Harder et al. 1997 Harder and Gerke 1994 Nakata et al. 1990; Senda et al. 1994
Annexin 3	Plasmamembran, Membranen intrazellulärer Granulae/Phagosomen	Le Cabec and Maridonneau-Parini 1994
Annexin 4	basolaterale und/oder apikale Membran polarisierter Epithelzellen	Massey, Traverso et al. 1991; Kojima, Utsumi et al. 1994; Massey-Harroche, Traverso et al. 1995; Mayran, Traverso et al. 1996
Annexin 5	Plasmamembran, Endoplasmatisches Retikulum	Spreca, Rambotti et al. 1992; Giambanco, Verzini et al. 1993
Annexin 7	Membranen intrazellulärer Granulae (Nebennierenrinde) Plasmamembran (gestreifte Muskulatur)	Kuijpers, Lee et al. 1992 Selbert, Fischer et al. 1995
Annexin 8, 9 und 10	Verteilungsmuster nicht exakt definiert	
Annexin 11	Nukleus	Mizutani, Usuda et al. 1992; Mizutani, Watanabe et al. 1995
Annexin 13	apikaler Bürstensaum von Enterozyten	Wice and Gordon 1992

Abb. 4) **Lokalisation der Annexine.** Die Lokalisation von Annexin 6 ist gesondert in dem Kapitel 1.4.4 beschrieben.

1.4.3 Funktion

Annexine treten praktisch in allen Zelltypen nachweisbar auf und sind an einer Vielzahl intrazellulärer und membranassoziierter Prozesse beteiligt: die Regulation der Membranorganisation, des Membranverkehrs, der Verknüpfung von Membranen mit dem Zytoskelett und der Organisation des Zytoskeletts. Außerdem beeinflussen Annexine die Zelldifferenzierung, das Zellwachstum und die Signaltransduktion. Extrazellulär sind Annexine in biologische Abläufe wie der Blutkoagulation beteiligt (Gerke and Moss 2002). Dabei steht die Rolle der Annexine in Prozessen des Membranverkehrs im Vordergrund und soll exemplarisch an Anx6 dargestellt werden.

1.4.4 Annexin 6

Anx6 weist eine strukturelle Besonderheit innerhalb der Annexinfamilie auf, indem es zwei Kerndomänen aus jeweils vier Annexinrepeats besitzt. Diese zwei Repeat-Tetraden verbindet eine 49 Aminosäuren lange Verbindungshelix, die die koplanare Bindung beider Hälften an Membranen ermöglicht (s. Abb. 5; Zaks and Creutz 1991). Es wird vermutet, dass Anx6 durch Duplikation und Fusion einer einzelnen Kerndomäne entstand (Smith, Davies et al. 1994). Die Bedeutung der zwei Kerndomänen ist nicht hinreichend geklärt. Jedoch liefert die Duplikation eine zweite calciumabhängige Membranbindungsstelle und ermöglicht somit ein eventuelles Interagieren verschiedener Membranen, das der Vesikelfusion vorausgeht (Avila-Sakar, Kretsinger et al. 2000).

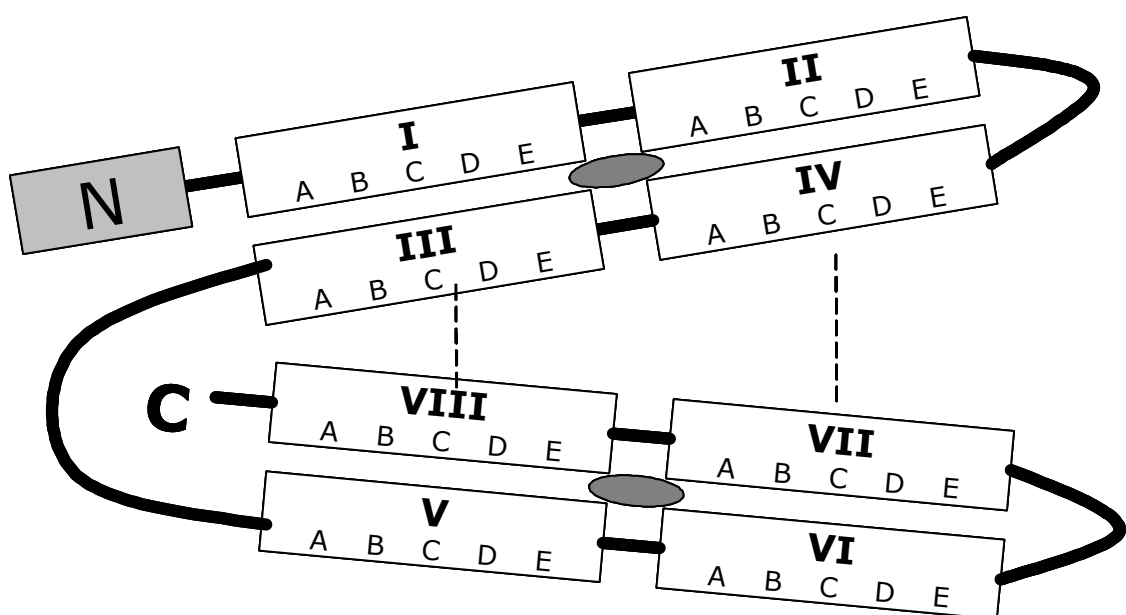


Abb. 5) **Molekulare Struktur von Annexin 6.**

Anx6 lokalisiert an der PM von Rattenhepatozyten (Tagoe, Boustead et al. 1994; Weinman, Feinberg et al. 1994) und Erythrozyten (Bandorowicz, Pikula et al. 1992). Es interagiert mit dem Aktinzytoskelett in Fibroblasten (Hosoya, Kobayashi et al. 1992). Anx6 findet sich in verschiedenen Zelltypen vor allem in frühen und späten endozytotischen Kompartimenten, das für eine regulatorische Rolle von Anx6 während der Endozytose spricht. Dafür spricht auch die Identifikation von Anx6 in clathrinumhüllten Vesikeln (Turpin, Russo-Marie et al. 1998). So wurde Anx6 an frühen und späten Phagosomen von J774-Makrophagen entdeckt (Desjardins, Celis et al. 1994). Eine ähnliche Lokalisation von Anx6 zeigen Untersuchungen in Anx6-überexprimierenden CHO-Zellen (Grewal, Heeren et al. 2000) und Analysen an hepatischen Endosomen (Jackle, Beisiegel et al. 1994). Anx6 findet sich in polarisierten Hepatozyten der Ratte vor allem in apikalen, Rab5-positiven endozytotischen Strukturen (Ortega, Pol et al. 1998). Studien in NRK-Zellen lokalisierten Anx6 sowohl in peripheren Rab5-positiven Endosomen als auch in perinukleären Rab5-negativen Vesikeln (Pons, Ihrke et al. 2000; Pons, Grewal et al. 2001). Das variierende Verteilungsmuster spiegelt vermutlich den dynamischen Zustand von Anx6 in vivo wieder. Veränderungen in der intrazellulären Calciumkonzentration, der Lipidkomposition und des intrazellulären Transports von Liganden können eine Umverteilung von Anx6 zwischen subzellulären Kompartimenten auslösen. Ein Beispiel dafür liefern glatte Muskelzellen. Bei einem Anstieg des freien intrazellulären Calciumspiegels verlagert sich Anx6 vom sarkoplasmatischen Retikulum zu sarkolemmalen Strukturen (Babiychuk, Palstra et al. 1999; Babiychuk and Draeger 2000).

Bei der Beschreibung der Funktion von Anx6 soll die Rolle im zellulären Membranverkehr hervorgehoben werden. Dabei soll im Folgenden besonders auf, erstens, die Beteiligung von Anx6 bei der Ausknospung von Clathrin Coated Pits (CCP) an der PM und, zweitens, auf die Regulation des Targeting endosomaler Membranen zu Lysosomen durch Anx6 eingegangen werden.

Zum ersten Punkt: Bereits unter 1.1.1 ist auf den Prozess des Ausknospens der CCPs aus der PM (Budding) bei der rezeptorvermittelten Endozytose eingegangen worden. Die AG um R. Anderson zeigte in einem in-vitro-System, dass Anx6 gemeinsam mit Calcium, ATP und weiteren zytosolischen Faktoren einen stimulatorischen Effekt auf das Abschnüren von CCPs während der rezeptorvermittelten Endozytose hat (Lin, Moore et al. 1991; Lin, Sudhof et al.

1992). Dass Anx6 durch Interaktion mit dem Zellgerüst an der Umstrukturierung des Zytoskeletts während der rezeptorvermittelten Endozytose beteiligt ist, wurde durch zahlreiche Beobachtungen bestätigt. So ließ sich eine phosphatidylserin- und calciumabhängige Bindung von Anx6 an die N-terminale Region von β -Spektrin identifizieren. Spektrin bildet gemeinsam mit anderen Zytoskelettproteinen ein Gerüst direkt unterhalb der PM, welches während der Endozytose kurzzeitig aufgelöst werden muss. Die Bindung von Anx6 an β -Spektrin hat das Dissoziieren von β -Spektrin von der PM zur Folge. Dabei rekrutiert Anx6 eine Cystein-Protease, Calpain 1, welche die Spaltung des membrangebundenen β -Spektrins durchführt und somit das Eintreten des sich lösenden CCP in das Zellinnere ermöglicht (Harris and Morrow 1990; Hu and Bennett 1991; Kamal, Ying et al. 1998). Die Behandlung von Fibroblasten mit ALLN, einem Cystein-Protease-Inhibitor, während der rezeptorvermittelten LDL-Aufnahme führte zu alternativen, Anx6- und clathrin-unabhängigen Internalisierungsmechanismen und einer reduzierten lysosomalen Degradation des LDL.

Zusätzlich enthält Spektrin eine Bindungsstelle für F-Aktin, die im Falle einer Interaktion mit Anx6 für Aktin nicht zugänglich ist und dadurch zu einer Inhibition der Vernetzung und Gerüstbildung von β -Spektrin und F-Aktin führen könnte (Watanabe, Inui et al. 1994). Diese Beobachtung könnte bei der Anx6-abhängigen Spaltung des Spektrins ebenfalls eine Rolle spielen.

Über die Interaktion mit Spektrin hinaus spricht der Nachweis der Assoziation und Kolo-kalisation von Anx6 mit Dynamin für eine Rolle in der Bildung von CCPs (Turpin, Russo-Marie et al. 1998). Dynamin ist nicht nur durch seine GTPase-Aktivität während des Ausknospens von CCPs charakterisiert (s. 1.1.1), sondern auch durch eine calciumabhängige Bindung zu PL (Liu, Powell et al. 1994). Anx6 fungiert hier möglicherweise als Stabilisator der Dynamin-Membran-Interaktion (De Camilli, Takei et al. 1995; Wang, Sudhof et al. 1995).

Arbeiten von Grewal et al. bestätigen eine Rolle von Anx6 bei der rezeptorvermittelten Endozytose. In CHO-Zellen führte die alleinige Überexpression von Anx6 nicht zu einer gesteigerten und rezeptorvermittelten LDL-Aufnahme, vermutlich wegen der limitierenden Zahl der LDL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Die Koexpression von Anx6 und LDL-R resultierte jedoch in einem linearen Anstieg der LDL-Internalisierung und LDL-Degradation (Grewal,

Heeren et al. 2000). Der stimulierende Effekt von Anx6 liegt dabei vermutlich in einer erhöhten Internalisationsrate von Rezeptor-Liganden-Komplexen durch eine gesteigerte Ausbildung von clathrinumhüllten Transportvesikeln. Andere Arbeiten legen dagegen keine essentielle Funktion für Anx6 in der rezeptorvermittelten Endozytose nahe (Smythe, Smith et al. 1994). Anx6-defiziente A431-Zellen und Anx6-exprimierende A431-Zellen zeigten vergleichbare Internalisierungs- und Recyclingraten des Tf-R. Dabei war man auf den endogenen Tf-R angewiesen und nahm nur das Recycling des Tf-R als Maß für den Einfluss von Anx6 auf die Tf-R Endozytose. Grewal et al. zeigten jedoch, dass auch die Koexpression von Anx6 und Tf-R in CHO-Zellen keinen Einfluss auf das Recycling des Tf-R hat und damit unabhängig von Anx6 abläuft (Grewal, Heeren et al. 2000).

Zum zweiten Punkt, der Regulation des Targeting endosomaler Membranen zu Lysosomen durch Anx6: Hier ist die Rolle von Anx6 in endosomalen Transport- und Fusionsvorgängen, vor allem im Targeting von Vesikeln zu LE und Lysosomen (spät-endozytotisches Kompartiment) hervorzuheben. In NRK-Fibroblasten und WIF-B-Hepatomzellen fand sich Anx6 in perinukleären Regionen und kolokalisierte mit Igp120, einem Markerprotein für das prälysosomale Kompartiment (Pons, Ihrke et al. 2000; Pons, Grewal et al. 2001). Die oben beschriebene Arbeit mit ALLN führte zur Akkumulation von LDL in Vesikeln, die perinukleär lokalisierten, und zu einer Reduzierung der LDL-Degradation (Kamal, Ying et al. 1998). Ein ähnliches Bild mit einer gestörten LDL-Degradation zeigte sich bei NRK-Zellen nach der Injektion einer Anx6-Mutante, die keine Bindungseigenschaften zu β -Spektrin und Membranen aufwies (Pons, Grewal et al. 2001). Damit erscheint Anx6 essentiell für das Zuführen von Transportvesikeln entlang des degradativen Weges zu Lysosomen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die gesteigerte LDL-Degradation in Anx6-überexprimierenden CHO-Zellen. Gleichzeitig kommt es infolge der LDL-Aufnahme zu einer Translokation von Anx6 an LE (Grewal, Heeren et al. 2000). Die Aktivierung von Anx6 und/oder Anx6-bindender Proteine könnte für die gesteigerte Affinität von Anx6 zu prälysosomalen Membranen verantwortlich sein. Alternativ gibt es Hinweise für die Bildung spezifischer Membrandomänen (Kobayashi, Gu et al. 1998; Gruenberg 2001), in denen negativ geladene PL vermehrt vorkommen und damit zu einer vermehrten Bindung von Anx6 an LE führen könnten. Ebenso könnte der

beginnende Zerfall und Abbau von LDL-Partikeln in LE und Prälysosomen zu einer veränderten Lipidkomposition der Membranen führen, die die Bindungsaffinität von Anx6 steigert.

1.4.5 Regulation der Membranbindung von Annexinen

Bereits in 1.4.1 ist detailliert beschrieben, dass Annexine lösliche und hydrophile Proteine sind, die calciumvermittelt an negativ geladene PL binden. Diese calciumabhängige Bindungseigenschaft wird von allen Annexinen geteilt, jedoch unterscheiden sie sich in ihrer Sensitivität für Calcium und der Spezifität für PL. Mit absteigender Affinität binden Annexine an Phosphatidylsäure, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol. Einige Annexine binden an neutrale PL wie Phosphatidylethanolamin, jedoch nicht an Phosphatidylcholin oder Sphingomyelin (Raynal and Pollard 1994). Für Anx2 wurde eine spezifische Bindung zu Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns-4,5-P₂) nachgewiesen, die nicht für alle Annexine allgemein gültig ist. Anx2 als F-Aktin-bindendes Protein nimmt hier an der Regulation der PtdIns-4,5-P₂-abhängigen Umstrukturierung der Membran und des Aktin-Zytoskeletts während der Bildung von endozytotischen Vesikeln teil (Hayes et al. 2004).

Durch Entzug des Calciums translozieren die Annexine wieder ins Zytoplasma und können nach einer weiteren Calcium-Induktion wieder an die gleichen oder an andere Membranen binden. Dies erklärt wohl auch die Dynamik der Annexine und die zum Teil unterschiedlichen Ergebnisse in Lokalisationsstudien. Wie an der intrazellulären Verteilung und Lokalisierung der verschiedenen Annexine zu erkennen ist, kann die calciumabhängige Bindung an PL nicht als alleiniger Regulationsmechanismus angenommen werden (Babiychuk and Draeger 2000). Für das spezifische Bindungsverhalten von Annexinen gegenüber intrazellulären Membranen sind nicht nur subzelluläre Änderungen des zellulären Calciumspiegels, sondern auch variierende Lipidkompositionen der intrazellulären Organellen und die Proteinfaktoren, die sich an den verschiedenen Verteilungsmustern der Lipide in diesen Membranen beteiligen, ausschlaggebend.

Als zusätzlichen Regulationsmechanismus für das spezifische Verteilungsmuster wird die pH-abhängige Affinitätsänderung diskutiert. Dabei sind für Anx2, Anx5 und Anx6 bei einem sauren pH-Wert Konformationsänderungen beschrieben, die zu einem veränderten Bindungsverhalten führen (Rosengarth

et al. 1998; Kohler et al. 1997; Golczak, Kicinska et al. 2001; Golczak, Kirilenko et al. 2001).

Daneben ist auch ein calciumunabhängiges Bindungsverhalten für Annexine bei einem neutralen pH-Wert beobachtet wurden (Jost, Zeuschner et al. 1997). Calciumbindende Agenzien führten zur Identifikation eines EGTA-resistenten, calciumunabhängig membrangebundenen Anx2-Pools. Studien mit cholesterin-sequestrierenden Agenzien wie Digitonin und Filipin setzten diese calciumunabhängig membranbindenden Anx2-Proteine frei. In dieser calciumunabhängigen Membranbindung von Anx2 spielt das in der Membran enthaltene Cholesterin somit eine entscheidende Rolle (Harder, Kellner et al. 1997; Jost, Zeuschner et al. 1997). Demnach wird der Lipidkomposition von Membranen und ihrem Cholesteringehalt ein Einfluss auf die Regulation der subzellulären Lokalisation von Anx2 in Anwesenheit von Calcium eine wichtige Rolle zugeordnet. Gleichzeitig hatte das Aggregieren des Membrancholesterins die Freisetzung Zytoskelett-bindender Proteine (α -Aktinin, Moesin, Ezrin und Aktin) neben der von Anx2 zur Folge. Dies legt die Vermutung nahe, dass Anx2 als ein Bindeglied zwischen zellulären Membranen und Elementen des Zytoskeletts fungiert (Harder, Thiel et al. 1993; Harder, Kellner et al. 1997). Für das calciumunabhängige Bindungsverhalten von Anx2 wird die N-terminale Gruppe des Moleküls verantwortlich gemacht. Mittels einer Proteinchimäre aus der N-terminalen Gruppe von Anx2 und der C-terminalen Kerndomäne von Anx1 ließ sich das calciumunabhängige Bindungsverhalten auf Anx1 übertragen (Konig and Gerke 2000). Weitere Arbeiten dazu lieferte die Arbeitsgruppe um Ayala-Sanmartin. Ein Teil des Anx2 blieb trotz EGTA-Behandlung an chromaffine Granulae gebunden. Mit dem cholesterin-sequestrierenden Methyl- β -Cyclodextrin ließ sich ein Teil des calciumunabhängig gebundenen Anx2 freisetzen (Ayala-Sanmartin, Henry et al. 2001). In weiteren Studien beobachtete diese AG eine von Cholesterin vermittelte calciumunabhängige Bindung von Anx2 an Liposomen, in deren Membranen das PL Phosphatidylserin erforderlich war. Bei konstantem Anteil von Phosphatidylserin kam es durch die Erhöhung des Cholesterinanteils in den Liposomenmembranen zu einer Steigerung dieser calciumunabhängigen Bindung von Anx2. Mittels eines proteolytisch am N-Terminus beschnittenen Anx2-Proteins, das in Calciumabwesenheit nicht an phosphatidylserin- und cholesterinhaltige Liposomen band, konkretisierte die AG, dass die cholesterin-

vermittelte Bindungsaffinität von Anx2 nicht direkt über die N-terminale Gruppe erfolgt (Ayala-Sanmartin 2001). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von König und Gerke, die das calciumunabhängige Bindungsverhalten von Anx2 mit dem N-Terminus von Anx2 auf Anx1 übertrugen.

Unterstützt wurde diese Hypothese von Ayala-Sanmartin durch Analysen mit Anx5 und Anx6, die unterschiedliche N-terminale Gruppen, aber homologe Kerndomänen besitzen. Ohne Calcium waren beide Annexinproteine nicht fähig, an Liposomen zu assoziieren. Cholesterin erhöhte die calciumabhängige Bindung von Anx5 und Anx6 an PL (Ayala-Sanmartin 2001). Dabei spekuliert der Autor, dass Cholesterin die Interaktion von Annexinen und Phosphatidylserin innerhalb des Liposoms verbessert (Ayala-Sanmartin 2001).

Diese Wechselwirkungen zwischen Cholesterin und Annexinen zeigen deutlich, dass neben der calciumabhängigen Membranbindung von Annexinen auch Cholesterin in Membranen ein zusätzlicher Modulator im Bindungsverhalten und der intrazellulären Verteilung von Annexinen sein kann. Für Anx6 wurden LE als ein Hauptlokalisationsort beschrieben (s. 1.4.4; Ergebnisse der AG Grewal). Gerade in LE mit ihren multivesikulären Strukturen, die für die Degradation cholesterinreicher LDL-Partikel und der subzellulären Verteilung freien Cholesterins sorgen (s. 1.3.5), erscheinen mögliche Wechselwirkungen zwischen Cholesterin und Anx6 von Bedeutung für diese physiologischen Vorgänge und bedürfen daher weiterer Bindungsstudien für Anx6.

1.5 Ziel der Arbeit

Arbeiten von der AG Grewal konnten zeigen, dass die LDL-Internalisierung in Anx6-überexprimierenden CHO-Zellen zur vermehrten Bindung und Translokation von Anx6 an LE führt (Grewal, Heeren et al. 2000), wobei eine über die transiente Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration vermittelte Bindungsreaktion als alleiniger Mechanismus unwahrscheinlich erscheint. Da es während der LDL-Degradation zur Akkumulation von Cholesterin und Cholesterinester im spät-endozytotischen Kompartiment kommt, deuten diese Ergebnisse auf eine Rolle von Cholesterin bei der Bindung von Anx6 an Membranen hin.

Deshalb soll in dieser Arbeit das Bindungsverhalten an LE als eine Hauptlokalisierung für Anx6 genauer charakterisiert werden. Die Frage, wie Cholesterin die Bindungsaffinität von Anx6 an endosomale Membranen beeinflusst, stand dabei im Mittelpunkt. Im ersten Teil dieser Arbeit steht die Etablierung eines Systems im Vordergrund, unter welchen Inkubationsbedingungen sich in vitro der Einfluss von Cholesterin auf die Membranbindung von Anx6 analysieren lässt. Dafür wurden unselektionierte Membranen von CHO-Zellen in einem Gelelektrophorese-System verwendet. Unter Berücksichtigung dieser Inkubationsbedingungen soll im Weiteren an isolierten Endosomen, die durch die subzelluläre Fraktionierung gewonnen werden, der Einfluss von Cholesterin auf die Bindungsaffinität von Anx6 selektiv zu endosomalen Membranen und damit auf die intrazelluläre Lokalisation von Anx6 untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen schließlich stabile Zelllinien etabliert werden, die Green-Fluoreszent-Protein-Annexin-Fusionsproteine (GFP-Anx) exprimieren und die Analyse der Bindungsaffinitäten von Anx6 und Anx2 in der Lebendzellmikroskopie ermöglichen. Zunächst soll hier zum einen der Expressionsnachweis dieser Fusionsproteine (GFP-Anx2 und GFP-Anx6) in den transfizierten CHO-Zellen erfolgen und zum anderen das Bindungsverhalten dieser Fusionsproteine mit den bekannten intrazellulären Lokalisationen für Anx2 und Anx6 verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Blottingkammer Trans-Blot Cell	Bio-Rad
Feinwaage BP 410 S	Sartorius
Filmbelichtungskassetten	Rego
Fluoreszenzmesser Fluorocount	Packard
Frigostat Kühlelement	Desaga
Gelelektrophorese-Systeme	Hoefer Scientific Instruments
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf
Inkubator B5060 EC/CO ₂	Heraeus Instruments
Magnetrührer und Heizplatte IKAMAG RH	Janke&Kunkel IKA Labortechnik
Magnetrührstab	Plastibrand
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, Tischzentrifuge	Sigma
Zentrifuge, Laborfuge 400R	Heraeus Instruments
Zentrifuge, L7-55 Ultracentrifuge	Beckmann
Zentrifuge, TL-100 Ultracentrifuge	Beckmann
Zentrifugenrotor SW 41	Beckmann
100 µl Spritze mit runder Kanüle	Hamilton Bonaduz

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
1,5 ml Röhrchen	Greiner
6-/ 12-well plate	NUNC
96-well plate	Packard
Deckgläschen 13 mm Ø rund	Assistent

Einmalspritzen 1 ml, 5 ml, 10 ml	Braun
Falcon Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner
Filtersystem 500 ml	Corning
Gel-Blotting Papier GB 002	Schleicher&Schüll
Kanülen (G20-24)	Becton Dickinson
Küvetten 10 x 10 x 45 mm Halb-Mikro	Greiner
Parafilm	American National Can
PD-10 Säule	Amersham
Petrischalen Cellstar 20 x 145 mm Ø	Greiner
Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml; steril	Becton Dickinson
Pipettenspitzen	Greiner
Protan Nitrocellulose Transfer Membrane	Schleicher&Schüll
Röntgenfilm Biomax MR 18 x 24 cm	Kodak
Spritzenvorsatzfilter 0,22 und 0,45 µm	Qualilab
Ultra-Clear Zentrifugenröhrchen	
Centrifuge Tube 11 x 34 mm	Beckmann
Ultra-Clear Zentrifugenröhrchen	
Centrifuge Tube 14 x 89 mm	Beckmann
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Costar
Zellschaber	Beckmann

2.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Merck
Acrylamid-Bis-Fertiglösung (30/0,8)	Molecular Probes
Ammonium Persulfat	Bio-Rad
Amplex Red Cholesterol Assay Kit	Merck
Antipain	Calbiochem
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Merck
BSA (Albumin aus Kälberserum)	Pierce
CaCl ₂ (Calciumchlorid)	Merck
Chymostatin	Calbiochem
CuSO ₄ (Kupfersulfat)	Merck
Digitonin	Fluca
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma

ECL (enhanced chemiluminescence)- Detektion-Reagenz	Amersham
ECL-Marker	Cell Signaling
ECL-Marker Antikörper (HRP-konjugiert)	Cell Signaling
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma
Ethanol	Merck
FBS (Fötales Kälberserum)	Gibco
Filipin	Sigma
Fugene™ Transfection Reagenz	Boehringer Mannheim
G418 Sulphat (Geneticin)	Gibco
L-Gutamin	Gibco
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
HCl (Salzsäure)	Merck
Imidazol	Sigma
Isobutanol	Merck
Kaliumtartrat	Merck
Leupeptin	Calbiochem
2-Mercaptoethanol	Serva
Methanol	Merck
Milchpulver	Bio-Rad
Mowiol	Calbiochem
NaCl (Natriumchlorid)	J.T.Baker
Na ₂ CO ₃ (Natriumbicarbonat)	Merck
NaOH (Natronlauge)	Merck
Nutrient Mixture F-12 (HAM)	Gibco
PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)	Gibco
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml)	Gibco
Pepstatin A	Calbiochem
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma
Ponceau-Färbelösung	Serva
PPD (Paraphenylendiamin)	Sigma
Rainbow-Marker RPN 756	Amersham
Saponin	Sigma
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma

Silane (3-Aminopropyltriethoxy-Silane)	Sigma
TEMED (Tetramethylethylenediamin)	Bio-Rad
Tris-Base	Invitrogen
Trypsin-EDTA	Gibco
Tween	Merck

2.1.4 Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Zelllinien verwendet: CHO (Chinese Hamster Ovary)-Wildtyp-Zellen (CHOwt) und eine Anx6-überexprimierende CHO-Zelllinie (CHOanx6). Dieser CHOanx6-Klon wurde von der AG Grewal hervorgebracht (Grewal, Heeren et al. 2000). Beide Zelllinien wurden in folgendem Nährmedium kultiviert: Nutrient Mix F-12 (HAM), 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin.

Die CHOanx6-Zellreihe wurde mit 1 mg/ml G418 Sulphat (Geneticin) selektioniert.

2.1.5 Antikörper

Folgende Antikörper (AK) wurden beim Western-Blot als primäre AK eingesetzt:

Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Herkunft
anti-Annexin 6; polyklonal	Schaf	1:250	Grewal et al. 2000
anti-Annexin 2 H7; monoklonal	Maus	1:1000	Osborn et al. 1988
anti-Caveolin; polyklonal	Kaninchen	1:10000	Transduction Laboratories; Cat.- No. C 13630-150

Die Verdünnung aller Primärantikörper erfolgte in 5% BSA 0.1% Tween.

Für die immunfluoreszenztechnische Darstellung der primären AK wurden folgende sekundären AK eingesetzt, die alle von Jackson Immuno Research bezogen wurden:

Antikörper	Ursprung	Verdünnung
RAS-PO (Rabbit Anti-Sheep Peroxidase conjugated): AffiniPure IgG AK	Kaninchen	1:1000
GAM-PO (Goat Anti-Mouse Peroxidase conjugated): AffiniPure IgG AK	Ziege	1:5000
GAR-PO (Goat Anti-Rabbit Peroxidase conjugated): AffiniPure F(ab) ₂ Fragment IgG AK	Ziege	1:1000

Die Verdünnung aller Sekundärantikörper ist in 10% Milchpulver 0.1% PBS Tween durchgeführt worden.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für das Kultivieren von eukaryotischen Zellen diente eine sterile Werkbank und sterile Einwegarbeitsmaterialien. Gearbeitet wurde mit adhärenenten CHO-Zellen in 75 cm² Kulturflaschen bei Inkubationsbedingungen von 37°C und 5% CO₂. Das Passagieren der Zellen erfolgte bei einer Zelldichte von 70-80% Konfluenz. Dazu wurde das Nährmedium abgesaugt, die Zellen dreimal mit 10 ml PBS (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂HPO₄, pH 7,3) gewaschen und mit 5 ml Trypsin/EDTA 2-3 Minuten behandelt. Die Proteaseaktivität von Trypsin wurde durch das Hinzufügen von 10 ml Nährmedium gestoppt, gefolgt von der Zellpassage im Verhältnis von 1:4 bis 1:6. Die Zellen wurden in frische Kulturflaschen überführt, die zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen geschwenkt und mit Nährmedium auf 15 ml aufgefüllt wurden.

2.2.2 Ausplattieren von Zellen

Nach Beendigung der Trypsinisierung und dem Gewinnen einer Zellsuspension wurden je 4 ml der Suspension auf Einfachkulturschalen von 14,5 cm Durchmesser verteilt, die anschließend mit 20 ml Nährmedium aufgefüllt wurden. Die Inkubation erfolgte bis zu einer Zelldichte von 80% Konfluenz.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Trypsinierte Zellen wurden mit 10 ml Medium versetzt und bei 2500 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 10 ml PBS gewaschen, erneut pelletiert und in 1 ml Ham's F-12 resuspendiert. Dieser Lösung wurde anschließend 1 ml Gefrierlösung (DMEM, 20% FCS, 20% DMSO) tröpfchenweise zugefügt und in

Kryoröhrchen überführt, dem ein zweistündiges Abkühlen auf 4°C folgte. Danach wurden die Zellen durchschnittlich 2 Tage bei -80°C gelagert, gefolgt vom Umsetzen der Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff.

Für die Rekultivierung wurden tiefgefrorene Zellen in 37°C warmen Wasser aufgetaut, in 15 ml Nährmedium aufgenommen und in 75 cm² Zellkulturflaschen ausplattiert.

2.2.4 Transfektion von Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit war es nötig eine stabile, GFPanx6-exprimierende CHO-Zelllinie herzustellen.

Mit Hilfe des Fugene6 Transfection Reagenz wurden deshalb CHOwt-Zellen entsprechend den Angaben des Herstellers mit 1 µg pcDNAGFPanx6-DNA transfiziert (1 x 10⁵ CHOwt-Zellen/ 14,5 cm Ø große Einfachkulturschale). 24 Stunden nach der DNA-Transfektion fand ein Nährmediumwechsel statt. Um stabil transfizierte Zellen zu selektionieren, wurde G418 in einer Konzentration von 1 mg/ml dem Nährmedium zugesetzt. Western-Blot-Analysen von Zelllysaten dienten als Transfektionskontrolle (s. 2.2.10)

2.2.5 Präparierung von Membranproteinen

Auf 14,5 cm großen Kulturschalen ausplattierte Zellen (2-3 x 10⁵ CHOwt-Zellen) wurden mit kaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1-3 ml kaltem PBS wurden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 100 µl Solubilitätspuffer mit ph 7,4 (50 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, 80 mM NaCl, 1% Triton) suspendiert und mit dreißigminütiger Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Dem Solubilitätspuffer war ein Proteaseninhibitorcocktail (10 mM Antipain, 10 mM Chymostatin, 10 mM Leupeptin und 1 mM Pepstatin A) im Verhältnis 1:1000 beigemischt, um die durch die Zelllyse freiwerdenden intrazellulären Proteasen zu inaktivieren. Das Zelllysate wurde nochmals für 3 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand zur Analyse aufbewahrt, in dem sich die extrahierten Membranproteine befanden.

2.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde nach der Methode von Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951) durchgeführt. Dazu wurde das Volumen einer 10 µl Probe (Zelllysate, Endosomenfraktion) auf 400 µl mit Aqua bidest

aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 ml Lowrylösung (65 Teile Lösung A [3% Na_2CO_3 in 0,15 N NaOH], ein Teil Lösung B [2% Kaliumnatriumtartrat], ein Teil Lösung C [1% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$]) wurde die Probe für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 125 μl Folin wurden beigefügt, die Probe gründlich durchmischt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Die photometrische Adsorptionsbestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge von 750 nm. Als Proteinstandard diente eine parallel angesetzte Albumin-Standardreihe. Die Proben- und Standardreihe wurden als Doppelwerte bestimmt und daraus die Mittelwerte gebildet.

2.2.7 Fluorometrische Bestimmung der Cholesterinkonzentration

Zur Bestimmung der Cholesterinkonzentration diente der Amplex Red Cholesterin Assay Kit. Dazu wurden die 20 μl Proben (Endosomenfraktion) mit dem Reaktionspuffer (0,1 M Kaliumphosphat, 5 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, pH 7,4) auf ein Volumen von 50 μl aufgefüllt. Anschließend wurde auf der Grundlage des Reaktionspuffers eine 300 μM Amplex-Red-Reagenz, 2 U/ml HRP, 2 U/ml Cholesterin-Oxidase und 0,2 U/ml Cholesterin-Esterase beinhaltende Arbeitslösung hergestellt, von der 50 μl zu jeder Probe gegeben wurde. Das Gesamtvolumen betrug nun 100 μl . Die Inkubation der Probe mit dieser Arbeitslösung erfolgte bei 37°C für 30 Minuten unter Lichtschutz. Mit einem Fluorometer wurde die Extinktion der Proben bei 530 nm/ 590 nm gemessen. Eine Standardreihe (Precipath) mit bekannter Konzentration diente der Berechnung der Konzentrationen der Proben. Die Proben- und Standardreihe wurden als Doppelwerte bestimmt, daraus die Mittelwerte gebildet und die Cholesterinkonzentration auf die Proteinkonzentration der Probe normiert (μg Cholesterin/ mg Protein).

2.2.8 Subzelluläre Fraktionierung

Die Isolation von endosomalen Fraktionen wurde nach der Methode von Gorvel durchgeführt (Gorvel, Chavrier et al. 1991). Auf 14,5 cm großen Einfachkulturschalen ausplattierte Zellen ($2-3 \times 10^7$ CHO-Zellen) wurden mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Von diesen Kulturschalen wurden die Zellen bei Zugabe von 10 ml HB (homogenization buffer: 250 mM Sucrose, 3 mM Imidazol, pH 7,4) mit einem Zellschaber abgelöst, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und in einer Zentrifuge bei 2200 rpm für 10 min pelletiert. Dem vorsichtigen Absaugen des Überstandes folgte das Lösen

der Zellen in 2 ml HB, dem im Verhältnis 1:1000 Proteaseninhibitorcocktail (1 mM Pepstatin A, 10 mM Chymostatin, 10 mM Leupeptin und 10 mM Antipain) zugesetzt war. Die Zellen wurden mit einer Kanüle der Größe G22 homogenisiert, das im Mikroskop kontrolliert wurde. Anschließend erfolgte das Abtrennen von Zellkern und Zelltrümmern durch Zentrifugation bei 3400 rpm für 15 min. Der durch die Zentrifugation entstandene postnukleäre Überstand (PNS) mit den subzellulären Fraktionen wurde mit einem Sucrose-Dichte-Gradienten aufgetrennt. Dieser postnukleäre Überstand enthielt neben Membranen der PM, des TGN und ER auch endosomale Membranen der lysierten Zellen. Das Pellet wurde verworfen.

Zur Endosomenpräparation mittels Sucrose-Dichte-Gradienten wurden 840 µl postnukleärer Überstand mit 1160 µl 62%iger Sucroselösung gemischt, um eine Gesamtsucrosekonzentration von 40,2% zu erhalten. Daraus ergab sich ein 2 ml Volumen, das vorsichtig mit 3 ml einer 35%igen Sucroselösung beschichtet wurde. Die weitere Beschichtung erfolgte mit 2 ml einer 25%igen Sucroselösung sowie abschließend mit 3 ml einer HB+PIC-Lösung. Diese Anordnung des Sucrose-Dichte-Gradienten erfolgte in einem 14 x 89 mm großen Zentrifugenröhrchen von Beckmann, das dann in den Schwingkopf des vorgekühlten Beckmann-SW-41-swing-out-Rotor eingelassen und mit einem Gegengewicht auf 0,002 g genau austariert wurde. Die Trennung der frühen Endosomen, späten Endosomen und schweren Membranen erfolgte an den Trennschichten der unterschiedlichen Sucroselösungen bei 30000 rpm für 90 min in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge. Die einzelnen Fraktionen wurden durch die sukzessive Abnahme von 0.5 – 1 ml Fraktionen von oben gesammelt. Um die Reinheit der früh- und spät-endosomalen Fraktionen zu überprüfen, wurde jede Fraktion auf ihre β-Hexosaminidaseaktivität getestet (Fischer et al. 1980). Dabei zeigte sich in allen Experiment eine starke Anreicherung der β-Hexosaminidaseaktivität in den spät-endosomalen Fraktionen. An Endosomen gebundene Proteine wurden mittels der SDS-PAGE, Western-Blot und der ECL-Immunodetektion nachgewiesen. Sämtlichen Sucroselösungen wurde 3 mM Imidazol zugesetzt, der pH auf 7,4 eingestellt. Die Lösungen wurden steril filtriert. Alle Arbeiten für das Gewinnen subzellulärer Fraktionen wurden auf Eis durchgeführt.

2.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der von Laemmli beschriebenen Methode (Laemmli 1970) handelt es sich um ein Verfahren, in dem denaturierte und mit negativen elektrischen Ladungen versehene Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht in einem Polyacrylamidgel, an dem ein elektrisches Feld angeschlossen ist, aufgetrennt werden. Dazu wurden die aufzutrennenden Proben einer Vorbehandlung unterzogen. Gleiche Proteinmengen der unterschiedlichen Proben wurden mit Aqua bidest auf gleiches Volumen gebracht, gefolgt von der Zugabe des fünffach konzentrierten Probenpuffers (0,1 M Tris-HCl [pH 6,8], 2% SDS, 20% Glycerin, 1% 2-Mercaptoethanol und 0,1% Bromophenolblau) zur Reduzierung der Proben. Nach dem Durchmischen der Proben wurden die Proteine bei 95°C und 5 min denaturiert und an das SDS gebunden. Anschließend wurden die Proben auf 4°C abgekühlt und auf das Gel aufgetragen.

Das Gelsystem bestand aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Das Trenngel diente dem Auftrennen der Proteine, das Sammelgel der Bildung einer einheitlichen Lauffront, deren Sichtbarwerden durch das Bromophenolblau im Probenpuffer verursacht wurde. Bei der Herstellung des Trenngels variierte entsprechend der gewünschten Acrylamid-Prozentigkeit der Aqua-bidest-Anteil. Für einen 30 ml Ansatz eines 12,5% Trenngels wurden 12,5 ml einer 30%-Acrylamid-0,8%-Bislösung, 7,5 ml einer 1,5 M Tris-HCl [pH 8,8], 9,3 ml Aqua bidest, 0,6 ml 10% SDS und 0,2 ml 10% Ammoniumpersulfat benötigt. Nach Zugabe von 10 µl TEMED, das mit dem Ammoniumpersulfat als Katalysator zur Polymerisation des Acrylamids diente, wurde der Ansatz zwischen 2 Glasscheiben eingebracht, die zu 3 Seiten luftdicht abgeschlossen waren. Für 20 ml eines 3,5% Sammelgels wurden 2,4 ml 30%-Acrylamid-0,8%-Bislösung, 5 ml 0,5 M Tris-HCl [pH 6,8], 12,4 ml Aqua bidest, 0,2 ml 10% SDS und 0,3 ml 10% Ammoniumpersulfat angesetzt. Dieser Ansatz wurde nach Gabe von 10 µl TEMED auf das polymerisierte Trenngel gegossen und zur Schaffung der Probenkammern mit einem Kamm besetzt. Nach vollständiger Polymerisation wurde die Dichtung zwischen den Glasplatten und der Kamm entfernt, die Probenkammern mit Laufpuffer gespült und das Gelsystem in vertikaler Richtung in eine mit Laufpuffer (0,25 M Tris, 0,2 M Glycin und 1% SDS, pH 8,8) gefüllte Kammer gesetzt. In die Probenkammern des Sammelgels wurden die vorbehandelten Proben sowie zwei Standards zur Molekulargewichtsbestimmung (Amersham Rainbow-

Marker RPN 756, ein biotinylierter Proteinmarker von Biolabs) mit einer 100 µl Spritze von Hamilton eingebracht, gefolgt von dem Eintritt der Proben in das Sammelgel durch das Anlegen von 5 mA Stromstärke. Nach Erreichen des Trenngels erfolgte die Proteinauftrennung bei einer Stromstärke von 10-20 mA für 4 Stunden.

2.2.10 Western-Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel luftblasenfrei auf einen Protan Nitrocellulosefilter gebracht und zu je beiden Seiten mit 2 Lagen Blotpapier und einer Schwammmatte belegt. Nach Einbringen dieser Gel-Nitrocellulose-Schichtanordnung in eine mit Blotpuffer (3% Borsäure, 20% Methanol, pH 9) gefüllten Kammer erfolgte der Proteintransfer bei einer Stromstärke von 200-250 mA unter ständiger Kühlung des in der Blotkammer befindlichen Blotpuffers. Die Überprüfung des Proteintransfers wurde mit dem Färben der Nitrocellulose durch die Ponceau-S-Lösung (0,2% Ponceau S, 3% Trichloressigsäure) durchgeführt. Das Entfärben der Nitrocellulose wurde durch mehrmaliges Waschen in Aqua bidest erreicht (Towbin, Staehelin et al. 1979).

Immunodetektion von Proteinen in Western-Blots mittels ECL (Whitehead, Kricka et al. 1979):

Dieses Verfahren dient der Erkennung von Proteinen auf der Nitrocellulose mittels zweier Antigen-Antikörperreaktionen. Zunächst wird die Nitrocellulose mit dem ersten AK inkubiert, der an das gesuchte Protein bindet. Dem folgt eine Inkubation mit einem gegen den ersten AK gerichteten zweiten AK, an den eine Horse-Radish-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist. Diese erlaubt zusammen mit dem ECL-Reagenz eine lichtabhängige Reaktion, die auf einem Röntgenfilm zur Erkennung des gesuchten Proteins führt.

Dazu wurde die Nitrocellulose für eine Stunde in eine Blocklösung (0,1% Tween, 10% Milchpulver in PBS) gelegt. Dem folgte eine neunzigminütige Inkubation mit dem ersten AK, der in 0,1% Tween, 5% BSA in PBS gelöst war. Bevor die Nitrocellulose für 60 min mit dem zweiten AK bearbeitet wurde, wurden drei Waschgänge für je 10 min in 0,1% Tween in PBS mit der Nitrocellulose durchgeführt. Auch der Inkubation mit dem zweiten AK folgten mehrere Waschgänge abgestuft mit 0,3% Tween in PBS (3x für 5 min) und 0,1% Tween in PBS (3x für 5 min) und zuletzt in reinem PBS (5x für 1 min).

Die Blocklösung sowie die mehrmals durchgeführten Waschgänge dienten der Reduktion unspezifischer Antigen-Antikörper-Reaktionen.

Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe wurde die Methode der Autoradiographie angewendet. Dazu wurden folgende Schritte in der Dunkelkammer ausgeführt: die ECL-Detektion-Reagenz-Lösungen wurden laut Protokoll vermischt, das Gemisch gleichmäßig auf die Membranstreifen verteilt und für 1 min inkubiert. Anschließend wurden die Membranstreifen trocken getupft. Ein Röntgenfilm wurde darauf gelegt und für 10 sec belichtet. Der Film wurde entwickelt und dem ersten Belichtungsergebnis entsprechend wurden weitere Belichtungen vorgenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Calciumabhängige Bindung von Annexin 6 an Membranen von CHO-Zellen

Annexine sind im Zytosol vorliegende Proteine, die calciumvermittelt an negativ geladene PL binden. Der Proteinkern ist für diese reversible Bindung verantwortlich. Calciumbindende Agenzien führen zu einer Freisetzung der an eine Phospholipidschicht bindenden Annexine (Gerke and Moss 1997; Grewal, Heeren et al. 2000). Im Experiment sollte diese Bindungseigenschaft für Anx6 bestätigt werden. Als Probe wurde ein von Zellkern und Zelltrümmern befreiter Zellextrakt (postnukläerer Überstand, PNS) von CHOwt-Zellen verwendet (s. 2.2.8). Um die calciumvermittelte und reversible Bindung von Anx6 darzustellen, wurden 50 µl der Proben (entspricht $\sim 5 \times 10^7$ Zellen) zum einen mit 50 mM EDTA und zum anderen mit 50 µM CaCl₂ inkubiert. EDTA komplexiert Calcium und bewirkt ein Ablösen calciumabhängig gebundener Proteine von den Membranen, CaCl₂ dagegen stimuliert das Binden freier, calciumabhängig bindender Proteine an die Membranen. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 4°C, anschließend wurden die Proben zentrifugiert. Die Pellets (Membranen) wurden in je 50 µl HB resuspendiert. Je 10 µl der Überstände (Zytosol) und Pellets wurden in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt. Die in der SDS-Page untersuchten Proben hatten in diesen und allen weiteren Experimenten eine Konzentration an Zellprotein von ca. 0,5-2 µg/µl. Mittels der Western-Blot-Analyse wurde die Verteilung von Anx6, Anx2 und Caveolin untersucht (s. Abb. 6). Anx2 dient als Positivkontrolle, Caveolin dagegen als Negativkontrolle, da es calciumunabhängig an Membranen bindet.

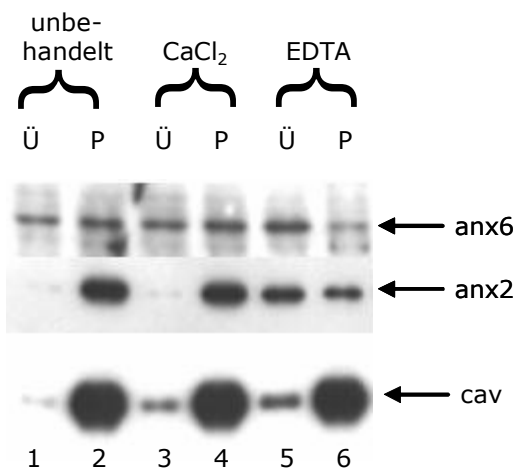


Abb. 6) **Wirkung von 50 mM EDTA auf die Membranbindung des Anx6 in CHOwt-Zellen.** Je ein PNS von $4-6 \times 10^7$ CHOwt-Zellen wurde mit 50 mM EDTA (Spuren 5 und 6) bzw. mit 50 µM CaCl₂ (Spuren 3 und 4) für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl HB resuspendiert und je 10 µl der Überstände (Ü) und Pellets (P) in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und mittels Western Blot auf die Verteilung von Anx6, Anx2 und Caveolin geprüft. Die Spuren 1 und 2 zeigen Ü und P eines unbehandelten PNS.

Überstand (Ü) und Pellet (P) des unbehandelten PNS (Spuren 1 und 2) zeigen für die Verteilung von Anx6, dass es zu 60% in membrangebundener und zu 40% in freier Form vorliegt. Eine deutlichere Verteilung zugunsten der membrangebundenen Form zeigt Anx2. Die Behandlung mit CaCl_2 erbrachte für beide Proteine kaum eine Änderung dieser Verteilung. Dies kann durch eine bereits erfolgte Sättigung der Phospholipidbindungsstellen mit Annexinen oder hohe Basalkonzentrationen von Calcium im Zytosol erklärt werden.

Die Inkubation mit EDTA hingegen führte bei Anx6 zu einer deutlich reduzierten Membranaffinität mit einem 80%igen Anteil an freiem Anx6 (Spur 5), dem nur ein geringer Teil membrangebundenes Anx6 gegenübersteht (Spur 6). Zu einer ähnlichen Umverteilung kam es bei Anx2 (Spuren 5 und 6). Der quantitative Unterschied in der calciumabhängigen Bindung spricht für eine erhöhte Calciumsensitivität des Anx6 gegenüber Anx2. Dies geht mit der Beobachtung einher, dass ein Anteil des Anx2 calciumunabhängig an Membranen bindet (Jost, Zeuschner et al. 1997; König and Gerke 2000). Wie erwartet zeigten Calcium und EDTA keinen signifikanten Einfluss auf die Membranaffinität von Caveolin (Vergleich der Spuren 2, 4 und 6).

3.2 Einfluss von Cholesterin auf die Bindung von Annexin 6 an Membranen

3.2.1 Einfluss von Filipin auf die Membranbindung von Annexin 6 in Gegenwart von Calcium

Neben der in 3.1 dargestellten calciumabhängigen Membranbindung von Anx6 gibt es weitere regulierende Faktoren. So wirkt ein saurer pH-Wert ebenfalls auf die Bindungsaffinität von Anx6 (Golczak, Kicinska et al. 2001; Golczak, Kirilenko et al. 2001). Die Translokation von Anx6 an LE bei der rezeptorvermittelten Endozytose von LDL (Grewal, Heeren et al. 2000) gibt außerdem Anlass zu der Vermutung, dass LDL-Cholesterin bzw. Cholesterin in der Lipidkomposition einer Membran eine direkte oder indirekte Rolle auf die Bindungsaffinität von Anx6 spielen könnte. Die Hypothese der cholesterinabhängigen Membranbindung von Anx6 wird durch Experimente an einem anderen Mitglied der Annexinfamilie, dem Anx2, gestärkt. Für Anx2 ist eine calciumabhängige und calciumunabhängige Bindung an biologische Membranen beschrieben (Harder, Kellner et al. 1997; Jost, Zeuschner et al. 1997; König and Gerke 2000; Ayala-Sanmartin 2001; Ayala-Sanmartin, Henry

et al. 2001). Bindungsstudien führten zur Identifikation eines EGTA-resistenten, calciumunabhängig membrangebundenen Anx2-Pools. Zum Beispiel sind etwa 50% von Anx2 in BHK (Baby Hamster Kidney)-Zellen calciumunabhängig an endosomale Membranen gebunden. Studien mit cholesterinsequestrierenden Agenzien wie Digitonin und Filipin setzten diesen calciumunabhängig membrangebundenen Pool an Anx2 frei. In dieser calciumunabhängigen Membranbindung von Anx2 spielt das in der Membran enthaltene Cholesterin eine direkte oder indirekte Rolle (Harder, Kellner et al. 1997; Jost, Zeuschner et al. 1997; König and Gerke 2000). Dabei scheinen Calcium und Cholesterin gemeinsam die Membranbindungsaffinität von Anx2 zu regulieren (Ayala-Sanmartin 2001). Unterstützt wird diese Hypothese durch Arbeiten an Anx5. In diesen vermittelte eine erhöhte Konzentration von Cholesterin in Liposomen einen Anstieg der calciumabhängigen Membranbindung von Anx5 (Ayala-Sanmartin 2001).

Der mögliche Einfluss von Cholesterin auf die Membranbindung von Anx6 wurde genauer analysiert. Dazu sollte im weiteren Verlauf des Experiments die Frage beantwortet werden, ob ein Cholesterinentzug aus Membranen zu einer reduzierten Bindung von Anx6 führt. Als Probe diente ein PNS von CHOwt-Zellen und CHOanx6-Zellen. Der 50 µl Probe wurde Filipin in einer Konzentration von 10 µg/ml Probe zugesetzt, für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das P wurde in je 50 µl HB resuspendiert. Je 10 µl der Ü und P wurden in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt, um mit der Western-Blot-Analyse die Verteilung von Anx6, Anx2 und Caveolin zu untersuchen (s. Abb. 7). Anx2 dient als Positivkontrolle, Caveolin als Negativkontrolle, da es resistent gegen die Behandlung der Membranen mit Filipin ist (Jost, Zeuschner et al. 1997; Ayala-Sanmartin 2001).

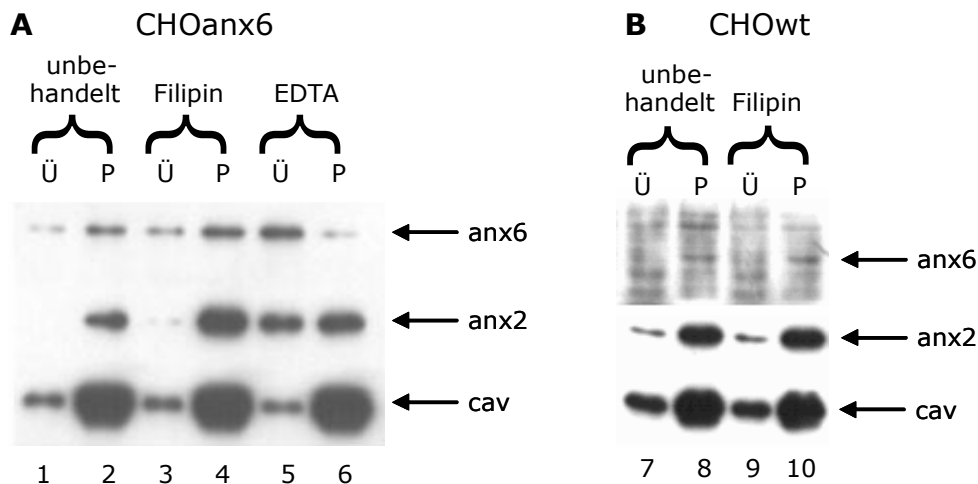


Abb. 7) **Wirkung von 10 µg Filipin auf die Membranbindung des Anx6 in CHOanx6- und CHOwt-Zellen.** Je ein PNS von 5×10^7 CHOanx6-Zellen (A) wurde mit 10 µg Filipin/ml Probe (Spuren 3 und 4) bzw. mit 50 mM EDTA (Spuren 5 und 6) für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das P wurde in 50 µl HB resuspendiert und je 10 µl der Ü und P in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und mittels Western-Blot auf die Verteilung von Anx6, Anx2 und Caveolin geprüft. Die Spuren 1 und 2 zeigen Ü und P eines unbehandelten PNS.

Teil B der Abbildung zeigt das Experiment mit dem PNS von CHOwt-Zellen. Die Spuren 7 und 8 zeigen Ü und P eines unbehandelten PNS. Die Spuren 9 und 10 repräsentieren Ü und P eines PNS nach 30minütiger Inkubation mit Filipin und Zentrifugieren.

Überstand und Pellet der unbehandelten PNS (A: Spuren 1 und 2; B: Spuren 7 und 8) zeigen für die Verteilung von Anx2 und Anx6, dass die Proteine vorwiegend membrangebunden vorliegen. Die Spuren 5 und 6 zeigen erneut die fast vollständige und partiell calciumabhängige Bindung von Anx6 und Anx2 (s. 3.1). Die Behandlung der PNS von CHOanx6-Zellen und CHOwt-Zellen mit Filipin zeigen im Vergleich mit der unbehandelten Probe keine Veränderung im Verteilungsmuster sowohl für Anx6 (A: Spuren 3 und 4) als auch für Anx2 (B: Spuren 9 und 10). Das Ergebnis für Anx2 steht im Gegensatz zur Literatur, die für Anx2 sowohl eine calciumabhängige als auch eine calciumunabhängige Bindung beschreibt. Die Inkubation der Probe mit EDTA zeigt, dass 50% des Anx2 membrangebunden bleibt. Für diese calciumunabhängig bindenden Anx2 Moleküle ließ sich eine cholesterinsensitive Bindung nachweisen (Harder, Kellner et al. 1997; König and Gerke 2000). Filipin zeigte in diesem Ansatz jedoch kein cholesterinsensitives Bindungsverhalten für Anx2 auf. Die Caveolin-Banden zeigen ein gleichbleibendes Verteilungsmuster und zeugen damit für die Resistenz des Caveolins gegenüber der Behandlung sowohl mit EDTA als auch mit Filipin. Die Resistenz gegen Filipin ist erstaunlich, da Caveolin als Strukturprotein

cholesterinreicher Lipid-Rafts/Caveolae an Cholesterin bindet und ein destabilisierender Effekt von Filipin auf diese Strukturen erwartet wurde. Jedoch zeigten weitere Arbeiten, dass die Bindung von Filipin an Cholesterin zwar eine Umverteilung, aber keinen kompletten Verlust von Lipid-Rafts/Caveolae zur Folge hat (Severs and Simons 1983; Pelletier and Vitale 1994).

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Filipinkonzentration in der Probe (PNS) auf 230 µg/ml erhöht. Mit diesem Experiment sollte ausgeschlossen werden, dass zu niedrige Filipinkonzentrationen verwendet wurden. Dazu wurde eine 50 µl PNS Probe mit 230 µg Filipin/ml inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 4°C mit anschließender Zentrifugation der Probe. Das P wurde in je 50 µl HB resuspendiert. Je 10 µl der Ü und P wurden in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt, um mit der Western-Blot-Analyse die Verteilung von Anx6 und Anx2 zu untersuchen (s. Abb. 8).

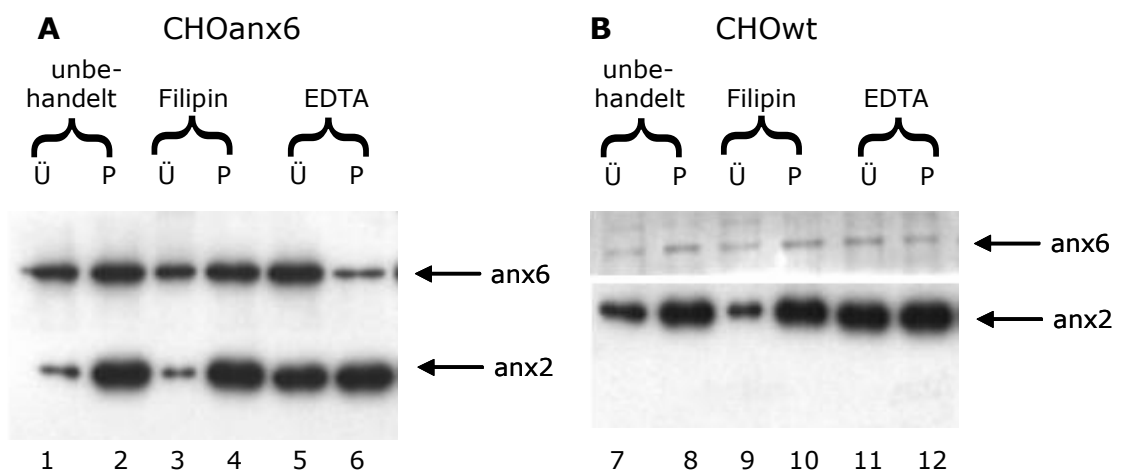


Abb. 8) **Wirkung von 230 µg Filipin auf die Membranbindung des Anx6 in CHOanx6- und CHOwt-Zellen.** Je ein PNS von 6×10^7 CHOanx6-Zellen (A) wurde mit 230 µg Filipin/ml (Spuren 3 und 4) bzw. mit 50 mM EDTA (Spuren 5 und 6) für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das P wurde in 50 µl HB resuspendiert und je 10 µl der Ü und P in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und mittels Western-Blot auf die Verteilung von Anx6 und Anx2 geprüft. Die Spuren 1 und 2 zeigen Ü und P eines unbehandelten PNS.

Teil B der Abbildung zeigt das Experiment mit dem PNS von CHOwt-Zellen. Die Spuren 7 und 8 zeigen Ü und P eines unbehandelten PNS. Die Spuren 9 und 10 repräsentieren Ü und P eines PNS nach 30minütiger Inkubation mit Filipin und Zentrifugieren. Ü (11) und P (12) zeigen als Kontrolle das Ergebnis der 50 mM EDTA-Behandlung eines PNS von CHOwt-Zellen.

Trotz der 23-fachen Steigerung der Filipinkonzentration zeigt sich ein nahezu identisches Verteilungsmuster von Anx2 und Anx6 im Vergleich zum oben gezeigten Experiment. Die Ü und P der unbehandelten bzw. der mit Filipin

behandelten Proben (Spuren 1, 2 und 3, 4 für CHOanx6-Zellen; Spuren 7, 8 und 9, 10 für CHOwt-Zellen) zeigen für Anx2 und Anx6 keine Änderung im Verteilungsmuster. Anx2 liegt zu 20-30% in freier Form und zu 70-80% in membrangebundener Form sowohl in CHOanx6- als auch in CHOwt-Zellen vor. Anx6 zeigt in CHOwt-Zellen trotz der Behandlung mit Filipin ein gleichbleibendes Verteilungsmuster im Vergleich zur unbehandelten Probe. Es liegt zu 20% in freier Form und zu 80% membrangebunden vor. Anx6-überexprimierende Zellen zeigen im Vergleich mit CHOwt-Zellen (Spur 7 und 8) eine veränderte Verteilung zwischen freiem und membrangebundenem Anx6 (40:60; Spur 1 und 2). Filipin führt aber in diesen CHOanx6-Zellen ebenfalls zu keiner Änderung in der Membranaffinität (Vergleich der Spuren 1, 2 mit 3, 4).

Beiden dargestellten Experimenten liegt der gleiche Versuchsansatz zugrunde, sie unterscheiden sich lediglich in der gewählten Filipinkonzentration. Für diesen Versuchsansatz lässt sich damit zusammenfassen, dass die Sequestration von Cholesterin mit Filipin an Membranen des PNS (endosomale Membranen, Plasmamembran) zu keiner Senkung der Membranbindung von Anx6 führt. Dieses Experiment schließt aber einen Einfluss von Cholesterin im Sinne einer Destabilisierung der calciumabhängigen Bindung von Annexinen an PL nicht komplett aus, kann jedoch in diesem Ansatz nicht beurteilt werden, da sowohl unbehandeltes als auch mit Filipin behandeltes PNS von CHO-Zellen ein identisches Verteilungsmuster zeigen (Vergleich der Spuren 1, 2 mit 3, 4 sowie 7, 8 mit 9, 10).

Um einen möglichen Einfluss von Filipin auf die Bindungsaffinität von Anx6 genauer zu prüfen, wurde in einem weiteren Experiment versucht, mit der maximal möglichen Anzahl membrangebundener Anx6-Moleküle zu arbeiten. Dazu wurde als Probe ein 250 µl PNS von CHOwt-Zellen verwendet, die zunächst mit 50 µM CaCl₂ für 30 min bei 4°C inkubiert wurde. Damit sollte durch die calciumvermittelte Membranbindung von Anx6 der Anteil an membrangebundenem Anx6 gesteigert bzw. freie Membranbindungsstellen für Anx6 besetzt werden. Nach der Inkubation wurde die Probe gedrittelt. Je 60 µl wurden entweder mit 50 mM EDTA oder mit 10 µg Filipin/ml Probe behandelt. Diese Bearbeitung erfolgte wiederum für 30 min bei 4°C, gefolgt vom Zentrifugieren der Proben. Eine weitere 60 µl Probe diente als Kontrolle und blieb unbehandelt. Je 10 µl der Ü und P wurden in einer 12,5%igen SDS-Page

aufgetrennt und mittels Western-Blot auf die Verteilung von Anx6, Anx2 und Caveolin geprüft (s. Abb. 9).

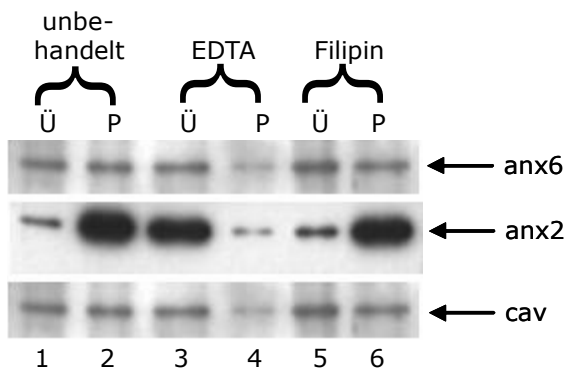


Abb. 9) **Wirkung von 10 µg Filipin auf die Membranbindung des Anx6 in CHOwt-Zellen in Gegenwart von 50 µM CaCl₂.**

Ein PNS von $2,5 \times 10^8$ CHOwt-Zellen wurde mit 50 µM CaCl₂ für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das PNS in drei 60 µl Proben aufgeteilt. Je eine Probe wurde entweder mit 10 µg Filipin/ml (Spuren 5 und 6) oder mit 50 mM EDTA (Spuren 3 und 4) wiederum für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das P wurde in 60 µl HB resuspendiert und je 10 µl der Ü und P in

einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und mittels Western-Blot auf die Verteilung von Anx6 und Anx2 geprüft. Die Spuren 1 und 2 zeigen Ü und P der unbehandelten Probe.

Überstand und Pellet des unbehandelten PNS (Spuren 1 und 2) zeigen für die Verteilung von Anx2 und Anx6 das bekannte Verteilungsmuster. Anx2 kommt vor allem membrangebunden vor (Verteilungsverhältnis 80:20), bei Anx6 überwiegt ebenfalls die membrangebundene Form (60:40). Die Inkubation mit EDTA verdeutlicht nochmals die calciumabhängige Bindung von Anx6 und Anx2. Die Behandlung mit Filipin zeigt jedoch im Vergleich mit der unbehandelten Probe eine kleine Änderung im Verteilungsmuster sowohl für Anx6 als auch für Anx2 (Spuren 5 und 6). Jedoch fällt die Änderung im Verteilungsmuster für beide Proteine gering aus und muss eher als unspezifisch angesehen werden. Die Caveolin-Banden zeigen ein gleichbleibendes Verteilungsmuster. Um diesen unspezifischen Effekt ausschließen zu können, wurde in einem weiteren Experiment mit je 6 PNS Proben von CHOwt-Zellen und von CHOanx6-Zellen eine Titrationsreihe mit ansteigenden Filipinkonzentrationen (16 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml, 96 µg/ml, 128 µg/ml und 160 µg/ml) erstellt. Dabei konnte klar festgestellt werden, dass Filipin auch in diesem Versuchsansatz keine Senkung der Membranbindung von Anx6 bewirkt (Ergebnisse nicht gezeigt). Damit werden die bereits beschriebenen Ergebnisse bestätigt, dass unter den von uns ausgewählten Bedingungen Filipin keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität von Anx6 bei Calciumanwesenheit hat.

3.2.2 Einfluss von Filipin auf die Membranbindung von Annexin 6 in Abwesenheit von Calcium

Bei allen unter 3.2.1 beschriebenen Experimenten fiel auf, dass nach der Behandlung des PNS (endosomale Membranen, PM, TGN) mit EDTA ein Anteil des Anx6 membrangebunden verblieb. Mit Bezug auf die Membranbindung erscheint dieser Anx6-Anteil resistent gegenüber EDTA. Da Filipin keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität des gesamten Anx6-Pools hat, sollte im Weiteren der Einfluss von Filipin auf den EDTA-resistenten Anx6-Anteil untersucht werden. Dafür sollte zuerst das PNS mit EDTA vorbehandelt werden, um den EDTA-resistenten Anteil von Anx6 zu isolieren. Der Versuchsansatz sah wie folgend aus. Ein 200 μ l PNS von CHOanx6-Zellen wurde für 30 min bei 4°C mit 50 mM EDTA inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das P wurde in 150 ml HB resuspendiert und anschließend in drei gleich große Proben aufgeteilt (50 μ l). Eine Probe wurde wiederum mit 50 mM EDTA inkubiert und diente damit als Kontrolle für EDTA-resistentes, calciumunabhängig bindendes Anx6. Die zweite Probe wurde mit 200 μ g Filipin/ml inkubiert. Die dritte Probe davon blieb unbehandelt und diente als Negativkontrolle. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für 30 min. Alle Proben wurden nochmals zentrifugiert, die P in 50 μ l HB resuspendiert. Je 10 μ l der Ü und P wurden in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt, um mittels Western-Blot die Verteilung von Anx6, Anx2 und Caveolin zu untersuchen (s. Abb. 10).

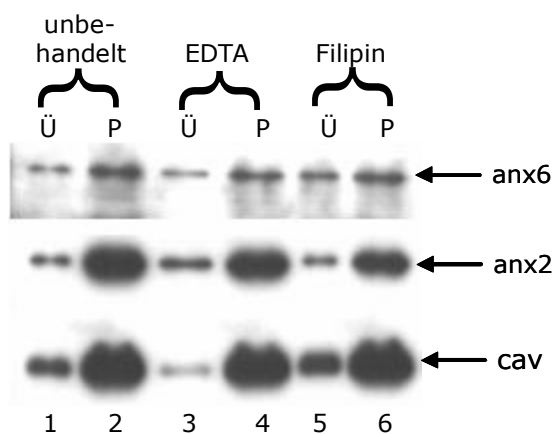


Abb. 10) **Wirkung von 200 μ g Filipin auf die Bindung des membranassoziiert verbliebenen Anx6 nach EDTA-Vorbehandlung.** Ein PNS von $1,5 \times 10^8$ CHOanx6-Zellen wurde mit 50 mM EDTA für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das P wurde in 150 μ l HB resuspendiert und gedrittelt. Nach diesem ersten Inkubationsschritt wurde eine Probe mit 50 mM EDTA (Spuren 3 und 4) als Kontrolle EDTA-resistenter, calciumunabhängig bindender Anx6-Proteine, die zweite mit 200 μ g Filipin/ml (Spuren 5 und 6) für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die P wurden nach dem zweiten Inkubationsschritt in 50 μ l HB

resuspendiert und je 10 μ l der Ü und P in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und mittels Western-Blot auf die Verteilung von Anx6 und Anx2 geprüft. Die Spuren 1 und 2 zeigen Ü und P einer Probe, die während des zweiten Inkubationsschrittes unbehandelt blieb, jedoch gleichen Inkubationsbedingungen unterworfen war.

Die Spuren 1 und 2, 3 und 4 zeigen in der Verteilung von Anx2 und Anx6 ein gleiches Muster. Für Anx2 und Anx6 präsentiert die Spur 2 den Anteil am Gesamtpool von Anx2 bzw. Anx6, der nach der EDTA-Vorbehandlung membrangebunden blieb. Eine zweite EDTA-Behandlung (Spuren 3 und 4) bewirkte keine Änderung im Verteilungsmuster für Anx2 und Anx6. Mit dieser zweiten EDTA-Behandlung als Kontrolle konnte nachgewiesen werden, dass ein Teil des membranbindenden Anx6 tatsächlich EDTA-resistent und damit calciumunabhängig an Membranen von CHO-Zellen bindet. Dass trotzdem Anx6 im Ü vorkommt (Spuren 1 und 3), obwohl nach dem ersten Inkubationsschritt nur mit dem membrangebunden verbliebenen Anteil von Anx6 gearbeitet wurde, ist am ehesten auf die Bedingungen des zweiten Inkubationsschrittes zurückzuführen und als unspezifisch zu werten. Die Filipin-Behandlung des EDTA-resistenten, also membrangebunden verbliebenen Anteils von Anx6 führte zu einer Änderung im Verteilungsmuster von 40% freien und 60% membrangebundenen Anx6-Proteinen. Die unbehandelte Probe (Spur 1 und 2) zeigt dazu im Vergleich eine Verteilung von 20% freiem und 80% membrangebundenem Anx6. Für Anx2 kommt es zu keiner Umverteilung. Das wiederum steht im Gegensatz zur Literatur, da für Anx2 ein EDTA-resistenter, calciumunabhängig bindender Anx2-Pool beschrieben ist, der cholesterinsensitiv an Membranen bindet (Harder, Kellner et al. 1997; König and Gerke 2000). Die Caveolin-Banden zeigen ein gleichbleibendes Verteilungsmuster.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Experimente einen EDTA-resistenten Pool von Anx6 identifizierten. Filipin bewirkt vermutlich durch die Bindung und Umverteilung des membranassoziierten Cholesterins eine Abnahme der Membranaffinität dieses EDTA-resistenten Anx6-Pools. Um den EDTA-resistenten und calciumunabhängig bindenden Anx6-Pool sowie die an diesem Pool cholesterinvermittelte Abnahme der Bindungsaffinität genauer zu charakterisieren, wurden weitere Experimente mit Digitonin durchgeführt. Digitonin ist ein Agens, das ähnlich dem Filipin biologischen Membranen Cholesterin entzieht (Harder, Kellner et al. 1997; König and Gerke 2000).

3.2.3 Einfluss von Digitonin auf die Membranaffinität calciumabhängig bindender Annexin-6-Proteine

Der von Filipin vermittelte Entzug von Cholesterin aus Membranen reduziert die Membranaffinität von EDTA-resistentem Anx6. Im Experiment sollte diese

Beobachtung für Digitonin als cholesterinsequestrierendes Agens bestätigt werden. Dazu dienten als Proben wieder 160 μl PNS von CHOwt-Zellen und von CHOanx6-Zellen, die in je vier gleich große 40 μl Anteile aufgeteilt wurden. Einer 40 μl Probe wurde Digitonin in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zugesetzt. Als Kontrolle für die calciumabhängige Bindung von Annexinen wurde eine 40 μl Probe mit 50 mM EDTA inkubiert. Einer weiteren 40 μl Probe wurde gleichzeitig 50 mM EDTA und Digitonin in der Konzentration 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zugesetzt. Eine Probe blieb unbehandelt, wurde aber den gleichen Inkubationsbedingungen unterworfen. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 4°C mit anschließender Zentrifugation der Proben. Die P wurden in je 40 μl HB resuspendiert. Je 10 μl der Ü und P wurden in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt, um mit der Western-Blot-Analyse die Verteilung von Anx 6, Anx2 und Caveolin zu untersuchen (s. Abb. 11). Caveolin dient als Negativkontrolle, da es resistent gegen die Behandlung der Membranen mit Digitonin ist (Jost, Zeuschner et al. 1997; Ayala-Sanmartin 2001).

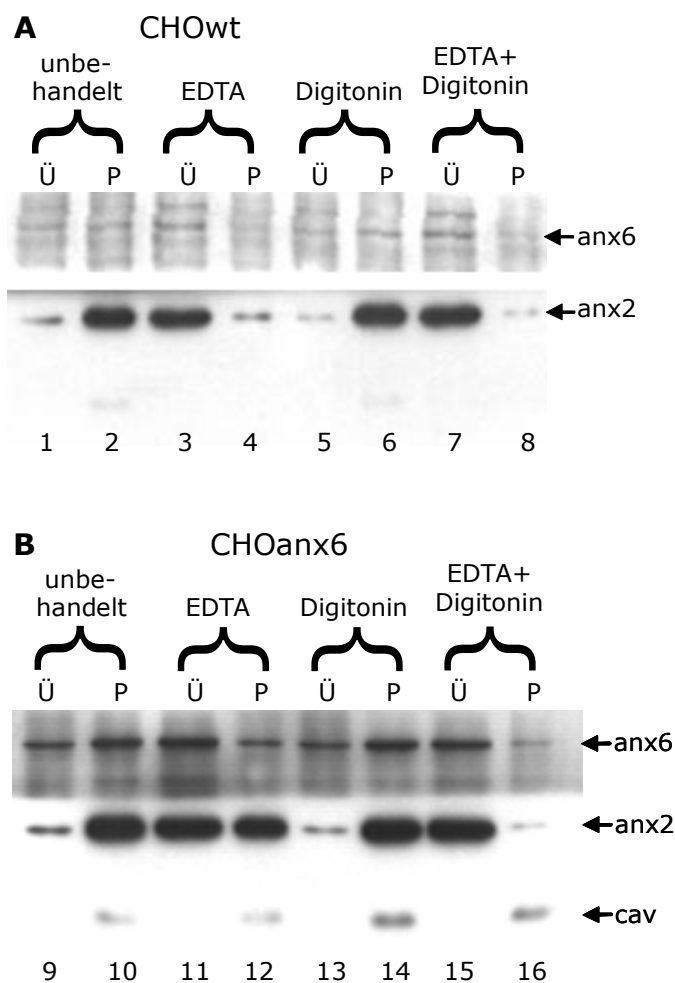


Abb. 11) **Wirkung von Digitonin auf die Membranbindung des Anx6 in (A) CHOwt- und (B) CHOanx6- Zellen in Gegenwart von Calcium.** In jedem Ansatz wurden vier Proben à 40 μl PNS (4-5 $\times 10^7$ CHO-Zellen) erstellt. Eine Probe wurde mit 50 mM EDTA (Spuren 3 und 4, 11 und 12), eine Probe mit Digitonin in der Konzentration 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Probe (Spuren 5 und 6, 13 und 14) und eine weitere gleichzeitig mit 50 mM EDTA und Digitonin in der Konzentration 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Probe (Spuren 7 und 8, 15 und 16) für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die P wurden in 40 μl HB resuspendiert und je 10 μl der Ü und P in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und mittels Western-Blot auf die Verteilung von Anx6 und Anx2 geprüft. Die Spuren 1 und 2, 9 und 10 zeigen Ü und P einer Probe, die unbehandelt blieb, jedoch gleichen Inkubationsbedingungen unterworfen war.

Die Spuren der unbehandelten Proben (1 und 2, 9 und 10) zeigen eine vorwiegend membranassoziierte Verteilung für Anx2 und Anx6. Anx2 liegt zu 10% in freier Form vor (Spur 1), der Rest ist membrangebunden (Spur 2). Bei Anx6 beträgt der Anteil frei vorkommender Moleküle 30% (Spur 1), der Rest ist membrangebunden (Spur 2). Dieses Verteilungsmuster wird durch den Entzug von Cholesterin mittels Digitonin aus postnukleären Membranen nicht verändert (A: Spuren 5 und 6, B: Spuren 13 und 14). EDTA hingegen führte bei Anx6 zu der bereits in 3.1 beschriebenen Senkung der Membranaffinität mit einem 70%igen Anteil an freiem Anx6 (Spur 3, 11), dem ein 30%iger Anteil an EDTA-resistentem, membranassoziiert verbliebenem Anx6 gegenübersteht (Spur 4, 12). Zu der qualitativ gleichen, lediglich im Ausmaß geringeren Umverteilung kam es bei Anx2 (Spuren 3 und 4, 11 und 12). Die gleichzeitige Behandlung der Proben mit Digitonin und EDTA (Spuren 7 und 8, 15 und 16) führte zu einer veränderten Verteilung, die aber dem Verteilungsmuster der EDTA-Behandlung entspricht. Digitonin bewirkt hier keinen zusätzlichen Effekt.

Diese Beobachtungen gehen konform mit den Versuchen und Ergebnissen mit Filipin (s. 3.2.1). Das heißt, der Cholesterinentzug mit Digitonin aus postnukleären Membranen (endosomale Membranen, Plasmamembran) führt zu keiner Senkung der Membranbindung von Anx6 in einem calciumhaltigen Milieu. Dies bestätigen Ergebnisse der AG von König und Gerke, die den Einfluss von Cholesterin auf das Bindungsverhalten von Anx2 nur an einem calciumunabhängig bindenden Pool demonstrieren konnten (König and Gerke 2000).

3.2.4 Einfluss von Digitonin auf die Membranbindung calciumunabhängig bindender Annexin-6-Proteine

Arbeiten mit Filipin an einem EDTA-resistenten und weiterhin membranbindenden Annexin-6-Pool zeigten, dass der Cholesterinentzug eine Abnahme der Membranbindung dieses EDTA-resistenten Annexin-6-Pools bewirkt (s. 3.2.2). In dem folgenden Experiment sollte diese Beobachtung nochmal mit Digitonin bestätigt werden. Dazu wurde ein 200 µl PNS von CHOanx6-Zellen mit 50 mM EDTA für 30 min bei 4°C vorbehandelt, um die calciumabhängig bindenden Proteine von den Membranen zu lösen und nachfolgend zentrifugiert. Die Resuspendierung des P erfolgte in 160 µl HB mit der Aufteilung in vier gleich große Proben (40 µl). Eine 40 µl wurde nochmals mit

50 mM EDTA, die zweite mit Digitonin bei einer Konzentration von 0,5 µg/µl Probe und eine weitere Probe gleichzeitig mit 50 mM EDTA und Digitonin in der Konzentration 0,5 µg/µl Probe für 30 min bei 4°C inkubiert. Die vierte Probe blieb unbehandelt, wurde aber den gleichen Inkubationsbedingungen unterzogen. Die Proben wurden ein zweites Mal zentrifugiert, die P in 40 µl HB resuspendiert. Je 10 µl der Ü und P wurden in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt, um mittels Western-Blot die Verteilung von Anx6, Anx2 und Caveolin zu untersuchen (s. Abb. 12).

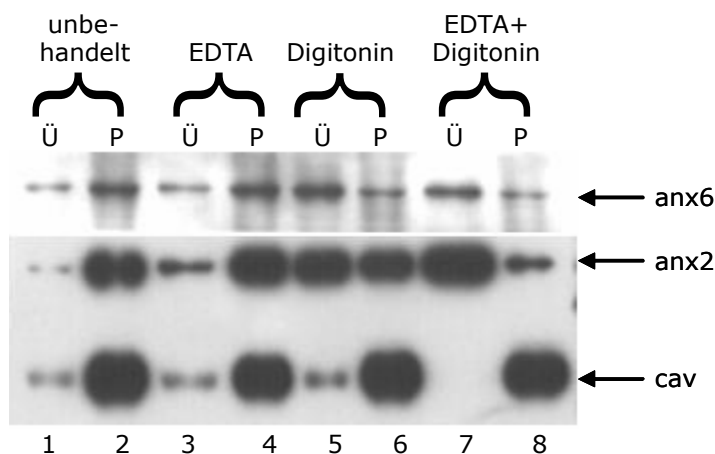


Abb. 12) **Wirkung von Digitonin auf das Bindungsverhalten des membranassoziiert verbliebenen Anx6 nach EDTA-Vorbehandlung.**

Ein PNS von $1,5 \times 10^8$ CHOanx6-Zellen wurde mit 50 mM EDTA für 30 min bei 4°C vorbehandelt und anschließend zentrifugiert. Das P wurde in HB resuspendiert und je 40 µl nochmals mit 50 mM EDTA (Spuren 3 und 4), mit 0,5 µg Digitonin/µl (Spuren 5 und 6) und mit 50 mM EDTA + 0,5 µg

Digitonin/µl (Spuren 7 und 8) für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Nach diesem zweiten Inkubationsschritt wurden von den Ü und den in 40 µl HB resuspendierten P je 10 µl in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und mittels Western-Blot auf die Verteilung von Anx6 und Anx2 geprüft. Die Spuren 1 und 2 zeigen Ü und P einer Probe, die während des zweiten Inkubationsschrittes unbehandelt blieb, jedoch den gleichen Inkubationsbedingungen unterworfen war.

Durch die erste EDTA-Behandlung wird der calciumsensitive Annexinpool entfernt. Nach diesem ersten Inkubationsschritt lag Anx6 in der unbehandelten Probe zu 80% membrangebunden und zu 20% ungebunden vor, Anx2 war zu über 90% membrangebunden (Spuren 1 und 2). Eine erneute EDTA-Behandlung brachte kaum eine Änderung in der Verteilung für Anx2 und Anx6 (Spuren 3 und 4). Das bestätigt die Existenz eines EDTA-resistenten Anx6-Pools, der calciumunabhängig eine stabile Bindung an Membranen eingeht. Die Behandlung mit Digitonin hingegen führte bei Anx6 zu einer deutlichen Senkung der Membranaffinität von 80% auf 30%, die Membranaffinität von Anx2 sank von 90% auf 50% (Spur 6). Während eine gemeinsame Behandlung mit EDTA und Digitonin bei Anx6 keine weitere Affinitätsänderung bewirkte, sank die Affinität von Anx2 nochmals auf 30% (Spur 8). Das spricht für einen kooperativen Effekt von EDTA und Digitonin bei

calciumunabhängig bindenden Anx2-Proteinen. Die Caveolin-Banden blieben weitgehend unverändert. Dieses Ergebnis verdeutlicht eindrucksvoll die Existenz eines EDTA-resistenten und calciumunabhängigen Pools von membranbindenden Anx6-Proteinen, der sensitiv für die Konzentration bzw. Verteilung von Cholesterin in der Membran ist (de Diego, Schwartz et al. 2002).

Allerdings könnte die Überexpression von Anx6 zu einer Sättigung aller calciumabhängigen Anx6-Bindungsstellen geführt haben, so dass es zu einer unspezifischen und calciumunabhängigen Assoziation weiterer Anx6-Moleküle hätte kommen können. Um die Existenz eines endogenen calciumunabhängigen, cholesterinsensitiven Pools von Anx6 zu überprüfen, wurde dieses Experiment zur Kontrolle mit CHOwt-Zellen durchgeführt (de Diego et al 2002). Dabei ließen sich die dargestellten Beobachtungen bestätigen. Man kann daraus schlussfolgern, dass auch Anx6 calcium- und cholesterinabhängig an Membranen bindet.

Um die Sensitivität der cholesterinabhängigen Bindung von Anx6 durch Digitonin zu prüfen, wurden im folgenden Experiment 3 PNS-Proben von CHOanx6-Zellen mit ansteigenden Digitoninkonzentrationen (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) inkubiert. Dazu wurden die Proben mit 50 mM EDTA vorbehandelt, zentrifugiert und die P in HB resuspendiert. Die einzelnen Proben wurden nun mit unterschiedlichen Digitoninkonzentrationen nochmals inkubiert. Als Kontrolle blieb eine Probe während der zweiten Inkubation unbehandelt. Nach dem Zentrifugieren und Resuspendieren der P wurden je 10 μl der Ü und P in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und mittels Western-Blot auf die Verteilung von Anx6 und Caveolin geprüft (s. Abb. 13).

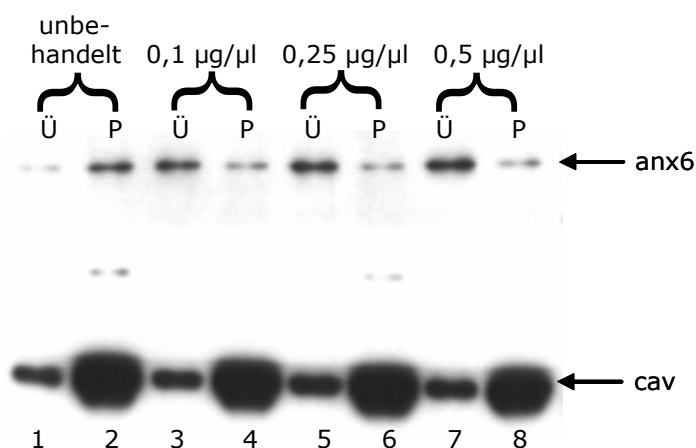


Abb. 13) **Sensitivität der cholesterinabhängigen Bindung von Anx6 bei ansteigenden Digitoninkonzentrationen.** Ein PNS von 6×10^7 CHOanx6-Zellen wurde mit 50 mM EDTA für 30 min bei 4°C vorbehandelt und anschließend zentrifugiert. Das P in HB resuspendiert und je 40 μl mit 0,1 μg Digitonin/ μl (Spuren 3 und 4), mit 0,25 μg Digitonin/ μl (Spuren 5 und 6) und mit 0,5 μg Digitonin/ μl (Spuren 7 und 8) für 30 min bei 4°C

inkubiert und anschließend zentrifugiert. Nach diesem zweiten Inkubationsschritt wurden von den Ü und den in 40 µl HB resuspendierten P je 10 µl in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und mittels Western-Blot auf die Verteilung von Anx6 geprüft. Die Spuren 1 und 2 zeigen Ü und P einer Probe, die während des zweiten Inkubationsschrittes unbehandelt blieb, jedoch den gleichen Inkubationsbedingungen unterworfen war.

Die Spuren 1 und 2 der unbehandelten Probe zeigen, dass Anx6 vorwiegend membrangebunden vorliegt. Bereits bei einer Konzentration von 0,1 µg Digitonin/µl Probe wird der von Digitonin vermittelte Effekt deutlich, so dass ein Großteil des calciumunabhängig gebundenen Anx6 im Ü zu finden ist (Spur 3). Bei den weiteren Konzentrationssteigerungen von Digitonin konnte nur eine leichte Zunahme dieses Effektes beobachtet werden (Spuren 5-8). Konzentrationen über 0,5 µg Digitonin/µl Probe hatten keine weitere Abnahme der cholesterinabhängigen Membranaffinität von Anx6 zur Folge (Daten nicht gezeigt), so dass in allen folgenden Versuchen mit der Konzentration 0,5 µg Digitonin/µl Probe gearbeitet wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Cholesteringehalt in biologischen Membranen die Membranaffinität eines calciumunabhängig bindenden Pools von Anx6 beeinflusst. Ob dabei dieser calciumunabhängig bindende, cholesterinsensitive Anx6-Pool eine stabile, direkte oder indirekte Interaktion mit Cholesterin in biologischen Membranen eingeht, kann nicht beurteilt werden.

Sobald aber das physiologische Gleichgewicht des Cholesteringehalts in biologischen Membranen mit cholesterinsequestrierenden Agenzien gestört wird, kommt es zu einer deutlichen Abnahme der Membranaffinität von Anx6.

3.2.5 Einfluss von Cholesterin auf die Membranbindung von Annexin 6 an frühen und späten Endosomen

In CHO-Zellen findet sich Anx6 vorwiegend an der PM und in endosomalen Kompartimenten (Grewal, Heeren et al. 2000; Pons, Grewal et al. 2001). Inwieweit die cholesterinabhängige Bindungsaffinität des EDTA-resistenten Pools der Anx6-Proteine Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von Anx6 hat, sollte in folgenden Experimenten an EE und LE untersucht werden. Dafür wurden die Lipidzusammensetzungen von EE und LE bestimmt, die durch die subzelluläre Fraktionierung (s. 2.2.8) gewonnen wurden. Mit Hilfe fluorometrischer Methoden wurden die Cholesterin- und die Phospholipidkonzentrationen in den Lipidkompositionen von LE und EE

bestimmt (s. Abb. 14). Dabei wurde in diesem Ansatz das Gesamtcholesterin (Cholesterinester und freies Cholesterin) bestimmt. Die Bestimmung der PL beruhte auf der Messung von Phosphatidylcholin.

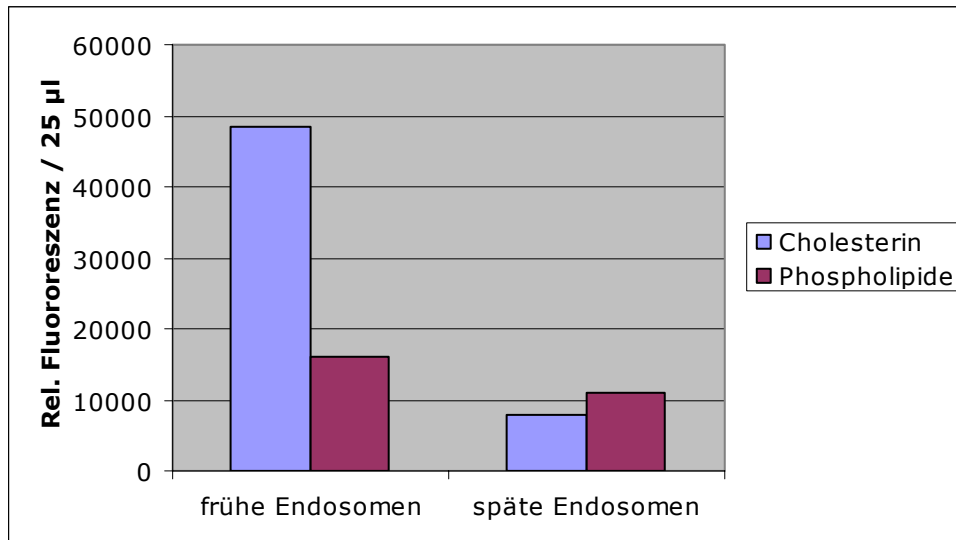


Abb. 14) 25 µl Aliquots einer subzellulären Präparation von EE und LE dienten zur fluorometrischen Bestimmung der PL (Phosphatidylcholin) und des Gesamtcholesterins.

Vergleichbare Mengen von EE und LE wurden gemessen. Im Gegensatz zu den LE beinhalten die EE weitaus mehr Cholesterin. Da dieser Assay keinen Unterschied zwischen freien, luminal vorliegenden und membranassoziierten Lipiden macht, geben die Daten bloß einen Hinweis darauf, dass Cholesterin und PL in EE und LE von CHOanx6-Zellen unterschiedlich verteilt vorliegen. Der hohe Anteil von Cholesterin in EE im Vergleich zu LE deutet darauf hin, dass Unterschiede der Lipidzusammensetzung endosomaler Membranen an der differentiellen Membranaffinität und damit am variierenden Verteilungsmuster von Anx6 beteiligt sein können.

Annexin 6 an Membranen von frühen Endosomen

Deshalb wurden EE aus $4-6 \times 10^7$ CHOanx6-Zellen isoliert und zunächst mit 50 mM EDTA inkubiert. Die weiteren Schritte waren die Zentrifugation und das Resuspendieren der Membranen in HB, um diese nochmals mit EDTA oder Digitonin sowie mit EDTA zusammen mit Digitonin für 30 min bei 4°C zu inkubieren. Die Membranen wurden wiederholt zentrifugiert und die Pellets wieder in HB resuspendiert. Je 10 µl der Ü und P (0,5-2 µg Zellprotein/µl Probe) wurden in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt, um mit der

Western-Blot-Analyse die Verteilung der gebundenen und ungebundenen Fraktionen von Anx6 und Anx2 zu prüfen (s. Abb. 15).

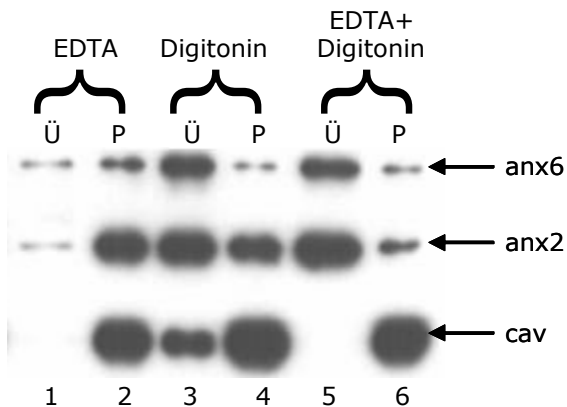


Abb. 15) **Digitonin reduziert die Bindung von EDTA-resistentem Anx6 an EE von CHOanx6-Zellen.** EE wurden aus dem PNS von $4-6 \times 10^7$ CHOanx6-Zellen präpariert (s. 2.2.8). 100 μ l EE wurden mit 50 mM EDTA für 30 min bei 4°C vorbehandelt und anschließend zentrifugiert. Das Membranpellet in HB resuspendiert, aufgeteilt und nochmals mit 50 mM EDTA (Spuren 1 und 2), mit 0,5 μ g Digitonin/ μ l (Spuren 3 und 4) und mit 50 mM EDTA + 0,5 μ g Digitonin/ μ l (Spuren 5 und 6) für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert.

Nach diesem zweiten Inkubationsschritt wurden von den Ü und den in HB resuspendierten P je 10 μ l in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und im Western-Blot auf die Verteilung von Anx6 und Anx2 geprüft.

Wie bereits an postnukleären Membranen gezeigt (s. 3.2.4), vermittelt Digitonin die Abnahme der Bindungsaffinität sowohl eines EDTA-resistenten, calciumunabhängig bindenden Anx2-Pools als auch eines EDTA-resistenten, calciumunabhängig bindenden Anx6-Pools an Membranen von EE (de Diego, Schwartz et al. 2002). Die zweite Inkubation mit EDTA bestätigt die Existenz von EDTA-resistentem Anx2 und Anx6 (A: Spur 2). Die Behandlung mit Digitonin reduzierte die Membranbindung von über 80% des EDTA-resistenten Anx6 an EE (A: Spuren 3 und 4 verglichen mit den Spuren 1 und 2). Der calciumunabhängig bindende Anx2-Pool wird durch die einfache Behandlung mit Digitonin um mehr als die Hälfte von endosomalen Membranen gelöst (A: Spuren 3 und 4). Um den Hauptteil des EDTA-resistenten Anx2 zu lösen, bedurfte es der gleichzeitigen Behandlung von EDTA und Digitonin und zeigt damit wieder den kooperativen Effekt an (A: Spuren 5 und 6 verglichen mit den Spuren 3 und 4), der bereits an Membranen des postnukleären Überstandes für das calciumunabhängig bindende Anx2 zu sehen war (Abb. 3.2.6 Spuren 7 und 8). Die gleichzeitige Inkubation mit EDTA und Digitonin hatte keine weiteren Konsequenzen auf die Membranbindung von Anx6 (A: Spuren 5 und 6) und zeigt keinen kooperativen Effekt für Anx6. Caveolin blieb durch die Behandlung mit EDTA oder Digitonin unbeeinflusst.

Damit wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass ein EDTA-resistenter und in seiner Bindungsart cholesterinsensitiver Anx6-Pool an EE von CHO-Zellen bindet. Dadurch wird deutlich, dass neben der calciumabhängigen Membranbindung von Anx6 auch die calciumunabhängige und

cholesterinsensitive Bindung von Anx6-Proteinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation nimmt.

Annexin 6 an Membranen von späten Endosomen

Aufgrund der geringen Mengen an LE, die sich mit der subzellulären Fraktionierung gewinnen liessen, wurden vier endosomale Fraktionen von je $6-8 \times 10^7$ CHOanx6-Zellen gepoolt und zunächst mit 50 mM EDTA für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Membranen wurden pelletiert, in HB resuspendiert und nochmals mit EDTA oder mit Digitonin für 30 min bei 4°C inkubiert, zentrifugiert und die P wieder in HB resuspendiert. Je 10 μ l der Ü und P wurden in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt, um mit der Western-Blot-Analyse die Verteilung der gebundenen und ungebundenen Fraktionen von Anx6 und Anx2 zu prüfen (s. Abb. 16).

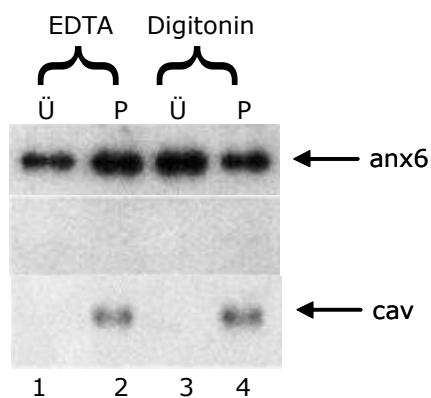


Abb. 16) **Digitonin reduziert die Bindung von EDTA-resistentem Anx6 an LE von CHOanx6-Zellen.** LE wurden aus dem PNS von $2-3 \times 10^8$ CHOanx6-Zellen präpariert (s. 2.2.8). 100 μ l LE wurden mit 50 mM EDTA für 30 min bei 4°C vorbehandelt und anschließend zentrifugiert. Das Membranpellet wurde in HB resuspendiert, aufgeteilt und nochmals mit 50 mM EDTA (Spuren 1 und 2), mit 0,5 μ g Digitonin/ μ l (Spuren 3 und 4) für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Nach diesem zweiten Inkubationsschritt wurden von den Ü und den in HB resuspendierten P je 10 μ l in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und im Western-Blot auf die Verteilung von Anx6 und Anx2 geprüft.

Die von Digitonin vermittelte Sequestration von Cholesterin reduzierte die Membranaffinität des calciumunabhängig bindenden Anx6 signifikant und repräsentierte 40-50% des membrangebundenen und EDTA-resistenten Anx6 (Vergleich von Spur 1 und 3). Anx2 wurde nicht detektiert und entspricht damit der bekannten intrazellulären Lokalisation von Anx2, dass dieses Annexinprotein nicht an LE bindet.

Auch hier wird zum ersten Mal nachgewiesen, dass Verteilung und Gehalt an Cholesterin in Membranen von LE die Bindungsaffinität des EDTA-resistenten Anx6 zu Membranen des zweiten biologischen Kompartiment beeinflussen (de Diego, Schwartz et al. 2002). Dieses cholesterinabhängige Bindungsverhalten von Anx6 an Membranen von LE erscheint umso interessanter, da Vorarbeiten der AG Grewal zeigten, dass es 2 h nach der Inkubation von CHO-Zellen mit

LDL zur Translokation freier Anx6-Proteine an Membranen von LE kommt (s. Diskussion; Grewal, Heeren et al. 2000).

3.2.6 Einfluss von Digitonin auf die Membranbindung von Annexin 6 in vivo

Nachdem in einem in-vitro-Ansatz gezeigt werden konnte, dass die Membranbindung von Anx6 durch den Entzug von Cholesterin aus den Membranen gesenkt werden kann (s. 3.2.4), sollte überprüft werden, ob Digitonin einen generellen Einfluss auf die Membranaffinität von Anx6 in Zellen besitzt. Dazu wurden CHOanx6-Zellen 20 h mit Digitoninkonzentrationen von 0,5 – 4 µg/ml Nährmedium inkubiert. Nach Herstellung des PNS und Zentrifugation wurden von den unbehandelten Ü und P je 10 µl auf einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und mittels Western-Blot auf die Verteilung von Anx2, Anx6 und Caveolin untersucht (Abb. 17).

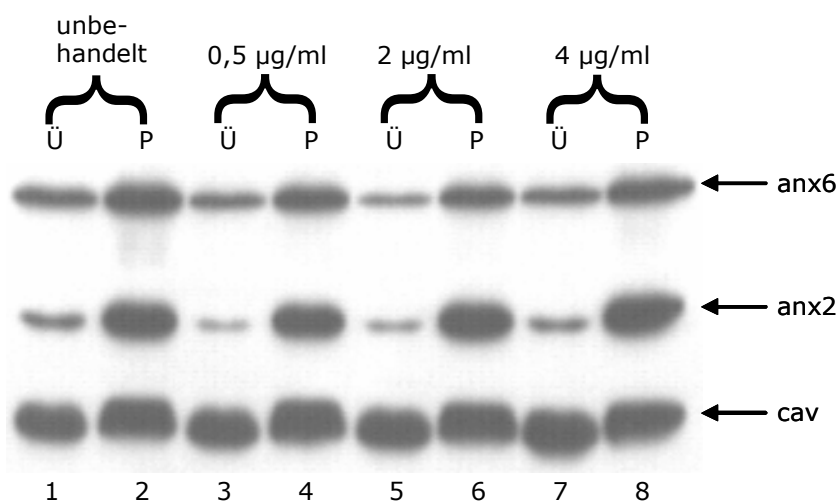


Abb. 17) **Einfluss von Digitonin auf die Bindung von Anx6 an Membranen aus Zellen, die mit Digitonin im Nährmedium für 20 h inkubiert wurden.** Je $4-6 \times 10^7$ CHOanx6-Zellen wurden 20 h ohne Digitonin (Spuren 1 und 2), mit 0,5 µg/ml (Spuren 3 und 4), mit 2 µg/ml (Spuren 5 und 6) und 4 µg/ml (Spuren 7

und 8) im Medium inkubiert. Das PNS wurde hergestellt, zentrifugiert und von Ü und resuspendierten P je 10 µl unbehandelt auf einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt. Mittels Western-Blot wurde die Verteilung von Anx2, Anx6 und Caveolin untersucht.

Betrachtet man die jeweils zueinander gehörenden Ü und P (Spuren 1 und 2, 3 und 4, 5 und 6, 7 und 8), so zeigt sich, dass auch mit zunehmender Digitoninkonzentration weder Anx6 (60-70% in Membranbindung) noch Anx2 (80% in Membranbindung) an Bindungsaffinität verlieren. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass in diesem Experiment sämtliche Annexin-pools betrachtet wurden, also sowohl die calciumabhängigen als auch die calcium-unabhängigen, da keine Behandlung mit EDTA erfolgte. Da der calcium-unabhängige Pool an Anx6 nur ca. 10% aller zellulären Anx6-Moleküle

ausmacht (Ergebnis aus Experimenten der AG Grewal; de Diego et al. 2002), ist eine Beurteilung dieses Pools in diesem Experiment nicht ohne Weiteres möglich.

3.2.7 Zusammenfassung der von Filipin und Digitonin vermittelten Effekte auf das Bindungsverhalten von Annexin 6

Versuchsansätze, in denen alle Anx6-Proteine in der Anwesenheit von Calcium mittels Filipin oder Digitonin auf eine cholesterinabhängige Membranbindung analysiert wurden, zeigten keinen Einfluss auf die Membranbindung von Anx6 (Vergleich von 3.2.3 zu 3.2.1). Dabei führten Analysen in CHOwt- und CHOanx6-Zellen zu gleichen Ergebnissen (Abb. 7 und 11).

Bindungsstudien zu Anx2 führten zur Identifikation eines EGTA-resistenten, calciumunabhängig membrangebundenen Anx2-Pools, der durch cholesterin-sequestrierende Agenzien wie Digitonin und Filipin freigesetzt wurde (Harder, Kellner et al. 1997; König and Gerke 2000). Da sich somit Anx2 als Kontrolle für ein cholesterinbeeinflusstes Bindungsverhalten eignet, wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass auch in CHO-Zellen ein EDTA-resistenter und damit calciumunabhängig membranbindender Anx2-Pool existiert, der sich sensitiv gegenüber Verteilung und Gehalt an Cholesterin in Membranen zeigt. Aus den Ergebnissen unter 3.2.1 und 3.2.3, die nach der EDTA-Inkubation von PNS membrangebunden verbliebene Anx6-Proteine zeigten, und den Beobachtungen zu Anx2 wurde die Hypothese aufgestellt, dass es einen EDTA-resistent bindenden Anteil von Anx6 gibt. Durch eine EDTA-Vorbehandlung ließ sich erstmalig ein EDTA-resistenter Anx6-Pool in CHO-Zellen identifizieren, der calciumunabhängig membrangebunden bleibt. Mittels Filipin oder Digitonin lässt sich die Membranaffinität dieses calciumunabhängig bindenden Anx6-Pools senken. Diese Abnahme in der Membranaffinität von calciumunabhängig bindendem Anx6 ließ sich durch Digitonin im Vergleich zu Filipin sehr deutlich darstellen (Abb. 12).

Ein solches cholesterinsensitives Bindungsverhalten calciumunabhängig membranassoziierter Anx6-Moleküle ließ sich auch an Membranen von EE und LE nachweisen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Cholesterin ein zusätzlicher Modulator im Bindungsverhalten und der intrazellulären Verteilung von Anx6 ist.

3.3 Etablierung einer GFP-Anx6-exprimierenden CHO-Zelllinie zur Analyse der Membranaffinität von Annexin 6

Bisher waren Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisierung und Verteilung von Annexinen weitgehend auf die subzelluläre Fraktionierung und immunhistochemische Analyse fixierter Zellen begrenzt. Für eine Reihe von Annexinproteinen wurden mittlerweile Zellsysteme beschrieben, in denen die intrazelluläre Verteilung der Annexine mittels einer Proteinchimäre untersucht wurde. Die Proteinchimäre ging aus der Fusion des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) und des Annexinproteins hervor (Hayes, Rescher, Gerke and Moss 2004). Der calciumunabhängig bindende Anx6-Pool, der cholesterinabhängig an endosomale Membranen bindet, sowie die LDL-induzierte Translokation von Anx6 an LE (Grewal, Heeren et al. 2000) deuten auf dynamische Veränderungen in der Lokalisierung von Anx6 hin und waren Anlass, das intrazelluläre Bindungs- und Verteilungsmuster in Lebendzellen zu analysieren. Dazu sollten zwei stabile Zelllinien etabliert werden, die das grün fluoreszierende Protein (GFP) fusioniert mit Anx2 und Anx6 exprimieren (GFP-Anx2 und GFP-Anx6). Mit diesen Fusionsproteinen lässt sich das intrazelluläre Lokalisations- und Bindungsmuster mit Hilfe der Lebendzellmikroskopie untersuchen. In Kontrollexperimenten sollten zusätzlich im Rahmen dieser Arbeit mittels biochemischer Analysen die Fusionsproteine GFP-Anx2 und GFP-Anx6 mit den endogenen Anx2- und Anx6-Proteinen verglichen werden.

Das GFP ist ein 27 kDa monomerisches Protein, welches aus 238 Aminosäuren besteht. Es wurde aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert und emittiert grünes Licht mit einem Emissionsmaximum von 509 nm, wenn es mit blauen Licht oder UV-Licht angeregt wird (Absorptionsmaximum 395 nm).

Durch Vorarbeiten der AG Grewal wurden DNA-Plasmide erstellt, die Anx6 sowie Anx2 fusioniert mit dem GFP (GFP-Anx6 und GFP-Anx2) enthielten. Je $2-3 \times 10^5$ CHOwt-Zellen wurden mit 1 µg DNA unter Hilfe des Fugene6 Transfection Reagenz transfiziert und anschließend in Kulturflaschen bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert (s. 2.2.4). 24 h nach der Transfektion erfolgte ein Nährmediumwechsel. Mit Hilfe des neuen Kulturmediums, das G418 in der Konzentration 1 mg/ml Medium enthielt, wurden die transfizierten Zellen selektioniert. Nach ausreichendem Zellwachstum wurden isolierte G418-resistente Zelllinien auf die Expression der Proteine GFP-Anx2 und GFP-Anx6 überprüft. Zelllysate wurden mit einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und

mit dem Western-Blot analysiert. Die isolierten Zellklone zeigten eine Expression von GFP-Anx2 und GFP-Anx6, welche durch die Fusion mit GFP ein verändertes Molekulargewicht aufweisen (63 kDa für GFP-Anx2 und 95 kDa für GFP-Anx6, s. Abb. 18 und 19).

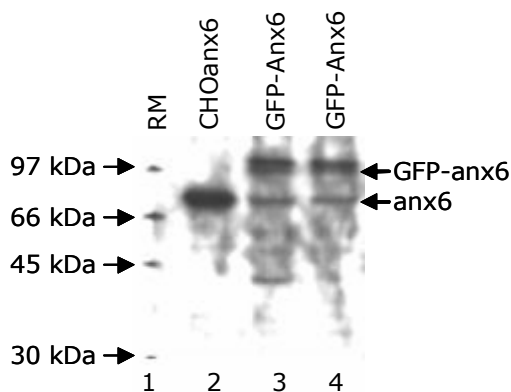


Abb. 18) **Überprüfung von CHOwt-Zellen auf die Expression des Proteins GFP-Anx6.** $2-3 \times 10^5$ CHOwt-Zellen wurden mit Hilfe eines Plasmids mit dem Fusionsprotein GFP-Anx6 (95 kDa) transfiziert. Zur Überprüfung der Proteinexpression erfolgte die Extrahierung aller Membranproteine (s. 2.2.5), die in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und mit der Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit von GFP-Anx6 überprüft wurden. Spur 1 zeigt zur Kontrolle der Molekulargewichtsgrößen den Rainbow-Marker (RM).

Spur 2 zeigt das Proteinextrakt von CHOanx6-Zellen, und die Spuren 3 und 4 repräsentieren Extrakte von GFP-Anx6-transfizierten CHO-Zellen, die unabhängig voneinander erstellt wurden.

Die Spuren 2 bis 4 zeigen die Expression des 68 kDa großen Anx6. Deutlich ist die Überexpression von Anx6 in Spur 2 zu sehen. Weiterhin zeigen die Spuren 3 und 4 klar abtrennbare Banden, die mit anti-Anx6-Antikörper detektiert wurden, bei 97 kDa liegen und GFP-Anx6 darstellen.

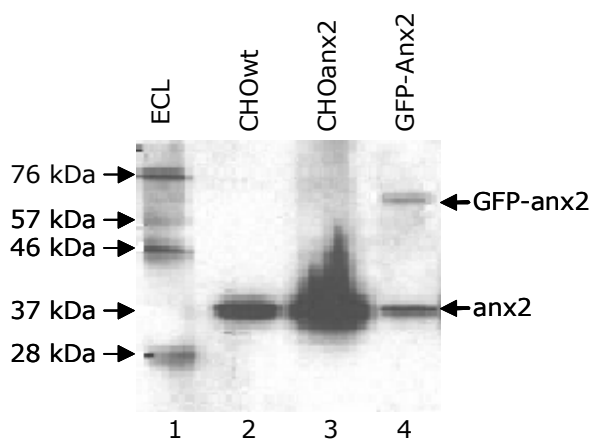


Abb. 19) **Überprüfung von CHOwt-Zellen auf die Expression des Proteins GFP-Anx2.** $2-3 \times 10^5$ CHOwt-Zellen wurden mit Hilfe eines Plasmids mit dem Fusionsprotein GFP-Anx2 (63 kDa) transfiziert. Zur Überprüfung der Proteinexpression erfolgte die Extrahierung aller Membranproteine (s. 2.2.5), die in einer 12,5%igen SDS-Page aufgetrennt und mit der Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit von GFP-Anx2 überprüft wurden. Spur 1 zeigt zur Kontrolle

der Molekulargewichtsgrößen den ECL-Marker. Spur 2 zeigt das Proteinextrakt von CHOwt-Zellen, Spur 3 Anx2-überexprimierender Zellen (CHOanx2-Zellen); Spur 4 repräsentiert das Extrakt von GFP-Anx2-transfizierten CHO Zellen.

Ebenso zeigte ein weiterer G418-resistenter Zellklon neben der Expression von endogenem Anx2 (36 kDa) eine weitere Bande, die zwischen den Größen 57 kDa und 76 kDa liegt. Berücksichtigt man dabei das Molekulargewicht von GFP-Anx2 (63 kDa), so ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Bande exprimiertes GFP-Anx2 darstellt.

3.3.1 GFP-Anx6 bindet an endosomale Membranen

Da das Bindungsverhalten von Anx2 und Anx6 an endosomale Membranen gut beschrieben ist, soll nun die intrazelluläre Verteilung von GFP-Anx2 und GFP-Anx6 an Membranen des endosomalen Kompartiments untersucht werden. Deshalb wurden aus GFP-Anx2- und GFP-Anx6-exprimierenden CHO-Zellen (CHOanx2-GFP- und CHOanx6-GFP-Zellen) EE und LE isoliert und nach der 12,5%igen SDS-Page mittels Western-Blot auf die Anwesenheit von GFP-Anx2 und GFP-Anx6 überprüft (s. Abb. 20).

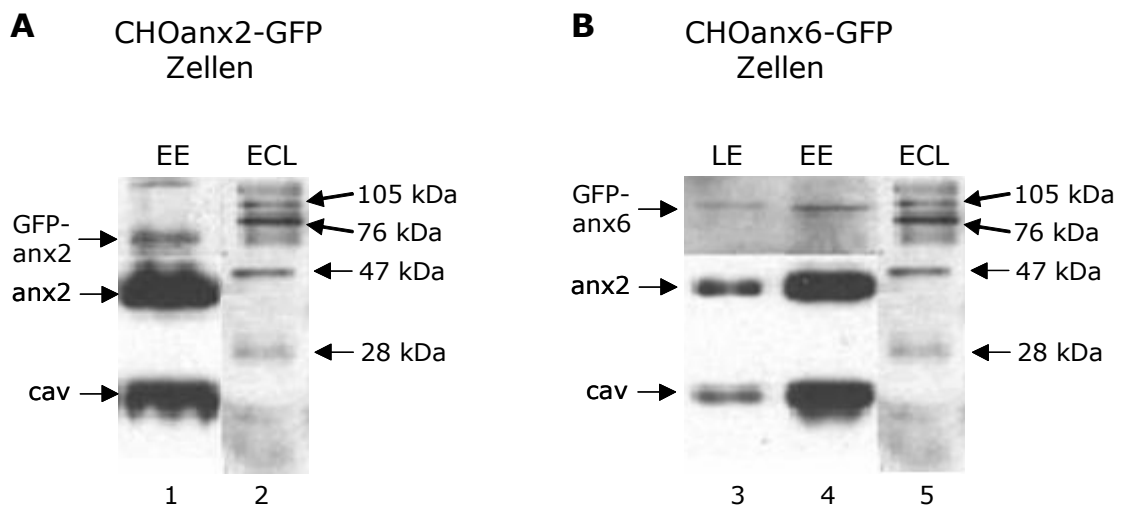


Abb. 20) **Membranbindung der Proteine GFP-Anx2 und GFP-Anx6 an endosomale Membranen.** EE und LE wurden aus dem PNS von $4-6 \times 10^7$ CHOanx2-GFP-Zellen (A) und CHOanx6-GFP-Zellen (B) präpariert.

A Spur 1 zeigt EE von CHOanx2-GFP-Zellen, die auf das Protein GFP-Anx2 mit einer 12,5%igen SDS-Page und der Western-Blot-Analyse überprüft wurden.

B Spur 3 zeigt LE, Spur 4 EE von CHOanx6-GFP-Zellen, die auf das Protein GFP-Anx6 mit einer 12,5%igen SDS-Page und der Western-Blot-Analyse überprüft wurden.

Spur 2 und 5 zeigen den ECL-Marker zum Vergleich der Molekulargewichte.

Abschnitt A der Abbildung zeigt GFP-Anx2 an EE (Spur 1). Deutlich wird, dass GFP-Anx2 auf einem weit niedrigeren intrazellulären Level detektiert wird als Anx2, jedoch als Marker für EE in einem ausreichenden Maße, um mit der Lebendzellmikroskopie die intrazelluläre Verteilung zu studieren. Gleiches gilt für GFP-Anx6, um dessen Membranbindung an LE und EE (Abschnitt B Spur 3 und 4) sowie seine intrazelluläre Verteilung in der Lebendzellmikroskopie zu untersuchen.

Zu den mit Hilfe der SDS-Page und Western-Blot ermittelten Signalen, die GFP-Anx2 und GFP-Anx6 repräsentieren, sei angemerkt, dass sie nur wenige Rückschlüsse auf das zelluläre Expressionslevel dieser Proteine zulassen. Ein

ungünstiges Falten der Fusionsproteine kann trotz der Behandlung der Proteine mit 2-Mercaptoethanol für die SDS-Page nicht ausgeschlossen werden und später in der ECL-Immunodetektion bzw. in der Autoradiographie zu schwächeren Signalen führen. Außerdem kann durch die Fusion selbst ein Teil des Proteins derart blockiert sein, das die Identifikation der Fusionsproteine mit den Antikörpern in der ECL-Immunodetektion gemindert ist und es somit zu schwächeren Signalen in der Autoradiographie kommt.

Zusammengefasst zeigen GFP-Anx2 und GFP-Anx6 ein vergleichbares biochemisches Verhalten wie Anx2 und Anx6 und können zum Studium der intrazellulären Verteilung beider Proteine eingesetzt werden.

4. Diskussion

4.1 Calcium- und cholesterinabhängiges Bindungsverhalten von Annexinen

4.1.1 Calciumabhängige Bindung von Annexinen

Annexine werden in allen Zelltypen exprimiert und sind an einer Vielzahl physiologischer Abläufe beteiligt. Dabei zeigen alle Annexine je nach Zelltyp unterschiedliche intrazelluläre Verteilungsmuster. Diese variierenden Lokalisationen deuten auf dynamische Veränderungen in der Membranbindung der Annexine hin. Die reversible Membranassoziation der Annexine ist eng mit der Rolle der Annexine in Prozessen des Membranverkehrs verknüpft. Dies spiegelt sich auch an der Lokalisation und Funktion von Anx6 wieder. Anx6 findet sich in den meisten bisher untersuchten Zelltypen sowohl im Zytosol als auch an der Plasmamembran (Tagoe et al. 1994; Weinman et al. 1994; Bandorowicz et al. 1992; Lavalie et al. 2000) sowie an dem endosomalen Kompartiment von Zellen (Desjardins, et al. 1994; Pons et al. 2000; Pons et al. 2001; Jackle et al. 1994; Ortega et al. 1998; Grewal et al. 2000). Grundlage für die reversible Assoziation von Annexinproteinen mit Membranen ist deren calciumabhängige Bindung an negativ geladene PL. Jedoch zeigen neuere Arbeiten, dass nicht nur Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration, sondern auch die Lipidkomposition intrazellulärer Organellen und Proteinfaktoren, die sich an der Ausbildung spezifischer Membransubdomänen beteiligen, an einer dynamischen Umverteilung von Annexinen zwischen subzellulären Kompartimenten beteiligt sein können. Annexine binden mit absteigender Affinität an Phosphatidylsäure, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol. Einige Annexine binden aber auch an neutrale PL wie Phosphatidylethanolamin, jedoch nicht an Phosphatidylcholin oder Sphingomyelin (Raynal and Pollard 1994). Die Calcium- und Phospholipidbindung der Annexine wird durch die konservierte Kerndomäne mit ihren Calciumbindungsstellen vom Typ II und Typ III vermittelt. Das gebundene Calcium dient dabei als Brückenbaustein bei der Interaktion von Annexinen mit den Kopfgruppen der PL (Weng, Luecke et al. 1993). Durch Entzug des Calciums lösen sich Annexine von PL in Membranen und können nach einer weiteren Induktion mit Calcium wieder an die gleichen oder an andere Membranen binden. Dabei ist zu beachten, dass Annexine nicht an alle intrazellulären Membranen binden. So ist eine

Lokalisation von Anx6 bisher nicht am ER oder TGN gefunden worden. Dies deutet darauf hin, dass die Dynamik und Funktion eines jeden Mitglieds der Annexinfamilie auf bestimmte zelluläre Kompartimente beschränkt ist.

Da Anx6 vor allem im endosomalen System lokalisiert ist und funktionelle Studien der AG Grewal eine Translokation von Anx6 in späte endosomale Kompartimente während der Internalisierung von LDL nachwiesen, sollte in dieser Arbeit das calciumabhängige Bindungsverhalten von Anx6 an endosomale Membranen genauer studiert werden. Zur Etablierung des experimentellen Systems und zur Analyse der generellen Bindungsaffinität von Anx6 wurden im ersten Teil dieser Arbeit zunächst postnukleäre Membranen, die sowohl PM und endosomale Membranen als auch Membranen anderer Kompartimente enthalten, untersucht. In diesen Experimenten wurde durch den Entzug von Calcium mittels EDTA sowohl für Anx6 als auch für Anx2, einem weiteren Mitglied der Annexinfamilie, das vorwiegend an der PM und in EE lokalisiert ist, die calciumabhängige Bindungsaffinität gezeigt (s. 3.1). Anx6 zeigte dabei eine höhere Calciumsensitivität als Anx2, da die Inkubation Anx6-haltiger Membranen mit EDTA zu einer 80%igen Freisetzung von Anx6 aus der Membranbindung führte. Im Vergleich dazu blieben nach der Behandlung mit EDTA noch 50% des Anx2 membrangebunden. Die Reversibilität dieser calciumabhängigen Bindungsart durch Gabe von Calcium zu EDTA-vorbehandelten Proben konnte durch die AG Gerke eindrucksvoll bestätigt werden. Dabei bindet Anx2 calciumabhängig und reversibel in zahlreichen in-vitro-Untersuchungen an Membranen mit variierenden Lipidkompositionen. Durch die Titration der Calciumkonzentration bei konstanten Anx2-Konzentrationen wurde die Reversibilität mittels Adsorption- und Desorptionkurven gezeigt. Diese Ergebnisse bestätigten frühere Untersuchungen und weisen nochmals deutlich auf das Vorhandensein zweier Anx2-Pools hin, die sich in der Membranbindung unterscheiden. Das Verhältnis beider Anx2-Pools ist sowohl von dem Gehalt an Phosphatidylserin und Cholesterin in der Membran als auch von der Calciumkonzentration abhängig (Ross, Gerke and Steinem 2003). Die Arbeiten in Ross et al. bestätigen somit die hier vorgestellten Daten. Eine Steigerung der Membranaffinität von Anx6 und Anx2 durch die zusätzliche Gabe von Calcium in unbehandelten Proben konnten wir nicht nachweisen. Dies ist wahrscheinlich auf eine Sättigung der Phospholipidschicht mit Annexinen zurückzuführen.

Die Analyse postnukleärer Membranen erlaubte nur bedingt Rückschlüsse auf das Membranbindungsverhalten von Anx2 und Anx6 an die PM und an endosomale Membranen. Diese Membranen können kompartimentspezifische Lipidkompositionen aufweisen, die unterschiedliche Bindungsaffinitäten für Anx2 und Anx6 zur Folge haben. In Vorarbeiten der AG Grewal zeigte jedoch das rekombinante GST-Annexin-6-Fusionsprotein (GST-Anx6) ein calcium-induzierbares Bindungsverhalten zu Membranen von frühen und späten Endosomen sowie 'schweren' Membranen (PM-Trümmer), die aus LDL-beladenen CHO-Zellen gewonnen wurden. Dieses Bindungsverhalten ähnelt dem des endogen und stabil transfizierten Anx6 in CHOwt- und CHOanx6-Zellen. Dabei ließ sich eine mit Calcium schwach induzierbare Bindung von GST-Anx6 an 'schwere' Membranen und EE nachweisen. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation von GST-Anx6 mit LDL-Cholesterin beladenen LE bei 50 μM CaCl_2 zu einer starken Membranbindung von GST-Anx6. Dies deutet darauf hin, dass die intrazelluläre Prozessierung von LDL im Lumen von LE die calciuminduzierbare Interaktion von Anx6 mit Vesikeln des spät-endozytotischen Kompartiment verstärkt (Grewal, Heeren et al. 2000). Dieses Beispiel veranschaulicht deutlich die intrazelluläre Dynamik und die spezifische subzelluläre Lokalisation von Anx6. Obwohl PL in sämtlichen biologischen Membranen vorkommen, ist Anx6 nicht gleichmäßig über die ganze Zelle verteilt. So wurde in zahlreichen Bindungsstudien bisher kein Anx6 an Membranen des ER und des TGN gefunden (s. 1.4.2). Damit kann die calciumabhängige Bindung von Anx6 an PL nicht als alleiniger Regulationsmechanismus angenommen werden (Babiychuk and Draeger 2000).

Die Existenz calciumunabhängiger Mechanismen, die eine Membranbindung von Anx6 stimulieren können, wird durch Arbeiten an Anx2 bestärkt. So wurde für Anx2 neben der calciumabhängigen Bindung eine cholesterinabhängige, calciumunabhängige Bindung beschrieben (Harder et al. 1997; Jost et al. 1997; König and Gerke 2000; Ayala-Sanmartin et al. 2001; Ayala-Sanmartin 2001). Ayala-Sanmartin beobachtete zudem für Anx5 eine cholesterinabhängige Steigerung der calciumabhängigen Membranbindung zu PL (Ayala-Sanmartin 2001). Dies deutet darauf hin, dass neben PL auch andere Lipide wie Cholesterin einen Einfluss auf die Lokalisation von Annexinen haben. Der in dieser Arbeit identifizierte calciumunabhängig membranbindende Anx6-Pool,

der in seiner Bindungsart cholesterinsensitiv ist, bestätigt diese Hypothese (s. 3.2.2 und 3.2.4).

Als weiterer Regulationsmechanismus wurde zusätzlich eine ph-abhängige, calciumunabhängige Membranbindung beschrieben, die jedoch bisher nur an artifiziellen Liposomenmembranen beobachtet wurde (Ayala-Sanmartin 2001; Golczak, Kicinska et al. 2001; Golczak, Kirilenko et al. 2001). Eine Steigerung der Anx6-Bindungsaffinität an Liposomen im sauren ph-Bereich (halbmaximale Bindung bei einem ph-Wert 5,3) bedurfte keiner spezifischen Lipidkomposition. Arbeiten von Golczak et al. deuten an, dass Anx6 in diesem sauren ph-Bereich (ph 4,6) in Membranen integriert vorkommt und hier Ionenkanäle auszubilden vermag. Die ph-induzierten Konformationsänderungen von Anx6 führen anscheinend zu hydrophobischen Moleküleigenschaften, die eine Integration von Anx6 in die Membran ermöglichen (Golczak, Kicinska et al. 2001). Da diese Arbeiten jedoch lediglich mit aufgereinigtem Anx6 und Liposomen durchgeführt wurden, ist die ph-abhängige Bindungsaffinität vermutlich von eingeschränkter physiologischer Relevanz. Darüber hinaus stellt sich auch die Frage, in welchen biologischen Kompartimenten ein ph 4,5 - 5,5 auftritt. Im Lumen der LE beträgt der ph 6, Lysosomen stellen ein membranumgebenes Organell mit einem luminalen ph von 5-5,5 dar.

Lysosomen stellen keine Hauptlokalisierung für Anx6 dar. Es wurde jedoch in einigen Zelltypen überwiegend mit sauren prälysosomalen Strukturen von polarisierten wie auch unpolarisierten Zellen assoziiert gefunden (Pons et al. 2000; Pons et al. 2001).

Außerdem konnten zwei KFERQ-artige Pentapeptidsequenzen, die vermutlich zytosolische Proteine dem chaperonvermittelten lysosomalen Abbauweg zuführen (Dice 1990), innerhalb von Anx6 identifiziert werden (Positionen 81-85 Repeat 1 und Positionen 564-568 in Repeat 7) (Cuervo et al. 2000). Anhand von Beobachtungen an dem Protein ARF1 (ADP-ribosylation factor 1) könnten diese Signalsequenzen dafür verantwortlich sein, dass Anx6 in einigen Zellen bevorzugt an LE bindet (Gu and Gruenberg 2000). Da diese KFERQ-Sequenzen in alpha-helikalen Regionen lokalisiert sind, die in der Kerndomäne verborgen sind, muss Anx6 bis zu einem gewissen Grad entfaltet werden, damit es mit hsc73 (heat shock cognate protein, 73 kDa), dem Chaperon, das für den Transport von Anx6 im Anx6/hsc73-Komplex zu LE verantwortlich ist, interagieren kann (Avila-Sakar et al. 1998; Zanotti et al. 1998). Einen

möglichen Erklärungsansatz liefern dafür die Beobachtungen von Golczak und Mitarbeitern. Zudem wurde Anx6 im Ganzen und fragmentiert im Lumen von LE gefunden (Cuervo et al. 2000). Solche fragmentierten Formen von Annexinen können unter anderem durch proteolytische Spaltung entstehen (Liu et al. 1995; Vishwanatha et al. 1998; Movitz et al. 1999) und sind aus unbekanntem Gründen gegenüber einer vollständigen Proteolyse resistent. Ob eine limitierte Proteolyse von Annexinen im lysosomalen Lumen stattfindet und daraus funktionell aktive Annexinfragmente entstehen, wird in weiteren Untersuchungen zu klären sein. Dabei sind die mögliche pH-abhängige Bindungsaffinität von Anx6 an biologische Membranen mit ihren variierenden Lipidkompositionen und der Einfluss auf das spezifische intrazelluläre Verteilungsmuster von Anx6 zu klären.

4.1.2 Cholesterinabhängige Bindung von Annexin 6 an Membranen

Die Mechanismen, die zu der spezifischen Verteilung (s. 1.4.4) von Anx6 in der Zelle führen, sind kaum erforscht. Als Mitglied der Annexinfamilie bindet Anx6 calciumabhängig an anionische PL. Endosomen sind im Vergleich zur PM reich an Sphingomyelin und Phosphatidylserin (Urade et al. 1988). Letzteres würde die Bindung von Annexinen generell unterstützen, jedoch binden nur wenige Annexine selektiv an endosomale Membranen. Ebenso bindet Anx6 auch nicht an alle Membranen, die Phosphatidylserin enthalten.

Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen zeigten, dass neben der calciumabhängigen Membranbindung von Annexinen auch Cholesterin in Membranen ein zusätzlicher Modulator im Bindungsverhalten und der intrazellulären Verteilung von Annexinen sein kann (Konig and Gerke 2000; Ayala-Sanmartin 2001). Arbeiten der AG Grewal ergaben, dass eine Überexprimierung von Anx6 gemeinsam mit einer LDL-Rezeptorüberexprimierung zu einer gesteigerten Aufnahme von LDL und einer vermehrten Bindung und Translokation von Anx6 an Membranen des prälysosomalen Kompartiments führt (Grewal, Heeren et al. 2000). Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass es einen calciumunabhängig bindenden Anteil von Anx6 geben kann. Diese Hypothese konnte in dieser Arbeit an postnukleären Membranen von CHO-Zellen bestätigt werden, die zweimal mit EDTA behandelt wurden und zur Identifikation eines EDTA-resistenten, calciumunabhängig membranbindenden Anx6-Pools führten (s. 3.2.1 und 3.2.3). Dass Cholesterin hier ein zusätzlicher Modulator im

Bindungsverhalten für Anx6 ist, bestätigte sich durch die Behandlung des calciumunabhängig membranbindenden Anx6-Pools mit cholesterin-sequestrierenden Agenzien wie Digitonin (s. 3.2.4).

In Folgeexperimenten sollte der Einfluss des calciumunabhängigen Bindungsverhaltens von Anx6 auf seine intrazelluläre Verteilung untersucht werden. Dabei ist Anx6 vor allem an der PM, im Zytosol und an endosomalen Membranen zu finden (s. 1.4.4). Bereits oben erwähnt ist die durch LDL-induzierte Translokation von Anx6 an Membranen von LE (Grewal, Heeren et al. 2000). Mit Ausnahme von NRK- und WIF-B-Zellen (Pons et al. 2001) findet sich nur wenig Anx6 im spät-endosomalen Kompartiment ruhender Zellen. Es ist unwahrscheinlich, dass die LDL-vermittelte Translokation von Anx6 an Membranen aus LE durch eine transiente Induktion der Calciumkonzentration vermittelt wird. Da die veränderte Lokalisation von Anx6 erst nach 120 min der Inkubation mit LDL und konsekutiver Akkumulation von LDL im prälysosomalen Kompartiment nachgewiesen werden konnte, gehen wir von einer permanenten und stabilen Translokation aus. Somit müssen andere Faktoren die Translokation von Anx6 erklären. Diese Beobachtung könnte sich durch die Akkumulation von LDL-Cholesterin in LE erklären und korreliert mit dem cholesterinsensitiven, calciumunabhängigen Bindungsverhalten von Anx6 an Membranen von EE und LE (s. 3.2.5). Der Nachweis an endosomalen Membranen, dass Cholesterin die Membranbindung von Anx6 beeinflusst, erfolgte durch den Entzug von Cholesterin aus diesen Membranen mittels Digitonin. Die Abhängigkeit zwischen dem Cholesterinanteil in der Membran und der Bindungsaffinität von Anx6 sollte dazu führen, dass die Erhöhung des Cholesterinanteils in der Membran zu einer Steigerung der Membranaffinität von Anx6 führt. Ayala-Sanmartin zeigte bereits eine Steigerung der Membranaffinität von exogen zugeführtem Anx6 an artifiziellen phospholipidhaltigen Vesikeln, deren Membrangehalt an Cholesterin erhöht wurde (Ayala-Sanmartin 2001). In Folgeexperimenten gelang der AG Grewal die Etablierung eines Systems, das mit 3 β -(2Diethylaminoethoxy)-androst-5-en-17-on (im Folgenden U18666A genannt) zu einer Akkumulation von Cholesterin in LE und Lysosomen führte (Liscum and Faust 1989). Mit Hilfe dieses Systems konnte der stimulierende Einfluss von Cholesterin auf die Bindungsaffinität von Anx6 an spät-endosomale Membranen genauer untersucht werden. Die in-vivo-Inkubation von CHOWt- und CHOanx6-Zellen

mit U18666A führte zu einer 50%igen Steigerung des zellulären Cholesteringehalts. Nach der subzellulären Fraktionierung von U18666A-behandelten CHOwt-Zellen und CHOanx6-Zellen konnte an EE und LE gezeigt werden, dass es dabei ausschließlich zu einem signifikanten Anstieg von Cholesterin in LE, jedoch nicht in EE im Vergleich zu unbehandelten CHO-Zellen kommt (de Diego, Schwartz et al. 2002). Dies konnte in der Fluoreszenzmikroskopie mittels verstärkter Filipinfärbung und Kolo-kalisation mit spät-endosomalen Markern bestätigt werden. Mit diesem Phänotyp ähneln diese CHO-Zellen den NPC-Fibroblasten und Tangier-Fibroblasten (s. 1.3.5; Liscum and Faust 1989; Neufeld et al. 2004). Bindungsstudien an LE aus U18666A-inkubierten CHO-Zellen zeigten, dass mehr Anx6 an LE bindet im Vergleich zu LE, die aus unbehandelten CHO-Zellen gewonnen wurden. Diese Mehranreicherung von Anx6 in cholesterinangereicherten LE ließ sich in der Immunfluoreszenzmikroskopie mit U18666A-behandelten CHO-Zellen bestätigen (de Diego, Schwartz et al. 2002).

Dies deutet auf eine von U18666A-induzierte Translokation von Anx6 aus EE zu LE hin. Weitere Bindungsstudien mit dem rekombinanten GST-Anx6-Fusionsprotein zeigten eine Steigerung der Bindungsaffinität von GST-Anx6 an LE aus U18666A-behandelten CHOwt-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (de Diego, Schwartz et al. 2002). Gemeinsam mit den hier vorgestellten Daten konnte somit die Existenz EDTA-resistenter und damit calcium-unabhängig bindender Anx6-Proteine nachgewiesen werden, die in ihrer Bindungsaffinität gegenüber Cholesterin vor allem in spät-endosomalen Membranen sensitiv sind.

Die U18666A-induzierte Translokation von Anx6 an spät-endosomale Membranen (de Diego, Schwartz et al. 2002) könnte einem ähnlichen Mechanismus unterliegen, wie die LDL-induzierte Translokation von Anx6 an LE (Grewal et al. 2000). Sowohl bei der Behandlung mit U18666A als auch während der Internalisierung von LDL kommt es zur Akkumulation von Cholesterin in LE (s. 1.3.5). Cholesterin als Hauptbestandteil von LDL gelangt über spät-endosomale Membranen anschließend zur PM oder zum TGN (s. 1.3.2). Das Cholesterin, welches die spät-endosomale Membran passiert, führt zu einer Änderung der Lipidzusammensetzung der jeweiligen Membran und liefert damit einen Erklärungsansatz für die veränderte Membranaffinität von Anx6. Es ist noch unklar, ob Anx6 das Cholesterin auf dem Weg der

Internalisierung durch die endosomalen Kompartimente begleitet oder ob das an spät-endosomalen Membranen nachgewiesene Anx6 erst durch den erhöhten Cholesterinanteil in LE dorthin verschoben wird. In-vitro-Experimente, in denen GST-Anx6 nachträglich zu isolierten LE aus U18666A-behandelten CHOwt-Zellen hinzugefügt wurde, zeigten eine deutlich erhöhte Affinität von GST-Anx6 zu cholesterinreichen, spät-endosomalen Membranen. Dieses Ergebnis verstärkt ein Modell der Rekrutierung von Anx6 aus dem Zytosol an spät-endosomale Membranen.

Obwohl gezeigt werden konnte, dass die cholesterinabhängige Membranbindung von Anx6 auch calciumunabhängig funktioniert (s. 3.2.4), ließ sich in den in-vitro-Experimenten mit dem GST-Anx6 an LE aus U18666A-behandelten CHOwt-Zellen zeigen, dass es ab einer Calciumkonzentration von 5 μM zu einer deutlichen Affinitätszunahme des GST-Anx6 im Vergleich zu LE aus unbehandelten CHO-Zellen kam, gleichbedeutend mit der Begünstigung der cholesterinabhängigen Membranbindung von Anx6 durch Calcium. Dies verdeutlicht eindrucksvoll die Komplexität des Zusammenspiels von Calcium und Cholesterin bei der Membranbindung des Anx6.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten an, dass Anx6 ähnlich dem Anx2 (Uittenbogaard et al. 2002) eine direkte Interaktion mit Cholesterin eingehen könnte. Diese direkte Interaktion von Anx6 mit Cholesterin könnte eine verbesserte Zugänglichkeit von PL in Membranen und damit eine erhöhte calciumabhängige Bindung an phosphatidylserinreichen Mikrodomänen zur Folge haben.

Inwieweit die strukturelle Besonderheit von Anx6 mit der Duplikation der Kerndomäne eine Rolle in der cholesterinabhängigen Bindungsaffinität spielt, muss in weiteren Bindungsstudien untersucht werden.

4.1.3 Cholesterinabhängige Bindung von Annexin 2 an Membranen

Annexin 2 (Anx2) ist an sekretorischen und endozytotischen Transportvorgängen beteiligt und wird an der PM und EE gefunden (Emans et al. 1993; Harder et al. 1997; Nakata et al. 1990; Senda et al. 1994). Anx2 existiert in Zellen als Monomer, p36, und als Heterotetramer, das aus zwei schweren p36-Ketten und zwei leichten Ketten, p11-Proteinen aus der Familie der S100-Proteine, besteht (s. 1.4.1). Beide Formen binden calciumabhängig an Membranen, wobei diese Bindung unabhängig von der Bindung zu p11 durch

den C-terminalen Kern von Anx2 (Seitenketten 30-338) reguliert wird (Glenney 1986; Johnsson et al. 1986; Drust and Creutz 1988). Für eine solche Bindung ist es nötig, dass in der entsprechenden Membran anionische PL wie Phosphatidylserin oder Phosphatidylinositol enthalten sind (Ayala-Sanmartin et al. 2001; Ayala-Sanmartin 2001).

Calciumbindende Agenzien führten bei Anx2 zur Identifikation eines calciumunabhängig membrangebundenen Anx2-Pools, den cholesterinsequestrierende Agenzien wie Digitonin und Filipin von der Membran freisetzen (Harder, Kellner et al. 1997; Jost, Zeuschner et al. 1997). Für das calciumunabhängige Bindungsverhalten von Anx2 wird die N-terminale Gruppe des Moleküls verantwortlich gemacht (König and Gerke 2000), jedoch stellen Arbeiten von Ayala-Sanmartin et al. diese Beobachtung in Frage (Ayala-Sanmartin et al. 2001; Ayala-Sanmartin 2001). Darüber hinaus postuliert diese Arbeitsgruppe, dass Cholesterin die Formierung oder Stabilisierung phosphatidylserinreicher Mikrodomänen induziert, welche die Interaktion zwischen Anx2 und Phosphatidylserin begünstigen. Hier erfolgt die Interaktion zu Phosphatidylserin über die C-terminale Kerndomäne des Annexinmoleküls. Jedoch postulieren Ayala-Sanmartin et al. zudem, dass der N-Terminus des Anx2-Proteins die calciumunabhängige und cholesterinsensitive Bindung der C-terminalen Kerndomäne reguliert (Ayala-Sanmartin et al. 2001; Ayala-Sanmartin 2001).

Bei unseren Bindungsstudien zu Anx6 sind wir davon ausgegangen, dass sich Anx2 als Kontrolle für ein cholesterinbeeinflusstes Bindungsverhalten eignet. Dabei konnten wir erstmals nachweisen, dass auch in CHO-Zellen ein EDTA-resistenter, calciumunabhängig membranbindender Anx2-Pool existiert, der sensitiv gegenüber Verteilung und Gehalt an Cholesterin in postnukleären Membranen ist. In einer weiterführenden Beobachtung stellten wir zudem fest, dass Digitonin mit EDTA kooperativ auf die Membranbindung des EDTA-resistenten Anx2-Pools an früh-endosomale Membranen wirkt (s. Abb. 15). Inwieweit Anx2 eine Interaktion mit Cholesterin in biologischen Membranen eingeht, bleibt unklar. Die Kooperativität von Digitonin und EDTA zeigt wie differenziert die Regulation der Membranbindung der einzelnen Annexine sein muss, da wir diese Beobachtung nicht für Anx6 gemacht haben. Die Hypothese von Ayala-Sanmartin aufgreifend (s. oben), dass es durch eine cholesterininduzierte Stabilisierung phosphatidylserinreicher Mikrodomänen zu einer

Steigerung der calciumabhängigen Bindung von Annexinen kommt, kann nicht beurteilt werden. Es lässt sich aber darüber spekulieren, ob der digitonin-vermittelte Cholesterinentzug zu einer Destabilisierung phosphatidylserin-reicher Mikrodomänen und zur Formation neuer Membrandomänen führt.

Dass die subzelluläre Verteilung von Anx2 einen Einfluss auf die Lokalisation anderer endosomaler Proteine haben kann, zeigen neuere Arbeiten der AG Gerke an Anx2-positiven und Anx2-negativen frühen Endosomen aus BHK-Zellen. Dabei zeigte sich, dass sich an den Anx2-positiven Membranen Tf-R und Rab4, an den Anx2-negativen Membranen EEA1 befindet (Zeuschner et al. 2001). Dies konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden. Anx2 wurde weder an LAMP1-markierten LE und Lysosomen noch an EEA1-markierten endosomalen Vakuolen gefunden, die als erste Station endozytotisch aufgenommener Vesikel erachtet werden (Simonsen et al. 1998). Vielmehr befand sich Anx2 an endosomalen Tubuli, die als Ausgangspunkt für den Recyclingweg betrachtet werden (Stoorvogel et al. 1996; Futter et al. 1998; Zeuschner et al. 2001). Die Rolle von Anx2 beim Recycling wird verstärkt durch die Veränderung des Tf-R-Recyclings nach siRNA-vermitteltem Anx2-Expressionsverlust in HeLa-Zellen. Dabei kommt es in Anx2-defizienten Zellen zur Akkumulation von perinukleär lokalisierten, Rab11-positiven Strukturen, die mit ihren tubulären Strukturen dem ERC ähneln und als Ausgangspunkt für den Recyclingweg betrachtet werden. Im Gegensatz dazu scheint ein Verlust von Anx2 keinen negativen Einfluss auf die Degradation von LDL entlang des lysosomalen Weges zu haben (Zobiack et al. 2003). In elektronenmikroskopischen Analysen zeigte sich, dass Anx2 die Struktur und Organisation des ERC beeinflusst. Im Einklang damit stehen Beobachtungen der AG Ullrich. Dabei fanden sich die beiden miteinander agierenden Proteine EEA1 und Rab5 an SE. Anx2 zeigte eine Kollokalisierung mit Rab11 im ERC, nicht jedoch in den Rab5-positiven SE (Ullrich et al. 1996; Trischler et al. 1999). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Arbeiten der AG Gruenberg. So waren Tf-R-positive Endosomen von polarisierten MDCK Zellen, die damit zum ERC gehören, frei von EEA1 und Anx2 (Gagescu et al. 2000). Die AG Gruenberg zeigte in Bindungsstudien an phosphatidylsäure- und cholesterin-enthaltenden Liposomen, dass Anx2 anscheinend eine spezifische Bindung mit Cholesterin eingeht. Für diese Interaktion von Anx2 mit Cholesterin ist Phosphatidylsäure essentiell (Mayran et al. 2003). Dass diese cholesterin-

abhängige Membranbindung auch die oben beschriebene subzelluläre Verteilung von Anx2 beeinflussen kann, zeigten Gruenberg und Mitarbeiter durch eine veränderte Verteilung von Anx2 in NPC1-Fibroblasten. In diesen Zellen wurde eine Umverteilung von Anx2 an NPC1-Zellen charakterisierende cholesterinreiche LE gesehen. Die gleiche Umverteilung von Anx2 zu LE wurde auch in U18666A-behandelten BHK-Zellen gesehen. Elektronenmikroskopisch waren infolge der cholesterinvermittelten Umverteilung keine Anx2-Proteine an den EE nachweisbar. Gruenberg und Mitarbeiter halten die Umverteilung von Anx2 zu LE über einen Vesikeltransport für unwahrscheinlich und schlagen eine Rekrutierung zytosolischer Anx2-Proteine an spät-endosomale Membranen vor. Zudem schlussfolgerten die Autoren, dass der Membrantransport von EE zu LE durch Anx2 reguliert wird. EE, die nach Behandlung mit U18666A frei an Anx2 waren, zeigten sich nicht fähig zur Formation von endosomalen Transportvesikeln (Endosomal Carrier Vesicle, ECV), die das Bindeglied im Transport von EE zu LE darstellen. Somit scheint Anx2 über das direkte Interagieren zu Cholesterin cholesterinreiche früh-endosomale Membrandomänen zu organisieren, von denen schließlich die Bildung der ECV und damit der Beginn des degradativen Weges ausgeht (Mayran et al. 2003). Diese Ergebnisse stehen jedoch im Gegensatz zu den hier beschriebenen Ergebnissen der AG Grewal. Die Behandlung von CHO-Zellen mit U18666A führte zwar zu einer Akkumulation von Anx6 an LE, jedoch konnte in diesen Arbeiten keine Umverteilung von Anx2 in U18666A-behandelten CHO-Zellen an spät-endosomale Membranen nachgewiesen werden.

Bei den oben beschriebenen variierenden Verteilungsmustern von Anx2 am endosomalen System ist zu berücksichtigen, dass die Protein- und Lipidkompositionen von Mikrodomänen in EE- und LE-Membranen in den verschiedenen Zelltypen sehr unterschiedlich sein können. Dies könnte entscheidend zu einem unterschiedlichen Bindungsverhalten von Anx2 in den verschiedenen experimentellen Systemen beitragen. Sicherlich sind hier in Zukunft weitere Bindungsstudien für Anx2 und Anx6 nötig.

4.2 Funktion von Annexin 6 beim Targeting von LDL-Cholesterin in späte Endosome

Anx6 bewirkt durch seine Interaktion mit Calpain und Spektrin an der PM die Ausknospung von CCPs (Watanabe et al. 1994; Kamal et al. 1998). Zudem wurde an endozytotischen und Transferrin-positiven Vesikeln eine Assoziation

von Anx6 und Dynamin, einer für das Ausknospen von CCPs von der PM essentiellen GTPase, beobachtet (Turpin et al. 1998). In vorangegangenen Arbeiten der AG Grewal wurde eine LDL-induzierte Translokation von Anx6 an LE dargestellt (Grewal et al. 2000). Darüber hinaus führte die Injektion einer dominant-negativen Anx6-Mutante nicht nur zu einer reduzierten Internalisierung von LDL, sondern zur Akkumulation cholesterinreicher Vesikel in Kernnähe (Kamal et al. 1998; Pons et al. 2001). Pons et al. konnten in weiteren Experimenten mit spät-endosomalen und prälysosomalen Membranen eine direkte Interaktion von Anx6 mit Spektrin an Strukturen des spät-endozytotischen Kompartiment nachweisen (Pons et al., 2001). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Interaktionen von Membranen und zytoskelettalen Bestandteilen mit Anx6 nicht nur bei der Ausknospung von CCP an der Zellmembran beteiligt sind, sondern dass Anx6 den lysosomalen Weg endozytotischer Vesikel über zwischenzeitliche Kontakte mit zytoskelettalen Strukturen steuert.

Eine andere Möglichkeit ist, dass Anx6 sich nach der Ausknospung der CCP von diesen löst und ins Zytoplasma diffundiert, um später an anderer Lokalisation rekrutiert zu werden. Dafür sprechen die calciumabhängige und stressinduzierte Translokation von PM-ständigem Anx6 in das Zytoplasma (Hoyal et al. 1996) und die calciuminduzierte reversible Formation von Membran-Zytoskelett-Komplexen in glatten Muskelzellen (Babiychuk et al. 1999). Damit wäre nicht geklärt, wie Anx6 seine Zielmembran findet. In 4.1 wurde bereits auf die ph-induzierte Proteinentfaltung von Anx6 als einen möglichen Mechanismus eingegangen, der die Bindung von Anx6 an LE bei der LDL-Internalisierung verursachen könnte. Nach der Entfaltung käme es zur Interaktion der KFERQ-Sequenzen von Anx6 mit hsc73 (heat shock cognate protein, 73 kDa), einem Chaperon, das für den Transport von Anx6 im Anx6/hsc73-Komplex zu LE verantwortlich ist.

In weiteren Experimenten bleibt herauszufinden, ob eine derartige chaperonvermittelte Führung die Bindung von Anx6 an LE während der LDL-Endozytose verursacht oder ob der intraluminale ph-Wert der LE und phospholipidreiche, durch Cholesterin in spät-endosomalen Membranen etablierte und stabilisierte Membrandomänen Signale darstellen, die zur Translokation von Anx6 an LE führen.

4.3 Funktion von Annexin 6 im Cholesterintransport aus dem spät-endozytotischen Kompartiment

Es gibt zwei wesentliche Möglichkeiten für die Zelle, die intrazelluläre Cholesterinhomöostase zu beeinflussen: Erstens, die Neusynthese von Cholesterin am ER mit konsekutivem Transport des Cholesterins zur PM und, zweitens, die vom LDL-R vermittelte Aufnahme von LDL-Cholesterin aus dem Extrazellulärraum mit nachfolgendem Transport ins spät-endozytische Kompartiment. Die Transportwege von neusynthetisiertem Cholesterin vom ER über das TGN zur PM sind verschieden im Vergleich zum LDL-Cholesterin, das nach Rezeptoraufnahme ins spät-endozytische Kompartiment gelangt und anschließend zur PM und ER abtransportiert wird (DeGrella and Simoni 1982; Urbani and Simoni 1990; Kaplan and Simoni 1985; Neufeld et al. 1996). Für die Aufrechterhaltung der zellulären Cholesterinhomöostase gibt es für jeden der beiden oben genannten Transportwege unterschiedliche Regulationsmechanismen. Diese Regulationsmechanismen stellen sicher, dass die asymmetrische Verteilung von Cholesterin mit hohen Konzentrationen in der PM und niedrige Konzentrationen im ER konstant bleibt (Schroeder et al. 1996; Liscum and Munn 1999).

Anx6 ist am Membranverkehr von LE beteiligt (s. 4.4; Grewal et al. 2000; Pons et al. 2001, de Diego, Schwartz et al. 2002) und scheint im Gegensatz zu Anx2 in cholesterinreichen LE zu akkumulieren. Die Bindung von Anx6 an cholesterinreiche LE ist vermutlich vergleichbar mit der Regulation der Membranaffinität von Anx6 an cholesterinreiche Lipid-Rafts. Zudem scheinen auch in LE mit Lipid-Rafts vergleichbare Mikrodomänen zu existieren (Fivaz et al. 2002). Diese Membrandomänen können spezifische Funktionen durch das Konzentrieren und Ausschließen von Membranproteinen erwerben und dienen vermutlich als Schaltstelle von Signaltransduktionskaskaden oder in der Regulation des Membranverkehrs. Eingebettet mit anderen Proteinstrukturen (s. 1.3.5) in solchen Mikrodomänen könnte Anx6 den Cholesterintransport aus dem spät-endozytotischen Kompartiment regulieren. In Anbetracht der hohen Dynamik des Cholesteringehalts im spät-endozytotischen Kompartiment während der LDL-Internalisierung und -Degradation muss hinterfragt werden, ob es zur stabilen Ausbildung solcher cholesterinreichen lateralen Lipidzusammenlagerungen kommt. Vor diesem Hintergrund ist es interessant, dass die inneren Membrananteile der multivesikulären Strukturen von späten

Endosomen reich an dem Phospholipid Lysobisphosphatidsäure (LBPA) sind. Die AG Gruenberg hebt in einer Reihe von Arbeiten die Rolle von LBPA in diesen inneren Strukturen von LE hervor und postuliert, dass LBPA-reiche Membrandomänen in LE an der Regulation des intrazellulären, spät-endozytotischen Cholesterintransport entscheidend mitwirken (s. 1.3.5; Kobayashi et al. 1998; Kobayashi et al. 1999; Matsuo, Chevallier et al. 2004). Somit liegt die Vermutung nahe, dass Anx6 in LE über die Bindung an Mikrodomänen in spät-endosomalen Membranen an der Regulation des Cholesterintransports aus dem spät-endozytotischen Kompartiment beteiligt ist. Um die Funktion von Anx6 in diesem physiologisch wichtigen Prozess (s. unten) genauer zu charakterisieren, sind weitere Experimente durchzuführen.

4.4 Klinische Relevanz von Annexinen

Die konservierte Annexinstruktur und das Vorkommen der Annexine in einer Vielzahl von Spezies deuten auf eine wichtige Rolle der Annexine hin. Deshalb ist es erstaunlich, 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 ist. Diese Korrelationen wurden als „Annexinopathien“ bezeichnet (Rand 2000).

Das erste Beispiel beschreibt Patienten mit der hämorrhagisch verlaufenden Form der akuten promyeloischen Leukämie (APL) mit der reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 15 und 17, $t(15;17)$, die zu einer Fusion des verkürzten Vitamin-A-Säure-Rezeptor-alpha (AR-alpha)-Gens mit dem Gen für den Transkriptionsfaktor PML (für Promyelozyten-Leukämie) führt (Menell et al. 1999). Einige dieser Patienten weisen eine erhöhte Expression von Anx2 auf. Anx2 dient 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 Anx2 führt bei den APL-Patienten zu einer gesteigerten Fibrinolyse und damit zur Hämorrhagie (Cesarman et al. 1994; Hajjar et al. 1994).

Ein zweites Beispiel beschreibt die Rolle von Anx5 bei Patientinnen mit dem Antiphospholipidsyndrom (APS), welches sich durch Antikörperbildung gegen anionische PL auszeichnet. Anx5 bildet einen kristallinen Schutzschild gegen koagulatorische Proteine, welche mit den anionischen PL in Kontakt treten

können. Das Syndrom manifestiert sich in vaskulären Thrombembolien oder wiederholten Spontanaborten. In den Plazentae von Präeklampsie-Patientinnen wurde eine verminderte Anx5-Konzentration gemessen. In diesen Fällen kommt es zu einer eingeschränkten, von Anx5 vermittelten Ausbildung eines kristallinen Schutzschildes über PL-enhaltende Oberflächen. Monoklonale anti-Phospholipid (aPL)-AK unterbrechen zudem die kristalline Anordnung von Anx5. Im Weiteren vermitteln diese aPL-AK eine beschleunigte Koagulation und Ausbildung von Thromben im Plasma von APS-Patientinnen (Rand et al. 1997; Rand et al. 2003; Rand et al. 2004).

Für Anx6 ist noch keine derart direkte Beteiligung an Krankheitsprozessen bekannt. Trotzdem besitzt Anx6 ein gewisses Potential, an pathophysiologischen Vorgängen mitzuwirken, wie im folgenden Absatz gezeigt werden soll.

4.4.1 Potentielle Rolle von Annexin 6 im Lipidstoffwechsel

Die bedeutende Rolle von Anx6 bei der Endozytose von LDL wurde in den vorherigen Punkten bereits dargestellt. Zwar ist alternativ eine von Anx6 unabhängige Endozytose möglich, jedoch werden dabei die endozytotischen Vesikel in der Zelle fehlgeleitet. Es kommt zur Akkumulation von LDL in großen, kernnahen Vesikeln. Dies geht einher mit einer reduzierten LDL-Prozessierung im spät-endozytotischen Kompartiment (Kamal, Ying et al. 1998; Grewal et al. 2000). Ein ähnliches Bild zeigen Zellen, die mit U18666A behandelt wurden (Liscum and Faust 1989), Zellen von NPC-Patienten (Liscum and Faust 1989; Liscum 2000) sowie Zellen von Patienten mit der Tangier-Krankheit (Neufeld et al. 2004).

Die klinische Symptomatik dieser Erkrankungen und das typische Erscheinungsbild von Fibroblasten dieser Patienten ist in 1.3.5 bereits detailliert beschrieben worden. Es wäre somit interessant zu erfahren, ob die Wirkung der NPC1- und der ABCA1-Mutation auf die intrazelluläre Verteilung von Anx6 die gleiche ist, wie die des U18666A. Da Arbeiten der AG Grewal und Experimente in dieser Arbeit auf eine Rolle von Anx6 an regulierenden Prozessen in LE hinweisen, könnte es auch eine Rolle in der komplexen Pathophysiologie der Niemann-Pick-C-, der Tangier (Alpha-Lipoproteinämie)-Erkrankung sowie in Sphingolipidosen spielen, die von einer Cholesterinanreicherung in LE begleitet sind. Über mögliche Zusammenhänge in dieser Richtung gibt es bislang noch keine Erkenntnisse, aber falls ein

Zusammenhang aufgedeckt wird, kann das zum Verständnis sowohl der Niemann-Pick-C- und der Tangier-Krankheit als auch der Funktion des Anx6 beitragen.

Der fehlende Phänotyp der Anx6-Knock-out-Maus (Hawkins et al., 1999) weist darauf hin, dass eventuell andere Mitglieder der Annexinfamilie den Verlust einer Anx6-Funktion kompensieren können. Zukünftige Experimente in transienten siRNA-Knockdown-Systemen werden eventuell dazu beitragen, den Anteil von Anx6 bei verschiedenen Krankheitsbildern zu identifizieren.

5. Zusammenfassung

Anx6 gehört zu einer Gruppe konservierter und membranbindender Proteine, die an der Regulation des zellulären Membrantransports beteiligt sind. Bis heute ist die genaue Bedeutung von Anx6 unklar. Anx6 stimuliert die von dem LDL-R vermittelte Endozytose von Lipoproteinen und immer mehr Arbeiten bestätigen eine Bedeutung von Anx6 bei der Regulation des endosomalen Membranverkehrs.

Bisher war bekannt, dass die Bindung von Anx6 an Membranen, wie bei allen anderen Mitgliedern der Annexinfamilie, durch eine calciumabhängige Bindung an PL reguliert wird. In dieser Arbeit konnte erstmals eine calciumunabhängige Bindung von Anx6-Proteinen gezeigt werden, die durch die Cholesterinkonzentration in der Membran reguliert wird. Um dies darzustellen wurde das Bindungsverhalten von Anx6 an Membranen Anx6-exprimierender Zellen nach Cholesterinentzug studiert. Nach dem Entfernen calciumabhängig bindender Anx6-Proteine konnte in diesen Experimenten ein Pool an Anx6-Proteinen identifiziert werden, der in Calciumabwesenheit weiterhin stabil an Membranen bindet und sich in diesem Bindungsverhalten abhängig zum Membrangehalt an Cholesterin zeigt. Durch den Entzug von Cholesterin aus diesen Membranen liessen sich die calciumunabhängig bindenden Anx6-Proteine lösen. Dieses calciumunabhängige und cholesterinsensitive Bindungsverhalten konnte in dieser Arbeit an den bekannten intrazellulären Lokalisationsorten von Anx6 (EE und LE) nachgewiesen werden. Umgekehrt zeigten Bindungsexperimente an LE, dass durch eine Cholesterinanreicherung in LE die Bindung von Anx6 an späten Endosomen stimuliert wird. Zusammenfassend zeigen diese Experimente erstmalig, dass Cholesterin das Bindungsverhalten und damit die intrazelluläre Verteilung von Anx6 entscheidend beeinflussen kann. Die cholesterinabhängige Bindung von Anx6 an LE deutet darauf hin, dass Anx6 nach Stimulation der LDL-Internalisierung an der PM auch eine wichtige Rolle beim Targeting von LDL-Cholesterin in LE spielen könnte.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	ATP-Binding-Cassette-Transporter
ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
Anx	Annexin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
AP	Adaptor-Proteine
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Apoprotein	Apolipoprotein
BHK	Baby Hamster Kidney, Nierenzellen des Hamsterbabys
CCP	Clathrin Coated Pit, clathrinumhüllte Membranausstülpung
CHO	Chinese Hamster Ovary, Ovarialzellen des chinesischen Hamsters
CM	Chylomikron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRM	Detergent Resistent Membrane
ECV	Endosomal Carrier Vesicle; endosomale Trägervesikel
EE	Early Endosomes, frühe Endosomen
EEA1	Early Endosome Antigen1, früh-endosomales Antigen1
EGF	Epidermal Growth Factor, epidermaler Wachstumsfaktor
EGF-R	EGF-Rezeptor
ER	Endoplasmatische Retikulum
ERC	Endocytic Recycling Compartment, endosomales rezyklierende Kompartiment
FCS	Fötales Kälberserum
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden

HDL	High Density Lipoprotein
HRP	Horse-Radish-Peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
kDa	kilo Dalton
LAL	Lysosomale Saure Lipase
LBPA	Lysobisphosphatidacid, Lysobisphosphatidsäure
LCAT	Lecithin-Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-R	LDL-Rezeptor
LE	Late Endosomes, späte Endosomen
LPL	Lipoproteinlipase
LRP	LDL-Receptor-related-Protein
M-6-P	Mannose-6-Phosphat
M-6-P-R	M-6-P-Rezeptor
MDCK	Madin Darby Canine Kidney, Madin Darby Nierenzellen des Kaninchen
min	Minute
MVB	Multivesicular Bodies, multivesikuläre Körperchen
NCEH	Neutrale Cholesterinesterhydrolase
NPC1	Niemann-Pick-C-Protein 1
NRK	Normal Rat Kidney Fibroblasts, Fibroblasten der Rattenniere
NSF	N-Ethyl-Maleimide-Sensitive Fusion Protein
P	Pellet(s)
PI-3-K	Phosphoinositol-3-OH Kinase
PL	Phospholipide
PM	Plasmamembran
PNS	Postnukleärer Überstand
PtdIns-3-P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PtdIns-4,5-P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
s.	siehe
SDS-Page	Sodium Dodecylsulfat – Polyacrylamid Gelelektrophorese
SE	Sorting Endosomes, sortierende Endosomen
sec	Sekunde

SNARE	Soluble NSF Attachment Protein Receptor
SR-BI	Scavenger Receptor BI
SRE	Sterol Responsive Element
SREBP	SRE-Binding Protein
TGN	Trans-Golgi-Apparat
Tf	Transferrin
Tf-R	Tf-Rezeptor
Ü	Überstand
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

7. Literaturverzeichnis

- Ahle, S., A. Mann, et al. (1988). "Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane." *Embo J* 7(4): 919-29.
- Ahmed, S. N., D. A. Brown, et al. (1997). "On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes." *Biochemistry* 36(36): 10944-53.
- Alpy, F., M. E. Stoeckel, et al. (2001). "The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein." *J Biol Chem* 276(6): 4261-9.
- Andree, H. A., G. M. Willems, et al. (1993). "Aggregation of phospholipid vesicles by a chimeric protein with the N-terminus of annexin I and the core of annexin V." *Biochemistry* 32(17): 4634-40.
- Aniento, F., F. Gu, et al. (1996). "An endosomal beta COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes." *J Cell Biol* 133(1): 29-41.
- Avila-Sakar, A. J., C. E. Creutz, et al. (1998). "Crystal structure of bovine annexin VI in a calcium-bound state." *Biochim Biophys Acta* 1387(1-2): 103-16.
- Avila-Sakar, A. J., R. H. Kretsinger, et al. (2000). "Membrane-bound 3D structures reveal the intrinsic flexibility of annexin VI." *J Struct Biol* 130(1): 54-62.
- Ayala-Sanmartin, J. (2001). "Cholesterol enhances phospholipid binding and aggregation of annexins by their core domain." *Biochem Biophys Res Commun* 283(1): 72-9.
- Ayala-Sanmartin, J., J. P. Henry, et al. (2001). "Cholesterol regulates membrane binding and aggregation by annexin 2 at submicromolar Ca(2+) concentration." *Biochim Biophys Acta* 1510(1-2): 18-28.
- Babiyuchuk, E. B. and A. Draeger (2000). "Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains." *J Cell Biol* 150(5): 1113-24.
- Babiyuchuk, E. B., R. J. Palstra, et al. (1999). "Annexin VI participates in the formation of a reversible, membrane-cytoskeleton complex in smooth muscle cells." *J Biol Chem* 274(49): 35191-5.
- Bandorowicz, J., S. Pikula, et al. (1992). "Annexins IV (p32) and VI (p68) interact with erythrocyte membrane in a calcium-dependent manner." *Biochim Biophys Acta* 1105(2): 201-6.
- Barbieri, M. A., S. Hoffenberg, et al. (1998). "Evidence for a symmetrical requirement for Rab5-GTP in in vitro endosome-endosome fusion." *J Biol Chem* 273(40): 25850-5.
- Becker, T., K. Weber, et al. (1990). "Protein-protein recognition via short amphiphilic helices; a mutational analysis of the binding site of annexin II for p11." *Embo J* 9(13): 4207-13.
- Beisiegel, U. (1995). "Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism." *Curr Opin Lipidol* 6(3): 117-22.
- Beisiegel, U., A. Krapp, et al. (1994). "The role of alpha 2M receptor/LRP in chylomicron remnant metabolism." *Ann N Y Acad Sci* 737: 53-69.
- Beisiegel, U., W. Weber, et al. (1989). "The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein." *Nature* 341(6238): 162-4.
- Bennett, M. K., N. Calakos, et al. (1992). "Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones." *Science* 257(5067): 255-9.
- Bernard, D. W., A. Rodriguez, et al. (1990). "Influence of high density lipoprotein on esterified cholesterol stores in macrophages and hepatoma cells." *Arteriosclerosis* 10(1): 135-44.
- Bernard, D. W., A. Rodriguez, et al. (1991). "cAMP stimulates cholesteryl ester clearance to high density lipoproteins in J774 macrophages." *J Biol Chem* 266(2): 710-6.
- Blanchette-Mackie, E. J. (2000). "Intracellular cholesterol trafficking: role of the NPC1 protein." *Biochim Biophys Acta* 1486(1): 171-83.
- Braell, W. A., D. M. Schlossman, et al. (1984). "Dissociation of clathrin coats coupled to the hydrolysis of ATP: role of an uncoating ATPase." *J Cell Biol* 99(2): 734-41.
- Brown, D. A. and E. London (1998). "Functions of lipid rafts in biological membranes." *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 111-36.
- Brown, D. A. and E. London (2000). "Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts." *J Biol Chem* 275(23): 17221-4.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1997). "The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor." *Cell* 89(3): 331-40.
- Brown, M. S., Y. K. Ho, et al. (1980). "The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters." *J Biol Chem* 255(19): 9344-52.

- Brown, R. E. (1998). "Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal." *J Cell Sci* 111 (Pt 1): 1-9.
- Bucci, C., R. G. Parton, et al. (1992). "The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway." *Cell* 70(5): 715-28.
- Carstea, E. D., J. A. Morris, et al. (1997). "Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis." *Science* 277(5323): 228-31.
- Castle, C. K., M. E. Pape, et al. (1991). "Secretion of pre-beta-migrating apoA-I by cynomolgus monkey hepatocytes in culture." *J Lipid Res* 32(3): 439-47.
- Cavalli, V., M. Corti, et al. (2001). "Endocytosis and signaling cascades: a close encounter." *FEBS Lett* 498(2-3): 190-6.
- Cesarman, G. M., C. A. Guevara, et al. (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(33): 21198-203.
- Chang, T. Y., C. C. Chang, et al. (1997). "Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase." *Annu Rev Biochem* 66: 613-38.
- Chen, Y. A. and R. H. Scheller (2001). "SNARE-mediated membrane fusion." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2): 98-106.
- Christoforidis, S., M. Miaczynska, et al. (1999). "Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors." *Nat Cell Biol* 1(4): 249-52.
- Clary, D. O., I. C. Griff, et al. (1990). "SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast." *Cell* 61(4): 709-21.
- Cuervo, A. M., A. V. Gomes, et al. (2000). "Selective degradation of annexins by chaperone-mediated autophagy." *J Biol Chem* 275(43): 33329-35.
- Curtiss, L. K. (2000). "ApoE in atherosclerosis : a protein with multiple hats." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(8): 1852-3.
- Danielsen, E. M., G. H. Hansen, et al. (1993). "Apical secretion of apolipoproteins from enterocytes." *J Cell Biol* 120(6): 1347-56.
- Davis, C. G., J. L. Goldstein, et al. (1987). "Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region." *Nature* 326(6115): 760-5.
- De Camilli, P., K. Takei, et al. (1995). "The function of dynamin in endocytosis." *Curr Opin Neurobiol* 5(5): 559-65.
- de Diego, I., F. Schwartz, et al. (2002). "Cholesterol modulates the membrane binding and intracellular distribution of annexin 6." *J Biol Chem* 277(35): 32187-94.
- DeGrella, R. F. and R. D. Simoni (1982). "Intracellular transport of cholesterol to the plasma membrane." *J Biol Chem* 257(23): 14256-62.
- Dell'Angelica, E. C., C. Mullins, et al. (1999). "AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors." *J Biol Chem* 274(11): 7278-85.
- Dell'Angelica, E. C., H. Ohno, et al. (1997). "AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression." *Embo J* 16(5): 917-28.
- Desjardins, M., J. E. Celis, et al. (1994). "Molecular characterization of phagosomes." *J Biol Chem* 269(51): 32194-200.
- Dice, J. F. (1990). "Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis." *Trends Biochem Sci* 15(8): 305-9.
- Dice, J. F., S. R. Terlecky, et al. (1990). "A selective pathway for degradation of cytosolic proteins by lysosomes." *Semin Cell Biol* 1(6): 449-55.
- Dirac-Svejstrup, A. B., T. Sumizawa, et al. (1997). "Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI." *Embo J* 16(3): 465-72.
- Drust, D. S. and C. E. Creutz (1988). "Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium." *Nature* 331(6151): 88-91.
- Dunn, K. W., T. E. McGraw, et al. (1989). "Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome." *J Cell Biol* 109(6 Pt 2): 3303-14.
- Echard, A., F. Jollivet, et al. (1998). "Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6." *Science* 279(5350): 580-5.
- Ellson, C. D., S. Gobert-Gosse, et al. (2001). "PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox)." *Nat Cell Biol* 3(7): 679-82.
- Emans, N., J. P. Gorvel, et al. (1993). "Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles." *J Cell Biol* 120(6): 1357-69.
- Ericsson, J., S. M. Jackson, et al. (1996). "Sterol regulatory element binding protein binds to a cis element in the promoter of the farnesyl diphosphate synthase gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(2): 945-50.
- Fasshauer, D., W. K. Eliason, et al. (1998). "Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly." *Biochemistry* 37(29): 10354-62.
- Fasshauer, D., R. B. Sutton, et al. (1998). "Conserved structural features of the synaptic fusion

- complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15781-6.
- Fazio, S. and Z. Yao (1995). "The enhanced association of apolipoprotein E with apolipoprotein B-containing lipoproteins in serum-stimulated hepatocytes occurs intracellularly." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(5): 593-600.
- Feng, Y., B. Press, et al. (1995). "Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic." *J Cell Biol* 131(6 Pt 1): 1435-52.
- Fielding, C. J. and P. E. Fielding (1997). "Intracellular cholesterol transport." *J Lipid Res* 38(8): 1503-21.
- Fivaz, M., F. Vilbois, et al. (2002). "Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins." *Embo J* 21(15): 3989-4000.
- Ford, M. G., I. G. Mills, et al. (2002). "Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin." *Nature* 419(6905): 361-6.
- Fukui, K., T. Sasaki, et al. (1997). "Isolation and characterization of a GTPase activating protein specific for the Rab3 subfamily of small G proteins." *J Biol Chem* 272(8): 4655-8.
- Futter, C. E., S. Felder, et al. (1993). "Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor." *J Cell Biol* 120(1): 77-83.
- Futter, C. E., A. Gibson, et al. (1998). "In polarized MDCK cells basolateral vesicles arise from clathrin-gamma-adaptin-coated domains on endosomal tubules." *J Cell Biol* 141(3): 611-23.
- Gagescu, R., N. Demaurex, et al. (2000). "The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components." *Mol Biol Cell* 11(8): 2775-91.
- Gerke, V. and S. E. Moss (1997). "Annexins and membrane dynamics." *Biochim Biophys Acta* 1357(2): 129-54.
- Gerke, V. and S. E. Moss (2002). "Annexins: from structure to function." *Physiol Rev* 82(2): 331-71.
- Christoforidis, S., H. McBride, et al. (1999). "The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking." *Nature* 397(6720): 621-5.
- Giambanco, I., M. Verzini, et al. (1993). "Annexins V and VI in rat tissues during post-natal development: immunochemical measurements." *Biochem Biophys Res Commun* 196(3): 1221-6.
- Glenney, J. (1986). "Phospholipid-dependent Ca²⁺ binding by the 36-kDa tyrosine kinase substrate (calpactin) and its 33-kDa core." *J Biol Chem* 261(16): 7247-52.
- Glenney, J. R., Jr., M. Boudreau, et al. (1986). "Association of the S-100-related calpactin I light chain with the NH₂-terminal tail of the 36-kDa heavy chain." *J Biol Chem* 261(23): 10485-8.
- Golczak, M., A. Kicinska, et al. (2001). "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* 15(6): 1083-5.
- Golczak, M., A. Kirilenko, et al. (2001). "Conformational states of annexin VI in solution induced by acidic pH." *FEBS Lett* 496(1): 49-54.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1990). "Regulation of the mevalonate pathway." *Nature* 343(6257): 425-30.
- Gorvel, J. P., P. Chavrier, et al. (1991). "rab5 controls early endosome fusion in vitro." *Cell* 64(5): 915-25.
- Grewal, T., J. Heeren, et al. (2000). "Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of low density lipoprotein to the prelysosomal compartment." *J Biol Chem* 275(43): 33806-13.
- Grosser, J., O. Schrecker, et al. (1981). "Function of hepatic triglyceride lipase in lipoprotein metabolism." *J Lipid Res* 22(3): 437-42.
- Gruenberg, J. (2001). "The endocytic pathway: a mosaic of domains." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(10): 721-30.
- Gruenberg, J., G. Griffiths, et al. (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(4): 1301-16.
- Gu, F. and J. Gruenberg (2000). "ARF1 regulates pH-dependent COP functions in the early endocytic pathway." *J Biol Chem* 275(11): 8154-60.
- Guan, G., P. Dai, et al. (1998). "Differential transcriptional regulation of the human squalene synthase gene by sterol regulatory element-binding proteins (SREBP) 1a and 2 and involvement of 5' DNA sequence elements in the regulation." *J Biol Chem* 273(20): 12526-35.
- Hajjar, K. A., A. T. Jacovina, et al. (1994). "An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II." *J Biol Chem* 269(33): 21191-7.

- Hanson, P. I., R. Roth, et al. (1997). "Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy." *Cell* 90(3): 523-35.
- Hao, M., S. X. Lin, et al. (2002). "Vesicular and non-vesicular sterol transport in living cells. The endocytic recycling compartment is a major sterol storage organelle." *J Biol Chem* 277(1): 609-17.
- Harder, T. and V. Gerke (1994). "The annexin IIp11(2) complex is the major protein component of the triton X-100-insoluble low-density fraction prepared from MDCK cells in the presence of Ca²⁺." *Biochim Biophys Acta* 1223(3): 375-82.
- Harder, T., R. Kellner, et al. (1997). "Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol." *Mol Biol Cell* 8(3): 533-45.
- Harder, T., C. Thiel, et al. (1993). "Formation of the annexin IIp112 complex upon differentiation of F9 teratocarcinoma cells." *J Cell Sci* 104 (Pt 4): 1109-17.
- Harris, A. S. and J. S. Morrow (1990). "Calmodulin and calcium-dependent protease I coordinately regulate the interaction of fodrin with actin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(8): 3009-13.
- Hawkins, T. E., J. Roes, et al. (1999). "Immunological development and cardiovascular function are normal in annexin VI null mutant mice." *Mol Cell Biol* 19(12): 8028-32.
- Hayashi, T., H. McMahon, et al. (1994). "Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly." *Embo J* 13(21): 5051-61.
- Hayes, M. J., C. J. Merrifield, et al. (2004). "Annexin 2 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on endocytic vesicles is regulated by the stress response pathway." *J Biol Chem* 279(14): 14157-64.
- Hayes, M. J., U. Rescher, et al. (2004). "Annexin-actin interactions." *Traffic* 5(8): 571-6.
- Heeren, J., W. Weber, et al. (1999). "Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation." *J Cell Sci* 112 (Pt 3): 349-59.
- Hinshaw, J. E. (2000). "Dynamin and its role in membrane fission." *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 483-519.
- Hinshaw, J. E. and S. L. Schmid (1995). "Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding." *Nature* 374(6518): 190-2.
- Hirst, J. and M. S. Robinson (1998). "Clathrin and adaptors." *Biochim Biophys Acta* 1404(1-2): 173-93.
- Hofmann, A., C. Raguene-Nicol, et al. (2000). "The annexin A3-membrane interaction is modulated by an N-terminal tryptophan." *Biochemistry* 39(26): 7712-21.
- Hohl, T. M., F. Parlati, et al. (1998). "Arrangement of subunits in 20 S particles consisting of NSF, SNAPs, and SNARE complexes." *Mol Cell* 2(5): 539-48.
- Horiuchi, H., R. Lippe, et al. (1997). "A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function." *Cell* 90(6): 1149-59.
- Hosoya, H., R. Kobayashi, et al. (1992). "Ca²⁺-regulated actin and phospholipid binding protein (68 kD-protein) from bovine liver: identification as a homologue for annexin VI and intracellular localization." *Cell Motil Cytoskeleton* 22(3): 200-10.
- Hoyal, C. R., A. P. Thomas, et al. (1996). "Hydroperoxide-induced increases in intracellular calcium due to annexin VI translocation and inactivation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase." *J Biol Chem* 271(46): 29205-10.
- Hu, R. J. and V. Bennett (1991). "In vitro proteolysis of brain spectrin by calpain I inhibits association of spectrin with ankyrin-independent membrane binding site(s)." *J Biol Chem* 266(27): 18200-5.
- Hussain, M. M., R. K. Kancha, et al. (1996). "Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors." *Biochim Biophys Acta* 1300(3): 151-70.
- Jackle, S., U. Beisiegel, et al. (1994). "Annexin VI, a marker protein of hepatocytic endosomes." *J Biol Chem* 269(2): 1026-32.
- Jahn, R. and T. C. Sudhof (1999). "Membrane fusion and exocytosis." *Annu Rev Biochem* 68: 863-911.
- Jing, S. Q., T. Spencer, et al. (1990). "Role of the human transferrin receptor cytoplasmic domain in endocytosis: localization of a specific signal sequence for internalization." *J Cell Biol* 110(2): 283-94.
- Johnsson, N., J. Vandekerckhove, et al. (1986). "Binding sites for calcium, lipid and p11 on p36, the substrate of retroviral tyrosine-specific protein kinases." *FEBS Lett* 198(2): 361-4.
- Jost, M., D. Zeuschner, et al. (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 (Pt 2): 221-8.
- Kamal, A., Y. Ying, et al. (1998). "Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes." *J Cell Biol* 142(4): 937-47.

- Kaplan, M. R. and R. D. Simoni (1985). "Transport of cholesterol from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane." *J Cell Biol* 101(2): 446-53.
- Kirchhausen, T. (1999). "Adaptors for clathrin-mediated traffic." *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 705-32.
- Kirchhausen, T. (2000). "Clathrin." *Annu Rev Biochem* 69: 699-727.
- Klucken, J., C. Buchler, et al. (2000). "ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2): 817-22.
- Kobayashi, T., M. H. Beuchat, et al. (1999). "Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport." *Nat Cell Biol* 1(2): 113-8.
- Kobayashi, T., F. Gu, et al. (1998). "Lipids, lipid domains and lipid-protein interactions in endocytic membrane traffic." *Semin Cell Dev Biol* 9(5): 517-26.
- Kobayashi, T., E. Stang, et al. (1998). "A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function." *Nature* 392(6672): 193-7.
- Kohler, G., U. Hering, et al. (1997). "Annexin V interaction with phosphatidylserine-containing vesicles at low and neutral pH." *Biochemistry* 36(26): 8189-94.
- Kojima, K., H. Utsumi, et al. (1994). "Highly polarized expression of carbohydrate-binding protein p33/41 (annexin IV) on the apical plasma membrane of epithelial cells in renal proximal tubules." *FEBS Lett* 342(3): 313-8.
- Konig, J. and V. Gerke (2000). "Modes of annexin-membrane interactions analyzed by employing chimeric annexin proteins." *Biochim Biophys Acta* 1498(2-3): 174-80.
- Kornfeld, S. and I. Mellman (1989). "The biogenesis of lysosomes." *Annu Rev Cell Biol* 5: 483-525.
- Kowal, R. C., J. Herz, et al. (1989). "Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(15): 5810-4.
- Kowal, R. C., J. Herz, et al. (1990). "Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein." *J Biol Chem* 265(18): 10771-9.
- Krauss, M., M. Kinuta, et al. (2003). "ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma." *J Cell Biol* 162(1): 113-24.
- Krieger, M. (1999). "Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI." *Annu Rev Biochem* 68: 523-58.
- Kuijpers, G. A., G. Lee, et al. (1992). "Immunolocalization of synexin (annexin VII) in adrenal chromaffin granules and chromaffin cells: evidence for a dynamic role in the secretory process." *Cell Tissue Res* 269(2): 323-30.
- Kurzchalia, T. V. and R. G. Parton (1999). "Membrane microdomains and caveolae." *Curr Opin Cell Biol* 11(4): 424-31.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
- Lange, Y., J. Ye, et al. (2000). "Cholesterol movement in Niemann-Pick type C cells and in cells treated with amphiphiles." *J Biol Chem* 275(23): 17468-75.
- Lanzetti, L., V. Rybin, et al. (2000). "The Eps8 protein coordinates EGF receptor signalling through Rac and trafficking through Rab5." *Nature* 408(6810): 374-7.
- Lavialle, F., D. Rainteau, et al. (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(1): 83-94.
- Lawe, D. C., V. Patki, et al. (2000). "The FYVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 binding. Critical role of this dual interaction for endosomal localization." *J Biol Chem* 275(5): 3699-705.
- Lawn, R. M., D. P. Wade, et al. (1999). "The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway." *J Clin Invest* 104(8): R25-31.
- Le Cabec, V. and I. Maridonneau-Parini (1994). "Annexin 3 is associated with cytoplasmic granules in neutrophils and monocytes and translocates to the plasma membrane in activated cells." *Biochem J* 303 (Pt 2): 481-7.
- Lewit-Bentley, A., S. Rety, et al. (2000). "S100-annexin complexes: some insights from structural studies." *Cell Biol Int* 24(11): 799-802.
- Lin, H. C., M. S. Moore, et al. (1991). "Reconstitution of clathrin-coated pit budding from plasma membranes." *J Cell Biol* 114(5): 881-91.
- Lin, H. C., T. C. Sudhof, et al. (1992). "Annexin VI is required for budding of clathrin-coated pits." *Cell* 70(2): 283-91.
- Lin, R. C. and R. H. Scheller (1997). "Structural organization of the synaptic exocytosis core complex." *Neuron* 19(5): 1087-94.

- Liscum, L. (2000). "Niemann-Pick type C mutations cause lipid traffic jam." *Traffic* 1(3): 218-25.
- Liscum, L. and J. R. Faust (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(20): 11796-806.
- Liscum, L. and N. J. Munn (1999). "Intracellular cholesterol transport." *Biochim Biophys Acta* 1438(1): 19-37.
- Liu, J. P., K. A. Powell, et al. (1994). "Dynamin I is a Ca(2+)-sensitive phospholipid-binding protein with very high affinity for protein kinase C." *J Biol Chem* 269(33): 21043-50.
- Liu, L., A. B. Fisher, et al. (1995). "Lung annexin II promotes fusion of isolated lamellar bodies with liposomes." *Biochim Biophys Acta* 1259(2): 166-72.
- Lombardi, D., T. Soldati, et al. (1993). "Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network." *Embo J* 12(2): 677-82.
- Lorkowski, S., M. Kratz, et al. (2001). "Expression of the ATP-binding cassette transporter gene ABCG1 (ABC8) in Tangier disease." *Biochem Biophys Res Commun* 283(4): 821-30.
- Lorkowski, S., S. Rust, et al. (2001). "Genomic sequence and structure of the human ABCG1 (ABC8) gene." *Biochem Biophys Res Commun* 280(1): 121-31.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* 193(1): 265-75.
- Mahley, R. W. and Z. S. Ji (1999). "Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E." *J Lipid Res* 40(1): 1-16.
- Mailliard, W. S., H. T. Haigler, et al. (1996). "Calcium-dependent binding of S100C to the N-terminal domain of annexin I." *J Biol Chem* 271(2): 719-25.
- Malhotra, V., L. Orci, et al. (1988). "Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack." *Cell* 54(2): 221-7.
- Marks, M. S., L. Woodruff, et al. (1996). "Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components." *J Cell Biol* 135(2): 341-54.
- Massey, D., V. Traverso, et al. (1991). "Lipocortin IV is a basolateral cytoskeleton constituent of rabbit enterocytes." *J Biol Chem* 266(5): 3125-30.
- Massey-Harroche, D., V. Traverso, et al. (1995). "Changes in expression and subcellular localization of annexin IV in rabbit kidney proximal tubule cells during primary culture." *J Cell Physiol* 165(2): 313-22.
- Matsuo, H., J. Chevallier, et al. (2004). "Role of LBPA and Alix in Multivesicular Liposome Formation and Endosome Organization." *Science* 303: 531-534.
- Maxfield, F. R. and T. E. McGraw (2004). "Endocytic recycling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(2): 121-32.
- Maxfield, F. R. and D. Wustner (2002). "Intracellular cholesterol transport." *J Clin Invest* 110(7): 891-8.
- Mayran, N., R. G. Parton, et al. (2003). "Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells." *Embo J* 22(13): 3242-53.
- Mayran, N., V. Traverso, et al. (1996). "Cellular and subcellular localizations of annexins I, IV, and VI in lung epithelia." *Am J Physiol* 270(5 Pt 1): L863-71.
- McGraw, T. E. and F. R. Maxfield (1990). "Human transferrin receptor internalization is partially dependent upon an aromatic amino acid on the cytoplasmic domain." *Cell Regul* 1(4): 369-77.
- McLauchlan, H., J. Newell, et al. (1998). "A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits." *Curr Biol* 8(1): 34-45.
- Menell, J. S., G. M. Cesarman, et al. (1999). "Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia." *N Engl J Med* 340(13): 994-1004.
- Merkel, M., J. Heeren, et al. (2002). "Inactive lipoprotein lipase (LPL) alone increases selective cholesterol ester uptake in vivo, whereas in the presence of active LPL it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake." *J Biol Chem* 277(9): 7405-11.
- Mizutani, A., N. Usuda, et al. (1992). "CAP-50, a newly identified annexin, localizes in nuclei of cultured fibroblast 3Y1 cells." *J Biol Chem* 267(19): 13498-504.
- Mizutani, A., N. Watanabe, et al. (1995). "The long amino-terminal tail domain of annexin XI is necessary for its nuclear localization." *Arch Biochem Biophys* 318(1): 157-65.
- Monier, S., D. J. Dietzen, et al. (1996). "Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol." *FEBS Lett* 388(2-3): 143-9.
- Morgan, R. O. and M. P. Fernandez (1997). "Annexin gene structures and molecular evolutionary genetics." *Cell Mol Life Sci* 53(6): 508-15.
- Movitz, C., C. Sjolín, et al. (1999). "Cleavage of annexin I in human neutrophils is mediated by a membrane-localized metalloprotease." *Biochim Biophys Acta* 1416(1-2): 101-8.

- Mukherjee, S., R. N. Ghosh, et al. (1997). "Endocytosis." *Physiol Rev* 77(3): 759-803.
- Nakata, T., K. Sobue, et al. (1990). "Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry." *J Cell Biol* 110(1): 13-25.
- Neufeld, E. B., A. M. Cooney, et al. (1996). "Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin." *J Biol Chem* 271(35): 21604-13.
- Neufeld, E. B., S. J. Demosky, Jr., et al. (2002). "The ABCA1 transporter functions on the basolateral surface of hepatocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 297(4): 974-9.
- Neufeld, E. B., A. T. Remaley, et al. (2001). "Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter." *J Biol Chem* 276(29): 27584-90.
- Neufeld, E. B., J. A. Stonik, et al. (2004). "The ABCA1 transporter modulates late endocytic trafficking: insights from the correction of the genetic defect in Tangier disease." *J Biol Chem* 279(15): 15571-8.
- Neufeld, E. B., M. Wastney, et al. (1999). "The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo." *J Biol Chem* 274(14): 9627-35.
- Nielsen, E., S. Christoforidis, et al. (2000). "Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain." *J Cell Biol* 151(3): 601-12.
- Nielsen, E., F. Severin, et al. (1999). "Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules." *Nat Cell Biol* 1(6): 376-82.
- Oling, F., W. Bergsma-Schutter, et al. (2001). "Trimers, dimers of trimers, and trimers of trimers are common building blocks of annexin a5 two-dimensional crystals." *J Struct Biol* 133(1): 55-63.
- Olivecrona, T., G. Liu, et al. (1993). "Regulation of lipoprotein lipase." *Biochem Soc Trans* 21(2): 509-13.
- Oram, J. F. and S. Yokoyama (1996). "Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids." *J Lipid Res* 37(12): 2473-91.
- Ortega, D., A. Pol, et al. (1998). "Annexin VI defines an apical endocytic compartment in rat liver hepatocytes." *J Cell Sci* 111 (Pt 2): 261-9.
- Oyler, G. A., G. A. Higgins, et al. (1989). "The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations." *J Cell Biol* 109(6 Pt 1): 3039-52.
- Patel, S. C., S. Suresh, et al. (1999). "Localization of Niemann-Pick C1 protein in astrocytes: implications for neuronal degeneration in Niemann-Pick type C disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4): 1657-62.
- Pelchen-Matthews, A., J. E. Armes, et al. (1991). "Differential endocytosis of CD4 in lymphocytic and nonlymphocytic cells." *J Exp Med* 173(3): 575-87.
- Pelletier, R. M. and M. L. Vitale (1994). "Filipin vs enzymatic localization of cholesterol in guinea pig, mink, and mallard duck testicular cells." *J Histochem Cytochem* 42(12): 1539-54.
- Pevsner, J., S. C. Hsu, et al. (1994). "Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex." *Neuron* 13(2): 353-61.
- Pfeffer, S. R. (2001). "Membrane transport: retromer to the rescue." *Curr Biol* 11(3): R109-11.
- Poirier, M. A., J. C. Hao, et al. (1998). "Protease resistance of syntaxin.SNAP-25.VAMP complexes. Implications for assembly and structure." *J Biol Chem* 273(18): 11370-7.
- Poirier, M. A., W. Xiao, et al. (1998). "The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle." *Nat Struct Biol* 5(9): 765-9.
- Pons, M., T. Grewal, et al. (2001). "Evidence for the Involvement of annexin 6 in the trafficking between the endocytic compartment and lysosomes." *Exp Cell Res* 269(1): 13-22.
- Pons, M., G. Ihrke, et al. (2000). "Late endocytic compartments are major sites of annexin VI localization in NRK fibroblasts and polarized WIF-B hepatoma cells." *Exp Cell Res* 257(1): 33-47.
- Putney, J. W., Jr. (1999). "'Kissin' cousins": intimate plasma membrane-ER interactions underlie capacitative calcium entry." *Cell* 99(1): 5-8.
- Rand, J. H. (2000). "The annexinopathies: a new category of diseases." *Biochim Biophys Acta* 1498(2-3): 169-73.
- Rand, J. H., X. X. Wu, et al. (1997). "Antiphospholipid immunoglobulin G antibodies reduce annexin-V levels on syncytiotrophoblast apical membranes and in culture media of placental villi." *Am J Obstet Gynecol* 177(4): 918-23.
- Rand, J. H., X. X. Wu, et al. (2004). "Detection of antibody-mediated reduction of annexin A5 anticoagulant activity in plasmas of patients with the antiphospholipid syndrome." *Blood* 104(9): 2783-90.
- Rand, J. H., X. X. Wu, et al. (2003). "Human monoclonal antiphospholipid antibodies disrupt the annexin A5 anticoagulant crystal shield on phospholipid bilayers: evidence from atomic force microscopy and functional assay." *Am J Pathol* 163(3): 1193-200.

- Rawson, R. B., N. G. Zelenski, et al. (1997). "Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs." *Mol Cell* 1(1): 47-57.
- Raynal, P. and H. B. Pollard (1994). "Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins." *Biochim Biophys Acta* 1197(1): 63-93.
- Rety, S., D. Osterloh, et al. (2000). "Structural basis of the Ca(2+)-dependent association between S100C (S100A11) and its target, the N-terminal part of annexin I." *Structure Fold Des* 8(2): 175-84.
- Rety, S., J. Sopkova, et al. (1999). "The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide." *Nat Struct Biol* 6(1): 89-95.
- Rice, L. M. and A. T. Brunger (1999). "Crystal structure of the vesicular transport protein Sec17: implications for SNAP function in SNARE complex disassembly." *Mol Cell* 4(1): 85-95.
- Rietveld, A. and K. Simons (1998). "The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts." *Biochim Biophys Acta* 1376(3): 467-79.
- Robinson, M. S. and B. M. Pearse (1986). "Immunofluorescent localization of 100K coated vesicle proteins." *J Cell Biol* 102(1): 48-54.
- Rohlmann, A., M. Gotthardt, et al. (1998). "Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants." *J Clin Invest* 101(3): 689-95.
- Rosengarth, A., A. Wintergalen, et al. (1998). "Ca²⁺-independent interaction of annexin I with phospholipid monolayers." *FEBS Lett* 438(3): 279-84.
- Ross, M., V. Gerke, et al. (2003). "Membrane composition affects the reversibility of annexin A2t binding to solid supported membranes: a QCM study." *Biochemistry* 42(10): 3131-41.
- Rothman, J. E. and S. L. Schmid (1986). "Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles." *Cell* 46(1): 5-9.
- Rubino, M., M. Miaczynska, et al. (2000). "Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes." *J Biol Chem* 275(6): 3745-8.
- Rubinstein, A., J. C. Gibson, et al. (1985). "Effect of heparin-induced lipolysis on the distribution of apolipoprotein e among lipoprotein subclasses. Studies with patients deficient in hepatic triglyceride lipase and lipoprotein lipase." *J Clin Invest* 75(2): 710-21.
- Rust, S., M. Rosier, et al. (1999). "Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1." *Nat Genet* 22(4): 352-5.
- Sakai, J., E. A. Duncan, et al. (1996). "Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment." *Cell* 85(7): 1037-46.
- Sakai, J., A. Nohturfft, et al. (1998). "Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies." *J Biol Chem* 273(10): 5785-93.
- Sakai, J., R. B. Rawson, et al. (1998). "Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells." *Mol Cell* 2(4): 505-14.
- Scales, S. J. et al. (2000). "SNAREs contribute to the specificity of membrane fusion." *Neuron* 26: 457-464.
- Scherer, P. E., T. Okamoto, et al. (1996). "Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1): 131-5.
- Schroeder, F., A. A. Frolov, et al. (1996). "Recent advances in membrane cholesterol domain dynamics and intracellular cholesterol trafficking." *Proc Soc Exp Biol Med* 213(2): 150-77.
- Seemann, J., K. Weber, et al. (1996). "Structural requirements for annexin I-S100C complex-formation." *Biochem J* 319 (Pt 1): 123-9.
- Seemann, J., K. Weber, et al. (1996). "The association of annexin I with early endosomes is regulated by Ca²⁺ and requires an intact N-terminal domain." *Mol Biol Cell* 7(9): 1359-74.
- Selbert, S., P. Fischer, et al. (1995). "Expression and localization of annexin VII (synexin) in muscle cells." *J Cell Sci* 108 (Pt 1): 85-95.
- Senda, T., T. Okabe, et al. (1994). "Quick-freeze, deep-etch visualization of exocytosis in anterior pituitary secretory cells: localization and possible roles of actin and annexin II." *Cell Tissue Res* 277(1): 51-60.
- Severs, N. J. and H. L. Simons (1983). "Failure of filipin to detect cholesterol-rich domains in smooth muscle plasma membrane." *Nature* 303(5918): 637-8.
- Simons, K. and D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." *Nat Rev Mol Cell Biol*

- 1(1): 31-9.
- Simonsen, A., R. Lippe, et al. (1998). "EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion." *Nature* 394(6692): 494-8.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." *Science* 175(23): 720-31.
- Smith, J. R., T. F. Osborne, et al. (1990). "Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene." *J Biol Chem* 265(4): 2306-10.
- Smith, P. D., A. Davies, et al. (1994). "Structure of the human annexin VI gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(7): 2713-7.
- Smythe, E., P. D. Smith, et al. (1994). "Endocytosis occurs independently of annexin VI in human A431 cells." *J Cell Biol* 124(3): 301-6.
- Soccio, R. E., R. M. Adams, et al. (2002). "The cholesterol-regulated StarD4 gene encodes a StAR-related lipid transfer protein with two closely related homologues, StarD5 and StarD6." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(10): 6943-8.
- Soldati, T., A. D. Shapiro, et al. (1994). "Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange." *Nature* 369(6475): 76-8.
- Sollner, T., M. K. Bennett, et al. (1993). "A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion." *Cell* 75(3): 409-18.
- Spector, A. A. and M. A. Yorek (1985). "Membrane lipid composition and cellular function." *J Lipid Res* 26(9): 1015-35.
- Spreca, A., M. G. Rambotti, et al. (1992). "Immunocytochemical localization of annexin V (CaBP33), a Ca(2+)-dependent phospholipid- and membrane-binding protein, in the rat nervous system and skeletal muscles and in the porcine heart." *J Cell Physiol* 152(3): 587-98.
- Stenmark, H. and R. Aasland (1999). "FYVE-finger proteins--effectors of an inositol lipid." *J Cell Sci* 112 (Pt 23): 4175-83.
- Stenmark, H., R. Aasland, et al. (1996). "Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger." *J Biol Chem* 271(39): 24048-54.
- Stenmark, H., G. Vitale, et al. (1995). "Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion." *Cell* 83(3): 423-32.
- Stocco, D. M. (2001). "StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis." *Annu Rev Physiol* 63: 193-213.
- Stoorvogel, W., V. Oorschot, et al. (1996). "A novel class of clathrin-coated vesicles budding from endosomes." *J Cell Biol* 132(1-2): 21-33.
- Sudhof, T. C., D. W. Russell, et al. (1987). "42 bp element from LDL receptor gene confers end-product repression by sterols when inserted into viral TK promoter." *Cell* 48(6): 1061-9.
- Tabas, I. (1995). "The stimulation of the cholesterol esterification pathway by atherogenic lipoproteins in macrophages." *Curr Opin Lipidol* 6(5): 260-8.
- Tagoe, C. E., C. M. Boustead, et al. (1994). "Characterization and immunolocalization of rat liver annexin VI." *Biochim Biophys Acta* 1192(2): 272-80.
- Takahashi, Y. and J. D. Smith (1999). "Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 11358-63.
- Tall, A. R., X. Jiang, et al. (2000). "1999 George Lyman Duff memorial lecture: lipid transfer proteins, HDL metabolism, and atherogenesis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(5): 1185-8.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4.
- Trigatti, B. and A. Rigotti (2000). "Scavenger receptor class B type I (SR-BI) and high-density lipoprotein metabolism: recent lessons from genetically manipulated mice." *Int J Tissue React* 22(2-3): 29-37.
- Trimble, W. S., D. M. Cowan, et al. (1988). "VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(12): 4538-42.
- Trischler, M., W. Stoorvogel, et al. (1999). "Biochemical analysis of distinct Rab5- and Rab11-positive endosomes along the transferrin pathway." *J Cell Sci* 112 (Pt 24): 4773-83.
- Turpin, E., F. Russo-Marie, et al. (1998). "In adrenocortical tissue, annexins II and VI are attached to clathrin coated vesicles in a calcium-independent manner." *Biochim Biophys Acta* 1402(2): 115-30.
- Uittenbogaard, A., W. V. Everson, et al. (2002). "Cholesteryl ester is transported from caveolae to internal membranes as part of a caveolin-annexin II lipid-protein complex." *J Biol Chem* 277(7): 4925-31.

- Ullrich, O., H. Horiuchi, et al. (1994). "Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange." *Nature* 368(6467): 157-60.
- Ullrich, O., S. Reinsch, et al. (1996). "Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome." *J Cell Biol* 135(4): 913-24.
- Urade, R., Y. Hayashi, et al. (1988). "Endosomes differ from plasma membranes in the phospholipid molecular species composition." *Biochim Biophys Acta* 946(1): 151-63.
- Urbani, L. and R. D. Simoni (1990). "Cholesterol and vesicular stomatitis virus G protein take separate routes from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane." *J Biol Chem* 265(4): 1919-23.
- van Deurs, B., P. K. Holm, et al. (1993). "Multivesicular bodies in HEp-2 cells are maturing endosomes." *Eur J Cell Biol* 61(2): 208-24.
- van Weert, A. W., K. W. Dunn, et al. (1995). "Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump." *J Cell Biol* 130(4): 821-34.
- Venkateswaran, A., J. J. Repa, et al. (2000). "Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols." *J Biol Chem* 275(19): 14700-7.
- Vishwanatha, J. K., R. G. Davis, et al. (1998). "Annexin I degradation in bronchoalveolar lavage fluids from healthy smokers: a possible mechanism of inflammation." *Clin Cancer Res* 4(10): 2559-64.
- von Eckardstein, A., J. R. Nofer, et al. (2001). "High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(1): 13-27.
- Wang, L. H., T. C. Sudhof, et al. (1995). "The appendage domain of alpha-adaptin is a high affinity binding site for dynamin." *J Biol Chem* 270(17): 10079-83.
- Wang, N., D. Lan, et al. (2004). "ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(26): 9774-9.
- Watanabe, T., M. Inui, et al. (1994). "Annexin VI-binding proteins in brain. Interaction of annexin VI with a membrane skeletal protein, caldesmon (brain spectrin or fodrin)." *J Biol Chem* 269(26): 17656-62.
- Weinman, J. S., J. M. Feinberg, et al. (1994). "Annexins in rat enterocyte and hepatocyte: an immunogold electron-microscope study." *Cell Tissue Res* 278(2): 389-97.
- Weng, X., H. Luecke, et al. (1993). "Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution." *Protein Sci* 2(3): 448-58.
- Whitehead, T. P., L. J. Kricka, et al. (1979). "Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory." *Clin Chem* 25(9): 1531-46.
- Wice, B. M. and J. I. Gordon (1992). "A strategy for isolation of cDNAs encoding proteins affecting human intestinal epithelial cell growth and differentiation: characterization of a novel gut-specific N-myristoylated annexin." *J Cell Biol* 116(2): 405-22.
- Yang, B., L. Gonzalez, Jr., et al. (1999). "SNARE interactions are not selective. Implications for membrane fusion specificity." *J Biol Chem* 274(9): 5649-53.
- Yu, R. C., P. I. Hanson, et al. (1998). "Structure of the ATP-dependent oligomerization domain of N-ethylmaleimide sensitive factor complexed with ATP." *Nat Struct Biol* 5(9): 803-11.
- Zaks, W. J. and C. E. Creutz (1991). "Ca²⁺-dependent annexin self-association on membrane surfaces." *Biochemistry* 30(40): 9607-15.
- Zanotti, G., G. Malpeli, et al. (1998). "Structure of the trigonal crystal form of bovine annexin IV." *Biochem J* 329 (Pt 1): 101-6.
- Zerial, M. and H. McBride (2001). "Rab proteins as membrane organizers." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2): 107-17.
- Zeuschner, D., W. Stoorvogel, et al. (2001). "Association of annexin 2 with recycling endosomes requires either calcium- or cholesterol-stabilized membrane domains." *Eur J Cell Biol* 80(8): 499-507.
- Zhang, M., N. K. Dwyer, et al. (2001). "Sterol-modulated glycolipid sorting occurs in niemann-pick C1 late endosomes." *J Biol Chem* 276(5): 3417-25.
- Zobiack, N., U. Rescher, et al. (2003). "The annexin 2/S100A10 complex controls the distribution of transferrin receptor-containing recycling endosomes." *Mol Biol Cell* 14(12): 4896-908.

8. Danksagung

Mein großer Dank gilt dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II sowie ihrer Direktorin Ulrike Beisiegel, die es mir mit der Vergabe dieser Dissertationsarbeit ermöglichte, an diesem interessanten Thema in einer offenen und unkomplizierten Atmosphäre zu arbeiten. Ebenso bedanke ich mich bei allen Institutsmitarbeitern, im besonderen Maße bei Walter Tauscher, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen und es mir ermöglichten, mich in die Arbeitsgruppe einzubringen.

Dankbar bin ich meinem Betreuer Thomas Grewal für seine sorgfältige und geduldige Unterstützung. Wie wertvoll seine Unterstützung war, lässt sich schwer in wenigen Worten zusammenfassen. Nur soviel: Es gibt wohl kaum einen Betreuer, der ebenso rückhaltlos und verantwortungsbewusst seinen Studenten gegenüber steht. Dass er mir darüber hinaus einige Volleyball- und Fussballweisheiten aus Köln näher brachte, spricht nur für die Qualität unserer Zusammenarbeit.

Zum Entstehen dieser Arbeit haben natürlich noch mehr Menschen beigetragen: So danke ich meinen Eltern Annemarie und Wilhelm, weiterhin Ingrid, Erhard, Martin und Christoph. Als einen besonderen familiären Bezugspunkt hebe ich meine Schwester Yvonne hervor, die ihren jüngeren Bruder ausnahmslos zu unterstützen weiß.

Ich bedanke mich bei meinen Freunden, mit denen mich all das verbindet, was mir besonders wertvoll ist. Mein besonderer Dank gilt Ingo, der mir eine große Hilfe bei den Anfängen der schriftlichen Ausarbeitung war.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Schröder und der gesamten Familie Ehmann bedanken, die mir mit ihrer großen Lebensfreude in jederlei Hinsicht Unterstützung und Hilfe boten. Mit ihrem Motivationsvermögen trug Frau Ehmann ganz wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit bei.

Zum Schluß möchte ich mich nochmals und gesondert bei meiner Mutter Annemarie bedanken. Bei allen zeitlichen und familiären Wandlungen gab Sie mir Halt und Orientierung und bemühte sich stets bei meiner Erziehung, mir die größtmögliche Freiheit einzuräumen.

9. Lebenslauf

Name: Paul Dauterstedt
 Geburtsdaten: 28.03.1977 in Dresden
 Familienstand: ledig

Schulbildung/Wehrdienst

1983 – 1993 Grundschule und Gymnasium Kreuzschule in Dresden
 1993 – 1996 Gymnasium Bondenwald in Hamburg
 1996 – 1997 Wachbataillon BMVg in Bonn

Studium

10/1997 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
 05/2004 Beendigung des Studiums an der Universität Hamburg mit dem 3. Staatsexamen (Note 2)

2000 – 2001 Studium an der Karl – Franzens – Universität Graz / Österreich

2001 – 2002 Studium an der Université Victor Segalen Bordeaux / Frankreich

Wissenschaftliche Ausbildung

05/2001 Beginn der Promotionsarbeit zum Thema „Regulation der Bindung von Annexin 6 an endosomale Membranen“ am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie (Direktorin: Frau Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. U. Beisiegel) der Universität Hamburg

Berufliche Ausbildung

03/2005 Assistenzarzt an der Medizinischen Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum / Knappschafts Krankenhaus Bochum (Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmiegel)

10. Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich und 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.

Paul Dauterstedt