

Aus der Abteilung Molekulare Zellbiologie  
des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie  
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Direktorin Prof. Dr. rer.physiol., Dr. h.c. U. Beisiegel

LDL-Cholesterin als potentieller Regulator der Cholesterin-induzierbaren

Bindung von Annexin 6 an späte Endosomen

## **D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Heide Strosina

aus Berlin

Hamburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 26.Januar 2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

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

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

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. Dipl.-Biochem. J. Heeren

# Inhaltsverzeichnis

**Arbeitshypothese**.....Seite 1

## 1. Einleitung

### 1.1 Lipoproteinstoffwechsel

1.1.1 Lipoproteine..... 2

1.1.2 Lipoproteinrezeptoren..... 3

1.1.2.1 LDL-Rezeptor..... 4

1.1.2.2 LDL-Receptor-related-protein..... 6

1.1.2.3 Megalin/Gp 330..... 7

1.1.2.4 VLDL-Rezeptor..... 7

### 1.1.3 Exogener und Endogener Lipidstoffwechsel

1.1.3.1 Exogener Lipidstoffwechsel..... 9

1.1.3.2 Endogener Lipidstoffwechsel..... 9

### 1.1.4 Endozytose

1.1.4.1 Rezeptor-vermittelte-Endozytose..... 11

### 1.1.5 Intrazellulärer Cholesterintransport..... 16

1.1.5.1 Cholesterin in lipid rafts..... 18

1.1.5.2 Reverser Cholesterin-Transport..... 19

1.1.5.3 ABCA 1..... 20

1.1.5.4 SRB 1..... 21

### 1.2 Regulation des endosomalen Membrantransportes

1.2.1 Vesikeltransport..... 22

1.2.2 Rab-Proteinfamilie..... 23

1.2.2.1 Rab 5..... 24

### 1.3 Annexine und Membrantransport

1.3.1 Rolle von Annexinen in Zellen..... 25

1.3.2 Annexine und Phospholipide..... 27

1.3.3 Regulierende Rolle von Annexin 6 im Membranverkehr..... 29

1.3.4 Interaktion von Annexin 2 mit Cholesterin..... 31

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagentien..... 34

2.1.2 Primäre Antikörper..... 35

2.1.3 Sekundäre Antikörper.....	35
2.1.4 Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz.....	36
2.1.5 Verbrauchsmaterialien.....	36
2.1.6 Geräte.....	37
2.2 Methoden	
2.2.1 Zellkultur.....	37
2.2.1.1 Pflege der Zellkultur.....	38
2.2.1.2 Ausplattieren von Zellen.....	38
2.2.1.3 Einfrieren von Zellen.....	38
2.2.1.4 Auftauen von Zellen.....	39
2.2.1.5 Cholesterinanreicherung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .....	39
2.2.2 Membranpräparation.....	40
2.2.2.1 Herstellung von perinucleärem Überstand.....	40
2.2.2.2 Triton X Solubisierung.....	41
2.2.3 Endosomenpräparation.....	42
2.2.3.1 Gradienten schichten.....	42
2.2.3.2 Aufkonzentrierung endosomaler Membranen.....	42
2.2.3.3 Proteinmessung nach Lowry.....	43
2.2.3.4 LDL Aufreinigung.....	44
2.2.3.5 Dialyse von Proben.....	44
2.2.4 SDS Page nach Laemmli (1970).....	45
2.2.4.1 Probenvorbereitung.....	47
2.2.4.2 Westernblot.....	48
2.2.4.3 Immunoblot.....	49
2.2.4.4 Strippen von Nitrocellulose Membranen.....	50
2.2.5 Silberfärbung.....	50
2.2.6 Immunfluoreszenz	
2.2.6.1 Beschichtung von Coverslips.....	51
2.2.6.2 Fixierung und Antigenmarkierung.....	51
2.2.7 Beta-Hexosaminidase Aktivitätsmessung.....	52
2.2.8 Cholesterin Bestimmung.....	53
2.2.9 Phospholipid Bestimmung.....	54
2.2.10 HPLC.....	54
2.2.11 Dünnschicht Chromatographie.....	55

### **3 Ergebnisse**

3.1 Etablierung eines experimentellen Systems zur Akkumulation von Cholesterin in Endosomen.....	56
3.2 Charakterisierung von frühen und späten Endosomen (+) U18666A	
3.2.1 Messung der Beta-Hexosaminidase Aktivität.....	65
3.2.2 Messung des Phospholipidgehaltes.....	67
3.3 Vergleichende Analyse der Lokalisation von Annexin 6 in +/- U18666A behandelten Zellen.....	68
3.4 Bindungsaffinität von bakteriell exprimiertem Annexin 6 an Membranen aus LDL-beladenen Zellen.....	72
3.4.1 Silberfärbung der GST Proteine.....	72
3.4.2 GSTanx6 Bindung an Membranen aus CHO-WT Zellen.....	73
3.4.3 GST und GSTanx6 Bindung an CHO-WT Endosomen +/- LDL Inkubation.....	74
3.5 Einfluss von LDL auf die Bindung von Annexin 6.....	76
3.5.1 Einfluss von LDL und Calcium auf früh-endosomale Proteine.....	78
3.6 Bindungsstudien mit der Deletionsmutante GSTanx6 <sub>1-175</sub> .....	79
3.7 Cholesterinentzug reduziert die Affinität von Annexin 6 an Membranen.....	85
3.8 Einfluss von Annexin 6 auf die Lokalisation von HDL-Rezeptoren.....	87

### **4 Diskussion**

4.1 Einfluss von U18666A auf den Cholesterin Haushalt.....	90
4.2 Einfluss von Cholesterin auf die Lokalisation von Annexin 6.....	92
4.2.1 Molekulare Mechanismen zur Translokation von Annexin 6 in späte Endosomen	
4.2.1.1 Rolle von Cholesterin.....	95
4.3 Cholesterineinfluss auf die Membranaffinität von Annexin 6.....	98
4.4 Veränderte Lokalisation von SRB 1 in CHOanx6 Zellen.....	102

<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>104</b>
-------------------------------	------------

<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>105</b>
------------------------------------	------------

**7 Abbildungsverzeichnis.....127**

**8 Abkürzungsverzeichnis.....129**

**Veröffentlichungen**

**Danksagung**

**Lebenslauf**

**Erklärung**

## Arbeitshypothese und Zielsetzung

Annexin 6 stimuliert an der Zelloberfläche die LDL-Rezeptor- vermittelte Endocytose und vermittelt innerhalb des endosomalen Membranverkehrs das "Targeting" von LDL entlang des degradativen Weges in die Lysosomen. Dabei kommt es während der Internalisierung von LDL zu einer Translokation von Annexin 6 in späte endosomale Kompartimente. Alle Mitglieder der Annexinfamilie, so auch Annexin 6, binden Calcium- abhängig an membranständige, negativ geladene Phospholipide. Neuere *in vitro* Bindungsstudien weisen auf einen Einfluss von Cholesterin auf die Membranaffinität von Annexin 6 hin. Gemeinsam mit der LDL-induzierten Translokation von Annexin 6 deutet dies darauf hin, dass Cholesterin als Hauptbestandteil von LDL maßgeblich an der verstärkten Assoziation von Annexin 6 mit späten endosomalen Membranen beteiligt ist. Deshalb soll in dieser Arbeit der mögliche Einfluss von LDL-Cholesterin auf die Lokalisation von Annexin 6 untersucht werden.

Dafür wurde zuerst die Membranaffinität von Annexin 6 an Cholesterin-verarmten endosomalen Membranen (mit Hilfe von Digitonin) untersucht. Im Anschluss daran sollte mittels der U18666A-induzierten Akkumulation von Cholesterin in späten Endosomen die Membranassoziation von Annexin 6 an Cholesterin-reichen endosomalen Membranen analysiert werden. Im Anschluss an die Untersuchung U18666A behandelter Zellen sollen Bindungs- und Lokalisationsstudien von Annexin 6 und Annexin 6 Mutanten in LDL-beladenen Zellen dazu beitragen, den molekularen Mechanismus der Interaktion von Annexin 6 mit späten endosomalen Membranen zu verstehen.

# 1 Einleitung

## 1.1 Lipoproteinstoffwechsel

### 1.1.1 Lipoproteine

Bei einer optimalen Ernährung sollte die Fettzufuhr ca. 30-35 % der gesamten Energiezufuhr betragen. Das entspricht ungefähr einem Bedarf von 60g/Tag an Nahrungslipiden. Bei den aufgenommenen Lipiden unterscheidet man zwischen tierischen und pflanzlichen Fetten, wobei die letzteren einen höheren Anteil an ungesättigten und essentiellen Fettsäuren aufweisen. Zu dieser Gruppe gehören die Linolsäure, die Linolensäure und die Arachidonsäure. Die Arachidonsäure kann aus Linolsäure gebildet werden, weshalb sie eng an die essentiellen Fettsäuren geknüpft ist.

Die Nahrungslipide bestehen zum größten Teil aus Triacylglycerinen und Cholesterin. Der Transport der Lipide im Blutplasma erfolgt auf Grund ihrer hydrophoben Eigenschaften gekoppelt an Lipoproteine. Die Unterteilung der Lipoproteine erfolgt in Klassen entsprechend ihrer Dichte (nach Goldstein und Brown, 1985). Danach unterscheidet man Lipoproteine

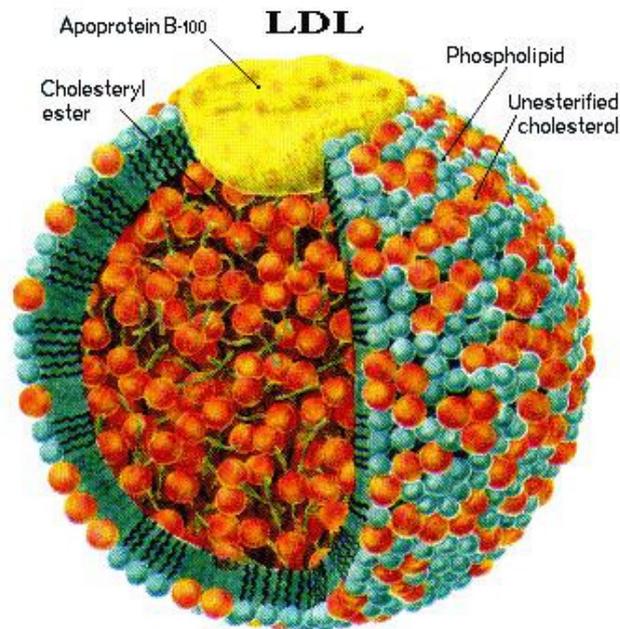
- sehr geringer Dichte (very low density lipoproteins; VLDL),
- geringer Dichte (low density lipoproteins; LDL),
- hoher Dichte (high density lipoproteins; HDL),
- Chylomikronen (mit geringerer Dichte als die VLDL).

Mit zunehmender Dichte ändert sich auch das Lipid/Protein Verhältnis, das heißt die Lipidmenge nimmt ab. Daraus ergibt sich ein Lipid/Protein Verhältnis von:

- 99/1 in Chylomikronen,
- 90/10 in VLDL,
- 78/22 in LDL,
- 50/50 in HDL.

Der größte Teil des Cholesterins wird mit den LDL und HDL transportiert. Die mit den Lipoproteinen assoziierten Apolipoproteine sind spezifisch für jede einzelne Lipoproteinklasse. Die Lipide bilden einen apolaren, hydrophoben Kern der

Lipoproteine, die durch die Umhüllung mit den Apolipoproteinen und Phospholipiden wasserlösliche Eigenschaften erhält und im Blutplasma transportiert werden kann. Jedes Apolipoprotein hat einen speziellen Einfluss auf den Stoffwechsel seiner Lipoproteinklasse. Bisher konnten zehn Apolipoproteine identifiziert werden: Apo A1, Apo A2, Apo A4, Apo B48, Apo B100, Apo C1, Apo C2, Apo C3, Apo D und Apo E.



**Abb 1.1:** Aufbau von Lipoproteinen am Beispiel des LDL-Partikels. Im Zentrum des Partikels befinden sich die Cholesterinester (CE). Umgeben werden sie von dem Apolipoprotein B100, das die Rezeptorbindung vermittelt, sowie Phospholipiden, die durch ihre amphiphilen Helices die Wasserlöslichkeit ermöglichen. Der hydrophile Teil der Kette ragt dabei zur Blutplasmaseite und der hydrophobe Teil ist zum apolaren Kern orientiert. Das freie Cholesterin ragt ebenfalls zur Plasmaseite. Der Aufbau der anderen Lipoproteine ähnelt sich diesem, nur wird die Oberfläche durch andere Apolipoproteine gebildet.

### 1.1.2 Lipoprotein-Rezeptoren

Die Lipoprotein Rezeptoren sind Membranrezeptoren, die bestimmte Lipoproteine binden und deren Aufnahme in die Zelle vermitteln. Aufgrund ihres ähnlichen strukturellen Aufbaus können alle Lipoproteinrezeptoren, die Apo E binden, zu einer Superfamilie, der LDL-Rezeptorfamilie gefasst werden. Die einzelnen Familienmitglieder weisen zum Teil starke Strukturhomologien auf, unterscheiden sich aber in Teilbereichen wie Größe, Aufbau und Bindungspartner. Zur Übersicht seien im Folgenden einige der Rezeptoren dargestellt.

### 1.1.2.1 LDL-Rezeptor

Als erster Lipoproteinrezeptor wurde der LDL-Rezeptor (LDL-R) beschrieben (Brown et al 1979). Er nimmt im Cholesterinstoffwechsel eine zentrale Rolle ein. Aus diesem Grund bekamen Joseph Goldstein und Michael Brown auch für die Strukturaufklärung und die Wirkmechanismen 1985 den Nobelpreis für Medizin.

Der LDL-Rezeptor hat ein Molekulargewicht von 120 kD und besteht aus 839 Aminosäuren. Er ist ein Transmembranprotein, das fünf funktionelle Domänen besitzt. Der extrazelluläre Anteil des LDL-Rezeptors besteht aus drei Domänen, ihm folgt eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne.

Das Aminoende umfasst 292 Aminosäuren. An ihm befinden sich sieben Wiederholungen von 40 Aminosäuren („repeats“). Die Anzahl der repeats ist innerhalb der Rezeptorfamilie variabel. Sie umfasst generell sechs Cysteine, die durch intramolekulare Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. An die Cysteinreste grenzen Aminosäurereste, die negativ geladen sind und die die hoch konservierte Sequenz Ser-Asp-Glu (SDE-) beinhalten. Da diese Sequenz homolog bei verschiedenen Komplementfaktoren existiert, wird sie als „complement type repeat“ bezeichnet. Die gesamte N-terminale Domäne vermittelt die Bindung der Liganden. An ihr befinden sich die Bindungsstellen für die Apolipoproteine B100 (auf VLDL, IDL bzw. LDL) und E (auf Chylomikronen, Remnants, VLDL, IDL). Die Apolipoproteine B100 sind positiv geladen und binden bevorzugt an die repeats 3-7. Apo E bindet vor allem an repeat 5 (Russel et al 1989). Die Kapazität der Apo B100 Bindung an den LDL-R ist sehr viel höher als die Apo E Bindung. LDL Partikel haben ein Apo B100, das die Bindung an den Rezeptor vermittelt. Lipoproteine, die Apo E als Apolipoprotein haben, sind mit mehreren Apo E versehen. Jedes dieser Apo E vermittelt eine Bindung an den LDL-R, wodurch viel mehr Bindungsstellen durch nur ein Lipoprotein besetzt sind. Dadurch ergibt sich bei zwar erhöhter Apo E Affinität zum LDL-R eine geringere Kapazität für dieses Lipoprotein.

Die Vermittlung der Bindung der Apolipoproteine an den Rezeptor erfolgt über ein Cluster positiv geladener Aminosäuren auf den Apolipoproteinen B100 und E, die komplementär zu negativ geladenen Aminosäureabschnitten am Rezeptor passen (Glutamat und Aspartat) (Hospattankar et al 1986 und Weisgraber et al 1983).

Die dem Aminoende folgende zweite extrazelluläre Domäne besteht auch aus Cystein-reichen Wiederholungen und weist starke Homologien zu der Präkursorform des Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) auf. Deswegen werden diese repeats auch „growth factor repeats“ genannt und die Domäne „EGF precursor homology domain“. Zwischen diesen repeats finden sich sog. Bindungsregionen oder „Spacerregionen“, die charakterisiert sind durch das Tetrapeptid Tyr-Trp-Thr-Asp (YWTD). Ihre Aufgabe findet diese Domäne in der intrazellulären, säureinduzierten Dissoziation des Liganden vom Rezeptor (Gray et al 1983). Diese Dissoziation findet in sog. „CURLS“ statt. Das sind „compartment of uncoupling receptor and ligand“. Diese Organellen stellen eine Zwischenform aus endozytotischen Vesikeln nach der Ligandeninternalisation in die Zelle und den Lysosomen dar.

Ihr schließt sich die dritte Domäne an, die noch extrazellulär vor dem Transmembransegment liegt. Sie besteht aus 58 Aminosäuren und ist über O-glycosidische Bindungen mit der Transmembrandomäne verbunden. Ihre Aufgabe ist noch nicht klar, man vermutet, dass sie stützende Funktion des Rezeptors an der Membranoberflächen hat. Die 22 Aminosäuren lange Transmembrandomäne zeigt hydrophobe Eigenschaften und befestigt den Rezeptor an der Membran.

Als intrazelluläre Domäne verbleibt die fünfte Domäne, die C-terminal aus 50 Aminosäuren besteht. Sie kontrolliert die Wechselwirkung des Rezeptors mit „coated pits“ (s.u.) über eine Aminosäuresequenz aus Asp-Pro-Val-Tyr (NPXY). Diese ist essentiell für Internalisierungsvorgänge (Chen et al 1990).

Der Syntheseort des Rezeptors liegt im rauhen endoplasmatischen Retikulum als Präkursor-Form mit einem Gewicht von 120 kD. Seine Prozessierung erfolgt im Golgi-Apparat. Anschließend hat er ein Gewicht von 160 kD. Die Synthesedauer beträgt nur 45 Minuten. Abschließend wird er in richtiger Konformation und voll funktionstüchtig an der Zelloberfläche exprimiert. Seine Lebensdauer beträgt ungefähr einen Tag. Das den Rezeptor codierende Gen hat ein Sterol-reguliertes Element (sre), das die Synthesegeschwindigkeit der mRNA beeinflusst.

Defekte des LDL-Rezeptor-Gens sind Ursache der familiären Hypercholesterinämie. Erkrankte Patienten leiden an stark erhöhtem Plasmacholesterin und LDL mit Folgen für das Herz-Kreislaufsystem (Goldstein et al 1989). Sie versterben früh an koronarer

Herzkrankheit. Es sind bis zu 150 verschiedene Mutationen beschrieben, die einen Defekt am LDL-Rezeptorgen ausmachen (Hobbs et al 1990).

### 1.1.2.2 LDL-Receptor-related-Protein (LRP)

Sowohl Herz et al als auch Beisiegel et al konnten biochemische und strukturelle Verwandtschaft zwischen dem LDL-Rezeptor und dem LDL-Rezeptor-zugehörigen Protein (LRP) identifizieren (Herz et al 1988, Beisiegel et al 1989).

LRP ist ein 600 kD schweres, aus 4544 Aminosäuren bestehendes Protein, mit Ähnlichkeiten zum LDL-Rezeptor und dem EGF Precursor Protein. Die Ähnlichkeiten belaufen sich zum einen in ähnlichen Strukturen an den Liganden-Bindungsstellen, (LDL-R) aber auch in ähnlichen Repeat-Strukturen, wie das EGF Protein sie aufweist. Eine weitere Ähnlichkeit besteht in der „NPXY“-Aminosäuresequenz, die am C-Terminus des LDL-Rezeptors zu finden ist. Sie ist an der Signalgebung zur Einknospung der coated pits zuständig und konnte in doppelter Ausführung im LRP nachgewiesen werden konnte. Herz beschrieb 1990 die Struktur des LRP als Protein, dessen Transmembrandomäne glycosyliert ist. Das Präkursorprotein gelangt in den Golgi-Apparat, in dem es in zwei Untereinheiten geteilt wird. Die größere Untereinheit ist 515 kD schwer und enthält den N-Terminus, während die kleinere Untereinheit mit einer Größe von 85 kD zytoplasmatisch liegt, die Transmembrandomäne enthält und nicht-kovalent an die große Untereinheit gebunden ist. An ihr befindet sich der C-Terminus.

Das LRP ist ein wichtiger multifunktionseller Rezeptor, zu dem sehr viele Forschungsarbeiten vorliegen. Aus diesem Grund soll hier nur eine Übersicht über seine vielfältigen Funktionen gegeben werden. Liganden des LRP sind neben Chylomikronen Remnants, die über Apo E und LpL gebunden werden,  $\alpha_2$  Makroglobulin und Proteasen des Gerinnungssystems (Beisiegel et al 1989, Beisiegel 1991).

### 1.1.2.3 Megalin / Gp 330

Saito et al beschrieben 1994 (Saito et al 1994) den LDL-Rezeptor strukturverwandten Rezeptor gp 330/Megalin. Er besteht aus einer 4660 großen Aminosäure (AS) Sequenz und hat einen ähnlichen Aufbau, wie der LDL-Rezeptor.

Der N-Terminus besteht aus einer 25 AS Sequenz, die, gleich dem LDL-Rezeptor, mit drei cysteinreichen Domänen versehen ist. Weiterhin enthält er vier Cluster als Ligandenbindungsdomänen. Der extrazelluläre Teil besteht aus 4400 AS, ihm folgt eine 22 AS lange Transmembrandomäne und an der cytoplasmatischen Seite ein 213 AS langer C-Terminus. An diesem Teil findet sich auch die Sequenz Asp-Pro-Val-Tyr (NPXY), die, ebenso wie am LDL-Rezeptor, das Signal zu Einknospung der coated pits weiterleitet (Saito et al 1994).

Seine Expression dokumentierte Lundgren (Lundgren et al 1997) in der Nebenschilddrüse, den Cytotrophoblasten der Placenta, proximalen Tubuli der Niere, Epididymides Zellen des Hodens, Typ 2 Pneumocyten der Lunge, Brustdrüsengewebe, Schilddrüsenfollikelzellen sowie im Ciliarkörper des Auges. Ihm konnte eine Calciumsensitivität nachgewiesen werden.

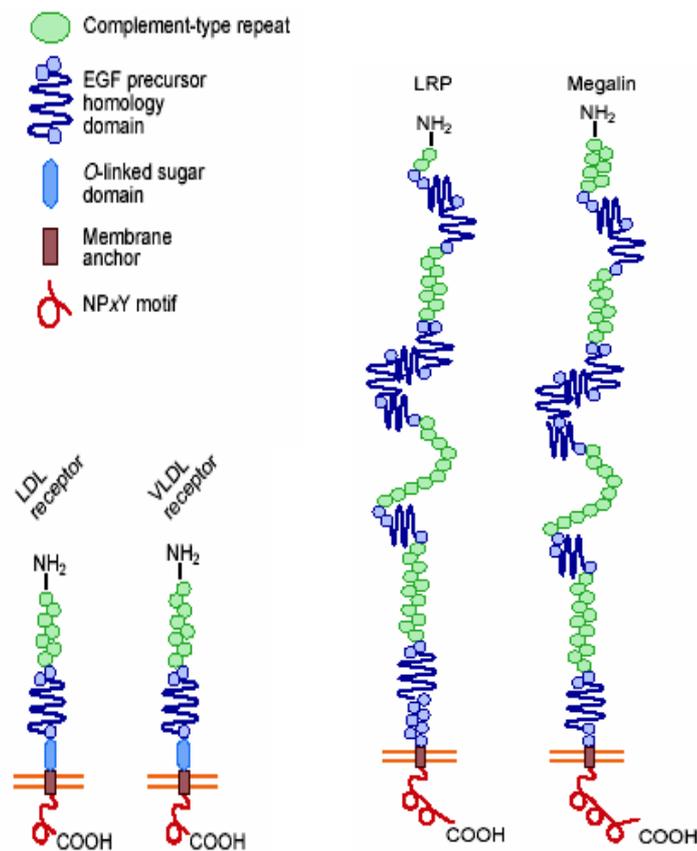
### 1.1.2.4 VLDL-Rezeptor

Der VLDL-Rezeptor (VLDL-R) war der zuerst beschriebene Rezeptor der Lipoproteinrezeptoren. Takahashi klonierte ihn 1992 aus Kaninchenherzen und konnte feststellen, dass er im Kaninchen ausschließlich VLDL- und nicht LDL-Partikel band. Deshalb gab er ihm den Namen VLDL-Rezeptor (Takahashi et al 1992). Er hat die größte Homologie zum LDL-Rezeptor. Der Unterschied besteht in Anzahl der cysteinreichen 40 AS Ligandenbindungsstellen Sequenzen. Der VLDL-R hat acht Bindungsstellen und damit eine mehr als der LDL-R.

Durch seine hochkonservierte Form ist eine große Homologie zwischen den Spezies zu erklären. Zum Beispiel bestehen zwischen der reifen humanen und der Kaninchen-Form 97% Homologie (Sakai et al 1994, Gavfels et al 1993). Seine höchste Expression in menschlichen Geweben ist im Herz, Muskel und Fettgewebe. Alle Gewebe, die als Energielieferanten freie Fettsäuren aufnehmen. (Gavfels et al 1993).

Ähnlich dem LRP ist auch der VLDL-R ein Multiligand-Rezeptor, der Chylomikronen remnants (Niemeier et al 1996), VLDL, IDL (Takahashi et al 1995 et 1992), Urokinase-Typ-1-Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Typ-1-Komplex (Argraves et al 1995, Heegaard et al 1995 ) und Thrombospondin 1 (Mikhailenko et al 1997) bindet.

Durch das Verteilungsmuster, seine Funktion als Multiligand-Rezeptor und seine strukturellen Eigenschaften wird dem VLDL-R eine Funktion im Energiestoffwechsel zugeschrieben (Yamamoto et al 1995). Das konnte durch Frykman et al 1995 unterstützt werden, die zeigen konnten, dass VLDL-R-defiziente Mäuse 50 % weniger Fettgewebe ausbilden, was zu einem 15-20 % niedrigeren BMI (body mass index) führte.



**Abb. 1.2:** Abbildung der beschriebenen Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie nach Th. E. Willnow aus Nature Cell Biology, Oct. 1999. Dargestellt ist im Modell die Struktur der Rezeptoren mit den sich ähnelnden Transmembrandomänen, complement type repeats, der EGF precursor binding homology domain sowie der NPXY Sequenz. Die o-glycosidische Verknüpfung findet sich nur am LDL- und VLDL Rezeptor.

### **1.1.3 Exogener und endogener Lipidstoffwechsel**

#### **1.1.3.1 Exogener Lipidstoffwechsel**

Der exogene Lipidstoffwechsel beschreibt den Transport der durch die Nahrung aufgenommenen Lipide. Dazu gehören vor allem Triacylglyceride und Cholesterin, aber auch Phospholipide und lipophile Vitamine. Die Lipide werden in der Darmmukosa zu großen Lipoproteinpartikeln, den Chylomikronen, verpackt und gemeinsam mit den Apolipoproteinen A1, A2 und B48 durch die Lymphe transportiert. Aus dem Lymphsystem gelangen die Chylomikronen anschließend in das Blutgefäßsystem und werden mit Apo E angereichert. Die Partikel erreichen anschließend extrahepatische Gewebe wie Fettgewebe oder Muskelgewebe, wo die Triglyceride von der Lipoproteinlipase gespalten werden und Chylomikronen remnants entstehen. Die freigesetzten Fettsäuren können internalisiert werden und zur  $\beta$ -Oxidation oder Speicherung genutzt werden. Die cholesterinreichen Chylomikronen remnants gelangen anschließend in die Leber, wo sie in den Lipidstoffwechsel der Leber eingehen.

#### **1.1.3.2 Endogener Lipidstoffwechsel**

Der endogene Lipidstoffwechsel beschreibt den Stoffwechselweg der in der Leber synthetisierten Lipoproteine und beginnt mit der VLDL Synthese in den Hepatozyten. VLDL gehören wie die Chylomikronen zu den triglyceridreichen Lipoproteinen (TRL). Die VLDL enthalten auch endogenes Cholesterin, dessen Synthese im glatten endoplasmatischen Retikulum (sER) abläuft.

Die Beladung der VLDL mit Lipiden und seinem Apolipoprotein erfolgt vermutlich in zwei Schritten (Yao et al 1997; Ginsberg 1997; Kendrick et al 1998). Zunächst wird mit Hilfe des Microsomal Triglycerid Transfer Proteins (MTP) das Apolipoprotein B100 auf eine lipidarme VLDL Vorstufe transferiert (Wetterau et al 1992; Sharp et al 1993; Du et al 1993). Die Triacylglyceride gelangen in Apoprotein-freien Partikeln in das Lumen des sER wo sie mit dem Apolipoprotein zum „kompetenten“ VLDL fusionieren (Higgins 1988; Hamilton 1994). Anschließend gelangt das VLDL in den Golgi-Apparat. Die cholesterin- und triacylreichen VLDL strömen in die Blutbahn und interagieren dort zunächst mit den HDL. Sie werden von ihnen mit den

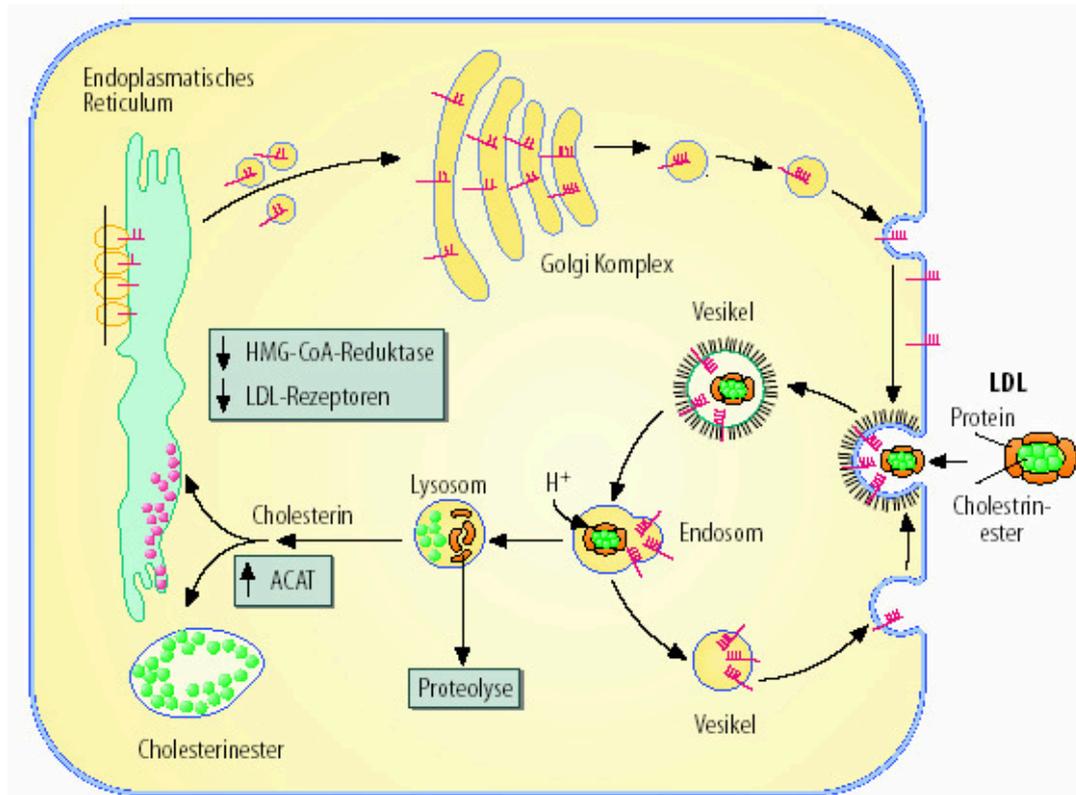
Apolipoproteinen B100 sowie C und E angereichert, die einen Schlüssel zur lipolytischen Spaltung durch die Lipoproteinlipase darstellen (Eisenberg et al 1992; Rubinstein et al 1985). Durch Reaktionen der VLDL mit der Lipoproteinlipase entstehen zunächst IDL (intermediate density lipoprotein) und dann die cholesterinreichen LDL-Partikel. Bei der Hydrolyse verliert der Partikel fast alle Oberflächen-Apoproteine. Dem LDL-Partikel verbleibt nur das Apolipoprotein B100, durch welchen die Bindung des LDL an den LDL-Rezeptor vermittelt wird.

Der LDL-Rezeptor spielt eine zentrale Rolle bei der Cholesterin-Homöostase, weil durch ihn die Aufnahme vom Cholesterinester in die extrahepatische Zielzelle ermöglicht wird (Goldstein et al 1990).

Die Aufnahme des LDL findet, vermittelt durch sein Apolipoprotein B100, durch die Rezeptor-vermittelte Endozytose statt. Nach der coated pit (Einknospung) in die Zelle, gelangt das an den Rezeptor gebundene LDL über verschiedene Zwischenschritte in die Lysosomen. Zunächst erfolgt die Trennung von Rezeptor und Partikel in den sortierenden Endosomen. Das geschieht durch deren sauren pH-Wert. Aus den sortierenden Endosomen gelangt der Rezeptor über die rezyclierenden Endosomen an die Zelloberfläche zurück, wo er erneut LDL binden kann. Der LDL-Partikel gelangt über die späten Endosomen in die Lysosomen, in denen er degradiert wird. Das Apolipoprotein B100 wird durch Proteasen in Aminosäuren abgebaut. Die Cholesterinester werden durch die lysosomale saure Lipase hydrolysiert. Das dabei entstehende freie Cholesterin verlässt das Lysosom und übernimmt im Zytosol regulatorische Aufgaben. Auf Transkriptionsebene reguliert es die Synthese der HMG-CoA-Reduktase (HMG-CoA-R), die der HMG-CoA-Synthase, des LDL-Rezeptors und der Prenyltransferase. Bei geringer intrazellulärer Cholesterin Konzentrationen steigt die Aktivität der HMG-CoA-R und Cholesterin wird in größerer Menge synthetisiert.

Die Regulation des Enzym Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) erfolgt ebenfalls über freies Cholesterin. Durch sie wird das freie Cholesterin wieder verestert und kann in Lipidtropfen gespeichert werden. Die gespeicherten Fettsäuren sind hauptsächlich Oleat und Palmitoleat, also einfach ungesättigte Fettsäuren, wohingegen die in den Cholesterinestern der LDL-Partikel sich hauptsächlich befindliche Fettsäure Linolat eine mehrfach ungesättigte Fettsäure ist. Neben der Funktion der Speicherung des Cholesterins kann das freie unveresterte Cholesterin

auch in die Membranbiosynthese der Zellen verwandt werden oder in entsprechenden Geweben als Vorstufen für die Hormonsynthese.



**Abb.1.3.:** Schematische Darstellung des LDL-Rezeptor mit LDL-Internalisierung und enzymatische Folgereaktion intrazellulär durch frei werdendes Cholesterin. Entnommen aus Löffler Petrides Biochemie und Pathobiochemie 6. Auflage, Kap. 16.5 Transport der Lipide im Blut

## 1.1.4 Endozytose

### 1.1.4.1 Rezeptor-vermittelte Endozytose

Die Aufnahme von Stoffen in das Zytosol kann neben passiver Diffusion und aktivem Transport auch über endozytotische Vorgänge stattfinden. Wichtige Mechanismen sind neben der Phagozytose und Pinozytose die Clathrinabhängige und -unabhängige Endozytose. Hier soll die Rezeptor-vermittelte Endozytose genauer erläutert werden.

Die Rezeptor-vermittelte Endozytose läuft über die Ausbildung von coated pits ab. Diese Vorgänge sind vor allem für den LDL-Rezeptor aber auch beispielsweise den Transferrin Rezeptor beschrieben, die als integrale Membranproteine Teil der

Plasmamembran sind. Eine entscheidende Rolle nimmt dabei das Clathrin ein. Dieses Protein ist ein Dimer, dessen schwere Kette 180 kD und dessen leichte Kette ca. 40 kD wiegt. Drei dieser Proteine lagern sich zu einem Triskelion zusammen, das an den Stellen der Plasmamembran lokalisiert ist, an denen Endozytose abläuft. Diese Areale nennen sich coated pit. Durch die Invagination der Membranen in diesen coated pits werden die Rezeptor-gebundenen Liganden in die Zelle aufgenommen (Kirchhausen 2000). Clathrin-Coated-Vesikel besitzen abhängig von ihrem Entstehungsort Adaptorproteine (AP1 und AP2), die den Liganden-Komplex als weitere Proteinkomponente einhüllen. AP1 stützt den Clathrin-Coated-Vesikel, der aus dem Trans Golgi Netzwerk ausknospt, AP2 stützt eingeschnürte Vesikel aus der Plasmamembran.

Zur Aufnahme von Liganden bildet sich ein Clathrin-gestützter Vesikel, der zunächst tropfenförmig in die Zelle hineinhängt. Hier tritt jetzt die GTPase Dynamin in Kraft, die den Verbindungssteg zwischen Clathrin-Coated-Vesikel und Plasmamembran durch ihre hydrolytische Aktivität trennt und den Vesikel in die Zelle entlässt (McNiven et al 1998). Diese hydrolytische Aktivität entsteht aus der Eigenschaft des Dynamins, spontan in Ringe und Spiralen zu oligomerisieren (Hinshaw et al 1995; Schmid et al 1998; Hinshaw 2000; Sever et al 1999; Stowell et al 1999). Die widersprüchliche Tatsache, dass eine verschlechterte GTPase-Aktivität von Dynamin die Effizienz der Endozytose verbessert (Sever et al 1999), wird dadurch erklärt, dass es wohl eher eine Funktion als regulatorisches G-Protein für den Durchmesser des Verbindungssteiges hat und folgende Prozesse vorreguliert, als seine Hauptfunktion in der Abspaltung des Vesikels findet (Kelly 1999, D`Hondt 2000) .

Damit der Vesikel nun in das Zellinnere aufgenommen werden kann, muss das zytosolisch unter der Plasmamembran gelegene Spektrin-Aktin-Gerüst gelöst werden. Das wird durch die Protease Calpain ausgeführt. Annexin 6 spielt hierbei eine Rolle, indem es Calpain an der Plasmamembran zur Bindung an Spectrin rekrutiert. Somit ist die Einknospfung des Vesikels in den Intrazellularraum ermöglicht (Kamal et al 1998; Michaely et al 1999).

Nachdem nun der Liganden-Rezeptor-Komplex in die Zelle internalisiert wurde und sein Clathrin-Stützgerüst durch ein ATP-abhängiges Enzym („uncoating enzyme“) entfernt wurde (Rothman et al 1986), beginnt, abhängig von seiner Struktur und

Funktion, die Verteilung bzw. Trennung innerhalb des Recyclings und degradativen Stoffwechselweges.

Man kann verschiedene Stoffwechselweges verfolgen. So werden manche Liganden von ihrem Rezeptor getrennt und der Rezeptor wandert in kürzester Zeit wieder an die Plasmamembran zurück, an der er seine volle Funktion wieder aufnehmen kann (LDL-Rezeptor). Sein Ligand gelangt über verschiedene Kompartimente schließlich in die Lysosomen, in denen er enzymatisch abgebaut wird (Brown et al 1983). Andere Liganden bleiben teilweise mit ihrem Rezeptor assoziiert und gelangen auf dem Weg des Recyclings an die Plasmamembran zurück (Transferrin-Rezeptor), beschrieben durch Dautry-Varsat et al 1983. Wieder andere Wege begeht der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGF-Rezeptor), der selbst auch degradiert wird (Herbst et al 1994).

Aufgrund der hohen Dynamik im Membranfluss sowie der intrazellulären Sortierung der aufgenommenen Liganden („sorting“) ist eine genaue Zuordnung und Identifizierung der einzelnen Kompartimente nicht immer ganz einfach. Deshalb nimmt man sich hierfür die internalisierten Liganden oder Rezeptoren als Markerproteine zu Hilfe, um eine genaue Zuordnung zu ermöglichen. So kann jedes Kompartiment über seinen Liganden, Rezeptor oder ein anderes Merkmal, abhängig von seinem jeweiligen Schicksal in der Zelle, zugeordnet und somit identifiziert werden.

Endosomen werden in frühe und späte Endosomen unterteilt. Die frühen Endosomen beinhalten Vesikel des Rezeptor-Recycling-Weges aber auch Moleküle, die nachfolgend in die späten Endosomen und Lysosomen gelangen und den degradativen Stoffwechselweg gehen. Eine weitere, feinere Unterteilung der frühen Endosomen geschieht durch die Unterscheidung in sortierende (sorting) Endosomen und rezyklierende („recycling“) Endosomen. In den sortierenden Endosomen hält sich zunächst der gesamte Liganden-Rezeptor-Komplex auf. Durch ihren sauren pH-Wert dissoziiert dann der Ligand vom Rezeptor und beide Anteile durchlaufen ihren vorbestimmten Weg innerhalb der Zelle. Das Beispiel des an seinen Rezeptor gebundenen LDLs verdeutlicht diese Wege. LDL wird vom Rezeptor gelöst und der Rezeptor gelangt nun über die rezyklierenden Endosomen an die Zelloberfläche zurück, während das LDL entlang des degradativen Weges weiter in die späten Endosomen gelangt (Gu et al 1999; Gruenberg 2001; Mukherjee 1997). Ein weiterer typischer Vertreter des frühen, rezyklierenden endosomalen Kompartiments wäre der

Transferrinrezeptor, der wie bereits beschrieben auch zu den rezyklierenden Molekülen gehört. Somit wird also auch klar, dass keine Moleküle des degradativen Stoffwechselweges in den frühen, rezyklierenden Endosomen nachzuweisen sein dürften (Yamashiro et al 1989).

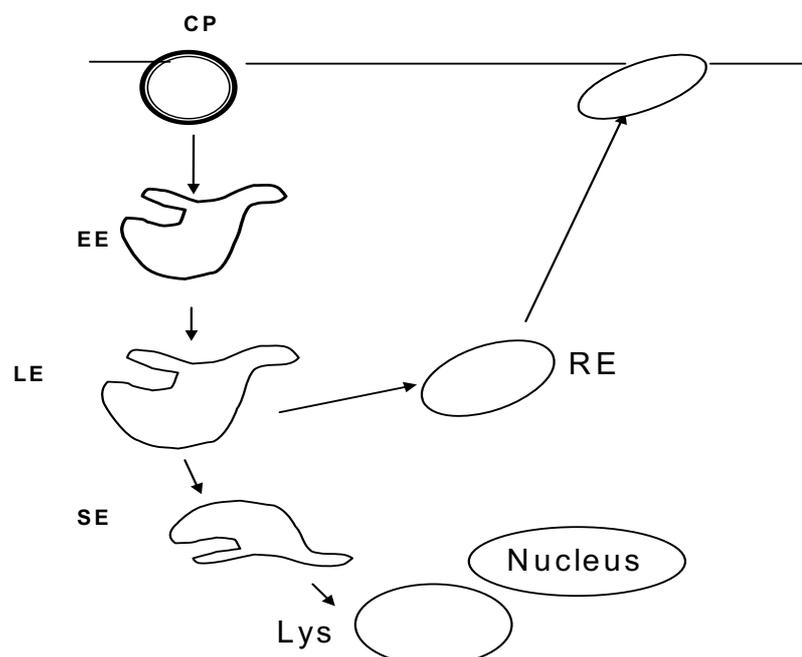
Seit den 80er Jahren sind morphologische Unterschiede innerhalb der beiden Untergruppen der frühen Endosomen bekannt. Die sortierenden Endosomen haben einen Durchmesser von ca. 250-400 nm mit einer überwiegend vesikulären Struktur. Von dieser Grundstruktur ausgehend ziehen sich tubuläre Ausläufer in einer Länge von ca. 4 µm in die Peripherie. Sie haben einen Durchmesser von ca. 50-60 nm (Geuze et al 1983; Gruenberg et al 1989; Marsh et al 1986) .

Die rezyklierenden Endosomen hingegen zeigen eine überwiegende tubuläre Struktur, die in ihrem Durchmesser stark den tubulären Ausläufern der sortierenden Endosomen ähneln. Da es noch immer nicht ganz eindeutig ist, wo genau die einzelnen Endosomen ihre Genese haben und welche genaue Entwicklung sie durchleben, liegt die Vermutung nah, dass die rezyklierenden Endosomen Abkömmlinge der Ausläufer der sortierenden Endosomen darstellen (Yamashiro et al 1989).

Die Tatsache, dass in den sortierenden Endosomen die Dissoziation von Ligand und Rezeptor stattfindet, spiegelt einen weiteren Unterschied wider. Zur Lösung des Komplexes ist in den sortierenden Endosomen ein saurer pH-Wert notwendig, der durch eine ATP-abhängige Protonenpumpe hergestellt wird (Nelson 1987). Eine mögliche Konformationsänderung, bedingt durch den niedrigen pH-Wert, könnte die Dissoziation erklären, wie Maxfield et al für den EGF-Rezeptor zeigen konnte (Dipaolo et al 1984). Die Beobachtung des niedrigen pH-Wertes von 5,9-6,5 in den sortierenden Endosomen im Vergleich zu Werten von 6,4-6,5 in CHO-Zellen unterstützt die Einteilung der frühen Endosomen nicht nur nach ihrer Morphologie, sondern auch nach ihrem pH-Wert (Presley et al 1993).

Die späten Endosomen haben nun die Aufgabe, internalisierte Moleküle zur Degradation oder zum Abbau in der Zelle zu den Lysosomen weiter zu schleusen. Deshalb sind folglich Rezeptoren, die an der Plasmamembran wieder Verwendung finden, in den späten Endosomen nicht mehr nachweisbar. Ein wichtiger, dem Transport dienender Rezeptor, der einem komplexeren Zyklus unterworfen ist, ist der

Mannose-6-Phosphat-Rezeptor. Er hat die Aufgabe, saure Hydrolasen aus dem Trans-Golgi-Netzwerk in die Lysosomen aufzunehmen. Dabei stellt er sozusagen die „Adresse“ dar, an die die Hydrolasen, aus dem Golgi Apparat mit einem Mannose-Phosphat-Rest adressiert, in Transportvesikeln mit ihm verknüpft an die Lysosomen binden. (Kornfeld et al 1989 / 1992). Dabei geht er den Weg auch über die späten Endosomen, was Mukherjee zeigen konnte (Mukherjee et al 1997). Eine Aufnahme in die Lysosomen direkt gelingt jedoch nicht, was ihn zu einem eindeutigen Unterscheidungsmerkmal oder Markerprotein für späte Endosomen macht. Als weiteres Unterscheidungsmerkmal kann man sich das Phospholipid Lysobisphosphatsäure zu Nutze machen, das in den späten Endosomen spezifisch in der Membran lokalisiert ist (Kobayashi 1998). Auf dem Weg von den frühen zu den späten Endosomen werden die Moleküle in sogenannten multivesikulären Körperchen (multivesikular bodies, MVB) transportiert (Mukherjee et al 1997; Gu et al 1999 ; Gruenberg 2001). Morphologisch ähneln sich die späten Endosomen und die sortierenden Endosomen. Im Elektronenmikroskop werden jedoch Invaginationen in der Membran sichtbar, welche den späten Endosomen ebenfalls den Namen multivesikuläres Körperchen gab. Auch hier findet sich ein niedriger pH-Wert von ca. 6,0 (Yamashiro et al 1987). Die letzte Station auf dem Stoffwechselweg sind die Lysosomen. Das sind Kompartimente, die von nur einer Membran umgeben sind, eine Fülle an sauren Enzymen beherbergen und ein pH-Optimum von 5,0 haben. Aufgrund ihrer Elektronendichte tragen sie auch den Namen „dense bodies“. Sie haben keine homologe Morphologie (Kornfeld et al 1989) .



**Abb. 1.4:** Schematische Darstellung des endosomal Transportes innerhalb der Zelle (CP = coated pits, EE = early endosomes, LE = late endosomes, SE = sorting endosomes, RE = recycling endosomes, Lys = Lysosomes)

### 1.1.5 Intrazellulärer Cholesterintransport

Der Cholesterintransport innerhalb der Zelle findet vornehmlich zwischen den Lysosomen, der Plasmamembran, dem Golgi-Apparat, dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und den Mitochondrien statt. Man unterscheidet hierbei einen Protein-vermittelten, nicht-vesikulären Transport Weg von einem vesikulären Weg. Der Transport des Cholesterins von den Lysosomen an die Plasmamembran wird vermutlich über einen Protein-vermittelten Weg gegangen. Welche Proteine insgesamt hierbei eine Rolle spielen ist abschließend noch nicht geklärt.

Der größte Teil des zytoplasmatischen Cholesterins wird auf vesikulärem Transport via Golgi-Apparat zur Plasmamembran und von dort zum endoplasmatischen Retikulum transportiert (Neufeld 1998). Dabei dauert diese Art des Transportes länger als der Protein-vermittelte Weg (SCP 2, siehe unten) (Frolov et al 1996; Frolov et al *JBC*, 1996; Schroeder et al 1998). Die Ursachen dafür sind nicht klar. Durch Experimente wurde deutlich, dass beide Transportwege parallel zueinander existieren und dass die Neuverteilung des Cholesterins ins ER ein gezielter Mechanismus ist und nicht durch eine veränderte Lipidkonzentration mit vermeintlich höherer Cholesterinaffinität begünstigt wird.

In besonderen Fällen wird der Transportweg nicht über die Plasmamembran gewählt (Johnson et al 1990; Underwood et al 1998; Neufeld et al 1996). Das ist vor allem dann der Fall, wenn der Golgi-Apparat nicht intakt ist. Dieser Effekt kann pharmakologisch erzielt werden und hat zur Folge, dass das Cholesterin direkt zum endoplasmatischen Retikulum wandert und nicht den Weg über die Plasmamembran wählt (Neufeld et al 1998). Hierbei wird ein Protein-vermittelter Transport vermutet, der wahrscheinlich durch eine kompensatorische Hochregulation bei mangelnder Vesikelmenge durch den Ausfall des Golgi-Apparates zu erklären ist (Neufeld et al 1998).

Ein Mechanismus des intrazellulären Cholesterintransportes verläuft über das Niemann-Pick-Typ-C-Protein (i. F. NPC). Es gibt zwei verschieden lokalisierte Proteine. Das NPC1 ist ein Membran-Glycoprotein, das vornehmlich in späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert ist. Das NPC2-Protein ist im Lumen der Lysosomen lokalisiert. Dabei könnte dem NPC2 eine Brückenfunktion zugeschrieben werden, bei der es freies Cholesterin entweder zu dem NPC1 an der

Plasmamembran transportiert und darauf transferiert oder aber die Löslichkeit des freien Cholesterins innerhalb der Zelle gewährleistet (Ioannou 2001).

Der intrazelluläre Transportweg des endogen synthetisierten Cholesterins geht entweder energieabhängig aus dem endoplasmatischen Retikulum via Golgi-Apparat an die Plasmamembran (DeGrella et al 1982) oder auf direktem Weg aus Cholesterin angereichertem LDL über die Lysosom an die Plasmamembran (Urbani et al 1990; Kaplan et al 1985; Neufeld et al 1996). Der Transport aus dem Lysosom an die Plasmamembran verläuft vermutlich unabhängig vom NPC1 (Cruz et al 2000). Hingegen ist die Cholesterinverteilung in zellulären Kompartimenten und der Einbau in die Plasmamembran abhängig von der Funktion des NPC1 (Cruz et al 2000). Diese Beobachtungen konnten durch weitere Studien unterstützt werden (Lange et al 2000) und bestärken die Vermutung, dass Cholesterin seinen Hauptspeicherort in der Plasmamembran hat, um einer Überladung anderer Kompartimente vorzubeugen.

Es sind Krankheiten beschrieben worden, die einen Defekt am Gen des NPC1-Proteins aufweisen ("Niemann Pick Krankheit"). Die betroffenen Patienten leiden unter einer Akkumulation von Cholesterin in ihren Lysosomen, was unter anderem neurodegenerative Symptome zur Folge hat (Patterson et al 2001). In Zellkulturstudien konnten die dort auftretenden Phänomene kopiert werden. Dazu nahm man sich dem Wirkstoff U18666A zu Hilfe. Liscum et al beschrieben 1989 erstmals den inhibierenden Effekt des Wirkstoffes auf den Cholesterintransport zwischen den Zellkompartimenten innerhalb von Chinese-Hamster-Ovary-Zellen (CHO) (Liscum et al 1989).

Nach Einsatz des Pharmakons in der Zellkultur konnte eine Akkumulation von Cholesterin in den Lysosomen der Zellen beobachtet werden, die scheinbar durch einen Stop des Weitertransportes von Cholesterins aus den Lysosomen (Vanier et al 1991) bedingt ist. Dieses zelluläre Bild konnte durch Zellen von erkrankten Patienten bestätigt werden.

Vermutlich ist das Sterol-Carrier-Protein 2 (SCP-2) ebenfalls ein beteiligtes Protein. Diese Vermutung ist darin begründet, dass der SCP-2-vermittelte Transfer des Cholesterins von den Lysosomen zur Plasmamembran um ein mehrere Hundertfaches beschleunigt ist, als bei spontanem Steroltransfer (Gallegos et al

1996). SCP 2 wurde als Vermittler des Cholesterintransfers aus Lipidtröpfchen in die Mitochondrienmembran identifiziert. In SCP 2 überexprimierenden Zellen konnte eine erhöhte Steroidogenese festgestellt werden. Es hat eine versorgende Funktion der äußeren Mitochondrienmembran mit Cholesterin (Gallegos et al 2000; Pfeifer et al 1993). (Übersicht: Minireview Schroeder, F. et al Experimental biology and medicine).

### 1.1.5.1 Cholesterin in lipid rafts

Neben Clathrin coated pits finden sich in Plasmamembranen auch sog. laterale Mikrodomänen, die „lipid rafts“ genannt werden. Dabei handelt es sich um heterogen zusammengesetzte Domänen, die durch bestimmte Proteine stabilisiert und charakterisiert werden können. Die Verteilung von Cholesterin und weiteren Lipiden in den sphingolipidreichen Regionen des inneren und äußeren Blattes der Plasmamembran ist nicht gleichmäßig, woraus die These des Vorhandenseins der sog. „rafts“ entstanden ist. Diese rafts stellen quasi ein Floß dar, das manche Proteine befördert und andere davon ausschließt (Simons et al 1997). Eine Untergruppe dieser rafts stellen die Caveolae dar. Sie könnten an der Strukturgebung der rafts beteiligt sein. Zudem wird ihnen eine wichtige Rolle beim Cholesterinefflux zugeschrieben. Bestandteile der Caveolae sind, neben Cholesterin, Sphingomyelin (50-96%), Phosphatidylinositol (50%), Ceramide (50%) und Diacylglycerol (50%). Während sie selbst nur 1% der Plasmamembranoberfläche ausmachen enthalten sie aber 10 % des Gesamt-Cholesterins der Plasmamembran (Smart et al 1998, Anderson 1998).

Charakteristisches Strukturprotein der Caveolae ist Caveolin, das in Caveolin 1-3 unterteilt werden kann. Sie haben alle ein Molekulargewicht von ca. 22 kDa (Rothberg et al 1992). Caveolin 1 und 2 sind in allen Zellen nachzuweisen, während Caveolin 3 ein Muskel spezifisches Protein zu sein scheint.

Caveolin-Proteine sind vor allem in den Invaginationen der Plasmamembran (Caveolae) aber auch im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und exo- und endozytotischen Vesikeln (Dupree et al 1993) lokalisiert. Sie finden sich also sowohl im Stoffwechselweg von exogen aufgenommenem Cholesterin, wie den Endosomen, Lysosomen und TGN mit anschließendem Ziel Plasmamembran aber auch an Orten

der endogenen Cholesterinsynthese, wie dem endoplasmatischen Retikulum und, unter Umgehung des Golgi-Apparates, der Plasmamembran. Der Transfer des Cholesterins zwischen diesen Kompartimenten scheint durch Caveolin unterstützt zu werden (Smart et al 1996). Die Beobachtung, dass neu synthetisiertes Cholesterin zwischen ER und Plasmamembran transportiert wird, konnte durch die Arbeitsgruppe von Murata bestätigt werden. Sie konnten außerdem zeigen, dass Caveolin speziell Membrancholesterin bindet (Murata et al 1995).

Ein weiterer Hinweis auf die Teilnahme von Caveolae am Cholesterinefflux ist die Tatsache, dass in Lymphozyten, die kein Caveolin exprimieren, nur ein sehr langsamer Transport von Cholesterin an die Plasmamembran nachgewiesen werden konnte (Smart et al 1998). Im Umkehrschluss wurde in einer Caveolin überexprimierenden Zelllinie gezeigt, dass der Transfer von Cholesterin zu Caveolae der Plasmamembran deutlich schneller lief.

Zellen, die das NPC-Protein nicht exprimieren, zeigen eine erhöhte Expression von Caveolin. Aus der Kenntniss, dass bei diesen Zellen eine lysosomale Speicherung von Cholesterin vorliegt, könnte diese Hochregulation als eine Kompensation zum lysosomalen Abtransport des angestauten Cholesterins verstanden werden (Garver et al BBRC 1997 ; Garver et al BBA 1997). Der Nachweis eines Lipoprotein Rezeptors, SRB1, der maßgeblich am reversen Cholesterinstoffwechsel in Caveolae beteiligt ist (siehe unten), verdichtet die These, dass Caveolae und Caveolin ebenfalls den Cholesterin Efflux aus Zellen vermittelt ( Babitt et al 1997).

#### **1.1.5.2 Reverser Cholesterin-Transport**

Als „Reversen Cholesterin-Transport“ (RCT) bezeichnet man den Transport von Cholesterin aus extrahepatischen Geweben in die Leber (Fielding et al 1995 et 2000; Barter et al 1996; von Eckardstein et al 2001). Die Leber erfüllt dann die Funktion der Cholesterinelimination, indem sie das antransportierte Cholesterin zu Gallensäuren abbaut und anschließend die Gallensäuren sezerniert. Dieser RCT ist der einzige Mechanismus, der die Zellen vor einer Überladung mit Cholesterin zu schützen und eine Elimination überschüssigen Cholesterins zu gewährleisten (s.u.) vermag. Er stellt damit einen aktiven Mechanismus zur Cholesterinelimination aus Zellen dar.

Transportproteine, die an der Ausschleusung des Cholesterins aus den Zellen (Cholesterinefflux) beteiligt sind, sind unter anderem das ABCA1 Protein sowie der Scavenger Rezeptor Klasse B Typ 1 (SRB1).

### 1.1.5.3 ABCA1

ABCA1 gehört in die Superfamilie der „ATP-Binding Cassettes“ Transportproteine. Diese Transporter haben intrazelluläre ATP Bindungsstellen und nutzen dieses als Energielieferant. Dabei deuten eine Vielzahl von Experimenten darauf hin, dass ABCA1 in einem ATP-abhängigen Prozess Cholesterin und Phospholipide an der Zellmembran auf das Apo A1 der HDL überträgt und somit zum reversen Cholesterin-Transport beiträgt.

Die Lokalisation von endogen exprimiertem ABCA1 ist an der Plasmamembran (Lawn et al 1999; Wang et al 2000; Orso et al 2000), die es mit sechs Transmembrandomänen durchspannt. Des weiteren findet man chimeres GFP-ABCA1 in transient und stabil transfizierten Zellen auf den Membranen endozytotischer Vesikel wie frühen und späten Endosomen sowie Lysosomen (Fitzgerald et al 2001; Remaley et al 2001; Hamon et al 2000).

ABCA1 enthaltende frühe Endosomen erfahren Fusion und Teilung und interagieren miteinander, mit späten Endosomen und der Plasmamembran. Neufeld et al konnten zeigen, dass ABCA1 tragende frühe Endosomen einen „shuttle“ zwischen der Plasmamembran und dem endozytischen Kompartiment bilden. Das führte sie zu der Aussage, dass dieser Verkehr innerhalb der Zellen eine Rolle am Cholesterin-Efflux spielen könnte. ( Neufeld et al 2001).

Oram et al formulierten eine These zum möglichen Ablauf des Cholesterin-Effluxes. Durch die Interaktion von ABCA1 mit den Apolipoproteinen wird die „Verpackung und Ausschleusung“ von Cholesterin und Phospholipiden über unbekannte Transportvesikel stimuliert. Dieser Prozess könnte vom Golgi-Apparat abhängig sein. Nach der Fusion mit dem inneren Blatt der Plasmamembran transloziert ABCA1 die Lipiddomäne nach außen, wo sie mit dem Apolipoprotein kommuniziert und einen HDL Partikel ausbildet, der den RCT fortleitet. Welche weiteren Proteine in diesen Mechanismus eingreifen könnten, ist derzeit nicht klar. Außerdem bestehen auch

andere Thesen, die diese Aufgabe von ABCA1 möglich erscheinen lassen (Oram 2000).

Ein Transfer des Cholesterins direkt aus Regionen der Plasmamembran wie lipid rafts konnte bislang nicht gezeigt werden (Mendez et al 2001).

Studien der Arbeitsgruppe Wang et al konnten nachweisen, dass das Cholesterin zum Efflux nicht direkt an den ABCA1-Transporter gebunden wird und dass der Efflux von Phospholipiden unabhängig vom Cholesterin-Efflux stattfindet. Sie schlossen daraus, dass die Bindung von Apo A1 an ABCA1 zu einer bestimmten Konformation der Phospholipide führte, die den Cholesterin-Efflux begünstigt (Wang et al 2001). Dem zu Folge könnte dem ABCA1-Transporter eine Funktion im Sinne eines regulatorischen Efflux Proteins oder einer Phospholipid Translokase zugeschrieben werden (Neufeld et al 2001; Wang et al 2001). Es wurden Krankheitsfälle beschrieben, bei denen es in Folge eines HDL- und Apolipoprotein A1-Fehlens zu einer Akkumulation von Cholesterinestern in Zellen der Patienten kommt. Dieser Krankheit liegt ein genetischer Defekt am ABCA1-Transporter zu Grunde. Durch diese als Tangier Krankheit bekannte Erkrankung konnte ein Zusammenhang zwischen dem Transportprotein ABCA1 und dem Cholesterin-Efflux aus Zellen vermutet werden.

#### **1.1.5.4 SRB1**

Neben dem aktiven Ausschleusen von Cholesterin aus der Zelle durch den ABCA1-Transporter kann es auch durch passive Diffusion aus den cholesterinreichen Zellen eliminiert werden. Dabei wird seine Aufnahme aus nichtheptischen, cholesterinreichen Zellen durch den Scavenger Rezeptor Klasse B Typ 1 (SRB1) vermittelt. Sie beschreibt somit einen weiteren Mechanismus des reversen Cholesterin-Transports (Ji et al 1997, Jian et al 1998).

Die Lokalisation von SRB1 innerhalb der Zelle ist in den Caveolae (s.o.). Über diese wird der Cholesterinefflux aus den Zellen ausgeführt und somit zur Erhaltung der intrazellulären Cholesterinhomöostase beigetragen. Babitt et al konnten zeigen, dass große Teile des murinen SRB1-Rezeptor mit dem Stützprotein der Caveolae, Caveolin-1, kolokalisieren (Babitt et al 1997). Patienten, die an der Tangier Krankheit erkrankt sind (s.o.), eliminieren ihr überschüssiges Cholesterin über den

SRB1 Rezeptor, was ebenfalls die Rolle des Rezeptors im Cholesterin-Efflux unterstreicht (Remaley et al 1997; Francis et al 1995; Rogler et al 1995).

Neben der Funktion von SRB1 beim Cholesterin-Efflux deuten eine Reihe von Befunden darauf hin, dass SRB1 eine wichtige Rolle bei der selektiven Aufnahme von Cholesterinestern aus HDL in Hepatozyten und Steroid-produzierenden Zellen spielt. (Krieger 1999; Trigatti et al 2000; Conelly 1999).

Durch Studien von Ji et al konnte gezeigt werden, dass in Steroid-produzierenden Zellen und der Leber neben Cholesterinestern auch das freie Cholesterin und Phospholipide SRB1 vermittelt aufgenommen werden. Aus seinen Ergebnissen formuliert Ji die These, dass SRB1 das HDL Partikel mit der Zelloberfläche verbindet. Anhand eines Gradienten zwischen Zelloberfläche und dem HDL Partikel vermittelt SRB1 anschließend den Austausch der Lipide in die Zelle oder aus der Zelle. Des weiteren formuliert er, dass das Ausmaß dieser Interaktion abhängig ist von der HDL Konzentration und seiner Zusammensetzung, dem Gehalt an exprimiertem SRB1 sowie dem intrazellulären Steroidstoffwechsel (Ji et al 1997). Somit vermittelt SRB1 vermutlich einen bidirektionalen Fluss von Cholesterin zwischen intrazellulären Cholesterin-pools, Caveolae und HDL-Lipoproteinen im Plasma.

## **1.2 Regulation des endosomalen Membrantransportes**

### **1.2.1 Vesikeltransport**

In jeder Zelle findet ein aktiver Transport zwischen der Plasmamembran, den Membranen intrazellulärer Kompartimente und den Kompartimenten untereinander statt. Dabei findet in immer gleichem Ablauf der Membrankontakt statt, der durch unterschiedliche Proteine vermittelt wird. Man unterscheidet vier verschiedene Schritte. Zuerst bildet sich ein Vesikel, in dem Moleküle transportiert werden sollen aus der Membran heraus. Der nächste Schritt wird „targeting“ bezeichnet und beschreibt den Transport des Vesikels zur Zielmembran/zum Zielkompartiment. Es folgt die Anlagerung der Vesikelmembran an die Zielmembran, die man als „docking“ bezeichnet. Abschließend findet die Fusion statt, die das Verschmelzen der beiden Membranen bezeichnet. Eine ungehinderte Fusion der beiden Membranen wird durch das fluid mosaic Modell ermöglicht (Zerial et al 2001).

Während die beiden ersten Schritte durch die Rab-Proteine mitvermittelt werden, spielen beim Docking und Fusionieren die SNARE-Proteine eine herausragende Rolle (Darsow et al 1997).

Es besteht weiterhin eine große Vielfalt an Proteinen, die ebenfalls an diesem Prozess mitbeteiligt sind. So sind in jüngeren Arbeiten Proteine in den Fokus gerückt, die sich durch eine EH-Domäne auszeichnen. EH steht für Eps15-Homologie. Eps15 ist ein Protein, das zunächst in Säugetierzellen identifiziert werden konnte (Di Fiore et al 1997). Es scheint eine Bindung mit dem AP2 Adaptorkomplex der Clathrin coated pits einzugehen (Benmerah et al 1995/Torrisi et al 1999) und einen Einfluss auf das Targeting von AP2 zu Plasmamembran-coated-pits zu haben (Benmerah et al 1999).

### **1.2.2 Rab-Proteinfamilie**

Eine klassische Familie, die den endosomalen Membranverkehr mitsteuert, ist die Familie der Rab-Proteine. Die Rab-Proteine sind an der zytoplasmatischen Seite der Membranen gebunden und teilweise am endozytotischen Stoffwechselweg beteiligt (Ferro-Novick et al 1997/Bean et al 1997/Novick et al 1997). Dabei erfüllt jedes Rab-Protein seine spezifische Funktion, was die Lokalisation der Rab-Proteine innerhalb der Zelle erklärt (Schimmöller et al 1998/Woodman 1998).

In diese Familie der GTP-asen mit niedrigem Molekulargewicht gehört das für den endosomalen Verkehr wichtige Rab 5. Ihm wird eine einflussreiche Rolle beim Prozess des dockings und der Fusion der Vesikelmembran mit der Zielmembran zugeschrieben (Rothman et al 1994/Lupashin et al 1997/Mayer et al 1997/Rothman et al 1997). Rab 5 ist in der Plasmamembran und in den frühen Endosomen lokalisiert (Li et al 1993 / Chavrier et al 1990). Die gleiche Lokalisation ist für Rab 4 gegeben, das sich neben Rab 5 ähnlichen Aufgaben auch durch seine Beteiligung an der Rezeptor-vermittelten Endozytose zwischen frühen/sortierenden Endosomen und rezyklierenden Endosomen auszeichnet ( van der Sluijs et al 1992).

Als beispielhaft für Rab-Proteine, die im späten endosomalen Kompartiment nachzuweisen sind, wäre Rab 7 zu nennen. Es ist involviert bei Transportvorgängen von frühen zu späten Endosomen und von späten Endosomen zu Lysosomen (Feng et al 1995; Vitelli et al 1997; Meresse et al 1995).

### 1.2.2.1 Rab 5

Rab 5 gehört mit seinem Molekulargewicht von 28 kD in die Familie der kleinen GTPasen. Es hat seine hauptsächliche Lokalisation in den frühen Endosomen, weswegen es für diese als Markerprotein genutzt wird (Chavrier et al 1999). Es konnte gezeigt werden, dass es hier die homotypische Fusion von frühen Endosomen *in vitro* reguliert (Gorvel et al 1991 / Stenmark et al 1994) und, wenn es überexprimiert wird, die Rezeptor-vermittelte Endozytose *in vivo* (Bucci et al 1992). Um seine Funktion bei der Membranfusion spielen zu können, benötigt es seine an GTP gebundene aktive Form. Weiterhin benötigt es einige Effektoren, ohne die der komplexe Mechanismus des targetings nicht ablaufen kann. In *in vitro* Experimenten konnte die Rolle von Rab 5 innerhalb der homotypischen und heterotypischen Fusion von Membranen von Clathrin Coated Vesikeln und frühen Endosomen genau studiert werden (Ullrich et al 1994).

Cytosolisches Rab 5-GDP bindet an einen RabGDI (Rab 5 Dissoziations-Inhibitor) und bildet einen Komplex „Rab 5 GDI“. Dieser Komplex wandert nun an die Donormembran und Rab 5-GDP wird zu Rab 5 GTP konvertiert. Vermittelt wird dieser Schritt durch einen „Nukleotid Exchange Faktor Rabex 5“. Die Aktivität dieses Faktors wiederum ist abhängig vom Vorhandensein seines Effektorproteins Rabaptin 5 (Horiuchi et al 1997) . Durch diesen Zyklus gelangt Rab 5 nun in seine aktive Form und bereitet zum einen die Fusion der Membranen vor zum anderen bahnt es aber auch die Rekrutierung von weiteren Proteinen wie das EEA 1 (early endosome antigen 1), das an der heterotypischen Fusion von Clathrin Coated Vesikeln mit frühen Endosomen beteiligt ist (Rubino et al 2000). Außerdem vermittelt EEA1 das Docking und die Fusion von frühen Endosomen (Christoforidis et al 1999). Der Unterschied zwischen Rab 5 und EEA 1 liegt unter anderem darin, dass der Rabaptin5/Rabex5-Komplex sowohl von frühen Endosomen als auch Clathrin Coated Vesikeln rekrutiert wird, während EEA 1 nur von den frühen Endosomen rekrutiert wird (Rubino et al 2000).

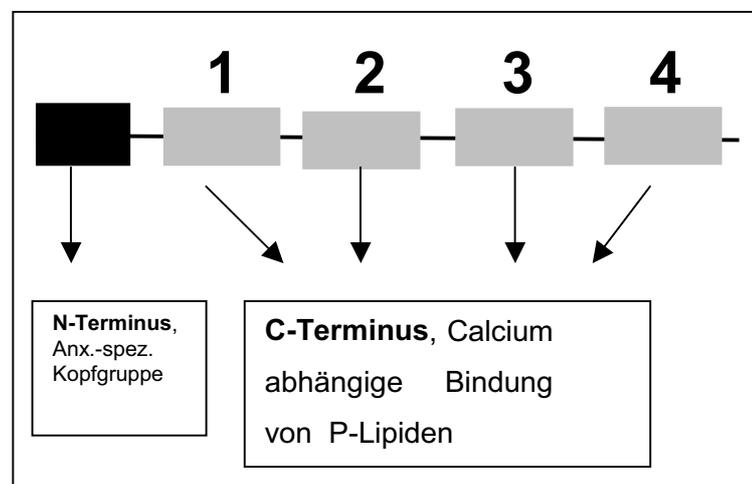
Für die Fusion von Membranen sind weitere Proteine außerhalb der Rab-Familie notwendig.

## 1.3 Annexine und Membrantransport

### 1.3.1 Rolle von Annexinen in Zellen

In den späten 70er und frühen 80er Jahren rückten Annexine ins Blickfeld der Wissenschaftler. Unter zunächst sehr uneinheitlichen Namen wie Synexin, Chromobindin, Calcimedien, Lipocortin und Calpactin wurde die Namensgebung an den jeweiligen Aufgaben orientiert. Durch intensive Forschung und sich herauskristallisierender Gemeinsamkeiten in Struktur, Funktion und biochemischen Eigenschaften wurde von Crumpton und Dedman 1990 der einheitliche Name Annexin vorgestellt (Crumpton et al 1990).

Annexine gehören zu einer Proteinfamilie von mehr als zehn Mitgliedern. Sie haben alle die gemeinsame Eigenschaft, dass sie Calcium abhängig negativ geladene Phospholipide binden. Die zweite Gemeinsamkeit, die die Familienmitglieder verbindet, ist die Struktur des Proteins. Alle Annexine bestehen aus einer N-terminalen Kopfgruppe, die die spezifische Annexin-Funktion charakterisiert. Jedes Familienmitglied hat also seinen spezifisch eigenen N-Terminus. Des Weiteren bestehen sie aus dem an die Kopfgruppe assoziierten C-Terminus. Dieser Terminus ist unter den Familienmitgliedern unterschiedlich stark kongruent. Er besteht aus den „Annexin repeats“, die aus 70 hochkonservierten Aminosäuren bestehen. In diesen repeats befindet sich die core-Domäne, über die die Annexin spezifische Calcium-abhängige Bindung an Phospholipide vermittelt wird. Mit Ausnahme von Annexin 6 haben alle Annexine vier repeats. Annexin 6 verfügt, vermutlich als Folge einer Genduplikation, über acht repeats.



**Abb. 1.5 :** Modell des strukturellen Aufbaus von Annexinen. Annexin 6 weist eine Duplikation der vier repeats auf und besteht somit aus acht repeats

Annexine weisen ein ubiquitäres Vorkommen auf. So konnte Annexin 1 in frühen Endosomen von Makrophagen (Diakonova et al 1997) und neutrophilen Granulozyten (Ernst 1991) nachgewiesen werden. In Baby Hamster Kidney Zellen (BHK) und Madin-darby canine kidney Zellen (MDCK) fand sich Annexin 1 in der Plasmamembran und ebenfalls in frühen Endosomen (Seemann et al 1996). EGF überexprimierende NIH 3T3 Zellen zeigen Annexin 1 in multivesikulären Körperchen (Futter et al 1993). Desweiteren gelangen Nachweise von Annexin 1 in  $\beta$ -Zellen des Pankreas und humanen Keratinozyten (Fava et al 1993; Onishi et al 1995).

Annexin 2 hat seine dominierende Aufgabe in membranorganisierenden Bereichen. Nachgewiesen werden konnte es in BHK, MDCK und J774-Zellen, in denen es submembranös und früh endosomal zu finden ist (Diakonova et al 1997; Gerke 1992; Emans et al 1993; Harder et al 1997).

In polaren Zellen wie Enterozyten und Säugetier Epithel Zellen ist die Lokalisation von Annexin 2 unterhalb der apikalen Membran konzentriert (Gerke et al 1984, Gould et al 1984; Handel et al 1991; Weinmann et al 1994). Aber auch in Zellen des sekretorischen Stoffwechselweges konnte Annexin 2 lokalisiert werden, wie zum Beispiel in chromaffinen Granula der chromaffinen Zellen der Nebenniere (Drust et al 1988; Creutz et al 1987; Nakata et al 1990) oder dem Hypophysenvorderlappen (Turgeon et al 1991; Senda et al 1994) und in Makrophagen der Linie J774 (Desjardins et al 1994).

Annexin 3 und 4 finden sich beide in der Plasmamembran. Wobei auch hier eine Verteilung abhängig von der Polarität der Zellen zu beobachten ist. Während sich Annexin 3 vornehmlich in Monozyten und Makrophagen nachweisen läßt (Le Cabec et al 1994) ist die Verteilung von Annexin 4 in epithelialen Zellen ganz variabel. In Enterozyten und Lungenepithelzellen ist die Lokalisation an der basolateralen Membran (Massay et al 1991; Mayran et al 1996), während sie in Nierenepithelzellen basolateral (Massay-Harroche et al 1995) und apikal (Kaetzel et al 1994) aufzufinden sind. In Uterusepithelzellen ist die Lage von Annexin 4 apikal (Kojima, Utsumi et al 1994; Kojima et al 1994).

Annexin 6 nun konnte in vielen verschiedenen Zelltypen lokalisiert werden, wie zum Beispiel Lymphozyten (Owens et al 1984), Hepatozyten (Weinmann et al 1994; Tagoe et al 1994), am sarkoplasmatischen Retikulum des Skelettmuskels (Hazarika

et al 1991). Desweiteren gelangen Jäckle et al 1994 der Nachweis von Annexin 6 in endosomalen Membranen von Rattenleber und am Golgi-Apparat (Jäckle et al 1994).

Lin et al konnten 1991 zeigen, dass die Einknospung von coated pits nicht nur von ATP und Calcium abhängig war, sondern auch von zytosolischen Proteinen wie Annexin 6. Der Entzug von Annexin 6 aus dem Zytosol führte zu einer Senkung der Einknospungsrate. Bei erneuter Zugabe von Annexin 6 konnten sie 1992 aber zeigen, dass sich die Rate an Einknospung nur mäßig steigerte, was auf andere weitere einflussnehmende Faktoren hinweist (Lin et al 1992).

Babiychuk et al demonstrierten 1999 und 2000 die Calcium abhängige Assoziation von Annexin 6 an Cholesterin reiche Mikrodomänen glatter Muskelzellen und deren Neuformation durch veränderte Calciumkonzentrationen am Sarkolemm bei Muskelkontraktionen (Babiychuk et al 1999; Babiychuk et al 2000). Dieses vielfältige Vorkommen der Annexin-Familie und vor allem Annexin 6 an der Plasmamembran und endosomalen Membranen, sowie Membranen des endozytotischen Stoffwechselweges deuten auf eine Einfluss nehmende Rolle im Membrantransport hin.

### **1.3.2 Annexine und Phospholipide**

Die Bindung von Annexinen an Membranen erfolgt an saure, negativ geladene Phospholipide (P-Lipide). Ihre Präferenz liegt dabei überwiegend bei den Phospholipiden Phosphatidylsäure, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol, die an der zytosolischen Seite der Membran gelegen sind. Die Annexine nehmen hierbei wohl eine Brückenfunktion zur Bindung zweier biologischer Membranen ein. Es besteht eine strenge Calcium-abhängigkeit zur Bindung. Dabei hängt die benötigte Calciummenge vom jeweiligen Annexin ab.

Annexin 1 und 2 sind hierbei die Annexine, die zur Bindung der Hälfte der Proteinmenge am wenigsten Calcium benötigen (Mengen im submikromolaren Bereich) und Annexin 5 ist das Annexin, das mit die größte Calciummenge benötigt (10-100  $\mu\text{M}$ ) (Raynal et al 1994).

Für die Bindung an ungeladene Phospholipide benötigen die Annexine grundsätzlich mehr Calcium (Blackwood et al 1990; de-la-Puente et al 1995; Junker et al 1994;

Gilmanshin et al 1994). Der vollständige Mechanismus der Calcium-abhängigen Bindung an Phospholipide ist noch nicht abschließend verstanden. Sicherlich nimmt der strukturelle Aufbau eine wesentliche Rolle bei der Bindung ein. Der Aufbau von Annexin 6 beispielsweise, mit der Duplikatur der vier core-Domänen, deutet auf zwei Bindungsdomänen für die P-Lipide hin.

In Kristallstudien konnten die core-Domänen des Proteins zur Bindung identifiziert werden. In ihnen sind die Calcium-Bindungsstellen lokalisiert. Es werden zwei verschiedene Typen Bindungsstellen voneinander unterschieden: Typ II und Typ III (Weng et al 1993). Es wurde weiter festgestellt, dass sich die Mitglieder der Familie in ihren Bindungsstellen voneinander unterscheiden (Weng et al 1993, Luecke et al 1995; Favierperron et al 1995; Burger et al 1996; Benz et al 1996; Kawasaki et al 1996; Huber et al 1990). So konnten Montaville und Ko-Autoren zeigen, dass für Annexin 5 die Bindungsstellen für die Bindung an Phosphatidylserin in der ersten und/oder der zweiten Domäne lokalisiert sind, niemals aber in den Regionen der core-Domänen drei und vier. Er identifizierte eine Consensus Sequenz, die hochkonserviert in allen Annexinen anzutreffen ist (Montaville et al 2002). Daraus lassen sich dann eventuell auch Schlüsse über weitere Funktion und Nutzen der einzelnen core-Domänen ziehen.

Wie in dieser Arbeit und durch andere Arbeiten gezeigt wurde, gibt es ebenfalls einen Calcium-unabhängigen Weg der Bindung an biologische Membranen. So konnte die Arbeitsgruppe um Golcak eine pH-Abhängigkeit zur Bindung an Membranen beobachten. Sie beobachteten für Annexin 6, dass bei mäßig saurem pH um 6 eine Penetration des Proteins in die Membran Calcium unabhängig erfolgen kann und machten dafür eine Konformationsänderung des Proteins unter diesen Bedingungen verantwortlich (Golcak et al 2001).

Wie auch in Kapitel 1.1.5 erörtert wird, spielt vermutlich auch Cholesterin eine Rolle bei der Bindung an Membranen. So zeigten die Arbeitsgruppen von Harder einen Calcium-unabhängigen, Cholesterin-sensitiven Pool für Annexin 2, den es vermutlich auch für Annexin 6 zu geben scheint (Harder et al 1997).

Auch die Arbeitsgruppe um Ayala-Sanmartin fand eine Cholesterin-Abhängigkeit für Annexin 2 und 6 heraus, indem sie zeigte, dass die Bindung von Annexin 2 und 6

durch Cholesterin verbessert werden kann und die benötigte Menge Calcium dabei reduziert wird (Ayala-Sanmartin 2001).

### **1.3.3 Regulierende Rolle von Annexin 6 im Membranverkehr**

In der vergangenen Zeit verdichteten sich die Hinweise auf eine Rolle von Annexin 6 beim endosomalen Membranverkehr.

Die Arbeitsgruppe um Ortega et al formulierten eine potentielle Rolle von Annexin 6 bei dem Transport und der Aufnahme von Rezeptoren in polaren Zellen. In Rattenleberzellen konnten sie Annexin 6 in drei verschiedenen endosomalen Fraktionen identifizieren. Dabei fand es sich zu 80% in den Gallengängen, also den apikalen Seiten der Hepatozyten und zu 20% in den Sinusoiden. Als Kontrolle diente der frühe endosomale Marker Rab 5, der zu 80% ebenfalls in den apikalen Endosomen mit Annexin 6 ko-lokalisiert war. 50% der Endosomen hatten ebenfalls den Transferrin-Rezeptor internalisiert. So beschrieben sie Annexin 6 als ein Strukturprotein in apikalen frühen Endosomen mit einer möglichen Beteiligung beim Rezeptortransport und -recycling innerhalb der Zelle (Ortega et al 1998).

Die Arbeitsgruppe um Pons et al untersuchte 2000 NRK-Fibroblasten und WIF-B-Zellen, polarisierte Hepatozyten. In NRK-Zellen konnten sie Annexin 6 in Endosomen, die an der Internalisation von fluid phase Markern beteiligt waren nachweisen. Kollokalisationsstudien von Annexin 6 und endosomalen Markern zeigten ein gemeinsames Vorkommen in späten Endosomen und Prelysosomen. Dabei konnte Annexin 6 in Strukturen, die das lysosomale Protein Igp 120 aufweisen vornehmlich identifiziert werden.

In WIF-B Zellen konnten zwei Populationen von Annexin 6 ausgemacht werden. Die eine trat ebenfalls mit dem Igp-120-Protein auf und verblieb dort auch nach Behandlung mit Brefeldin A. Diese Substanz verhindert das „budding“ der coated pits an dem trans-Golgi-Netz und verhindert so den Transport zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat. Die zweite Gruppe konnte zum Teil mit Membranen des Golgi-Apparates assoziiert identifiziert werden und war sensitiv auf die Behandlung auf Brefeldin A. Aus diesen Beobachtungen, dass Annexin 6 im engen Zusammenhang mit dem prelysosomalen Kompartiment steht, zogen Pons et al die Vermutung, dass es eine Rolle beim Fusionieren innerhalb des

spät-endosomalen Stoffwechselweges spielt. Sie vermuteten seine Rolle als bindende Funktion im Sinne einer Kette (Pons et al 2000).

Lin et al konnten zeigen, dass Annexin 6 unmittelbar an der Einknospung von Clathrin coated pits und damit an der Rezeptor vermittelten Endozytose beteiligt ist (Lin et al 1992). Sie zeigten in einem *in vitro* Modell, dass die Aufnahme von Rezeptoren und Liganden neben ATP und Calcium von Annexin 6 und eventuell anderen Zellproteinen abhängig ist. Durch Entzug von Annexin 6 senkte sich die Einknospungsrate, nach Substitution von aufgereinigtem Annexin 6 stieg die Aufnahmerate wieder an. Die Tatsache, dass die erneute Zugabe von Annexin 6 diese Rate aber nur moderat steigerte, deutet darauf hin, dass weitere Partner bei diesem Vorgang involviert sind. Annexin 6 mag dabei nur einen modulierenden Part spielen.

Diese Analysen wurden in der Arbeitsgruppe R. Anderson (Kamal et al 1998) detailliert fortgesetzt. Auch sie zeigten eine Verbesserung der Rezeptor-vermittelten Endozytose Leistung durch Annexin 6. Um den Wirkmechanismus von Annexin 6 näher zu charakterisieren, wurden die Zellen mit einem Cystein Protease Inhibitor (ALLN) behandelt. Dieser Wirkstoff inhibiert die Spaltung des  $\beta$ -Spectrin-Gerüsts unterhalb der Plasmamembran, das während der Internalisierung von Liganden kurzzeitig aufgelöst werden muss. Diese Spaltung ist Annexin 6 abhängig und resultiert in einer reduzierten Internalisierungsrate von LDL. Kamal et al konnten nun aber auch zeigen, dass ALLN-behandelte Fibroblasten einen alternativen Mechanismus zur Internalisierung von LDL etablieren. Die Zellen konnten den Annexin 6 abhängigen Weg durch eine gesteigerte Anzahl generierter Clathrin coated pits kompensieren. Diese Beobachtungen erklärten sie mit zwei verschiedenen Wegen der Rezeptor-abhängigen Endozytose. Den einen beschrieben sie als Annexin 6-abhängigen Weg, den anderen als Annexin 6-unabhängigen Weg. Der Annexin 6-unabhängige Weg stellt eine ALLN-unabhängige Einknospung dar.

Im Gegensatz zu den Experimenten der Arbeitsgruppe um Kamal wählten Smythe et al als Maß für die Endozytose die Internalisierung des Transferrin-Rezeptors, was mit den LDL-Aufnahme Experimenten von Kamal et al nicht direkt vergleichbar ist. Smythe et al zeigten, dass in der Annexin 6-defizienten Zelllinie A431 die Endozytose des Transferrin-Rezeptors Annexin 6-unabhängig erfolgt. Sie verglichen

Wildtyp A431 Zellen mit stabil transfizierten A431 Zellen, die Annexin 6 überexprimierten. Im direkten Vergleich konnten sie zeigen, dass die Kinetik der zellulären Prozesse in beiden Zelltypen identisch war und für das Recycling und die Internalisierung des Transferrin-Rezeptors Annexin 6 keine Verbesserung ausmachen konnte. Das ist wohl damit zu begründen, dass bei limitierter Menge des Rezeptors eine Überexpression seines Adaptorproteins keinen begünstigenden Effekt haben kann.

Außerdem zeigten sie, dass in permeabilisierten A431 Zellen aufgereinigtes Annexin 6 nicht die Trennung der coated pits begünstigte (Smythe et al 1994).

Diesen Schritt ging die Arbeitsgruppe um Grewal et al. 2000 konnten sie zeigen, dass die Aufnahme von LDL in CHO Zellen (Chinese Hamster Ovary) durch die Co-Expression des LDL-Rezeptors und Annexin 6 signifikant gesteigert werden konnte gegenüber LDL-Rezeptor überexprimierenden Kontrollzellen. Noch dazu konnte gezeigt werden, dass steigende Mengen Ko-transfizierten Annexin 6 die LDL Rezeptoraktivität linear ansteigen ließ. Sie demonstrierten weiterhin in dieser Veröffentlichung, dass Annexin 6 scheinbar nicht auf die Internalisation jeden Rezeptors einen Einfluss nehmenden Faktor darstellt. In Untersuchungen, in denen Zellen mit dem Transferrin-Rezeptor und Annexin 6 kotransfiziert wurden stellte sich heraus, dass Annexin 6 das Recycling des Transferrin-Rezeptors begünstigt aber die Aufnahmerate des Transferrin-Rezeptors nicht signifikant gesteigert werden konnte (Grewal et al 2000).

#### **1.3.4 Interaktion von Annexin 2 mit Cholesterin**

Annexin 2 ist wie in Kapitel 1.4.1 bereits erwähnt ein Protein, das sich vornehmlich in den frühen Endosomen, der Plasmamembran und Caveolae aufhält. Auch Annexin 2 ist ein Protein, das eine feste Calcium-abhängige Bindung an Phospholipide eingeht. Dabei bevorzugt es anionische, azide Phospholipide, wie vor allem Phosphatidylsäure, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol, wozu es steigende Calcium Konzentrationen benötigt (Blackwood et al 1990).

Ähnlich dem in dieser Arbeit betrachteten Annexin 6 konnte für Annexin 2 eine Cholesterin-Sensitivität nachgewiesen werden. Sie stellt sich allerdings anders als für Annexin 6 dar.

Die Arbeitsgruppe um T. Harder konnte nachweisen, dass ein geringer Teil des Annexin 2 Pools Calcium-unabhängig empfindlich auf Cholesterinentzug durch Digitonin und Filipin reagiert. Behandlung von Baby Hamster Nieren Zellen (BHK) mit Filipin oder Digitonin zeigten ein Loslösung von Annexin 2 aus den Membranen. In frühen Endosomen und der Plasmamembran besteht die höchste Konzentration an Cholesterin in der Zelle. Dort findet sich auch am meisten Annexin 2. Es könnte also eine Verbindung vermutet werden zwischen dem jeweiligen Cholesteringehalt in der Membran und dem Aufenthaltsort von Annexin 2. Diese Beobachtung der cholesterinabhängigen Bindung blieb auf Annexin 2 beschränkt und fand für andere Membranproteine der Annexinfamilie keine Gültigkeit. (Harder et al 1997) .

Zeitgleich studierte die Arbeitsgruppe um Jost das Bindungsverhalten von Annexin 2 in Abhängigkeit zur Calcium-Konzentration. Sie stellte fest, dass die Calcium-unabhängige Bindung von Annexin 2 von den intakten Resten 15-24 des N-Terminus abhängt. Die Vermittlung der Bindung schreibt Jost einem potentiellen Rezeptor zu oder erklärt, dass durch die Bindung der core-Domäne eine bestimmte Konformation ermöglicht wird, durch die sie eine Calcium-unabhängige Bindung eingehen kann (Jost et al 1997). In Ergänzung dazu fanden König et al heraus, dass die Signaltransduktion zur Bindung von Annexin 2 einen intakten N-Terminus erfordert.

Die eigentliche Signaltransduktion der Annexin-Familie zur Calcium-abhängigen Bindung verläuft, wie bereits besprochen, über die core-Domäne. Die Calcium-unabhängige Bindung aber scheint andere Signale zu benötigen, die über einen intakten N-Terminus vermittelt werden. In Konstrukten aus dem N-Terminus von Annexin 2 und der core-Domäne von Annexin 1, denen ein intakter N-Terminus fehlt, fand gar keine Bindung statt. Konstrukte, die einen intakten N-Terminus aufwiesen und diesen auf Annexin 1 transferiert bekamen konnten die Eigenschaft der Calcium-unabhängigen Bindung auf das neue Konstrukt übertragen. So konnten dafür die N-terminalen Reste 1-27 identifiziert werden (König et al 2000).

Ayala Sanmartin beschäftigte sich ebenfalls mit dem Cholesterin-abhängigen Bindungsverhalten von Annexin 2. Er kam in seinen Studien zu gegensätzlichen Ergebnissen zu denen der Arbeitsgruppen Gerke, Jost und König.

Der Hauptpartner der Phospholipidbindung der Annexine ist Phosphatidylserin. In *in vitro* Studien an Phosphatidylserin-haltigen Liposomen studierte er den Einfluss von Calcium und Cholesterin auf das Annexinbindungsverhalten. Er konnte zeigen, dass ein Anstieg in den Liposomen an Cholesterin den Calcium-Bedarf zur Bindung reduziert. Weiterhin wies er nach, dass die Cholesterin-abhängige Bindung nicht über den N-Terminus des Proteins vermittelt wird. Das belegte er durch Bindungsstudien mit N-Terminus deletierten Proteinen, die ebenfalls mit steigender Cholesterinkonzentration in den Liposomen weniger Calcium zur Bindung benötigten.

Um die Vermutung der core-Domän-vermittelten Cholesterinbindung zu unterstützen, testete er das Bindungsverhalten der Annexine 5 und 6. Wenn seine Hypothese tatsächlich stimmte, erwartete er ebenfalls Bindungsverhalten von Annexin 5 und 6 bei cholesterinangereicherten Liposomen. Die Bindung bei diesen beiden Proteinen verbesserte sich tatsächlich. Das veranlasste Ayala-Sanmartin zu den Aussagen, dass die Bindung von Annexinen in Phosphatidylserin reichen Liposomen durch Cholesterin begünstigt wird und eine geringere Menge Calcium benötigt.

Des weiteren beschreibt er die Notwendigkeit der Anwesenheit von sauren Phospholipiden generell zur Bindung von Annexinen und schreibt als dritten Punkt dem N-Terminus eine untergeordnete Rolle bei der Vermittlung von Bindungseigenschaften zu (Ayala-Sanmartin 2001).

Da Sanmartin aber der einzige ist, dem diese Nachweise gelang muss kritisch mit seinen Ergebnissen umgegangen werden. Ergebnisse, die aus verschiedenen anderen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander produziert werden konnten, sind sicher mit einer größeren Wertung zu beachten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien & Reagenzien

Firma	Produkt
Gibco-BRL	Medium F-12 Nutrient Mixture (HAM) L-Glutamin Penicillin/Streptomycin Trypsin/EDTA Lösung (1x) PBS Foetal Calf Serum (FCS) Fungizon Hepes Puffer Lösung 1M
Sigma	Bovines Serum Albumin (BSA) Paraformaldehyd (PFA) Filipin 3-Aminopropyltriethoxy-Silane EDTA-Dihydrat DMSO Ethidium Bromid Glycerol Imidazol Mes Saponin SDS Desoxycholic Acid Sodium Salt Tris pH 7-9 Triton X para-Nirophenyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosid Glycerid Standard
Merk	Aceton z.A. Acrylamid / Bisacrylamid 30% (37,5 :1) Borsäure krist. Bromphenol Blau Calciumchlorid-Dihydrat Diethylether Ethanol Essigsäure Folin-Ciocalteus Phenolreagenz Isobutanol Kaliumbromid Methanol Natronlauge (1M, 2M) Salzsäure (1M, 2M) Tween 20
BioRad	Ammonium Persulfat Blotting Grade Blocker, fettfreies Milchpulver
Biomol	3 $\beta$ -2-Et <sub>2</sub> NHEtO-Androstenon (U18666A)
Biolabs	HRP Protein Detection Kit

Calbiochem	Antipain Chymostatin Leupeptin Pepstatin A Mowiol
Amersham-Pharmacia	ECL Westernblotting Detection Reagents PD-10 Säulen Rainbow Protein Marker
Molecular Probes	Amplex red Cholesterol Assay Kit Amplex red Reagent
Pierce	Albumin Standard
Roche	Phospholipid Enzym Reagents
Serva	Panceau S Solution Dialyse Schläuche Ø 6mm
Pharmacia Biotech	Protein Silver Staining Kit Gel Seal Tube
Fluka	Digitonin
ICN	Glycin

### 2.1.2 Primäre Antikörper

Antikörper	Firma	Tier	Gewicht	IMF / WB
Annexin 2 H7	V. Gehrke	Maus	31 kDa	1:75/1:1000
Annexin 6	Selbst	Schaf	68 kDa	1:25/1:100
GST Annexin 6	Monica Pons (Spanien)	Hase	70 kDa	1:50/1:200-1000
Caveolin ges.	Transd.Lab	Hase	18-23 kDa	1:10000
SRB 1	Tall			1:500
	Westhuyzen			
	Williams			

### 2.1.3 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Firma
Goat anti Mouse-Peroxidase IgG abs. (GaM-PO)	Dianova/Jackson
Goat anti Rabbit-Peroxidase IgG abs. (GaR-PO)	Dianova/Jackson
Rabbit anti Sheep-Peroxidase IgG abs.(RaS-PO)	Dianova/Jackson
Donkey anti Goat-Peroxidase IgG abs. (DaG-PO)	Dianova/Jackson

### 2.1.4 Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz

Antikörper	Firma	IMF
CY2 IgG abs. donkey $\alpha$ rabbit	Dianova/Jackson	1:200
CY2 IgG abs. donkey $\alpha$ goat	Dianova/Jackson	1:50
CY3 IgG abs. donkey $\alpha$ sheep	Dianova/Jackson	1:500
CY3 IgG abs. $\alpha$ mouse	Dianova/Jackson	1:100
CY3 IgG abs. $\alpha$ goat	Dianova/Jackson	1:50
Filipin		1:100/1:50

### 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Firma	Material
Falcon/Beckton Dickinson :	Blue Max Falcon tubes 50 ml Zellkulturpipetten a 5ml Zellkulturpipetten a 10ml Zellkulturpipetten a 25ml
Beckmann	Centifuge tubes (11x34mm) Centrifuge tubes (14x89mm) Quick seal centrifuge tubes
Costar	Zellschaber Einmalfiltrationssystem mit Flasche 500ml, 0,22 $\mu$ m
Kodak	Biomax Filme MR1 18x24 cm
Millipore/Amicon	Centricon-10, 10.000 Da
Qualilab	Spritzenvorsatzfilter 0,45 $\mu$ m CM Membran Spritzenvorsatzfilter 0,22 $\mu$ m CM Membran
NUNC	Zellschaber 7.5 mm Petrischalen Zellkultur a 10cm Durchmesser Petrischalen Zellkultur a 14cm Durchmesser Zellkulturflaschen a 80 cm <sup>2</sup> , angled neck Zellkulturflaschen a 72cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen a 164 cm <sup>2</sup> Kryotubes 1,8 ml 6-well multidish plate 12-well multidish plate 15ml Plastikzentrifugenröhrchen
Braun	Einmalspritzen 1 ml Einmalkanülen 24G1 (lila) Douncer Füllvolumen 15 ml
Abimed	Pipette P20 (-20 $\mu$ l) Pipette P100 (-100 $\mu$ l) Pipette P200 (-200 $\mu$ l) Pipette P1000 (-1 ml)
Rudolf Franke	Pipettenspitzen Universal 1000 blau Pipettenspitzen Universal 200 gelb
Schleicher und Schuell	Protran Nitrocellulose Membran 300 mmx3 m
Packard	Schwarze Optiplatte 96-well
Greiner bio one	Meßküvetten á 10x10x45 mm

	Gewebekulturflaschen a 15 cm <sup>2</sup>
Sarstedt	Röhrentubes 5 ml, 75x12 mm

### 2.1.6 Geräte

Firma	Gerät
Sigma	Tischzentrifuge 1-15K
Beckmann	Ultrazentrifuge TL100 Rotor TL100 Ultrazentrifuge L 7-55 Rotor SW-41
Janke und Kunkell	Vortex Ika Labortechnik VF2 Rührer Ikamag RH
Braun Melsungen	Minishaker Modell Kühnen
Techne	Heizblock Dri-Block 1 (DB1)
BioRad	Power Supply Power Pac 300 Trans-Blot Zelle SmartSpec 3000 Photometer
BDK, Luft u. Reinraumtechnik	Zellbank Typ LAF, Vertikalstrom 1988
Seitz	Mikroskop Laborvert F2 Axio Vision Viewer (Computerprogramm)
Sartorius	Feinwaage BP 410S
GFL	Wärmebad
Binder	Zellkulturinkubator
Packard	Packard Fluorocount Packard Halogen Light Source (150 Watt)
Mettler Toledo	pH Meter MP220
Heraeus	Minifuge T Zentrifuge Labofuge 400R
Nalgene	Einfrierbox (gefüllt mit Isopropanol)
Bandelin	Sonifizierer Sonovex RK 255 Transistor

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### Nährmedium für CHO-WT & CHOanx6 Zellen:

500 ml Nutrient Mix Ham F12

+ 10% foetales Kälberserum

+ 1% Penicillin/Streptomycin

+ 1% L-Glutamin

Nährmedium für NRK Zellen :

500ml DMEM  
+ 10% foetales Kälberserum  
+ 1% Penicillin/Streptomycin

Einfriermedium :

Nährmedium ohne Zusätze  
+20% foetales Kälberserum  
+20% DMSO

**2.2.1.1 Pflege der Zellkultur**

Die Kultivierung der Zelllinien CHO-WT und CHOanx6 erfolgte in 72cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen bei 5% CO<sub>2</sub>, bei 37°C und 95% wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Inkubator.

Die Arbeit mit den Zellen erfolgte mit sterilen Materialien und Medien unter sterilen Bedingungen unter der Werkbank.

Die konfluent gewachsenen Zellen wurden alle 3 Tage passagiert. Nach Abnahme des alten Mediums wurden sie zunächst mit 37°C warmen PBS (10 ml) gewaschen. Nach Absaugen des PBS mit der Wasserstrahlpumpe wurden mittels Trypsin (5 ml) nach einer Einwirkzeit von 1 Minute die Zellen vom Flaschenboden gelöst. Durch die Zugabe doppelter Menge frischen Nährmediums wurde die Reaktion gestoppt. Aus der Zellsuspension konnte nun die gewünschte Menge entnommen und in eine neue Zellkulturflasche überführt werden und mit frischem Medium auf ein Gesamtvolumen von 15 ml aufgefüllt werden. Als optimal erwiesen sich 2 ml Zellsuspension mit 13 ml frischen Medium.

**2.2.1.2 Ausplattieren von Zellen**

Ausgehend von der mit Medium gestoppten Trypsinreaktion wurden 300 µl (ca. 1x10<sup>5</sup> Zellen) dieser Suspension pro sechs-Loch-Platte ausplattiert und mit 1,7 ml frischen Mediums aufgefüllt.

**2.2.1.3 Einfrieren von Zellen**

Die konfluent gewachsenen Zellen wurden mit warmen PBS gewaschen und mittels Trypsin vom Flaschenboden gelöst. Nach Stoppen der Reaktion mit frischem

Medium wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon überführt und mit 2000 rpm bei Raumtemperatur (RT) für 5 Minuten in der Labofuge 400R zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet mit 750  $\mu$ l Nährmedium aufgenommen und tropfenweise mit Einfriermedium auf ein Gesamtvolumen von 1,5 ml versetzt.

Die Suspension wurde in Kryotubes überführt, von da an auf Eis gelagert und zunächst für 24 Stunden in der Einfrierbox bei  $-80^{\circ}$  gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **2.2.1.4 Auftauen von Zellen**

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Zellen wurden nach der Entnahme aus dem Kühlfach innerhalb von 30 Minuten auf Eis aufgetaut. Dann wurden sie in ein 15 ml Falcon überführt und mit 10 ml warmen Nährmedium (mit Zusätzen) vermischt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 2 Minuten bei 2000 rpm in RT. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 10 ml warmen PBS resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation mit 2000 rpm für 2 Minuten bei RT konnte der Überstand abgenommen werden und das Pellet in 5 ml Nährmedium aufgenommen werden. Zunächst sollten die aufgetauten Zellen in einer kleinen Gewebekulturflasche kultiviert werden und nach gutem Anwachsen und konfluentem Wachstum am Folgetag in eine größere Zellkulturflasche ( $72\text{ cm}^2$ ) überführt werden. Dabei kann der Inhalt der kleinen Flasche auf 2-3 große Flaschen verteilt werden. Die Lagerung erfolgt im Inkubator.

#### **2.2.1.5 Cholesterinanreicherung *in vitro* und *in vivo***

Konfluent gewachsene Zellen aus  $72\text{ cm}^2$  Zellkulturflaschen wurden wie zur Passage behandelt.

Es wurden dann 3 ml Zellsuspension und 17 ml frisches Nährmedium pro Petrischale (14 cm Durchmesser) verteilt. Mittels 2  $\mu\text{g/ml}$  U18666A (*in vitro*) bzw. 50  $\mu\text{g/ml}$  aufgereinigten LDLs (*in vivo*) wurde nach mindestens 6 Stunden Inkubation mit U18666A bzw. mindesten 2 Stunden Inkubation mit LDL ein Cholesterinakkumulation in den Zellen erreicht.

### 2.2.2 Membranpräparation

#### HB-Puffer :

250 mM Sucrose Lösung (in aqua bidest.)

+ 3 mM Imidazol

pH Wert auf 7,4 einstellen

mit Einmalfiltrationsflasche steril filtrieren

Lagerung bei 4°C im Kühlschrank

#### MES-Puffer :

25 mM Mes

+ 0,15 M NaCl

+ 1 % Triton X-100

+ 1/1000 PIC

pH auf 6,5 einstellen

#### HEPES-Puffer :

25 mM HEPES

+ 0,15 M NaCl

+ 1 % Triton X-100

+ 1/1000 PIC

pH auf 7,4 einstellen

#### Protease Inhibitor Cocktail :

4mM Pepstatin A

+ 40mM Chymostatin

+ 40mM Leupeptin

+ 40mM Antipain

in DMSO lösen

unter dem Abzug pipettieren

#### 2.2.2.1 Herstellung von perinukleärem Überstand (PNS)

Nach Waschen mit kaltem PBS wurden die Zellen aus mindestens 4 konfluent gewachsenen Zellkulturflaschen à 164 cm<sup>2</sup> oder 4 Petrischalen à 14 cm Ø mit dem Zellschaber vom mit 5 ml vorgekühltem HB Puffer (+1/1000 PIC) benetzten Boden abgeschabt. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde der Boden mit weiteren 5 ml HB Puffer (+1/1000 PIC) nachgespült. Die Zell-Puffer-Suspension wurde in einem 50 ml Falcon gesammelt.

Es folgte eine Zentrifugation in der Labofuge 400R für 10 Minuten mit 2200 rpm bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1ml HB-Puffer + PIC (1/1000) resuspendiert. Mit einer 1ml Spritze und einer subcutan Kanüle (24G1) wurde das Gemisch nun 10-15x aspiriert.

Nach erneuter Zentrifugation für 15 Minuten, mit 3400 rpm, bei 4°C wurde der Überstand in ein Eppendorf Cup überführt und mit 2µl PIC versetzt. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C.

Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

### 2.2.2.2 Triton X 100 Solubilisierung

Alle Arbeitsschritte müssen auf Eis stattfinden. Alle Lösungen und Geräte müssen vorgekühlt verwendet werden.

Die konfluent gewachsenen Zellen aus mindestens 3 Petrischalen à 14 cm Ø wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen. Mit dem Zellschaber wurden sie mit je 5 ml MES vom Flaschenboden abgekratzt und in einen vorgekühlten Douncer überführt. Nach 10 maligem douncen wurden sie im Douncer für 20 Minuten auf Eis inkubiert.

Anschließend wurden sie mit 14.000 g, 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand stellte die TX-100 lösliche Fraktion dar.

Das Pellet wurde in 1ml HEPES Puffer aufgenommen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Nach Abschluss der Inkubation sollte es vollständig aufgelöst sein.

Nach Aliquotieren der löslichen Fraktion und des Pellets in Eppendorf Cups wurden die Aliquots bei -20°C gelagert.

### 2.2.3 Endosomenpräparation

#### Sucrose Lösungen :

62% (bzw. 35%, 25%) Sucrose

in 3mM Imidazol

pH auf 7,4 einstellen

Lösungen mit Spritzenvorsatzfilter (0,45µm) steril filtrieren

#### 2.2.3.1 Gradienten schichten

Es werden vorgekühlt in 15ml Falkons vorgelegt:

3ml 35% Sucrose Lösung

2ml 25% Sucrose Lösung

3ml HB-Puffer +PIC 1/1000

In einem Beckmann-Zentrifugen Röhrchen Ø 89 mm (Füllvolumen ~11 ml) wurden 840 µl PNS mit 1160 µl 62% Sucrose (auch vorgekühlt!) vermengt. Nach sorgfältigem vortexen wurden die 3 ml 35% Sucrose, die 2 ml 25% Sucrose und die

3 ml HB-Puffer mit PIC aufgeschichtet. Die geschichteten Gradienten in den Beckmann-Röhrchen wurden in den SW41 Rotor der Beckmann-Ultrazentrifuge L7-55 eingelassen. Die gegenüberliegenden Buckets werden auf +/- 0,002g auf der Feinwaage gegeneinander austariert.

Zentrifugation für 90 Minuten bei 35.000 rpm, im Vakuum und 4°C.

Nach der Zentrifugation sollten 2 trübe Fraktionen im oberen und unteren Drittel des Gradienten sichtbar sein.

Mit der 1 ml Pipette wurden die Fraktionen nun voneinander getrennt in Eppendorf Cups überführt. Fraktion 10 befindet sich hierbei nun an der Obergrenze des Gradienten, Fraktion 1 am Boden des Zentrifugenröhrchens.

Aus den einzelnen Fraktionen (F) konnten schwere Membranen (heavy membranes = HM), frühe Endosomen (early endosomes = EE) und späte Endosomen (late endosomes = LE) gewonnen werden.

Mittels Cholesterinbestimmung (s.u.) konnte zugeordnet werden, wo sich die heavy membranes, die early und die late endosomes innerhalb des Gradienten befanden.

In der Regel hielten sich die HM in den Fraktionen F1-F3 auf, die EE in den Fraktionen F4-F6 und die LE in den Fraktionen F7-F9 auf.

Durch Überführen gleicher Mengen der einzelnen Fraktionen in ein Gefäß konnten Probenpools der Endosomen und Membranen gesammelt werden.

Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

### **2.2.3.2 Aufkonzentrierung endosomaler Membranfraktionen**

Um eine größere Menge Protein in dem Probenvolumen zu erhalten, wurden die gepoolten Proben mit einem Volumen von 1000 µl dialysiert (s.u.). Die durch Dialyse verdünnten Proben (~ um Faktor 2 verdünnt) wurden in Centricon-10 tube überführt und für 3x10 Minuten und 1x7 Minuten bei 4230 g, bei 4°C in der Heraeus Sepatech-Minifuge T aufkonzentriert. Das erlangte Probenvolumen lag bei ~200 µl.

Lagen nach der Dialyse nur kleinere Volumina vor, konnten die Proben auch in die Ultrafree-MC Millipore überführt werden (Eppendorf Cups mit Filter) und in der Sigma Tischzentrifuge aufkonzentriert werden.

Die Zentrifugation erfolgte hier bei 4°C, 4000 rpm, für insgesamt ~ 60 Minuten. Durch regelmäßige Kontrolle der aufkonzentrierten Restmenge ergaben sich viele kurze Zentrifugationsschritte.

Die aufkonzentrierte Menge betrug hier von max. 450 µl auf ~40 µl. Entscheidend scheint der Proteingehalt in den Proben zu sein. Je mehr darin enthalten ist, desto langsamer erfolgte die Aufkonzentrierung.

### 2.2.3.3 Proteinmessung nach Lowry

Die Proteinmessung wurde nach der Methode von Lowry et al (1951) durchgeführt.

<u>Lowry Lösung A :</u>	<u>Lowry Lösung B:</u>	<u>Lowry Lösung C :</u>
3%Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2% Natriumkaliumtartrat	1% CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O
+ 0,15n NaOH		

Zur Erstellung einer Eichgrade wurde bovines Serumalbumin (BSA) in steigender Konzentration von 0 µg – 2 – 4 – 6 – 8 –10 – 15 – 20 µg/µl auf ein Gesamtvolumen von 400 µl mit H<sub>2</sub>O bidest (dd) in Sahrstedt-Röhrchen (5 ml) pipettiert

20 µl Probe wurde auf 400 µl mit H<sub>2</sub>O bidest aufgefüllt.

Nach Zugabe von 1ml Lowry Mix ( A : B : C 97 : 1,5 : 1,5) erfolgte ein sorgfältiges vortexen und eine 10 minütige Inkubation.

Anschließend wurden in jede Probe und Eichprobe 125 µl Folin Lösung (Folin-Ciocalteu-Reagenz : H<sub>2</sub>O 1 : 2 ) pipettiert. Nach abermaligem vortexen inkubierten die Proben für 30 Minuten. Anschließend wurden die Proben in Küvetten überführt und nach 30 Minuten konnte bei einer Wellenlänge von 750nm im Smartspec-Photometer die Extinktion gemessen werden.

### 2.2.3.4 LDL Aufreinigung

Lipoproteine wurden mit Hilfe von Kaliumbromid (KBr) Gradienten (Harvel et al) isoliert und nach der Isolierung in Kaliumbromid gelagert.

Zur weiteren Benutzung ist das KBr wegen seiner cytotoxischen Wirkung vom LDL zu extrahieren. Mittels PD10-Säulen erfolgt die Aufreinigung. Das KBr bleibt hierbei in den Säulen hängen.

Die Säulen wurden in einen Ständer über ein Becherglas gehängt. Von oben wurde sie nun mit sauberem PBS aufgefüllt. Das PBS lief als Waschschrift zuerst alleine durch. Der Waschvorgang erfolgte 4x. Anschließend wurden 2ml LDL auf die Säule gegeben. Zur LDL-Elution wurde erneut PBS auf die Säule gegossen. Mit dem Auslaufen des LDL aus der Säule wurde es in einem frischen Falkon aufgefangen und gelagert wird.

Die Lagerung erfolgte bis zum Folgetag im Kühlschrank bei 4°C.

### 2.2.3.5 Dialyse von Proben

<u>Dialyse Puffer:</u>	<u>PBS (10fach ):</u>
50mM Tris	137mM NaCl
100mM NaCl	2,7mM KCl
1% Triton X100	8,1mM $\text{KH}_2\text{HPO}_4$ reinst
pH auf 7,4 einstellen	1,5mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ bidest
	pH 6,9
	zur Anwendung 1:10 Verdünnung: pH =7,4

Um Sucrose aus den Proben zu waschen, werden die Proben entweder gegen Puffer oder gegen einfaches PBS dialysiert.

Dazu werden zurecht geschnittene Dialyse-Schläuche zunächst für 3 Minuten in kochendem Wasser aufgekocht, um sie von Proteasen zu befreien. Fortan wurden sie aus Schutz vor porösen Löchern immer feucht gehalten.

Man dichtet sie an Ihrem Ende mit einem Knoten und einer Nabelklemme ab.

Die Proben wurden in den Schlauch pipettiert und die andere Seite wurde ebenfalls mit Knoten und Nabelklemme gedichtet. Es sollte immer nur 2/3 des

Dialyseschlauches mit Probenmaterial gefüllt sein, da sich das Volumen während der Dialyse vergrößert.

Die Dialyseschläuche wurden bei 4 °C gegen PBS oder Puffer auf dem Rührer für mindestens 24 Stunden dialysiert..

Nach Beendigung der Dialyse wurden die Proben in Eppendorf Cups pipettiert und bei -20°C gelagert.

#### 2.2.4 SDS Page nach Laemmli (1970)

<u>Acrylamid/Bis :</u>	<u>Tris-HCl Puffer :</u>	<u>Tris-HCl Puffer :</u>
30% Acrylamid	1,5 M Tris –Base	0,5M Tris-Base
0,8 % Bis	500ml H <sub>2</sub> O bidest	500ml H <sub>2</sub> O bidest
500ml H <sub>2</sub> O bidest	pH 8,8	pH 6,8

<u>SDS :</u>	<u>5-fach Proben Puffer:</u>	<u>Laufpuffer (10x):</u>
10% SDS	20ml Tris-HCl pH 6,8; 0,5M	120g Tris-Base
100ml H <sub>2</sub> O bidest	20ml SDS 10%	576g Glycine
	20ml Glycerol	40g SDS
	30ml H <sub>2</sub> O bidest	4000ml H <sub>2</sub> O bidest
	10ml β-Mercaptoethanol	pH auf 8,8

Um komplexe Proteingemische nach ihrer Größe aufzutrennen wurde die Gelelektrophorese zur Proteinauftrennung nach U. K. Laemmli zu Hilfe durchgeführt.

Das Prinzip ist, durch eine vollständige Denaturierung der komplexen Polypeptide mittels Mercaptoethanol sowie Nivellierung ihrer eigenen negativen Ladung durch das Überwiegen des stark anionischen Natrium-Dodecylsulfat (SDS), eine Größentrennung im elektrischen Feld zu erreichen. Die Polymerisation von Acrylamidpolymeren führt, in Abhängigkeit zu ihrer Prozentigkeit im Trenngel, zu einer bestimmten Gelporengröße. Die Auftrennung der Proteine ist also nicht nur abhängig von ihrer Ladung und ihrer Größe, sondern auch von der Porengröße des Trenngels.

Empfohlene Prozentmengen von Acrylamid in Abhängigkeit der Proteingröße:

MW (Molekulargewicht) 10-60 kD	mit 15% Aa. (Acrylamid)
MW 30-120 kD	mit 10% Aa.
MW 50-200 kD	mit 8% Aa.

Zunächst wurden die Komponenten zur Herstellung des Acrylamid Geles vorbereitet.

Die beiden Glasplatten, zwischen die die Gellösungen gegossen werden, mussten zunächst mit Aceton oder Ethanol geputzt werden, um sie von restlichen Fettbeständen zu befreien. Dann wurden sie in die vorgesehene Haltevorrichtung eingespannt. Wird ein großes Gel gegossen, musste zwischen die beiden Glasplatten ein Spacer, Abstandhalter, mit Fett zur Dichtung benetzt, an die Außenseiten eingebaut werden. Bei Minigelen befand sich dieser Abstandhalter an der höheren Glasplatte. Er hatte eine Dicke von 1,5mm, was dem polymerisierten Gel eine höhere Stabilität verleitet.

Als erstes wurde das Untergel (= Trenngel) gegossen. Die angegebenen Mengen reichten für ein großes oder zwei Minigele:

Es wurden ausnahmslos 12,5% Acrylamid-Trenngele als Untergele gegossen:

Acrylamid-bis	12,5 ml
1,5M Tris-base pH8,8	7,5 ml
H <sub>2</sub> O bidest	9,3 ml
SDS 10%	600 µl
AP 10%	200 µl
Temed	20 µl

AP= Ammoniumpersulfat, dient als Katalysator der Polymerisation

Temed= N,N,N,N-tetramethylethylendiamin, dient ebenfalls als Katalysator

Die Lösung wurde gemischt und zwischen die beiden Glasplatten gegossen. Um eine gerade Trennlinie zwischen Ober- und Untergel zu erhalten, wurde auf das Gel eine dünne Schicht Isobutanol geschichtet. Sie schützte ebenfalls vor Austrocknung. Nach ca. 20 Minuten war eine Polymerisation erreicht.

Als Obergele (= Sammelgele) dienten ausnahmslos 3,5 % Acrylamidgele:

Acrylamid-bis	2,4 ml
0,5M Tris-HCl pH 6,8	5,0 ml
H <sub>2</sub> O bidest	12,4 ml
SDS 10%	200 µl
AP10%	300 µl
Temed	10 µl

Nachdem das Isobutanol abgekippt und mit Wasser nachgespült wurde, kann das Obergel ebenfalls gemischt und auf das Trenngel pipettiert werden.

Gleich im Anschluss daran wurde der Kamm, der die Taschen im Obergel formt in das frische, noch flüssige Obergel gesteckt.

Nach erneuter Polymerisationszeit von max. 20 Minuten (bei Minigelen) konnte das Gel mit Proben beladen werden. Dafür wurde der Kamm vorsichtig aus dem Obergel gezogen und die geformten Taschen mit Laemmli Laufpuffer ausgespült. Nun wurden die Glasplatten in die Gellaufkammer eingespannt und die Proben konnten eingefüllt werden.

Die Kammer wurde mit Laufpuffer so gefüllt, dass die Spannungsdrähte mit Laufpuffer bedeckt waren. Der Raum zwischen den Minigelen wurde ebenfalls mit Laufpuffer gefüllt.

Die Proben liefen im Sammelgel mit 20 mA in die Taschen ein und wurden dann bei max. 40 mA aufgetrennt. In Abhängigkeit, ob die Gelelektrophorese an einem oder zwei Gelen stattfand, dauerte sie zwischen 1,5 bis 3,5 Stunden

#### **2.2.4.1 Probenvorbereitung:**

Bei den Minigelen wurden in den meisten Fällen die Proben nach Volumen aufgetragen. Eine Tasche des Obergels hat ein Füllvolumen von maximal 45 µl.

Die Proben wurden in ein Eppendorf Cup vorgelegt und mit 1/5 des Gesamt-Taschenvolumens mit 5-fach Probenpuffer versehen. Durch die anschließende 5-minütige Erhitzung der Proben auf 95°C konnten die Wasserstoffbrückenbindungen der Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine gelöst werden. Durch den Zusatz von SDS im Probenpuffer bekamen alle Proteine eine gleichstarke negative Ladung. Der

Zusatz von Mercaptoethanol löste die Disulfidbrücken zwischen Cysteinen innerhalb der Proteine. Nach dem Aufkochen wurden die Proben für mindestens eine Minute auf Eis gelagert.

Als Größenreferenzwert für die Proteingröße lief immer Rainbow-Marker und gelegentlich ECL-Marker mit. Der Rainbow-Marker deckt den Größenbereich von 14-220 kD ab. Es wurden 1 µl Rainbow-Marker, 2,5 µl Glycerol zur Beschwerung der Probe und 7 µl Wasser vermengt. Der ECL-Marker bestand aus 3 µl Marker und 7 µl Wasser.

Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben für 10 Sekunden in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und konnten dann in die Geltaschen übertragen werden.

#### **2.2.4.2 Westernblot**

##### Blotting Puffer:

20% Methanol

0,31% Borsäure

pH 9,0

Die mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden nun auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dazu wurden die vorgeschchnittene Nitrocellulosemembran sowie jeweils 2 x 2 Filtermembranen zum Über- und Unterschichten und 2 Schaumstoffkissen in Blotting Puffer eingeweicht. Das Acrylamidgel wurde von der Glasplatte gelöst und auf die Seite der Kathode, die Nitrocellulose zur Seite der Anode zwischen die Filter und Schaumstoffkissen eingespannt. Der Proteintransfer war bei Minigelen nach 90 Minuten bei 350 mA, bei großen Gelen nach mindestens 4h bei 250 mA abgeschlossen.

Während des blotting-Vorganges musste die Kammer bei 4°C gekühlt sein.

Zur ersten Darstellung der transferierten Proteine wird die Nitrocellulosemembran mit Panceau S-Lösung eingefärbt.

Die Einfärbung mit Panceau-Lösung diente der Überprüfung des Proteintransfers. Dazu wurde die Nitrocellulose in ein Gefäß mit Panceau gefüllt gelegt und für 10 Minuten auf dem Rüttler inkubiert. Durch die Anfärbung der transferierten

Proteinbanden konnte man einen ersten Anhalt über Quantität und die Qualität des Transfers erhalten. Zur genauen Befundung wurden die Membranen vorsichtig mit H<sub>2</sub>O dd entfärbt und zur Dokumentation fotokopiert. Zwischen der Panceau-Lösung und den folgenden Antikörper Inkubationen fanden keine inhibierenden Interaktionen statt. Zur Weiterverwendung wurden die Membranen in H<sub>2</sub>O dd komplett entfärbt.

### **2.2.4.3 Immunoblot**

Zunächst wurde die Nitrocellulose jetzt in Blocking-Lösung aus PBS + 0,1% Tween + 10% Milchpulver für 45 Minuten auf dem Rüttler bei Raumtemperatur lichtgeschützt geblockt.

Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Er wurde in 5% BSA + 0,1% Tween beliebig verdünnt und inkubierte für 90 Minuten bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht auf dem Rüttler. Die Blocking-Lösung wurde für den zweiten Antikörper aufbewahrt.

Nach der Inkubation erfolgten 3 Waschvorgänge für jeweils 10 Minuten mit PBS + 0,1% Tween. Der primäre Antikörper konnte wiederholt eingesetzt werden.

Der sekundäre Antikörper wurde in der Blocklösung gelöst. Es wurden an Peroxidase gekoppelte IgG Antikörper in der Verdünnung 1:1000 verwandt. Die einzige Ausnahme stellt der Ziege  $\alpha$  Maus IgG Antikörper dar, der in der Verdünnung von 1:5000 eingesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte für alle zweiten Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rüttler. Wenn der ECL-Marker als Probe aufgetragen wurde, mußte als zweiter Antikörper ein Biotin-gelabelter HRP $\alpha$ ECL Antikörper in der Verdünnung 1:1000 ebenfalls in die Blocking-Lösung ergänzt werden. Nach der Inkubation mit den sekundären Antikörper wurde die Membran für 6 x 5 Minuten gewaschen. Die ersten drei Waschgänge in PBS + 0,3 % Tween, die folgenden drei in PBS + 0,1 % Tween. Die abgetropfte Membran wurde nun in eine Filmkassette gelegt, in der Dunkelkammer mit ECL-Lösung (Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 1:1) beträufelt und die Filme konnten aufgelegt werden. In der Regel erfolgten Belichtungszeiten von 10, 30, 60 Sekunden und 5 Minuten.

#### 2.2.4.4 Strippen von Nitrocellulose Membranen

##### Lösung A :

0,2M Glycin pH 2,5 (mit HCl)

##### Lösung B :

50mM Tris pH 7,5 (mit HCl)

Die Nitrocellulosemembran wurde mit H<sub>2</sub>O bidest angefeuchtet. Anschließend wurde sie für 2x10 Minuten mit der 0,2 molaren Glycin Lösung gewaschen. Es schloss sich ein 10-minütiger Waschgang mit 50 mM Tris an.

Nach 45 Minuten Block mit 10% Milchpulver in PBS / Tween 0,1% konnte der Streifen mit dem ersten Antikörper neu beladen werden. Das weitere Vorgehen verhielt sich wie bei einem Immunoblot.

#### 2.2.5 Silberfärbung

Durch die Reduktion von Silberionen durch die Aminosäuren Glutamin, Aspartat und Cystein können Proteine in der Silberfärbung sichtbar gemacht werden. Die untere Nachweisgrenze liegt hierbei bei 5-30 ng Protein /Bande.

Die Silberfärbung wurde streng nach dem Protokoll und mit den gelieferten Lösungen der Fa. Pharmacia Biotech durchgeführt. Das SDS Page Gel wurde nach der Proteinauftrennung für 30 Minuten fixiert. Als Fixierlösung dienten Ethanol/Eisessig (100 ml + 25 ml in 250 ml aqua bidest). Danach erfolgte die Sensibilisierungsphase für 30 Minuten. Das Gel wurde in eine Lösung bestehend aus Ethanol/Glutardialdehyd (25%w/v)/Natrium-Thiosulfat (5%w/v)/Natriumacetat (75 ml + 1,25 ml + 10 ml + 17 g in 250ml aqua bidest) überführt. Nach 3x5 minütigem waschen folgte die Silberreaktion. Silbernitrat Lösung (2,5% w/v) / Formaldehyd (37% w/v) (25 ml + 0,1 ml in 250ml aqua bidest.) wurden vermischt und das Gel darin für 20 Minuten gewaschen. Im Anschluss an zwei Waschungen in Wasser für jeweils 1 Minute erfolgte die Entwicklung. Als Entwicklerlösung dienten Natrium Carbonat/Formaldehyd (37%w/v) (6,25 g + 0,05 ml in 250ml aqua bidest). Die Entwicklungsdauer war abhängig vom Erscheinen sichtbarer Banden. Werden die Banden sichtbar musste die Entwicklerlösung abgegossen werden und Stop-Lösung auf das Gel gegossen werden. Sie bestand aus EDTA-Na (+2H<sub>2</sub>O) (3,65 g in 250ml aqua bidest). Nach 3x 5 Minuten waschen konnte das Gel eingescannt werden.

## **2.2.6 Immunfluoreszenz**

### **2.2.6.1 Beschichtung von Coverslips**

Die Coverslips (CS) wurden in einen Aceton-beständigen Ständer gestellt und in einem Silane-Aceton Mix im Verhältnis 1:50 für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rüttler gewaschen. Danach wurden die Coverslips in reinem Aceton für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rüttler gewaschen. Anschließend wurden sie für 2x5 Minuten in aqua bidest gewaschen, dann im Inkubator bei 37°C trocknen gelassen und unter Zellbank für mindestens 4 Stunden zur UV-Sterilisation stehen gelassen.

Die sterilen, beschichteten Coverslips wurden in eine 6-Loch-Platte gelegt (maximal 3 CS pro Loch) und die darzustellenden Zellen wurden wie unter Kapitel 2.2.1.2 beschrieben ausplattiert. Dort wuchsen sie dann unter sterilen Bedingungen im Inkubator bis zum Folgetag an den Coverslips an.

### **2.2.6.2 Fixierung und Antigenmarkierung**

Die bewachsenen Coverslips wurden vorsichtig mit einer feinen Pinzette in eine 12-Loch-Platte überführt (jeweils 1 Coverslip pro Loch). Dort wurden die Zellen auf den Coverslips mit Paraformaldehyd (PFA) 8 % und PBS 1:1 fixiert. Es reichten gut 500 µl jeder Komponente pro Loch. Nach der 30 minütigen Fixation bei Raumtemperatur wurde das PFA/PBS mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Coverslips 5x5 Minuten in reinem PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wurde PBS mit 0,5% Glycin und 0,05% Saponin (= Lösung A) als Waschlösung versetzt.

Es folgte im Anschluss der Blockvorgang für 20 Minuten. Die Blocklösung bestand aus Lösung A + 2% BSA (= Lösung B). Die Waschlösung wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgenommen und pro Coverslip wurden 60 µl Blocklösung auf das Coverslip pipettiert.

Lösung B diente ebenfalls als Antikörperlösung. Dabei wurden pro Coverslip 50 µl Lösung benötigt. Nach Absaugen der Blocklösung B wurden nun 50 µl dieser Antikörperlösung auf jedes Coverslip pipettiert. Die Inkubation dauerte 60 Minuten und fand bei 37°C statt. Im Anschluss daran folgten zwei kurze Waschgänge in PBS und anschließend 2x5 Minuten waschen in Lösung A.

Der zweite Antikörper wurde wie der erste in Lösung B verdünnt und in jeweils 50 µl auf jedes Coverslip pipettiert. Filipin als Marker für Cholesterin wurde ebenfalls wie der zweite Antikörper behandelt und in einer 1:100 Verdünnung eingesetzt. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte bei 37°C für 45 Minuten. Es schlossen sich 3x5 Minuten mit PBS waschen an.

Zum Abschluss wurden 25 µl PPD in 250 µl Mowiol gelöst und 4 µl des Gemisches pro Coverslip auf einen Objektträger pipettiert, auf das dann das Coverslip mit der Zelleseite zum Objektträger gerichtet fixiert wurde. Als alles etwas getrocknet war wurde das Coverslip mit Nagellack auf dem Objektträger versiegelt. Die Lagerung erfolgte in einer lichtgeschützten Box im Kühlschrank.

Die Betrachtung der vollständig fixierten Zellen konnte am Folgetag nach Erwärmen der Objektträger bei Raumtemperatur geschehen. Die Bildverarbeitung erfolgte an einem Zeiss-Mikroskop mit dem Axio-Vision-Viewer Programm der Fa. Zeiss.

### 2.2.7 Beta-Hexosaminidase Aktivitätsmessung

#### Substratpuffer-Lösung :

10 mM para-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D glucopyranosid in  
0,1 M Natrium-Citrat pH 4,6  
0,04% NaN<sub>3</sub>  
0,2% BSA

#### Stop-Lösung:

0,4M Glycin  
NaOH pH 10,4

#### Berechnung der Aktivität:

Aktivität (in mU/ml) =  $\frac{\Delta E_{405} \times \text{Meßvolumen in ml} \times 1000}{\epsilon \times \text{Enzymvolumen} \times \text{Inkubationszeit in Min.}}$

der molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) für p-Nitrophenol beträgt 18,5 cm<sup>3</sup> / Mol bei 405 nm Wellenlänge.

Die Bestimmung der β-Hexosaminidase-Aktivität dient zur Qualitätskontrolle der späten Endosomen. Sie ist ein hydrolytisches Enzym, das sich in den späten Endosomen anreichert. Hohe Aktivitätsmesswerte in den späten Endosomen geben Auskunft über eine gute Endosomenpreparation.

Es wurden 90 µl Substrat-Puffer mit 10 µl Triton-X100 vermengt. Dazu kamen 50 µl Probe. Nach sorgfältigem Mischen erfolgte eine Inkubation von mindesten 30 Minuten bei 37°C. Im Anschluss wurden 500 µl Stopp-Lösung dazu gegeben und die Extinktion des freiwerdenden p-Nitrophenols wird bei einer Wellenlänge bei 405 nm gemessen.

### 2.2.8 Cholesterin Bestimmung

Die Bestimmung des Cholesteringehaltes in den Proben erfolgte nach einer photometrischen Messung. Hierbei wurden sowohl das freie Cholesterin als auch die Cholesterin-Ester gemessen. Es wurde nach Protokoll der Herstellerfirma Molecular Probes mit den mitgelieferten Reagentien gearbeitet. Alle Proben wurden in einer 96-Loch-Platte vorgelegt.

Zunächst wurde eine Standardreihe mit der steigenden Konzentration von 0 - 0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,8 - 1,6 mg/ml Cholesterin auf ein Gesamtvolumen von 50 µl mit HB-Puffer aufgefüllt erstellt.

Das eingesetzte Probenvolumen waren stets 50 µl Probenmaterial. In Addition dazu wurden sowohl auf die Standardreihe als auch auf die Probenreihe 50µl Reaktionmix gegeben.

Der Reaktionsmix setzte sich wie folgt zusammen:

Horseradish Peroxidase (HRP) 1/100 der Gesamtmenge

Oxidase 1/500 der Gesamtmenge

Esterase 1/1000 d. G.

Amplex Red Reagenz 1/67 d. G.

1/5 der Gesamtmenge stellte der 5x Reaktions-Puffer dar. Die Differenz wurde mit H<sub>2</sub>O bidest ergänzen. Nachdem jede Probe mit Reaktionsmix versehen war, erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei 37°C im Wärmeschrank. Im Anschluss wurde die photometrische Messung am Flourocounat bei einer Extinktion von 530-590 nm (scan3) durchgeführt.

### 2.2.9 Phospholipidbestimmung

Mittels eines enzymatischen Farbtestes kann der Phospholipidgehalt in Proben ermittelt werden (nach Takayama et al 1977).

Dabei wurde nach dem Protokoll der Fa. Roche und ausschließlich mit ihren Reagentien gearbeitet.

Die Reaktionsmische wurden aus den mitgelieferten Flaschen hergestellt. Hierbei wurden aus Flasche 1 (Puffer Lösung) 40 ml in Flasche 2 (Enzym Reagenz) überführt. Flasche 3 diente gebrauchsfertig als Standardlösung. Die Messung erfolgt in einer 96 Loch Platte.

Zunächst wurde eine Standard-Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 100% Standard - 1:2 - 1:5 - 1:10 - 1:20 - 1:50 - 1:100 von der Ausgangskonzentration von 0,541 mg/ml ausgehend pipettiert. Der Standard für die 100 µl Proben bestand jeweils aus 10 µl Standard-Verdünnung und 90 µl HB-Puffer. Der Standard für die 10 µl Proben wurde unverdünnt eingesetzt.

Dann wurden die Proben vorgelegt. Sowohl bei den 10 µl Proben als auch bei den 100 µl Proben wurden 200 µl Reaktionsmix ergänzt.

Ohne Inkubationszeit konnte die Extinktion bei 470-560nm gemessen werden.

### 2.2.10 HPLC

Mittels einer HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) kann die Verteilung von Phospholipiden in Membranen gemessen werden.

Dazu mussten die Proben in einem organischen Lösungsmittel gelöst sein. Hierfür wurden 800 µl Probenmaterial eine Stunde bei 45.000 rpm in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die aufkonzentrierten Membranen wurden dann in 2 ml Methanol aufgenommen und in ein Pyrex-Röhrchen überführt. Es folgte für 30 Minuten eine Sonifikation im Wasserbad mit anschließendem sorgfältigen vortexen für 3 Minuten. 4 ml Chloroform wurden dazugegeben und die Proben für 1 Stunde unter dem Abzug stehen gelassen. Danach wurden 1,2 ml H<sub>2</sub>O bidest ergänzt und für 2 Minuten gevortext. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 2000 g zeichnete sich eine Chloroform-Phase unter der Methanolphase ab. Diese Chloroformphase wurde vorsichtig mit der Pasteurpipette abgenommen und in neues Pyrex-Röhrchen

überführt. Die Methanolphase wurde verworfen. Unter stetigem Stickstoffdampf wurde innerhalb einer Stunde das Chloroform unter dem Abzug abgedampft und die Proben konnten bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Nach Auftauen der Proben mussten sie zum Weitergebrauch in Lösung gebracht werden. Hierfür wurden n-Hexan : Isopropanol im Verhältnis 3 : 1 angesetzt und in den Pyrex-Röhrchen mit den Proben vermennt. Im Anschluss konnte in  $20\text{ }\mu\text{l}$  Portionen die Probe in die HPLC Säule injiziert werden.

### 2.2.11 Dünnschicht Chromatografie

#### Laufmittel für Phospholipide :

I : n-Hexan : Diethylether 1:1

II : Chloroform : Methanol : Ameisensäure : Wasser 65 : 35 : 2 : 4

III : n-Hexan : Diethylether : Essigsäure 80 : 20 : 1,5

#### Laufmittel für Glyceridstandard :

n-Heptan : Diethylether : Essigsäure 9 : 3 : 1

Als Proben wurden zunächst Phospholipid- und Glyceridstandards bekannter Konzentration aufgetragen. Sie waren gelöst in Chloroform : Methanol im Verhältnis 2:1.

Bei dem Lauf mit Phospholipiden wurde die Dünnschicht-Chromatographie-Platte zunächst in einem Leerlauf mit Laufmittel 1 vorgewaschen und trocknen gelassen.

Dann wurden die Proben in unterschiedlicher Konzentration auf die Platte pipettiert und Laufmittel 2 wurde zu einem Viertel an der Platte hoch laufen gelassen. Nachdem die Platte wieder getrocknet war, wurde Laufmittel 3 bis kurz unter den oberen Rand laufen gelassen. Die Laufront wurde markiert und die trockene Platte in einer gesättigten Jodkammer entwickelt.

Bei einem Glyceridstandard-Lauf wurden die Proben aufgetragen, trocknen gelassen und das Laufmittel anschließend bis zum oberen Rand laufen gelassen. Nach Markierung der Laufront wurde die Platte ebenfalls in einer gesättigten Jodkammer entwickelt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung eines experimentellen Systems zur Akkumulation von Cholesterin in Endosomen

Annexin 6 findet sich an der Plasmamembran und in frühen Endosomen vieler Säugetierzellen. Grewal et al konnte in einer Reihe von Experimenten zeigen, dass die Aufnahme und Akkumulation von LDL in späte Endosomen/Prelysosomen zur gleichzeitigen Translokation von Annexin 6 in späte Endosomen führt (Grewal et al 2000). Einer der Hauptbestandteile von LDL ist Cholesterin. Deshalb sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob eine Erhöhung des Cholesteringehaltes die Bindung von Annexin 6 an späte Endosomen beeinflussen kann und ob eine Akkumulation von Cholesterin in späten Endosomen einhergeht mit einer Anreicherung von Annexin 6 in diesen endosomalen Kompartimenten.

Erstes Ziel war, ein System zu entwickeln, das es ermöglicht, die Lokalisation und Membranaffinität von Annexin 6 in Abhängigkeit zum Cholesteringehalt darzustellen.

Da die verwendeten Annexin 6 überexprimierenden CHO (Chinese Hamster Ovary, CHOanx6) und Wildtyp CHO Zellen (CHO-WT) nur in geringer Menge LDL aufnehmen, wurde sich die pharmakologische Eigenschaft von 3-beta-(2-(diethylamino)ethoxy) androst-5 en-17-one (im folgenden U18666A) zu Nutze gemacht. Die Inkubation von Zellen mit diesem Wirkstoff führt zur starken Akkumulation von Cholesterin in späten Endosomen.

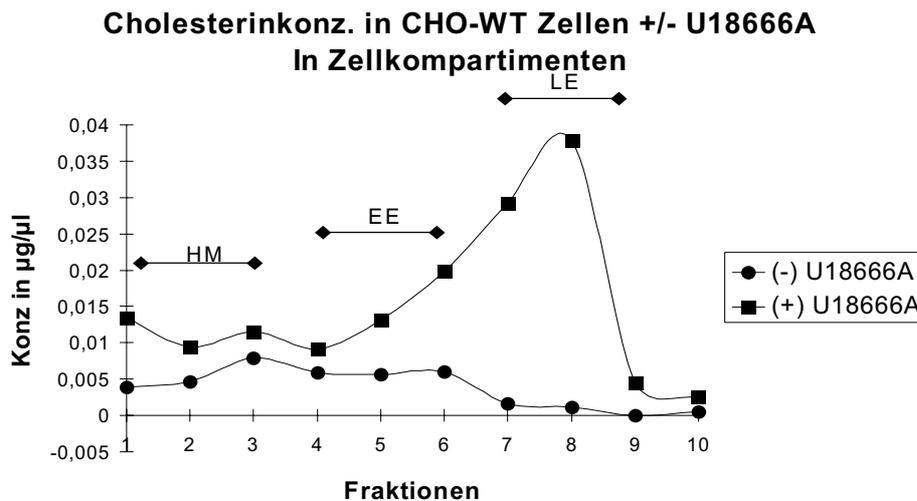
Liscum beschrieb 1989 den hemmenden Effekt dieses Stoffes auf die Fähigkeit, aus späten Endosomen Cholesterin in die Lysosomen zur Degradation weiter zu transportieren (Liscum et al 1989). Vermittelt wird dieser Effekt durch Beeinflussung verschiedener enzymatischer Schritte. Der eigentliche Mechanismus bleibt bis heute aber nicht eindeutig geklärt. Die LDL-Bindung, Internalisation und lysosomale Hydrolyse von LDL-Cholesterin Estern bleiben unbeeinflusst. Der Einfluss resultiert dann in einer Akkumulation von Cholesterin in späten Endosomen und Lysosomen.

Um zu testen, ob sich mit Hilfe von U18666A tatsächlich Cholesterin in den späten Endosomen anreichern lässt, wurden zunächst CHO-Zellen für maximal 24 Stunden mit 2 µg/ml U18666A inkubiert. Aus 4 Petrischalen à 14cm Ø wurden die Zellen lysiert und der Cholesteringehalt bestimmt.

Aus den lysierten Zellen wurde ein Sucrose-Gradient nach dem Verfahren von Jost et al (1997) durchgeführt. Die schweren Membranen (HM) finden sich in der Regel in den Fraktionen 1-3, die frühen Endosomen (EE) in den Fraktionen 4-6 und die späten Endosomen (LE) in den Fraktionen 7-9.

Mittels photometrischer Messung wurde dann die Cholesterinkonzentration in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in den einzelnen Fraktionen des Gradienten ermittelt und auf die Gesamtmenge Zellprotein in der Fraktion in mg berechnet. Ziel war es nachzuweisen, dass unter U18666A- oder LDL-Behandlung der Cholesteringehalt in den späten Endosomen zunimmt.

Als erstes wurde mit CHO-Wildtyp Zellen unter *in vivo* und *in vitro* Bedingungen geprüft, ob das System der Cholesterin Akkumulation in späten Endosomen in dieser Zelllinie funktioniert.

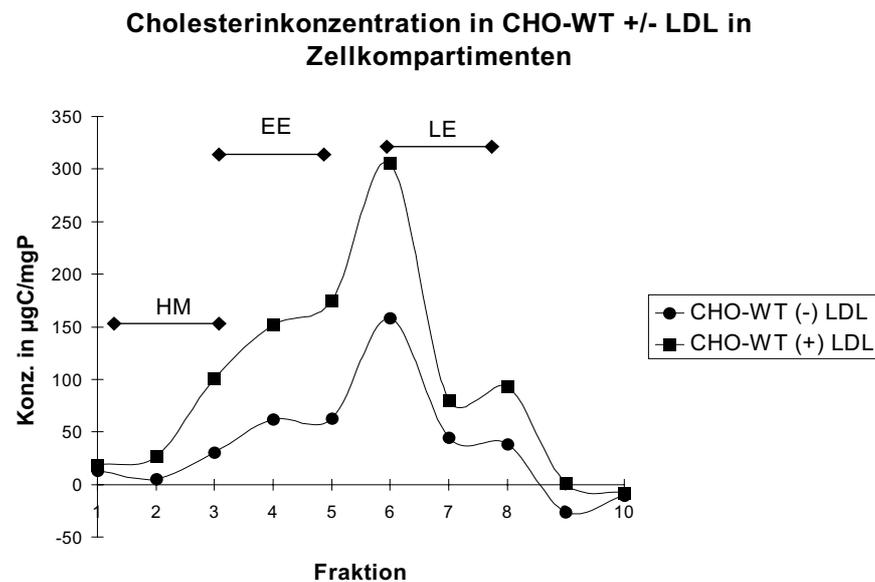


**Abb. 3.1:** Cholesterinkonzentration in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in CHO-WT Zellen +/- U18666A Inkubation. Das eingesetzte Probenvolumen zur Cholesterinbestimmung betrug  $50 \mu\text{l}$ . Die U18666A Inkubation erfolgte mit  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  für 24 Stunden. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels eines Sucrose Gradienten in ihre Kompartimente (schwere Membranen = HM, F1-3; frühe Endosomen = EE, F4-6; späte Endosomen = LE, F7-9) fraktioniert.

Das System der Cholesterinanreicherung in späten Endosomen mit U18666A funktioniert in CHO-WT Zellen. Das wird in der Abbildung 3.1 deutlich. Eine U18666A induzierte Cholesterin Akkumulation hat vor allem in den späten Endosomen (LE, Fraktionen 7-9) stattgefunden. Die Menge an photometrisch messbarem Cholesterin ist in allen drei Kompartimenten gestiegen. Der Anstieg des Cholesteringehaltes in den späten Endosomen ist jedoch am höchsten.

Als nächster Schritt sollte analysiert werden, ob die U18666A induzierte Cholesterin Akkumulation in späten Endosomen auch mit Hilfe von LDL möglich ist. Hierfür wurden erneut CHO WT Zellen verwendet, die für 2 Stunden mit 50 µg/ml LDL inkubiert wurden und dann mittels Sucrose-Gradienten fraktioniert werden konnten. Die LDL Aufbereitung erfolgte nach der Methode von Havel et al (1953).

Man kann in Abbildung 3.2 die Konzentration an Cholesterin pro mg Zellprotein in den CHO-WT Zell-Fractionen 1-10 des Sucrose-Gradienten abgebildet sehen.

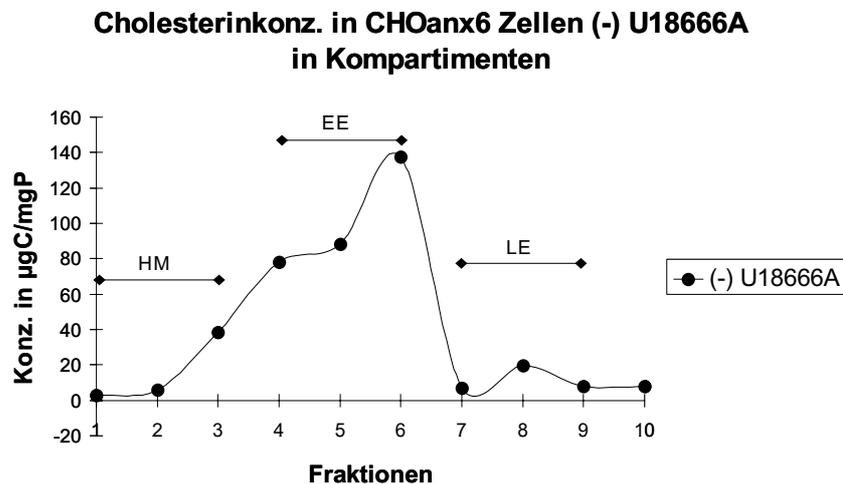


**Abb. 3.2:** Cholesterinkonzentration in µg pro mg Zellprotein (in CHO-WT Zellen). Das eingesetzte Probenvolumen zur Cholesterinbestimmung betrug 50 µl pro Fraktion. Die Inkubation mit 50 µg/ml LDL dauerte 2 Stunden an, die Zellen wurden anschließend lysiert und mittels Sucrose Gradienten nach ihrer Dichte aufgetrennt. Zur Proteinmessung nach Lowry wurden 20 µl Probe eingesetzt.

Unter LDL-Inkubation hat eine Cholesterin-Akkumulation in den Fraktionen der frühen Endosomen (EE, Fraktionen 3-5) stattgefunden. In den späten Endosomen (LE, Fraktionen 6-8) kann ebenfalls ein Anstieg des Cholesterins verzeichnet werden. Der scheint sogar größer, als in den frühen Endosomen. Da jeder Endoprep ein gering abweichendes Profil für die Verteilung der Kompartimente innerhalb des Gradienten bietet, muss individuell an Hand der Cholesterinkonzentration und anderen endosomalen Markern entschieden werden, wo die frühen und späten Endosomen verteilt liegen. In diesem Prep war die Zuordnung in die Fraktionen frühe und späte Endosomen nicht eindeutig.

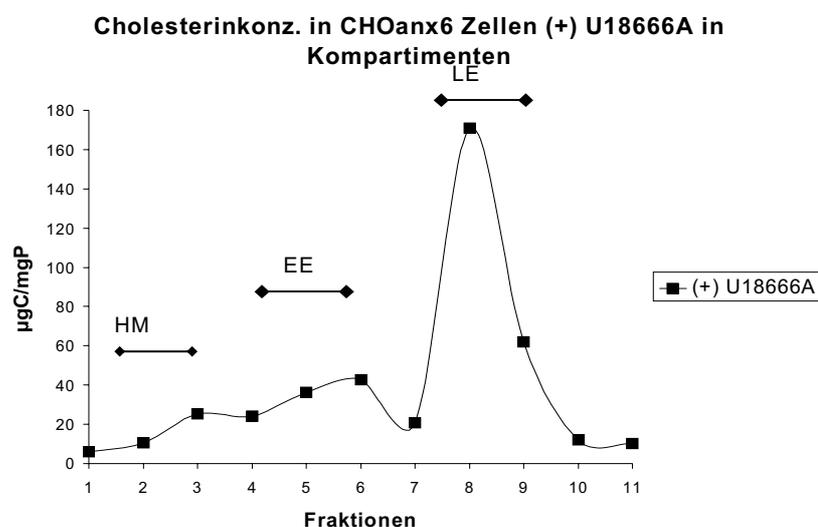
Es wurde darauf der Cholesteringehalt in CHOanx6 Zellen ermittelt. In Abbildung 3.3 sieht man die Verteilung des Cholesterins ohne U18666A Inkubation.

Es wird in Abbildung 3.3 deutlich, dass der Hauptbestandteil des Cholesterins sich in den frühen Endosomen (EE, Fraktionen 4-6) befindet. Sowohl in den schweren Membranen (HM, Fraktionen 1-3) als auch in den späten Endosomen (LE, Fraktionen 7-9) finden sich nur geringe Mengen Cholesterin.



**Abb 3.3:** Cholesterinkonzentration pro mg Zellprotein in CHOanx6 Zellen **ohne U18666A** Inkubation. Das Probenvolumen zur Cholesterinbestimmung betrug 50 µl pro Fraktion. Die Zellen wurden lysiert und mit einem Sucrose Gradient aufgetrennt. Aus den Fraktionen 1-10 wurde der Cholesteringehalt bestimmt. Nach der Methode von Lowry wurde der Proteingehalt bestimmt. Das eingesetzte Probenvolumen zur Proteinmessung betrug 20 µl. Dargestellt sind die schweren Membranen (HM) in den Fraktionen 1-3, die frühen Endosomen (EE) in den Fraktionen 4-6 und die späten Endosomen (LE) in den Fraktionen 7-9.

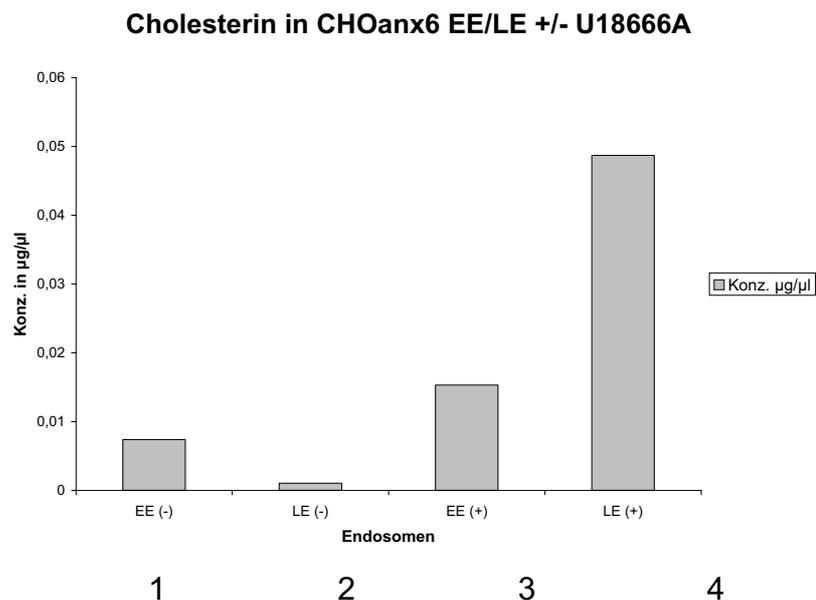
In Abbildung 3.4 sieht man den Cholesteringehalt pro mg Zellprotein innerhalb eines Sucrose-Gradienten von CHOanx6-Zellen nach U18666A Inkubation.



**Abb. 3.4:** Cholesterinkonzentration in CHOanx6 Zellen pro mg Zellprotein **mit U18666A** Inkubation. Das Probenvolumen zur Cholesterinbestimmung betrug 50 µl pro Fraktion. Nachdem die Zellen für 24 Stunden mit 2 µg/ml U18666A inkubierten, wurden sie lysiert und in einem Sucrose Gradienten aufgetrennt. Aus den Fraktionen 1-10 wurden der Cholesteringehalt und der Proteingehalt nach Lowry bestimmt. Zur Proteinbestimmung wurden 20 µl Probe eingesetzt. Dargestellt sind die schweren Membranen (F1-3), die frühen Endosomen (F4-6) und die späten Endosomen (F7-9).

Man kann sehen, dass die Verteilung von Cholesterin sich unter Behandlung mit U18666A verändert hat. Es sind nunmehr vor allem die späten Endosomen (LE, Fraktionen 7-9) mit Cholesterin angereichert. Dies beläuft sich auf eine Anreicherung um den Faktor 8-10 im Vergleich zu den unbehandelten späten Endosomen. Die schweren Membranen (HM, Fraktionen 1-3) haben einen nahezu gleichwertigen Cholesteringehalt (vgl. mit den berechneten Mengen aus den Kontrollzellen). Die frühen Endosomen (EE, Fraktionen 4-6) haben einen deutlich geringeren Cholesteringehalt als ohne U18666A Inkubation. Die Cholesterinkonzentrationen in unbehandelten schweren Membranen und frühen Endosomen verschiedener Zellextrakte lagen in der Regel bei 50-120  $\mu\text{g}$ .

Betrachtet man nun den Cholesterin-Anstieg in CHOanx6 Endosomen +/- U18666A Inkubation kann man ebenfalls eine erhöhte Gesamtmenge an Cholesterin in späten Endosomen unter dem Einwirken von U18666A beobachten. (siehe Abbildung 3.5 Reihe 2 und 4)



**Abb. 3.5:** Cholesterinkonzentration in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in CHOanx6 Endosomen +/- U18666A Inkubation. Zur Cholesterinmessung wurden 50  $\mu\text{l}$  Probenvolumen eingesetzt.

Vergleicht man die LDL Inkubation mit der U18666A Inkubation kann man feststellen, dass sowohl unter LDL Inkubation (siehe Abbildung 3.2) als auch mit U18666A Inkubation (siehe Abbildungen 3.1, 3.3 -3.4) eine Akkumulation von Cholesterin in den späten Endosomen erreicht werden kann. Somit kann die Inkubation von U18666A als System zur Cholesterinanreicherung in späten Endosomen genutzt werden.

Um diese These weiter zu unterstützen, wurden Immunfluoreszenzaufnahmen gemacht. Sie sollten unabhängig von der photometrischen Bestimmung von Cholesterin in späten Endosomen +/- U18666A Inkubation zusätzlich die kompartimentspezifische Akkumulation von Cholesterin nachweisen.

Dafür wurden die Zellen mit U18666A inkubiert, fixiert und mit Filipin, einem Marker für Cholesterin angefärbt. Durch die Chemikalie Filipin, die mit Cholesterin einen Komplex bildet, der dann im UV Spektrum unter dem Mikroskop sichtbar wird, kann Cholesterin in Zellen detektiert und quantifiziert werden.

Die Lokalisation von späten Endosomen sollte mit einem speziellen Antikörper gegen späte Endosomen, Lysobisphosphatidylsäure ( $\alpha$ LBPA), überprüft werden (Kobayashi et al 1998). Es wurden zunächst CHOanx6 Zellen verwendet. Ein Teil der Zellen wurde mit U18666A vorbehandelt. Die unbehandelten Zellen dienen als Kontrolle zum Nachweis des endogenen Cholesterins.

In Abbildung 3.6 A + B sieht man die Verteilung von Annexin 6 und dem Lipid LBPA in CHOanx6 Zellen mit und ohne U18666A Inkubation. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und als erstes mit Annexin 6- bzw.  $\alpha$ LBPA-Antikörper beladen. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte entsprechend mit dem grün fluoreszierenden CY2 Antikörper bzw. dem rot fluoreszierenden CY3 oder dem Wirkstoff Filipin.

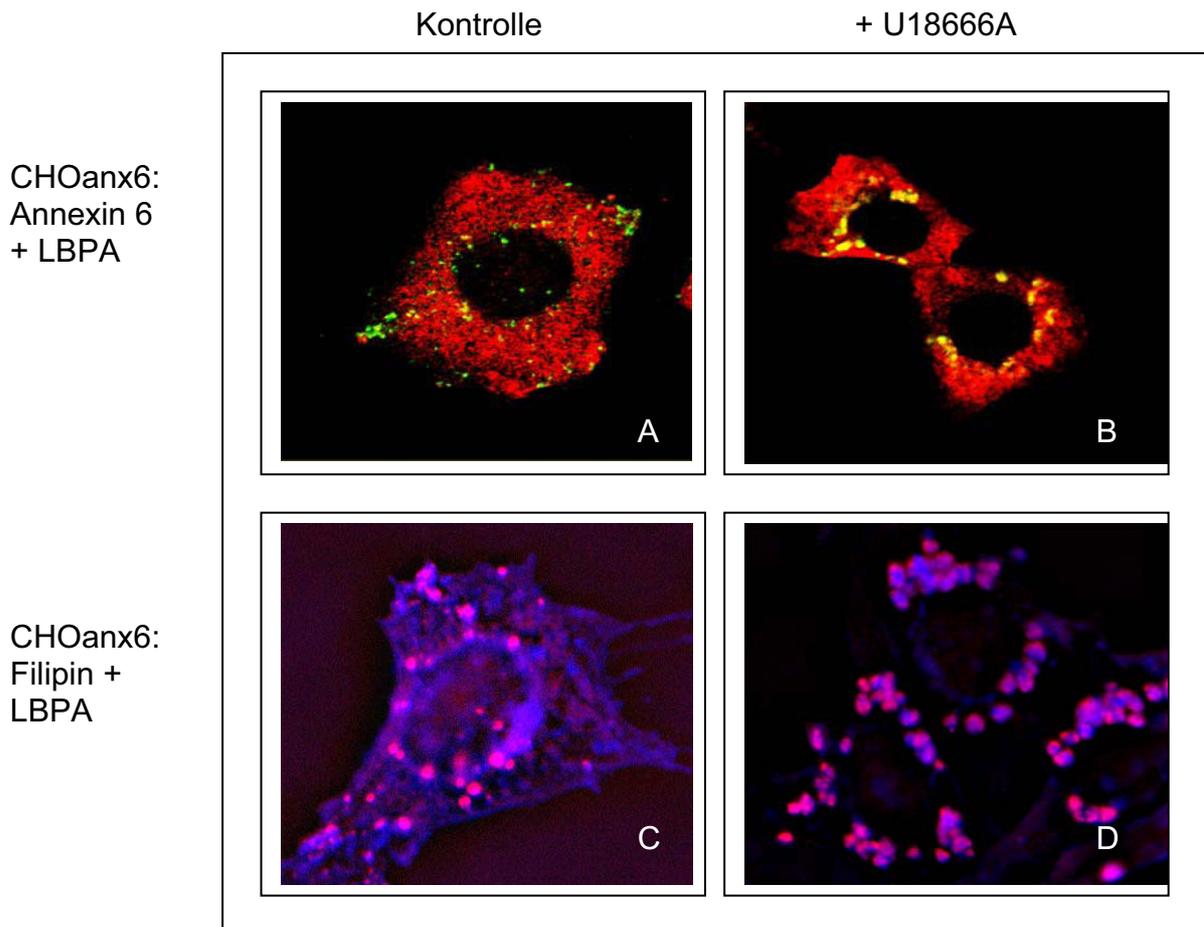
Es ist erkennbar, dass eine ubiquitäre Verteilung von Annexin 6 in CHOanx6 Zellen (Abb.3.6 A + B) vorliegt, da sich viel Annexin 6 anfärben lässt. Die größeren angefärbten Kompartimente stellen die Lysosomen dar.

Unter Abbildung 3.6 B sieht man den gleichen Zelltypus unter U18666A Inkubation. Die Anfärbbarkeit der großen Vesikel hat sich in Richtung Kernnähe vermehrt. Das sind die durch Pharmakonbehandlung vergrößerten späten Endosomen und Prelysosomen, die gefüllt mit Cholesterin zur Darstellung kommen. Es wird deutlich, dass diese vergrößerten Kompartimente ebenfalls mit einer größeren Menge Annexin 6 versehen sind.

In Abbildung 3.6 C und D sieht man ebenfalls CHOanx6 Zellen unbehandelt als Kontrolle sowie mit U18666A Inkubation behandelt. Auch hier lassen sich in C und D deutlich eine Zellmembran erkennen und als innere Membran die Kernmembran. In den unbehandelten Zellen wird die ubiquitäre Verteilung des Cholesterins markiert

durch Filipin sichtbar. Besonders stark lassen sich auch hier die Plasmamembran und die frühen Endosomen darstellen. Kernnah sieht man das Golginetzwerk.

Unter Behandlung mit U18666A verändert sich das Bild erneut zu Gunsten anfärbarer Strukturen in Kernnähe. Diese wieder vergrößerten und in ihrer Anzahl vermehrten Strukturen stellen die späten Endosomen dar, die durch die Behandlung mit U18666A mit Cholesterin angereichert werden konnten und sich stark mit Filipin anfärben.



**Abb. 3.6:** Immunfluoreszenz von CHOanx6 Zellen +/- 2µg/ml U18666A Vorbehandlung. Die Fixierung erfolgte mit Paraformaldehyd. Nach Fixierung und Permeabilisation erfolgte die Antikörper Inkubation mit  $\alpha$ GSTanx 6 in der Verdünnung 1:50. Als zweiter Antikörper diente der CY2 zur grünen Fluoreszenzmakierung in der Verdünnung 1: 200. Dargestellt ist die Translokation von Annexin 6 in späte Endosomen (B) und Akkumulation von Cholesterin in späte Endosomen (D).

Die Bilder wurden freundlicher Weise vom Department de Biologia Celular, Institut d 'Investigaciones Biomèdiques August Pi i Sunyer, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Spain zur Verfügung gestellt.

Unter Pharmakonbehandlung kann man also zusammenfassend feststellen, dass sich, dargestellt in den Abbildungen 3.6 B+D, um die Kernhülle konzentriert fluoreszierende Strukturen darstellen lassen, die zum einen die mit Cholesterin angefüllten späten Endosomen (3.6 D) sind, die vom translozierten Annexin 6

umgeben sind. Zum anderen formieren sich „Löcher“, die die Cholesterin gefüllten Endosomen darstellen, welche von einem Annexin 6-Gerüst umgeben zu sein scheinen (3.6 B).

Man kann folglich aus den Abbildungen 3.6 B+D zu der Annahme kommen, dass unter Cholesterinakkumulation eine Translokation von Annexin 6 in die späten Endosomen stattgefunden hat, dass diese späten Endosomen mit Cholesterin akkumuliert sind und neben einer Größenzunahme auch eine Mengenzunahme von späten Endosomen zu verzeichnen ist.

Zur Überprüfung, ob diese Beobachtungen auch in der CHO-WT Zelllinie zu bestätigen sind, wurden diese Versuche unter gleichen Bedingungen mit CHO-WT Zellen durchgeführt. Es konnte in Westernblot-Experimenten auch für diese Zelllinie gezeigt werden, dass unter U18666A Inkubation eine cholesterinabhängige Annexin 6 Translokation in Richtung der späten Endosomen vollzogen wird.

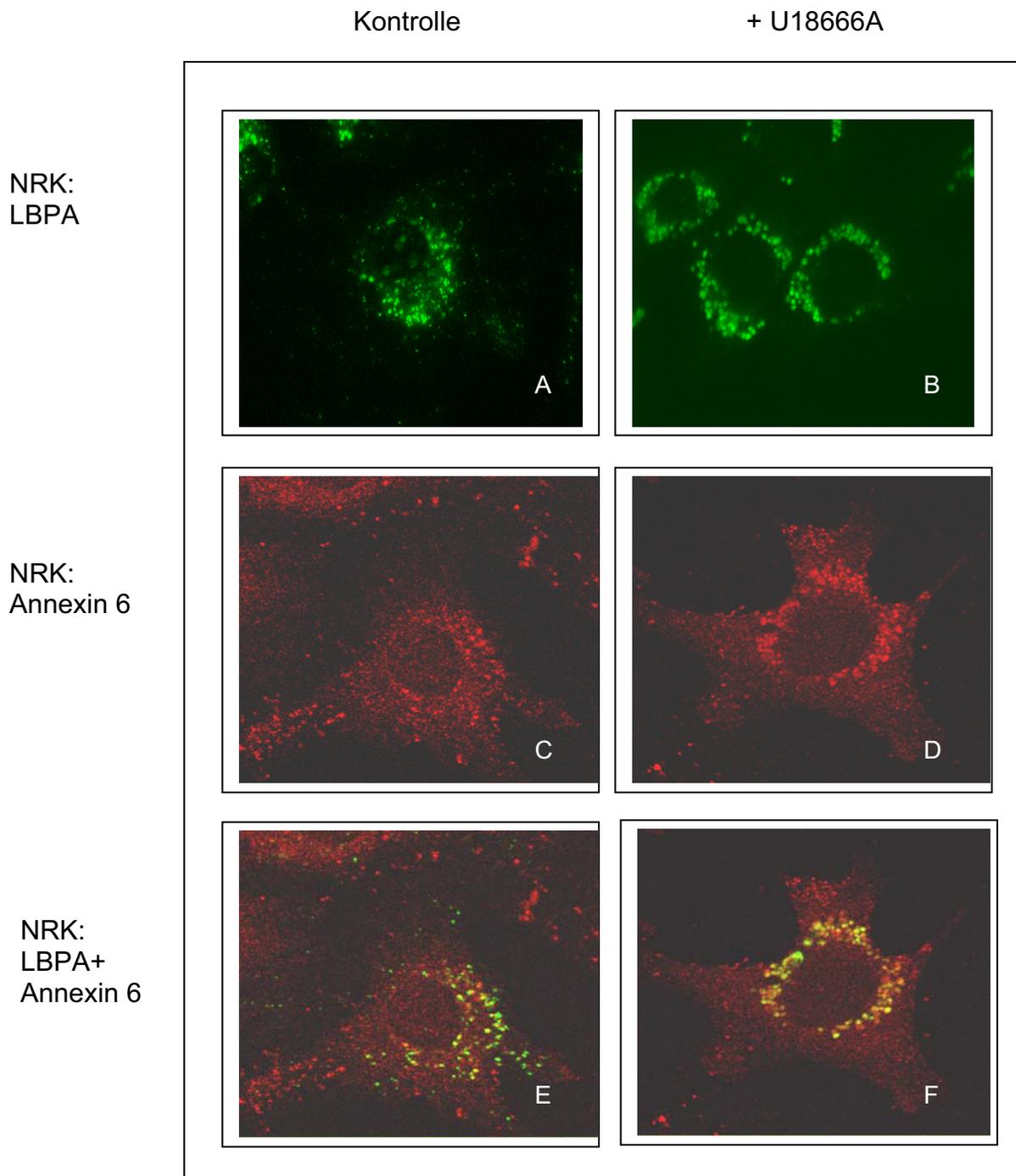
An Hand der gemessenen Akkumulation von Cholesterin in den späten Endosomen unter Behandlung mit U18666A kann man nun zum einen festhalten, dass ein System entwickelt werden konnte, mit dem es gelingt, in den physiologisch nur mit wenig Cholesterin gefüllten späten Endosomen sowohl der CHOanx6 Zelllinie als auch der CHO-WT Zelllinie eine Anreicherung mit Cholesterin zu erreichen. Die Fragestellung, ob eine Cholesterin-Erhöhung in den späten Endosomen eine Annexin 6 Translokation in die späten Endosomen zur Folge hat, konnte Ansatzweise positiv mit den Immunfluoreszenzbildern beantwortet werden.

Grewal et al konnten mittels Westernblot-Analyse zeigen, dass in Zelllinien wie normal rat kidney Zellen (NRK) eine physiologisch höhere Menge an Annexin 6 in späten Endosomen besteht. CHO-WT Zellen haben eine sehr geringes Level endogenen Annexins 6. Um zu testen, ob auch in Wildtyp Zellen das Pharmakon U18666A seine Wirkung zeigt, wurden Cholesterinbestimmungen in NRK Zellen durchgeführt, die keine überexprimierenden Eigenschaften haben.

Vergleicht man CHO Zellen mit normal rat kidney Zellen (NRK Zellen) kann man anhand des ermittelten Cholesterin Wertes erkennen, dass auch NRK Zellen Cholesterin vornehmlich in den frühen Endosomen halten.

Im Sucrose-Gradienten stellen sich die frühen Endosomen auch wieder in den Fraktionen 4-6 und die späten Endosomen in den Fraktionen 7-9. Auch in NRK Zellen kann nach 24-stündiger Inkubation mit U18666A eine Cholesterin

Akkumulation in den späten Endosomen nachgewiesen werden. Dabei können sich die Konzentrationen in den späten Endosomen verdoppeln.



**Abb. 3.7:** Darstellung von Cholesterin angereicherten späten Endosomen in NRK Zellen +/- 12 Std. U18666A Inkubation durch die AK  $\alpha$  LBPA und  $\alpha$  Annexin 6 nach Fixierung und Permeabilisierung.

Die Bilder wurden freundlicher Weise vom Department de Biología Celular. Institut d 'Investigaciones Biomédiques August Pi i Sunyer, Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona, Spain zur Verfügung gestellt.

In Abbildung 3.7 erkennt man die Cholesterinanreicherung in den späten Endosomen an der Größenzunahme der durch  $\alpha$ LBPA markierten Strukturen im Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Proben. Die Bilder veranschaulichen, dass auch in einer anderen Zelllinie als CHO die Cholesterin-Akkumulation durch U18666A in späten Endosomen induziert werden kann. Außerdem wird deutlich, dass auch in NRK Zellen eine Cholesterin-Akkumulation eine Zunahme der Bindung von Annexin 6 in den späten Endosomen induziert.

## **3.2 Charakterisierung von frühen und späten Endosomen (+) U18666A**

### **3.2.1 Messung der $\beta$ -Hexosaminidase- Aktivität**

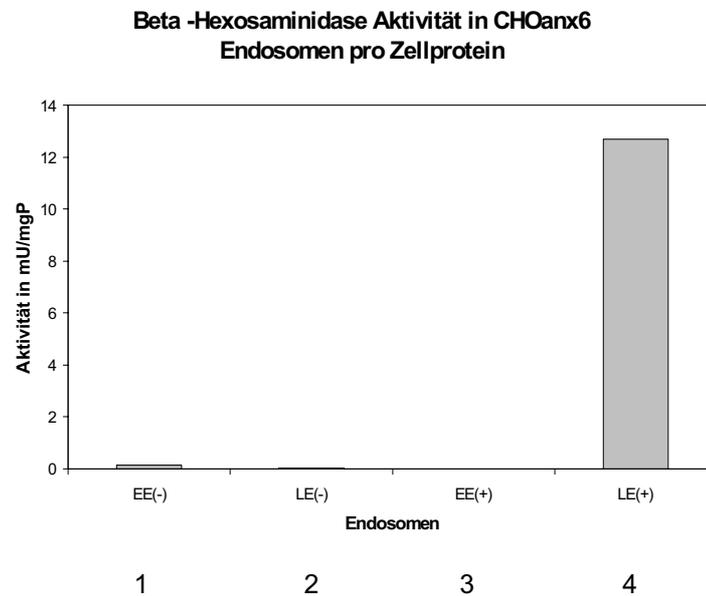
Die  $\beta$ -Hexosaminidase ist ein Enzym, das in Preylsomen und Lysosomen lokalisiert ist. Ihre Aufgabe besteht darin, mittels Hydrolyse internalisierte Liganden und Komponenten der extrazellulären Matrix abzubauen. Durch die Messung ihrer Aktivität kann man überprüfen, ob die fraktionierten späten Endosomen sauber isoliert wurden und ob sie tatsächlich, charakterisiert durch die Aktivität des Enzyms, späte Endosomen darstellen.

Zur Sicherstellung, dass sich bei der Akkumulation von Cholesterin späte Endosomen gebildet haben, wurde die Aktivität des lysosomalen Enzymes  $\beta$ -Hexosaminidase in den frühen und späten Endosomen vor und nach Pharmakonbehandlung gemessen. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Hexosaminidase Aktivität in den späten Endosomen unter Einfluß von U18666A durch eine Zunahme und Vergrößerung später Endosomen und ihrer enzymatischen Vesikel zunimmt.

Die Aktivität gibt des weiteren Aussage über die Reinheit der endosomalen Proben. Sie sollte generell durch die vorherige Behandlung der Zellen mit U18666A in den späten Endosomen steigen, was für eine Cholesterin induzierte Neuregeneration von Vesikeln spräche, während sie in den frühen Endosomen auch unter dem Einfluss von U18666A gleich bleiben sollte. Würde sie auch dort zunehmen, spräche das für eine Kontamination der Probe.

Mit U18666A behandelte und unbehandelte frühe und späte Endosomen wurden isoliert und zur Weiterverarbeitung gepoolt.

Es wurden 50 µl Probe mit 90 µl Substratpuffer und 10 µl Triton X 100 vermengt und inkubiert. Mit 500 µl Stop Lösung wurde die Reaktion beendet. Photometrisch konnte anschließend die Extinktion gemessen und auf die Proteinmenge in der Probe berechnet werden.



**Abb. 3.8:** Aktivität der  $\beta$ -Hexosaminidase in mU pro mg Zellprotein in  $\pm$  2  $\mu$ g/ml U18666A für 24 Stunden behandelten CHOanx6 Endosomen. Die Zellen wurden lysiert, mittels Sucrose Gradienten fraktioniert und anschließend im Endosomenpool wurden die Aktivität der  $\beta$ -Hexosaminidase und die Proteinmenge bestimmt.

Abbildung 3.8 stellt die Aktivität der  $\beta$ -Hexosaminidase in mU pro Milligramm Endosomenpool-Protein dar. Wie erwartet, ist ihre Aktivität bei den unbehandelten Endosomen in den frühen Endosomen höher als in den späten Endosomen (vgl. Abb. 3.8, Säulen 1+2).

Man kann auch in Abbildung 3.8 erkennen, dass die Aktivität in den späten Endosomen unter dem Einfluss von U18666A stark zugenommen hat (vgl. Abb. 3.8, Reihe 2+4), während sie in den frühen Endosomen annähernd gleich gering geblieben ist (vgl. Abb. 3.8, Reihe 1+3).

Insgesamt dominiert der Anstieg der Aktivität in den behandelten späten Endosomen (vgl. Abb. 3.8, Reihe 2+4). Das spricht für eine saubere, kontaminationsfreie Endosomenpräparation und eine Neuregeneration und vermutlich Vergrößerung der enzymatischen Vesikel und den späten Endosomen.

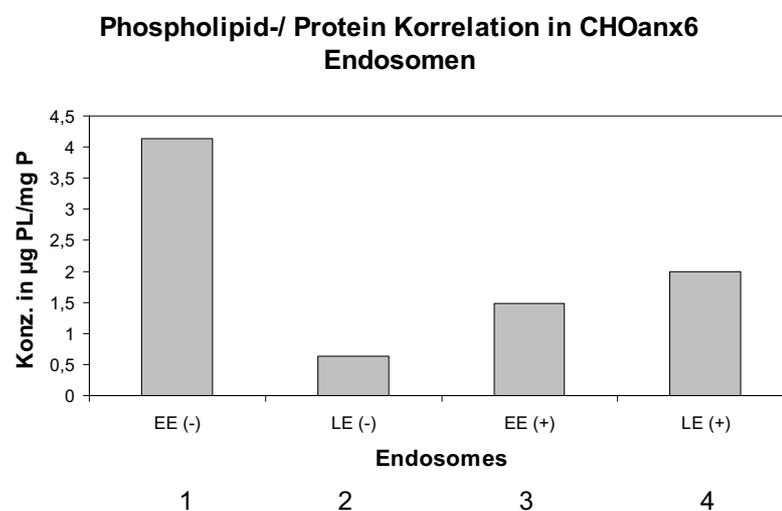
### 3.2.2 Messung des Phospholipid Gehaltes

Annexin 6 ist ein Protein, das Calcium-abhängig an negativ geladene Phospholipide bindet. Ziel war es, zu untersuchen, ob eine U18666A Inkubation über die oben detailliert beschriebene Akkumulation von Cholesterin auch zu einer Veränderung der Phospholipidkonzentration in den cholesterinakkumulierten Endosomen führt.

Die dafür durchgeführte Bestimmung der Phospholipide beruht auf der Messung des Gehalts von Phosphatidylcholin.

Zur Messung des Gehaltes von Phosphatidylcholin wurden CHOanx6 Endosomen isoliert und gepoolt. 10 µl Probe wurden mit 200 µl Reaktionspuffer versetzt und die Konzentration von Phosphatidylcholin konnte photometrisch bestimmt werden. Die ermittelte Konzentration wurde dann mit der Menge Zellprotein, ermittelt durch Proteinbestimmung nach Lowry, verrechnet (Lowry et al 1951).

Abbildung 3.9 stellt die Konzentration von Phosphatidylcholin pro Milligramm Zellprotein in fraktionierten Endosomen aus CHOanx6 Zellen dar.



**Abb. 3.9:** Korrelation von Phospholipiden mit Zellprotein in CHOanx6 Endosomen +/- 2 µg/ml U18666A Inkubation für 24 Stunden. 10 µl Probe wurde mit 200 µl Reaktionspuffer versetzt und die Konzentration von Phosphatidylcholin wurde photometrisch bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde nach Lowry ermittelt.

Der Gehalt des Phospholipids ist in den unbehandelten frühen Endosomen ungefähr zweimal so groß wie in den behandelten späten Endosomen (Abb. 3.9, Säulen 1 + 4). Die Abbildung verdeutlicht außerdem, dass der Gehalt an Phospholipiden pro Zellprotein in den späten Endosomen ohne Inkubation mit U18666A geringer ist als

unbehandelten frühen Endosomen aber auch behandelten späten Endosomen (vgl. Abb. 3.9, Säule 2 mit 1 + 4).

Werden mit U18666A inkubierte Endosomen isoliert und der Gehalt an Phosphatidylcholin in den späten Endosomen gemessen, sieht man, dass der Gehalt dort zugenommen hat (vgl. Abb. 3.9, Säulen 2 + 4)

Bezeichnenderweise ist der Cholesterinanstieg in diesen spät endosomalen Membranen fast 8-10 x so hoch zwischen unbehandelten und behandelten späten Endosomen, während die Phospholipide etwa 4 mal so hoch sind (vgl. Abb. 3.9 mit Abb. 3.3 + 3.4). Dieses Phänomen findet seine Erklärung wohl darin, dass die späten Endosomen sich durch die Pharmakonbehandlung speziell mit Cholesterin angereichert haben, während die Phospholipide nicht so stark angereichert wurden.

### **3.3 Vergleichende Analyse der Lokalisation von Annexin 6 in +/- U18666A behandelten Zellen**

Um zu bestätigen, dass eine Cholesterin-Akkumulation in späte Endosomen mit einer Translokation von Annexin 6 assoziiert ist und dadurch mit beeinflusst wird, wurden auf der Grundlage der Immunfluoreszenz Aufnahmen andere experimentelle Ansätze gewählt, um diese Beobachtung zu bestätigen.

Deshalb sollte zur Isolation der endosomalen Fraktionen Sucrose-Gradienten gefahren werden. Die Verteilung von Annexin 6 in den endosomalen Kompartimenten konnte anschließend mittels Westernblot-Analyse studiert werden. Aus den vorausgegangenen Versuchen konnte man davon ausgehen, dass eine Cholesterin Akkumulation in späten Endosomen durch die 24-stündige Inkubation mit 2 µg/ml U18666A stattfand und das Verfahren zur Kompartimentierung funktioniert (s. Abb. 3.1 - 3.7).

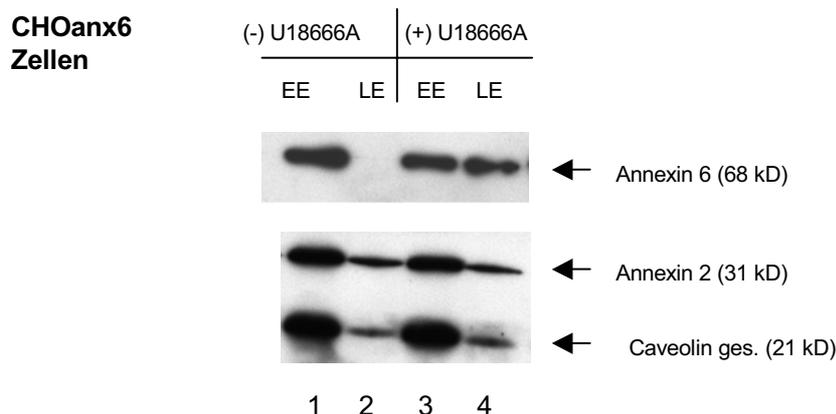
Zunächst wurden CHOanx6 Zellen für 24 Stunden mit 2 µg/ml U18666A inkubiert. Nach Zelllyisierung und Isolierung der frühen und späten Endosomen mittels Sucrose Gradienten wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Nach den Immunfluoreszenz Analysen sollte man erwarten, dass eine Cholesterin-Akkumulation in späten Endosomen unter U18666A Inkubation eine erhöhte Membranbindung für Annexin 6 zur Folge hat.

Nach Isolierung der Endosomen wurden die Fraktionen gepoolt und 40  $\mu$ l Probe wurde auf ein 12,5 % SDS Page aufgetragen. Der Immunoblot erfolgte für 2 Stunden mit dem  $\alpha$ Anx6 Antikörper aus dem Schaf in einer Verdünnung von 1:100. Der zweite Antikörper wurde 1:1000 verdünnt angewendet.

Als Kontrollmarker dienten Annexin 2 und Caveolin. Annexin 2 ist ein Mitglied der Annexin Familie und findet sich vor allem frühen Endosomen. Für die Bindung von Annexin 2 an Membranen ist ebenfalls wie beim Annexin 6 das Vorhandensein von Calcium notwendig. Ein kleiner Teil von Annexin 2 ist Calcium-unabhängig in seiner Membranbindung und cholesterinabhängig (Jost et al 1997).

Caveolin bindet Cholesterin. Entzieht man den Membranen von Caveolae das Cholesterin, ist es dem Markerprotein Caveolin nicht möglich an die Membran zu binden (Fielding et al 2000). Durch die Analyse, ob sie sich ebenfalls Cholesterinabhängig verändern, kann man kontrollieren, ob der Effekt der cholesterinabhängigen Translokation von Annexin 6 eine spezieller Effekt von Annexin 6 ist. Möglich wäre auch ein genereller Effekt in Endosomen, bei dem Cholesterin vermittelt Lokalisierungsveränderung von endosomalen Proteinen auftreten. Dies würde auch weitere Proteine betreffen.

Die aufgetragene Menge waren für die Kontrollproteine 50  $\mu$ l pro Probe. Die eingesetzten Antikörper lagen in einer Verdünnung von 1:1000 bei Annexin 2 und 1:10000 für Caveolin vor.



**Abb. 3.10:** Westernblot Analyse der Verteilung von Annexin 6 in Endosomen aus CHOanx 6 Zellen +/- 2  $\mu$ g/ml U18666A Inkubation. Aufgetragen wurden 50  $\mu$ l Probe / lane (40  $\mu$ l bei Anx.6) auf ein 12,5 % Gel. Der Proteintransfer dauerte 90 Min. bei 350 mA. Im Immunoblot wurden  $\alpha$  Anx6 Ak 1:100,  $\alpha$ Anx2 1:1000 und  $\alpha$  Cav.ges. 1:10.000 verdünnt für 90 Minuten bei RT eingesetzt.

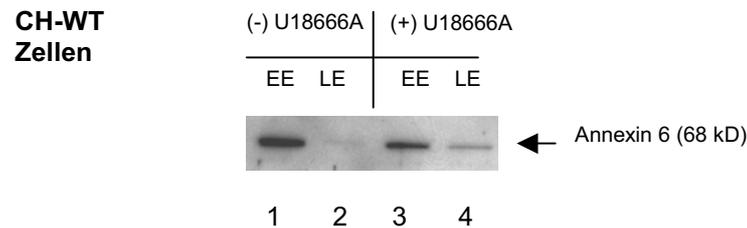
Betrachtet man zunächst einmal die Analyse des Annexin 6 (Abb. 3.10 oberer Streifen) wird deutlich, dass die Verteilung von Annexin 6 in unbehandelten CHOanx6 Zellen nahezu ausschließlich in den frühen Endosomen liegt. Man kann von einem Verhältnis von annähernd 100% : 0% (EE : LE) sprechen. In U18666A vorbehandelten Zellen verändert sich die endosomale Verteilung von Annexin 6 (Abb. 3.10, Spur 3 + 4). Aus dem Verteilungsverhältnis 100% : 0% entwickelt sich durch die Translokation ein Verhältnis von ungefähr 55% : 45% zu Gunsten der späten Endosomen.

Es lässt sich erkennen, dass unter Cholesterin-Akkumulation in späten Endosomen die Bindung von Annexin 6 in Vergleich zu cholesterinarmen Membranen zugenommen hat (Spuren 2 + 4).

Die Kontrollproteine Annexin 2 und Caveolin sind durch die Behandlung mit U18666A nicht beeinflusst worden. Sie binden beide vornehmlich in frühen Endosomen unabhängig von der Cholesterinkonzentration. Daraus lässt sich schließen, dass die Effekte von U18666A isoliert auf das Bindungsverhalten von Annexin 6 wirken und andere endosomale Proteine dadurch nicht beeinflusst werden.

Um sicher zu stellen, dass die Translokation von Annexin 6 in CHOanx6 Zellen nicht durch eine unkontrollierte Verteilung von Annexin 6 in die Zellkompartimente durch Überexpression, sondern Cholesterin vermittelt stattgefunden hat, wurden Endosomen aus CHO-WT Zellen in 10- facher Konzentration unter gleichen Bedingungen im SDS Page getrennt. Die Aufkonzentrierung war notwendig, weil CHO-WT Zellen natürlich ein sehr geringen Gehalt an Annexin 6 haben. Ohne die Aufkonzentrierung wäre eine Detektion nicht möglich gewesen. Im Immunoblot konnte dann das endogene Annexin 6 in den Wildtyp-Zellen detektiert werden.

Anhand dieser Analyse sollte geklärt werden, ob endogenes Annexin 6 aus CHO-WT Zellen ebenfalls Cholesterin-sensitiv an späte Endosomen binden kann. Das Phänomen des overspills, nämlich die unkontrollierte Verteilung von überexprimierten Proteinen in Zellkompartimente kann man damit leider nicht ausschließen. Es gibt aber die Sicherheit, dass in beiden Zelllinien ein gleiches Phänomen betrachtet und miteinander verglichen wird.



**Abb. 3.11:** Westernblot Analyse von der Verteilung von endogenem Annexin 6 in 10-fach aufkonzentrierten CHO-WT Endosomen +/- U18666A Inkubation. 40  $\mu$ l Probe wurde pro lane in einem 12,5% SDS Minigel aufgetrennt. Der Immunoblot erfolgte mit  $\alpha$ GSTanx6 1:1000 für 90 Min. bei RT.

In Abbildung 3.11 ist die Autoradiographie von endogenem Annexin 6 in CHO-WT dargestellt. CHO-WT Zellen wurden mit 2  $\mu$ g/ml U18666A inkubiert, lysiert und die Endosomen isoliert. Die 10-fach aufkonzentrierten Proben wurden mit 40  $\mu$ l Probe pro Probentasche auf ein 12,5 % SDS Page aufgetragen und anschließend im Immunoblot mit dem Antikörper  $\alpha$ GSTanx6 in der Verdünnung 1:1000 detektiert.

Auch in Wildtyp Endosomen liegt in cholesterinarmen Membranen der Hauptbestandteil der Annexin 6-Bindung in den frühen Endosomen (vgl. Abb. 3.11, Spuren 1 u. 2 mit Abb. 3.10, Spuren 1 u. 2). Unter Cholesterin-Akkumulation durch U18666A ändert sich das Bindungsverhalten von Annexin 6. Es ist jetzt in größerer Menge in den späten Endosomen der U18666A behandelten Zellen gebunden (Abb. 3.11, Spur 2 u. 4). Man kann von einer ungefähren prozentualen Umverteilung von 98% : 2% (EE : LE) in unbehandelten Zellen zu 85% : 15% (EE : LE) zu Gunsten der späten Endosomen in behandelten Zellen sprechen.

Die Umverteilung von Annexin 6 zur Seite der cholesterinreichen späten Endosomen unter U18666A Inkubation ist also ein Phänomen, das nicht nur in Annexin 6 überexprimierenden Zellen zu beobachten ist, sondern auch mit verändertem Bindungsverhalten endogenen Annexins 6 in späte Endosomenmembranen von CHO-WT Zellen nachzuweisen ist.

### 3.4 Bindungsaffinität von bakteriell exprimiertem Annexin 6 an Membranen aus LDL-beladenen Zellen

GST-Fusionsproteine eignen sich zur Expression eukaryonter Proteine in Bakterien und ermöglichen die Aufreinigung und Isolation großer Mengen von rekombinanten Annexin 6 Protein (GSTanx6). GSTanx6 eignet sich für *in vitro* Bindungsstudien an Membranen.

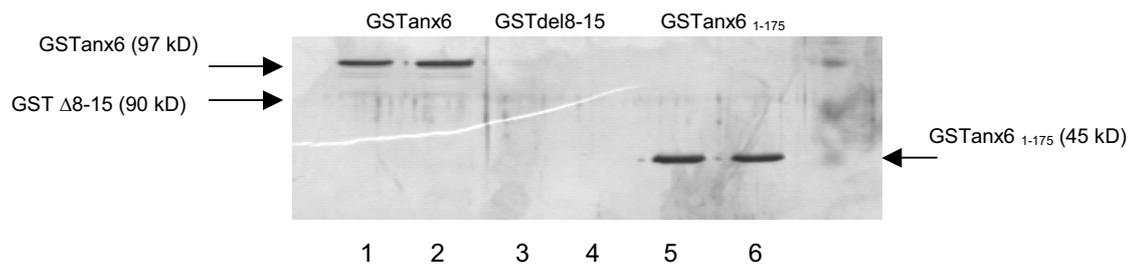
*In vitro* Bindungsstudien an CHO-WT Membranen sollten klären, ob die Cholesterin-induzierte Translokation von Annexin 6 auf eine veränderte Membranaffinität von Annexin 6 zurück zu führen ist.

Durch Einsetzen von Annexin 6-Mutanten sollten die Bindungsstudien weiter spezifiziert werden. Die zwei verschiedenen Mutationen waren die Mutation GSTdel8-15 (GST $\Delta$ 8-15), bei der die Aminosäuren 8-15 am N-terminalen Endes entfernt wurden und die Mutation GSTanx6<sub>1-175</sub>, die nur aus den ersten 175 Aminosäuren des Annexin 6 besteht. Das entspricht den ersten 2,5 vorderen repeats des Annexin 6 Proteins.

#### 3.4.1 Silberfärbung der GST Proteine

Zur Qualitätskontrolle der bakteriell exprimierten und aufgereinigten GST Annexin 6 (GSTanx6) Proteine und ihrer Mutanten wurde zunächst eine 12,5 % ige Gelelektrophorese gemacht mit anschließender Silberfärbung zur Identifikation der Proteine. Es wurden jeweils 1  $\mu$ g/ $\mu$ l aufgereinigtes Protein aufgetragen. Analysiert wurden GSTanx6 mit einer erwarteten Größe von 97kD, die Mutation GST $\Delta$ 8-15 mit 90 kD und die Mutation GSTanx6<sub>1-175</sub>, die eine Größe von 45 kD hat. Erwartet wurde, dass sich alle drei Proteine in der sensiblen Silberfärbung darstellen lassen. Sollte eines nicht oder unzureichend darstellbar sein, würde es keine weitere Verwendung finden.

Wie in der Silberfärbung deutlich wird, ist die Anfärbbarkeit von GSTanx6 von guter Qualität (Abb. 3.12, Spur 1 + 2), genauso wie die der Deletionsmutante GSTanx6<sub>1-175</sub> (Abb. 3.12, Spur 5 + 6). Ein Nachweis für GST $\Delta$ 8-15 gelang nicht, weshalb es in den Folgeversuchen keine weitere Verwendung fand.

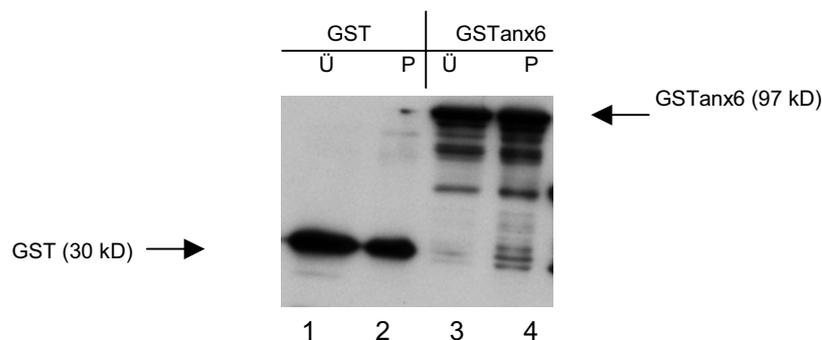


**Abb. 3.12:** Silberfärbung von GSTanx6 und den Mutationen GST $\Delta$ 8-15 und GSTanx6<sup>1-175</sup>. Analyse von 1  $\mu$ g/ $\mu$ l Protein pro Spur im 12,5 % SDS Page

### 3.4.2 GSTanx6 Bindung an Membranen aus CHO-WT Zellen

Zunächst sollten die Bindungseigenschaften von GSTanx6 an Membranen studiert werden. Es wurde erwartet, dass, vermittelt durch die Ankopplung von Annexin 6, GSTanx6 ein gutes Membranbindungsverhalten zeigt und durch Zentrifugation aus den Membranen wenig gelöst werden wird.

Als Negativkontrolle diente das GST-Protein.



**Abb. 3.13:** Westernblot Analyse von CHO-WT Membranen + 250  $\mu$ M Calcium im 12,5% SDS Minigel. Inkubiert mit GST oder GSTanx6, anschließend zentrifugiert, um den bindenden Teil (P) vom nicht-bindenden Teil (Ü) zu trennen.

Abbildung 3.13 stellt den Westernblot dar, der die schlechten Bindungseigenschaften von GST verifizieren und zugleich die Bindungseigenschaften von GSTanx6 darstellt. Es wurden je 50  $\mu$ l CHO-WT PNS mit äquimolaren Mengen GST und GSTanx6 sowie 250  $\mu$ M Calcium versetzt und dann für 30 Minuten inkubiert. Anschließend folgten 60 Minuten in der Ultrazentrifuge bei 4°C mit 45.000 rpm. Es wurden 40 $\mu$ l Überstand (komplett) und 20 $\mu$ l Pellet (komplett) aufgetragen. Als erster Antikörper

diente zur Detektion der  $\alpha$ GSTanx6 AK in einer Verdünnung von 1:1000 für GST und GSTanx 6.

In den Spuren 3 und 4 der Abbildung 3.13 sieht man die Bindungseigenschaften von GSTanx6 an Membranen. Schwach erkennt man, dass das Signal im bindenden Teil (an den Membranen = Reihe 4) stärker ist und weniger GSTanx6-Protein durch Zentrifugation im nicht-bindenden Teil (= Überstand Reihe 3) detektierbar wird. Es entspricht in seiner Signalstärke ungefähr einem Verhältnis von 30% im Überstand : 70% im Pellet.

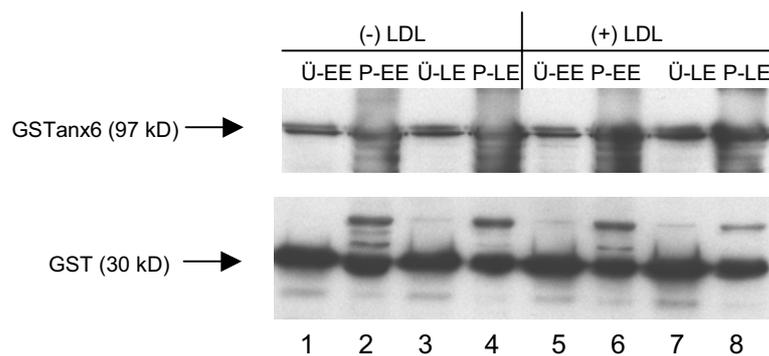
Vergleicht man Reihe 1 und 2 in Abbildung 3.13 wird deutlich, dass die Bindung für GST an Membranen mit einem ungefähren Verhältnis von  $\geq 60\%$  im Überstand zu  $\leq 40\%$  im Pellet nicht günstig ist. Der überwiegende Teil hat sich durch die Zentrifugation gelöst und ist in den nicht bindenden Teil (= Überstand) übergetreten. Dass trotzdem noch Bindung von GST an Membranen detektierbar sind, mag wohl an der großen Menge an Membranen in den Zelllysaten liegen.

### **3.4.3 GST und GSTanx6 Bindung an CHO-WT Endosomen +/- LDL Inkubation**

Zur Begutachtung der Bindungseigenschaften von GSTanx6 in Abhängigkeit von LDL als Liganden oder Einfluss nehmenden Faktor wurden CHO-WT Zellen mit 50  $\mu$ g/ml LDL vorbehandelt und anschließend die Endosomen isoliert.

Annexin 6 benötigt zur optimalen Bindung Calcium. Vorarbeiten der AG Grewal weisen eine optimale Menge von 50-250  $\mu$ M für die Bindung von Calcium auf. Deshalb wurden die ersten Experimente mit 250  $\mu$ M gemacht.

Durch Zentrifugation für 60 Minuten bei 45.000 rpm unter Zugabe von 250  $\mu$ M Calcium wurden endosomale Membranen isoliert. Das Pellet wurde mit 200  $\mu$ l HB-Puffer aufgenommen und abermals zur Konstanthaltung des Milieus mit 250  $\mu$ M Calcium versetzt. 100  $\mu$ l Pellet wurden dann mit 2,0  $\mu$ g GSTanx6 bzw. 1,0  $\mu$ g GST für 30 Min. bei 4 °C inkubiert. Nach 60 minütiger Zentrifugation mit 45.000 rpm wurden 40  $\mu$ l Überstand (=  $\frac{1}{2}$  der Gesamtmenge) und 20  $\mu$ l Pellet (komplett) in HB-Puffer auf das 12,5 % Gel aufgetragen. Zur Detektion des GST-Proteins diente der polyklonale Antikörper  $\alpha$  GSTanx6.



**Abb. 3.14:** Westernblot Analyse der Bindungseigenschaft von GSTAnx6 und GST an endosomale Membranen unter LDL-Einfluss im 12,5% SDS Minigel unter **250  $\mu$ M** Calcium Bedingungen. Die Detektion erfolgte im Immunoblot mit einer Antikörper Verdünnung von 1:500 gegen das Fusionsprotein GSTAnx6. Die Inkubationsdauer betrug 90 Minuten bei Raumtemperatur.

In Abbildung 3.14 kann man die Bindungseigenschaft von GSTAnx6 an endosomale Membranen unter LDL- Einfluss sehen. Man kann erkennen, dass die Bindung des GSTAnx6 an den Membranen stattfindet (Abb. 3.14, Spuren 2, 4, 6, 8). Es findet sich aber auch ein großer Teil des GSTAnx6 in dem nicht-bindenden Überstand. Man kann anhand der Signalstärke von einer ungefähren prozentualen Verteilung von 20% im Pellet (Abb. 3.14, Spur 2) : 80 % im Überstand (Abb. 3.14, Spur 1) sprechen.

In den späten Endosomen ist ohne LDL Einfluss eine erwartungsgemäße schlechte Bindungsaffinität für Annexin 6 (Abb. 3.14, Spuren 3 + 4).

Vergleicht man in der Abbildung die Spur 4 und 8 lässt sich aber die Tendenz erkennen, dass sich die Bindungsmodalitäten für GSTAnx6 unter LDL-Einfluss verbessern. Es lässt sich in Spur 8 eine größere Menge GSTAnx6 im bindenden Teil P (= Pellet) der späten Endosomen unter LDL-Einfluss detektieren als im bindenden Teil der späten endosomalen Membranen ohne LDL-Einfluss (Spur 4). Auch hier kann man die Bindungsaffinität anhand der Signalstärke ungefähr definieren. Dabei liegt in den behandelten späten Endosomen eine mindestens 5-fach höhere Konzentration von Annexin 6 vor, als in den unbehandelten späten Endosomen (Abb. 3.14, Spuren 4 + 8).

Ob die Bindung vielleicht über das GST-Protein vermittelt wurde konnte durch das Bindungsexperiment mit GST ausgeschlossen werden (Abb. 3.14, unterer Teil). Die Bindungseigenschaften für GST allein sind nicht gut. In allen Proben findet sich

unabhängig vom LDL-Gehalt mindesten 60 % im Überstand (Abb. 3.14, Spuren 1, 3, 5, 7), während maximal 40 % Pellet gebunden sind.

Da bei Bindungsstudien von GST und GSTanx6 ein recht hoher Anteil an unspezifischen Bindungen insgesamt an Membranen zu beobachten sind, kann man daraus schließen, dass die Bindungsspezifität für GSTanx6 an LDL behandelte späte Endosomen doch recht spezifisch zu sein scheint. Die unspezifischen Bindungen in den GSTanx6 Spuren, die in den Abbildungen auftauchen, scheinen durch das GST vermittelt zu werden. Die Bindungsaffinität von GST scheint außerdem durch LDL nicht beeinflussbar zu sein.

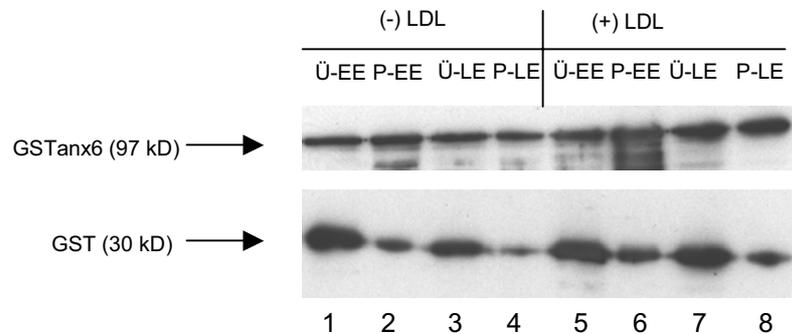
### **3.5 Einfluss von LDL auf die Bindung von Annexin 6**

Der Einfluss von Calcium auf die Bindungseigenschaft von Annexin 6 gehört zu den elementaren Eigenschaften der Annexin-Familie und ist bereits detailliert beschrieben (Gerke 1992). Um den möglichen Einfluss von LDL auf die Calcium-abhängige Bindung von Annexin 6 an frühe und späte Endosomen zu studieren, wurden CHO-WT Zellen mit 50 µg/ml mit LDL für 2 Stunden beladen. Untersucht werden sollte, ob sich die Calcium abhängige Bindungseigenschaft von Annexin 6 mit und ohne LDL ändert. Die Inkubation mit GST diente als Kontrolle, dass die Bindung tatsächlich Annexin 6 vermittelt stattfand und nicht durch das GST Protein.

Nach Zelllyisierung und Isolierung der LDL-haltigen Endosomen wurden 100 µl Endosomen mit 3 µg GSTanx6 bzw. 1,5 µg GST inkubiert, mit 50 µM Calcium versetzt und bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Nach Zentrifugation konnte das komplette Pellet in HB-Puffer aufgenommen werden. 40 µl Überstand (50% der Gesamtmenge) und das komplette Pellet wurden auf ein 12,5% SDS Page aufgetragen und im Westernblot analysiert (Abb. 3.15).

Die Versuchsbedingungen für den Kontrollversuch (Abb. 3.14) waren ähnlich. Die LDL-Inkubation betrug da jedoch 5 Stunden. Calcium wurde in der Konzentration 250 µM zugeführt. Die GSTanx6 Menge, die zur Inkubation genutzt wurde betrug 2 µg bzw. 1 µg GST. Inkubationsdauer und Zentrifugationsschritte blieben unverändert. Es wurden im Westernblot das komplette Pellet in 20 µl HB-Puffer gelöst sowie 40 µl Überstand (50% der Gesamtmenge) aufgetragen und analysiert.

In den Abbildungen 3.14 und 3.15 sind diese Westernblot-Analysen von CHO-WT Endosomen mit und ohne LDL Inkubation in Abhängigkeit mit der Calcium Konzentration dargestellt.



**Abb. 3.15:** Westernblot Analyse von +/- LDL beladenen CHO-WT Endosomen nach **50 µM Calcium** Inkubation im 12,5% SDS Minigel. Der Immunoblot erfolgte mit dem ersten Antikörper  $\alpha$ GSTanx6 1:200 verdünnt für 90 Minuten bei RT.

Bei der Begutachtung des Versuches in Abbildung 3.15 kann man zusammenfassend feststellen, dass die Bindung von GSTanx6 an die Membranen der frühen, unbehandelten Endosomen sehr gut ist und nur ein geringer Teil aus den Membranen gelöst im Überstand zu finden ist. In ungefähren Prozentangaben entspricht das ca. einer Verteilung von 30% : 70% (Überstand: Pellet), dargestellt in Spur 1 + 2 der Abb. 3.15.

Bei der GST-Bindung liegt das Verteilungsmuster anders. Mehr GST-Protein hat sich als Ausdruck der schlechten Bindungsfähigkeit aus den Membranen lösen lassen, so dass sich eine Verteilung von ca. 80% : 20% Überstand : Pellet (Abb. 3.15, Spur 1 + 2 unten) erkennen lässt.

Es wird also auch wieder deutlich, dass die Bindung an die Membranen der frühen Endosomen Annexin 6 vermittelt wird und GST allein keine bindende Eigenschaft hat. Die Bindung von GSTanx6 an die späten endosomalen Membranen ist ohne LDL-Inkubation nicht so gut wie an die frühen endosomalen Membranen aber immer noch besser, als die Membranbindung von GST an späte endosomale Membranen. Das Verteilungsmuster liegt bei beiden ungefähr mit ca. 60% : 40% (Überstand : Pellet) für GSTanx6 und 90% : 10% für GST (vgl. Abb. 3.15, Spuren 3 + 4 oben und unten).

Unter LDL-Beladung werden die Verteilungsmuster noch deutlicher. Die Bindungsverhältnisse für GSTanx6 haben sich durch die LDL-Inkubation sowohl an die frühen wie auch an die späten Endosomen verbessert. In den frühen Endosomen liegt eine ungefähre prozentuale Verteilung von 20% : 80% (Überstand : Pellet) für GSTanx6 vor (vgl. Abb. 3.15, Spur 6 + 2).

In den späten Endosomen verbessert sich das Verhältnis zu Gunsten der Membranbindung zu einem Verhältnis von 40% : 60% (Überstand : Pellet) (vgl. Abb. 3.15, Spur 8 + 4). Das entspricht ungefähr 20% mehr Bindungsaffinität von GSTanx6 an LDL-beladene als an unbeladene späte Endosomen

Die Situation für GST bleibt annähernd gleich mit einem Verhältnis von ca. 80% : 20% (Überstand : Pellet) (Abb. 3.15, Spur 6 + 8).

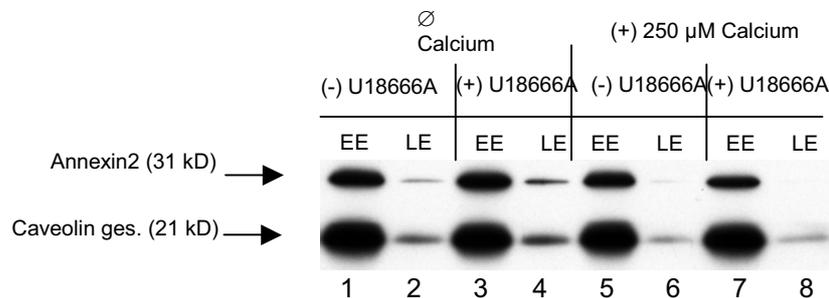
Vergleicht man die Exponate 3.14 mit 250  $\mu$ M Calcium Konzentration mit der Abb. 3.15 bei 50  $\mu$ M Calcium stellt man fest, dass die Bindungseigenschaft von Annexin 6 an LDL behandelte späte Endosomen bei der höheren Konzentration von Calcium insgesamt nicht besser wird. Die Signale in Abbildung 3.15 sind insgesamt genauer und schärfer. Die Unterschiede in den Bindungseigenschaften, die durch die Zentrifugationen sichtbar werden, sind in Abbildung 3.14 weniger genau. Daraus lässt sich ableiten, dass bei niedrigen Calcium Konzentrationen die LDL-vermittelte Translokation von Annexin 6 an Membranen von späten Endosomen begünstigt wird und 50  $\mu$ M Calciumzugabe unter diesen Bedingungen wohl optimal zu sein scheinen.

Die Kontrolle durch das Protein GST allein zeigt, dass es sich durch verschiedene Calcium Konzentrationen und das Vorhandensein von LDL in den Membranen nicht in seiner Bindungseigenschaft ändert. Es ist unter allen Bedingungen ein schlechter Binder an Membranen, der sich durch Zentrifugation aus den Membranen lösen lässt (vgl. Abb. 3.14 + 3.15, Spuren 1, 3, 5, 7).

### **3.5.1 Einfluss von LDL und Calcium auf weitere früh endosomale Proteine**

Die beiden früh endosomalen Kontrollproteine Annexin 2 und Caveolin sind ebenfalls Cholesterin moduliert. 50% von Annexin 2 ist Cholesterin-sensitiv und benötigt entweder Calcium oder Cholesterin als Bindungsmodulator. Caveolin bindet Cholesterin direkt. Es sollte nun geklärt werden, ob deren Bindungsverhalten durch

unterschiedliche Calcium-Konzentration ebenfalls beeinflusst werden kann, oder ob der Effekt, der für Annexin 6 deutlich wurde darauf beschränkt bleibt.



**Abb. 3.16:** Westernblot Analyse von +/- **U18666A** inkubierten CHO-WT Endosomen +/- Calcium Inkubation im 12,5% SDS Minigel. Der Immunoblot erfolgte für Annexin 2 mit dem  $\alpha$  Annexin 2 H7 Antikörper 1:1000 und  $\alpha$  Caveolin ges. Antikörper 1:10000 verdünnt.

Betrachtet man die beiden Kontrollproteine kann man keine deutliche Verbesserung der Bindungseigenschaft durch Calcium- oder Cholesterin-Akkumulation durch U18666A vermittelt feststellen. Obwohl Annexin 2 als Mitglied der Annexin Familie calciumabhängig Phospholipide bindet, scheint eine Verbesserung der Bindungseigenschaft durch eine hohe Calcium-Konzentration nicht stattzufinden. Vermutlich reichen die endogenen Calcium-Reserven in den lysierten Zellen aus, um eine Bindung optimal stattfinden zu lassen (vgl. Abb.3.16, Spuren 1-4 + 5-8). Die vorrangige Lage von Annexin 2 wie Caveolin in den frühen Endosomen ist typischer Aufenthaltsort der beiden endosomalen Marker.

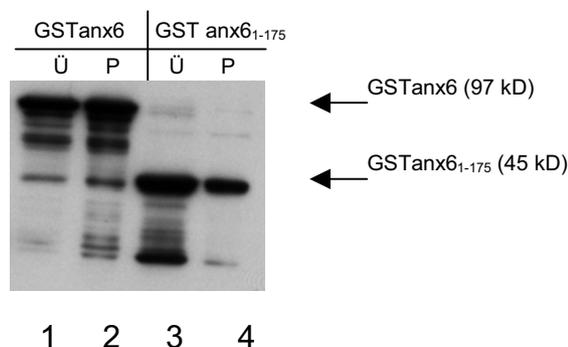
Für Caveolin lässt sich keine bessere Bindung in Abhängigkeit von der herrschenden Calcium-Molarität in den Proben feststellen. Wie erwartet ist auch der Einfluss von Cholesterin für Annexin 2 und Caveolin nicht zu zeigen, wie er für Annexin 6 gezeigt werden konnte. Es findet keine bessere Bindung an späte, durch U18666A induzierte Cholesterin-akkumulierte Endosomen statt (vgl. Abb. 3.16, Spuren 3 + 4 und 7 + 8 mit 1 + 2 und 5 + 6).

### 3.6 Bindungsstudien mit der Deletionsmutante GSTanx6<sub>1-175</sub>

Um einen bindenden Bereich am Annexin 6 identifizieren zu können, der für die cholesterin-induzierbare Bindung von Annexin 6 an späte Endosomen verantwortlich sein könnte, nimmt man sich die Deletionsmutante GSTanx6<sub>1-175</sub> zu Nutze. An ihr

folgen dem N-Terminalen Ende nur noch 175 Aminosäuren, das entspricht ungefähr 2,5 repeats. Daraus folgt, dass dem Annexin 6-spezifischen N-Terminus nur ein kurzes Stück zur Calcium abhängige Bindung zur Verfügung stehen. GSTanx6<sub>1-175</sub> hat ein Gewicht von 45 kD und wurde in seiner Bindung an CHO-WT Membranen unter unterschiedlichen Konditionen untersucht.

Zunächst sollte eine vergleichende Bindungsstudie von GSTanx6 und GSTanx6<sub>1-175</sub> durchgeführt werden. Hierfür wurden 50 µl CHO-WT PNS mit 250 µM Calcium sowie 3 µg GSTanx6 oder 1 µg GSTanx6<sub>1-175</sub> für 30 Minuten inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 Stunde bei 45.000 rpm wurde das komplette Pellet in 20 µl HB-Puffer gelöst und 40 µl Überstand im 12,5% SDS Page aufgetragen und analysiert.



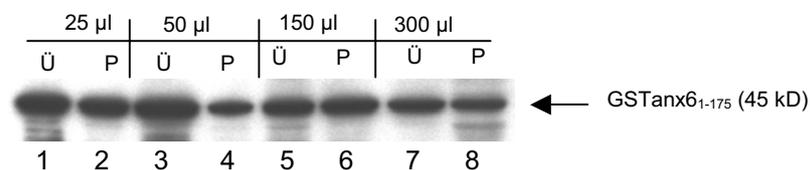
**Abb. 3.17:** Westernblot Analyse von GSTanx6 und GSTanx6<sub>1-175</sub> in CHO-WT PNS im 12,5% SDS Minigel. Nach Inkubation mit äquimolaren Mengen GSTanx6 oder GSTanx6<sub>1-175</sub> und 250 µM Calcium erfolgte die Zentrifugation. Der Immunoblot folgte mit αGSTanx6 in der Verdünnung 1:1000 für 90 Minuten bei RT.

GSTanx6 zeigt ein etwas besseres Membranbindungsverhalten (Abb. 3.17, Spur 1 + 2). Vermittelt durch das Annexin 6, das an das Fusionsprotein gekoppelt ist, hat es eine höhere Membranaffinität als die Deletionsmutante GSTanx6<sub>1-175</sub>, der Teile der calciumabhängigen Bindungsstellen fehlen. Auch hier kann man an der Signalintensität ungefähr schätzen, dass die Verteilung bei 40% : 60% (Überstand : Pellet) liegen müsste.

In Abbildung 3.17 Spuren 3 + 4 erkennt man, dass wie erwartet GSTanx6<sub>1-175</sub> schlecht an die Membranen binden kann und durch Zentrifugation aus den Membranen gelöst werden (Abb. 3.17, Spur 3 + 4). Die Signalintensität entspricht ungefähr 80% : 20% (Überstand : Pellet).

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Grewal zeigten, dass GSTanx6<sub>1-175</sub> ein schlechter Binder an zelluläre Membranen ist.

Um die geeigneten Versuchsbedingungen zu finden, wurden steigende Mengen perinukleärer Überstand (PNS) titriert. Zur Untersuchung der Membranbindung der Mutante wurden 25 – 300 µl PNS mit 250 µM Calcium versetzt und für 30 Minuten mit 1 µg GSTanx6<sub>1-175</sub> inkubiert. Nach einstündiger Zentrifugation bei 45.000 rpm wurden Überstand und Pellet voneinander getrennt. 20 µl HB-Puffer dienten zur Aufnahme des gesamten Pellets. Das Pellet und 40 µl des Überstandes wurden im 12,5 % SDS Page analysiert.



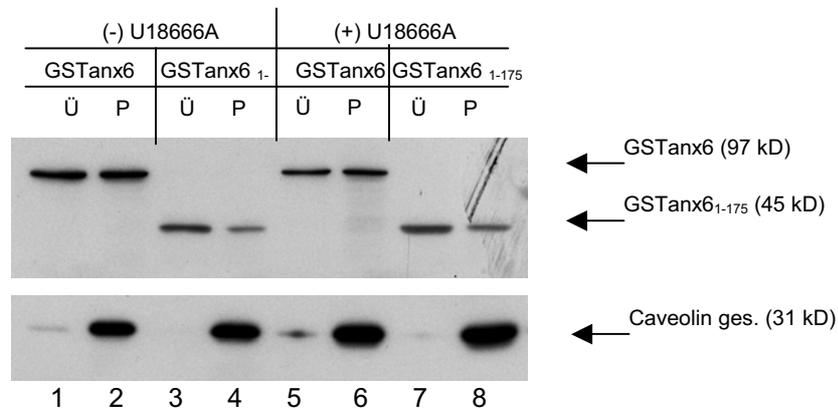
**Abb. 3.18:** Westernblot Analyse von titrierter CHO-WT PNS Menge mit Calcium 250 µM Inkubation und 1 µg GSTanx6<sub>1-175</sub> im 12,5% Minigel. Der Immunoblot erfolgte 1:1000 verdünnt mit dem αGSTanx6 Antikörper für 90 Minuten bei RT.

In Abbildung 3.18 sieht man die schlechte Membranbindung in den eingesetzten Mengen 25 und 50 µl. Spuren 2 und 4 zeigen einen deutlich geringeren Gehalt an detektierbarem GSTanx6<sub>1-175</sub> im bindenden Teil als Spuren 1 und 3 im nicht-bindenden Teil. Das nahezu ausgewogene Verhältnis zwischen bindendem und nicht bindendem Teil in den Spuren 5 und 6 bzw. 7 und 8 ist durch die unspezifische Assoziation von GSTanx6<sub>1-175</sub> an viele Membranfragmenten zu erklären, in denen es „kleben“ bleibt, dort dann gefangen ist und nicht durch Zentrifugation gelöst werden kann.

Die optimale Menge CHO-WT PNS liegt nach Auswertung dieses Versuches also bei 25-50 µl eingesetztem Probenvolumen.

Der nächste Schritt ist die Untersuchung, ob für die Bindung der Deletionsmutante eine Cholesterinabhängigkeit nachzuweisen ist. Dafür wurden CHO-WT Zellen mit U18666A vorbehandelt und lysiert. Anschließend wurden 15 µl Probe mit 500 nM Calcium sowie wahlweise 3 µg GSTanx6 oder 1 µg GSTanx6<sub>1-175</sub> inkubiert. Nach Zentrifugation für 60 Minuten mit 45.000 rpm wurden der komplette Überstand und

das Pellet komplett in 30  $\mu$ l HB-Puffer gelöst im 12,5 % SDS Page separiert und im Immunoblot analysiert.



**Abb. 3.19:** Westernblot Analyse von CHO-WT PNS mit 500 nM Calcium, +/- 2  $\mu$ g/ml U18666A und äquimolaren Mengen GST Fusionsproteinen nach Zentrifugation im 12,5% SDS Minigel. Der Immunoblot erfolgte mit  $\alpha$ GSTanx6 1:1000 verdünnt und  $\alpha$ Caveolin ges. 1:10000 für 90 Minuten bei RT.

In Abbildung 3.19 ist die Abhängigkeit der Membranbindung für GSTAnx6 und GSTAnx6<sub>1-175</sub> vom Vorhandensein von Cholesterin dargestellt. In den Spuren 1 und 2 sieht man, dass die Membranbindung von GSTAnx6 ohne Cholesterin sich annähernd gleich gegenüber dem aus der Membran gelösten Teil (Abb. 3.19, oberer Teil) darstellt (ca. 50% : 50%, Ü : P).

Für GSTAnx6<sub>1-175</sub> wird die schwache Bindungseigenschaft in Abwesenheit von Cholesterin schon etwas deutlicher. Der überwiegende Teil der Deletionsmutante findet sich im Überstand (Abb. 3.19, Spur 3 + 4, mittlere Spur). In Prozentangaben aus der Signalstärke sieht man eine ungefähre Verteilung von 80% : 20%, Überstand : Pellet.

Unter Einfluss von Cholesterin ändert sich das Bild geringfügig. Sowohl GSTAnx6 als auch GSTAnx6<sub>1-175</sub> scheinen unter Cholesterineinfluss eine höhere Membranaffinität als ohne Cholesterin zu haben. Mehr Protein findet sich nun im bindenden Teil, im Pellet (Abb. 3.19, Spuren 6 + 8, vgl. mit 5 + 7 bzw. 2 + 4). Hier liegt die Verteilung für GSTAnx6 jetzt bei ca. 40% : 60% und für GSTAnx6<sub>1-175</sub> 70% : 30%, Überstand : Pellet.

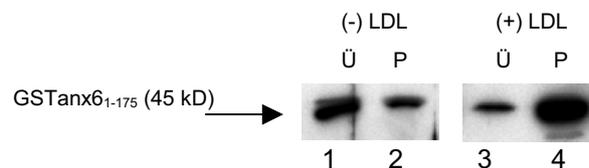
Daraus lässt sich schließen, dass die Bindungsaffinität nicht nur für Annexin 6 und GSTAnx6 durch Cholesterin moduliert wird und zur Translokation führt, sondern auch

die Bindungsaffinität von GSTanx6<sub>1-175</sub> eine Cholesterinabhängigkeit aufzuweisen scheint.

Das frühe endosomale Kontrollprotein Caveolin demonstriert wieder die Unabhängigkeit anderer endosomaler Proteine gegenüber Cholesterinakkumulation. Außerdem zeigt sich, dass Überstand und Pellet sauber voneinander getrennt auf das Gel aufgetragen werden konnten und somit die Signale nicht durch Kontamination entstanden sind (Abb. 3.19, unterer Teil).

Um die Bindungseigenschaft von GSTanx6<sub>1-175</sub> weiter an Endosomen zu spezifizieren, wurden mit U18666A oder LDL vorinkubierte Endosomen isoliert und analysiert.

Aus LDL beladenen CHO-WT Zellen wurden 300 µl frühe Endosomen isoliert. Durch einstündige Zentrifugation (45.000 rpm, 4°C) konnten Membranen isoliert werden und mit 300 µl HB-Puffer aufgenommen werden. 100 µl konzentrierte Membranen wurden mit 250 µM Calcium und 1 µg GSTanx6<sub>1-175</sub> für 30 Minuten inkubiert und anschließend durch einstündige Zentrifugation bei 45.000 rpm in bindenden (Pellet) und nicht bindenden Teil (Überstand) aufgetrennt. Das Pellet wurde in 20 µl HB-Puffer komplett gelöst und auf das 12,5 % SDS Page aufgetragen sowie 40 µl vom Überstand.



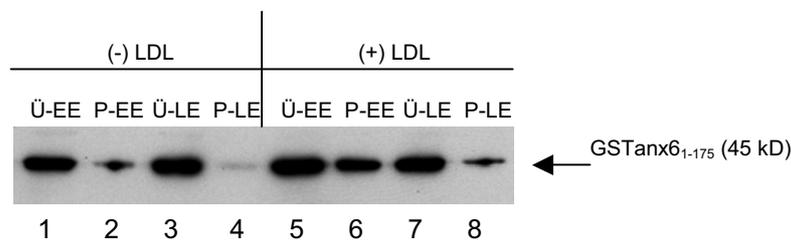
**Abb. 3.20:** Westernblot Analyse von +/- LDL beladenen CHO-WT frühen Endosomen im 12,5% SDS Minigel. Die Detektion im Immunoblot erfolgte mit dem  $\alpha$ GSTanx6 Antikörper 1:1000 verdünnt für 90 Minuten bei RT.

In Abbildung 3.20 ist eine Westernblot-Analyse des bindenden (P) und nicht-bindenden (Ü) Teils aus +/- LDL beladenen CHO-WT Endosomen dargestellt.

In Abb. 3.20 Spur 1 und 2 sieht man die frühen Endosomen ohne LDL Inkubation. Der Hauptbestandteil der Deletionsmutante ist aus den Membranen gelöst und findet sich im nicht bindenden Überstand (~ 80% : 20%, Ü : P). Das unterstreicht die Beobachtungen, dass GSTanx6<sub>1-175</sub> ein schlechtes Bindungsverhalten an Membranen hat.

Unter LDL Inkubation ändert sich das Bild. Der Hauptbestandteil des GSTanx6<sub>1-175</sub> findet sich nun im bindenden Teil, in den Membranen wieder (~ 10% : 90%, Ü : P) . Das deutet daraufhin, dass die Bindungsaffinität von GSTanx6<sub>1-175</sub> durch LDL beeinflussbar ist.

Dieser Versuch wurde nun auch für späte Endosomen unter LDL Einfluss wiederholt. Aus 250 µl Endosomen Pool wurden die Membranen isoliert und mit 200 µl HB-Puffer aufgenommen. 134 µl aufkonzentrierte Endosomenmembranen wurden mit 250 µM Calcium und 1 µg GSTanx6<sub>1-175</sub> für 30 Minuten inkubiert und anschließend durch Zentrifugation für 60 Minuten bei 45.000 rpm in bindenden und nicht-bindenden Teil getrennt.



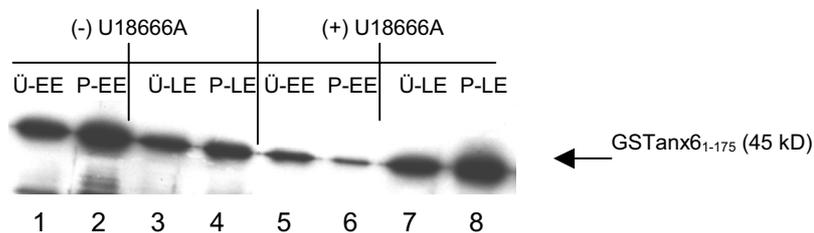
**Abb. 3.21:** Westernblot Analyse von CHO-WT Endosomen +/- 50 µg/ml LDL Inkubation nach Zentrifugation im 12,5% SDS Minigel. Es wurden der Nicht- bindende Teil (Ü) vom Bindenden Teil (P) getrennt. Der Immunoblot erfolgte mit dem αGSTanx6 Antikörper 1:1000 verdünnt für 90 Minuten bei RT.

In Abbildung 3.21 ist die Bindungseigenschaft von GSTanx6<sub>1-175</sub> an endosomale Membranen mit und ohne LDL-Akkumulation dargestellt. Aus den Spuren 1-4 wird deutlich, dass GSTanx6<sub>1-175</sub> ohne LDL nicht gut an Membranen bindet. Der überwiegenden Teil findet sich im nicht gebundenen Überstand.

Unter LDL Inkubation ändern sich die Bindungsbedingungen. Was in Abbildung 3.20 für die frühen Endosomen unter LDL-Einfluss gezeigt werden konnte (s. Abb. 3.20, Spuren 2 + 4) kann in Abbildung 3.21 für die späten Endosomen ausgeweitet werden. Nicht nur die Membranbindung in den frühen Endosomen ist unter LDL-Inkubation besser (Abb. 3.21, Spuren 6 und 2) auch die Affinität an Membranen der späten Endosomen ist größer unter LDL-Einfluss (Abb. 3.21, Spuren 8 und 4). Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Bindungsaffinität von GSTanx6<sub>1-175</sub> an endosomale Membranen durch LDL beeinflussbar ist.

Um eine Abhängigkeit der Bindungsbeeinflussung durch Cholesterin als Hauptbestandteil des LDL nachweisen zu können, wurden frühe und späte Endosomen aus mit 2 µg/ml U18666A inkubierten CHO-WT Zellen isoliert.

Aus 50 µl frühen und späten Endosomen wurden die Membranen isoliert (1 Stunde, 45.000 rpm Zentrifugation) und mit 100 µl HB-Puffer aufgenommen. Nach 30 Minuten Inkubation mit 250 µM Calcium und 1 µg GSTanx6<sub>1-175</sub> wurde der bindende Teil vom nicht-bindenden Teil durch Zentrifugation (1 Stunden, 45.000 rpm) getrennt und das komplette Pellet in 20 µl HB-Puffer und 40 µl Überstand auf ein 12,5 % SDS Page aufgetragen.



**Abb. 3.22:** Westernblot Analyse von CHO-WT Endosomen +/- 2 µg/ml U18666A Inkubation nach Zentrifugation. Es wurden der nicht-bindende Teil (Ü) vom bindenden Teil (P) getrennt. Der Immunoblot erfolgte mit dem αGSTanx6 Antikörper 1:1000 verdünnt für 90 Minuten bei RT.

In Abbildung 3.22 sieht man die Abhängigkeit der Bindungsaffinität von GSTanx6<sub>1-175</sub> von der Präsenz von Cholesterin. Vergleicht man die Spuren 8 und 4 wird deutlich, dass die Bindung der Deletionsmutante in Cholesterin-akkumulierten späten Endosomen besser wird. Es lässt sich mehr Protein in den Cholesterin-reichen Membranen detektieren.

Dies deutet darauf hin, dass die Cholesterin-sensitive Bindung von Annexin 6 durch die N-terminale Region des Annexin 6 Proteins vermittelt wird.

### 3.7 Cholesterinentzug reduziert die Affinität von Annexin 6 an Membranen

Aus bisher gezeigten Arbeiten wurde deutlich, dass eine Cholesterin-induzierte Bindung von Annexin 6 an späte Endosomen beobachtet werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass ein höheres Vorhandensein von Cholesterin in späten Endosomen eine größere Bindungsaffinität von Annexin 6 dorthin zur Folge hatte.

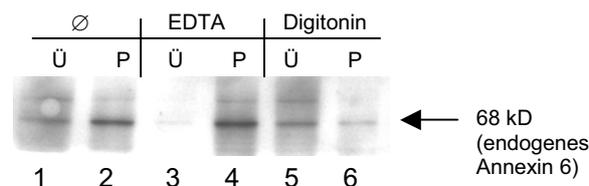
Deshalb sollte im Umkehrschluss getestet werden, ob aus einem Cholesterin-Entzug weniger Bindung von Annexin 6 an späte Endosomen resultiert.

10 % vom Annexin 6-Pool sind EDTA resistent. Wenn man Zellen lysiert, die Membranen durch Zentrifugation isoliert und dadurch aufkonzentriert, kann man durch die Zugabe eines Calcium-Chelators wie EDTA das Calcium-abhängig bindende Annexin 6 durch Calciumentzug aus den Membranen lösen.

Ein geringer Pool von Annexin 6 ist durch den Calcium-Entzug nicht beeinflusst und bleibt als membranbindender Teil in den Membranen detektierbar. Dieser Annexin 6 Pool wird „EDTA-resistenter Pool“ genannt.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der EDTA-resistente Annexin 6-Pool in seinem Bindungsverhalten ebenfalls auf Cholesterinentzug reagiert. Hierbei wurde aber nicht durch eine Zugabe von Cholesterin das Bindungsverhalten studiert, sondern der Umkehrschluss wurde gezogen und das Bindungsverhalten von Annexin 6 bei Cholesterin Entzug wurde untersucht.

200 µl CHO-WT PNS wurden mit 5 mM EDTA vorinkubiert. Dadurch sollte der EDTA resistente Teil des Annexin 6 entfernt werden. Nach 30-minütiger Inkubation folgte eine 60-minütige Zentrifugation zur Isolierung der Membranen. Die isolierten Membranen wurden mit 100 µl HB-Puffer aufgenommen. 25 µl verblieben so, 25 µl wurden erneut mit 5 mM EDTA versetzt und 25 µl wurden mit 5 µg /ml Digitonin versetzt. Digitonin ist ein Detergenz, das das Cholesterin bindet und aus den Membranen löst und somit ein cholesterin-freies Milieu schafft. Nach der 30 minütigen Inkubation folgte eine 60-minütige Zentrifugation, die den bindenden Teil vom nicht bindenden Teil trennen soll. Sowohl das komplette Pellet als auch der komplette Überstand wurden in einem 12,5% SDS-Page aufgetrennt und anschließend analysiert.



**Abb. 3.23:** Westernblot Analyse von CHO-WT PNS nach EDTA Vorbehandlung und erneuter Inkubation mit EDTA bzw. Digitonin und anschließende Zentrifugation im 12,5% SDS Minigel. Der nicht-bindende Teil (Ü) wurde vom bindenden Teil (P) getrennt. Der Immunoblot erfolgte mit  $\alpha$ GSTanx6 Antikörper in der Verdünnung 1:1000 für 90 Minuten bei RT.

In Abbildung 3.23 ist das Bindungsverhalten von EDTA resistentem, endogenem Annexin 6 dargestellt. In Spur 2 sieht man in der Kontrolle den EDTA resistenten Teil von Annexin 6. Das spiegelt sich darin, dass durch Vorinkubation mit EDTA nur noch eine zarte Bande im bindenden Teil (Pellet) detektierbar ist. Im Überstand (Spur 1) befindet sich, ebenfalls als Bande detektierbar ein geringer Rest, des vorher bereits entfernten Teils des Calcium- abhängigen Annexin 6 Pools.

Auch Spur 3 und 4 dienen als Kontrolle zur Detektion und Selektion des EDTA-resistenten Pools von Annexin 6. Man findet auch dort in Spur 4 den Calcium-unabhängig bindenden Teil von Annexin 6.

In den Spuren 5 und 6 sieht man, wie der EDTA-resistente Teil von Annexin 6 auf Cholesterin Entzug reagiert. Durch fehlendes Cholesterin in den Membranen kann Annexin 6 nicht mehr so gut an die Membranen binden (Spur 6). Das stärkere Signal für Annexin 6 findet sich im abzentrifugierten Überstand wieder (Spur 5).

Die Tatsache, dass ein Cholesterin-Entzug die Loslösung von Annexin 6 aus den Membranen zur Folge hat, ist ein weiterer Beweis dafür, dass die Membranbindung von Annexin 6 durch den Einfluß von Cholesterin moduliert wird.

### **3.8 Einfluss von Annexin 6 auf die Lokalisation von HDL Rezeptoren**

In den High Density Lipoproteinen (HDL) werden zu 19% Cholesterin und Cholesterinester gespeichert. Sie dienen dem reversen Transport von Cholesterin aus den extrahepatischen Organen in die Leber.

Die Aufnahme und Abgabe von HDL aus den Zellen erfolgt über den Scavenger Rezeptor Typ B1 (SRB1).

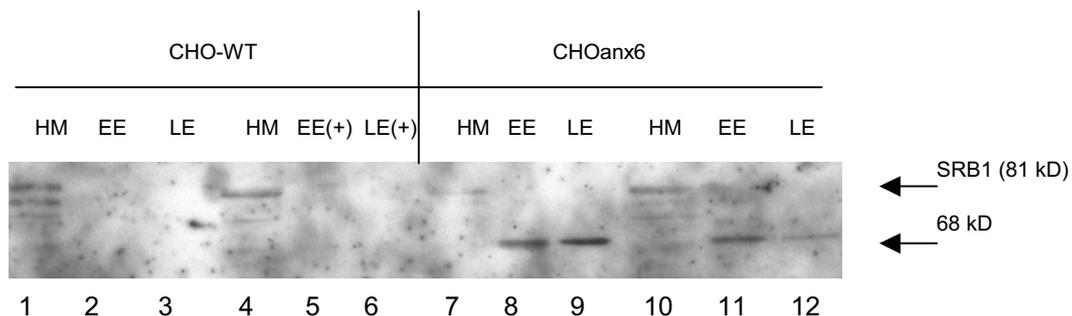
Da in CHOanx6 Zellen bereits auffiel, dass sich die Verteilung von Annexin 6 Cholesterin-abhängig verändert, wurde als nächstes das Augenmerk darauf gerichtet, ob in dieser Zelllinie die Lokalisation anderer Proteine sich durch die Überexprimierung von Annexin 6 verändert haben. Die frühen endosomalen Proteine Annexin 2 und Caveolin verändern sich, wie in vorherigen Kapiteln gezeigt, nicht. Andere endosomale Marker wie die Mitglieder der Rab-Proteinfamilie konnten in Arbeiten der AG Grewal auch als ortständig bewertet werden. Das gleiche gilt für lysosomale Marker wie lamp 1, den LDL-Rezeptor, den Transferrin-Rezeptor und

den Golgi-Apparat (Grewal et al 2000). Hier sollte als weiteres Protein die Abhängigkeit eines HDL Rezeptors, SRB1, in Annexin 6-überexprimierenden Zellen untersucht werden.

Dafür wurden zunächst aus Zelllysaten von CHOanx6 Zellen und einer Kontrolle, CHO-WT Zellen, die Verteilung des SRB1 Rezeptors in der Plasmamembran und Membranen der endosomalen Kompartimente miteinander verglichen.

Von allen Proben wurde mittels Lowry-Proteinmessung der Proteingehalt in den Proben bestimmt und dann nach Proteinmenge oder nach max. Volumen auf das Gel aufgetragen. Die schweren Membranen (HM) wurden mit einer Menge von 20 µg pro Tasche aufgetragen. Die frühen und späten Endosomen (EE/LE) mit maximalem Volumen von 120 µl Probe pro Tasche.

In den CHO-WT Zellen wurde eine Kontrollgruppe an frühen und späten Endosomen aus Zelllysaten extrahiert, die zuvor mit U18666A behandelt wurden und Cholesterinakkumuliert waren (EE+/LE+).



**Abb. 3.24:** Verteilung von SRB 1 in CHO-WT und CHOanx6 Zellmembranen. Die Proteine wurden in einem großen, 12,5 % SDS Page separiert und mit dem ersten Antikörper  $\alpha$  SRB1 (Tall , polyklonal) in der Verdünnung von 1:500 im Immunoblot detektiert.

SRB1 ist ein im vollglycosylierten Zustand ein Protein von 81 kD Protein. Da es sich um ein stark glycosyliertes Protein handelt, können Deglycolysierungen eine molekularen Massenunterschied von 50 kD ausmachen. Es ist anzunehmen, dass die Höhe von 68 kD in den endosomalen Fraktionen mit einer Deglycolysierung des Rezeptors zu erklären ist. Babitt et al. beschrieben diesen Abbau 1997 (Babitt et al 1997).

In der Abbildung wird deutlich, dass es eine unterschiedliche Verteilung des SRB1 in CHO-WT und CHOanx6 Zellen gibt. Während er in den CHO-WT Zellen vornehmlich in den schweren Membranen sitzt (Abb. 3.24, Spuren 1 + 4), die ja ein Konglomerat

aus allen Zellkompartimentmembranen darstellen, ist er in den CHOanx6 Zellen auch in den frühen und späten Endosomen nachzuweisen (Abb. 3.24, Spuren 8 + 9/11 + 12). Anhand der eindeutigen Markierung bei 68 kDa ist davon auszugehen, dass SRB1 hier in deglycolysiertem Zustand in den Zellen nachzuweisen ist. Ob die WT Zellen durch U18666A mit Cholesterin angereichert sind, scheint keine Einfluss nehmende Rolle zu spielen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einfluss von U18666A auf den Cholesterin Haushalt

Cholesterin wird in Säugetierzellen durch die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Lipoproteinen aufgenommen. Dabei spielt das LDL eine herausragende Rolle. Es wird nach der Bindung an den LDL-Rezeptor zunächst gemeinsam in die Zelle durch Rezeptor vermittelte Endocytose aufgenommen. LDL-Cholesterin und Rezeptor werden nun durch die frühen und späten Endosomen geschleust und anschließend in den sortierenden Endosomen voneinander getrennt. Der LDL-Rezeptor gelangt über die recycelnden Endosomen an die Plasmamembran, wo er erneute Verwendung findet. Das LDL-Cholesterinester gelangt zusammen mit den anderen Bestandteilen des LDL (Apolipoprotein B, Phospholipiden) in die Lysosomen, in denen es hydrolysiert wird. Das freie Cholesterin erreicht über die Lysosomen in den Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum und regelt dort die Steuerung der endogenen Cholesterinsynthese und die Synthese cholesterinhaltiger Stoffe wie Hormone und Vitamine. Wie der Mechanismus des Weitertransportes von Cholesterin aus den Lysosomen stattfindet ist derzeit noch unklar.

Chinese Hamster Ovary Zellen ist eine Zelllinie, die von Natur aus eine relativ geringe Menge an LDL-Rezeptoren exprimiert. Diese Tatsache macht eine Akkumulation von Cholesterin in den Zellen sehr schwierig, weil Rezeptor bedingt eine bestimmte Cholesterinaufnahmemenge nicht überschritten werden kann. CHO-Zellen sind aber optimal, um Studien von Annexin 6 zu betreiben, weshalb ein System zur Cholesterin Akkumulation in CHO Zellen entwickelt werden sollte. Um trotzdem die spezielle Akkumulation von Cholesterin in späten Endosomen zu erreichen und den Einfluss von Cholesterin auf Annexin 6 in späten Endosomen zu studieren, wurde die Substanz U18666A eingesetzt.

Liscum beschrieb 1998 den inhibierenden Effekt des Pharmakons U18666A (= 3-beta-[2-diethylamino]ethoxy]androst-5-en-17-one) auf den intrazellulären Transport von LDL-Cholesterin in Chinese Hamster Ovary Zellen (Liscum et al 1989). Der Gebrauch von U18666A führt in Zellkultur angewandt zu einem Bild, das auf zellulärer Ebene der Niemann-Pick-Krankheit ähnelt (Kobayashi et al 1999). Der Wirkstoff U18666A bewirkt eine Inhibition des Cholesterin Weitertransportes aus den Lysosomen der CHO Zellen. Das hat zur Folge, dass das niedrige endogene Level

von Cholesterin in CHO Zellen durch die Akkumulation von Cholesterin in den späten Endosomen und Lysosomen angehoben werden kann.

Diese organellspezifische Akkumulation von Cholesterin in späten Endosomen und Lysosomen konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden. In den Gradienten (Abb. 3.1, 3.2, 3.4, 3.5) kann man den peak der Cholesterinakkumulation in den späten Endosomen nachvollziehen und sehen, dass diese Akkumulation im Rahmen der endosomalen Kompartimente zeitabhängig auftritt. Die frühen Endosomen akkumulieren deutlich weniger Cholesterin. Es konnte gezeigt werden, dass nur der Weitertransport aus dem Kompartiment verlangsamt ist bzw. gar nicht mehr stattfindet. Das endogen synthetisierte Cholesterin ist vermutlich in seinem Transportverhalten unbeeinflusst.

Diese Beobachtungen der Cholesterinakkumulation in späten Endosomen deckten sich mit unseren nachgewiesenen Cholesterinakkumulationen in den U18666A-inkubierten Zellen. Am deutlichsten wird das wohl in den Immunfluoreszenzbildern, in denen die Cholesterinakkumulation durch Filipin in den späten Endosomen unter U18666A-Einfluss visualisiert werden konnte.

In Abbildung 3.1 wird der U18666A-induzierte Cholesterin Anstieg ebenfalls deutlich. Der Hauptbestandteil des Cholesterins findet sich ohne U18666A-Behandlung in den frühen Endosomen. Nach U18666A Behandlung verschiebt sich das Cholesterin in die späten Endosomen. Der Unterschied liegt nun darin, dass das endogene Cholesterin in CHO-WT Zellen angehoben werden konnte. Diese Anreicherung war die Bedingung und Grundvoraussetzung, um Bindungsstudien über die cholesterinabhängige Translokation von Annexin 6 durchführen zu können.

Wie man in der Abbildung 3.3 sehen kann findet sich in den CHOanx6 Endosomen ein sehr geringes Level an Cholesterin. Der maximale peak findet sich bei 160  $\mu\text{g}$  Cholesterin/mg Zellprotein in den frühen Endosomen. In Abbildung 3.4 sieht man den 9-fachen Anstieg des Cholesterins durch U18666A in den späten Endosomen von vormals 20  $\mu\text{g}$  Cholesterin/mg Zellprotein auf annähernd 180  $\mu\text{g}$  Cholesterin/ mg Zellprotein. Insgesamt ist das noch immer eine geringe Menge messbaren Cholesterins, aber der Anstieg durch den Einfluss von U18666A ist doch deutlich erkennbar.

## 4.2 Einfluss von Cholesterin auf die Lokalisation von Annexin 6

Die intrazelluläre Verteilung und Funktion von Annexin 6 sind Gegenstand langer Forschung und Beobachtungen. Die Identifikation einer regulatorischen Funktion von Annexin 6 und den anderen Annexinen wird aber erschwert durch die unterschiedliche Verteilung innerhalb der Zellkompartimente in Abhängigkeit vom analysierten Zelltyp. Zusätzlich exprimieren die verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Mitglieder der Annexin-Proteinfamilie, sodass eine eindeutige Zuordnung einer Funktion eines Annexins schwer fällt.

Die Lokalisation von Annexin 6 in unterschiedlichen Zelllinien, vor allem an der Plasmamembran und dem frühen endosomalen Kompartiment, deutet auf die mögliche Funktion von Annexin 6 als regulatorisches Element bei der Internalisierung von Liganden und dem endosomalen Membrantransport in Zellen hin. Dazu gehören auch die in dieser Arbeit verwendeten CHOanx6 Zellen. Auch bei ihnen findet sich Annexin 6 an der Plasmamembran und in den frühen Endosomen und stimuliert die Rezeptor-vermittelte Endozytose. In einer Reihe von Experimenten konnte die AG Grewal Ergebnisse zeigen, dass die Akkumulation von LDL zu einer Translokation von Annexin 6 in späte Endosomen führt (s.u.)

Grewal et al konnten 2000 eine Stimulation der Rezeptor-vermittelten Endozytose von LDL durch Annexin 6 nachweisen. Die behandelten Zellen zeigten nach LDL-Anreicherung eine Translokation von Annexin 6 aus den frühen in die späten Endosomen. Dabei, vermuteten sie, könnte diese Liganden-induzierte Translokation unter anderem durch Interaktionen mit LDL-Rezeptor-Adaptorproteinen vermittelt werden, die an die Annexin 6 spezifische N-terminale Domäne binden.

Den Hauptbestandteil von LDL stellt das Cholesterin dar. Auch wenn in der Literatur Cholesterin als einflussnehmender Faktor kaum beschrieben ist, bestand zumindest die Möglichkeit, dass Cholesterin einen Einfluss auf die Lokalisation ausübt.

Zum Studium der Cholesterin-abhängigen Bindung von Annexin 6 *in vivo* wurde als erstes ein zelluläres System etabliert, dass die Anreicherung von Cholesterin in endosomalen Membranen erlaubt.

Wie gezeigt werden konnte, ist der endogene Gehalt von Cholesterin in CHOanx6 und CHO-WT Zellen sehr gering. Es konnte aber ein System entwickelt werden, eine Akkumulation von Cholesterin in den späten Endosomen zu erreichen. (s. Abb. 3.1-

3.4) Unter dieser Voraussetzung wurde es dann auch möglich, den potentiellen Einfluss der Cholesterin Akkumulation in späten Endosomen auf die Membranaffinität von Annexin 6 zu studieren. Ähnliche Experimente wurden auch bereits für andere endosomale Membranproteine durchgeführt. Für Annexin 2 wurde von der Arbeitsgruppe Gruenberg et al herausgefunden, dass es eine Rolle an der Generierung von multivesikulären Körperchen (MVB= multivesicular bodies) spielt, aber auch ein Cholesterin abhängiges Verhalten in der Zelle zeigt. An Experimenten mit Liposomen zeigte Gruenberg, dass Annexin 2 eine Cholesterin-schützende Funktion hat, indem es verhinderte, dass Cholesterin durch bestimmte Chemikalien (MBCD = Methyl- $\beta$ - cyclodextrin, eine Substanz, die Cholesterin auswäscht) aus den Membranen der Liposomen gelöst werden konnte (Gruenberg et al 1989).

Ebenso wurde durch Immunfluoreszenz-Experimente deutlich, dass Annexin 2 ein gleiches Wanderungsverhalten in cholesterinakkumulierten Zellen zeigt, wie es für Annexin 6 gezeigt werden konnte. Annexin 2 konnte in den cholesterinreichen späten Endosomen lokalisiert werden.

Durch weitere Experimente wurde außerdem gezeigt, dass Annexin 2 das Ausknospen der MVB aus den frühen Endosomen mitreguliert (Mayran et al 2003).

Abbildungen 4.1 und 4.2 zeigen im Modell die cholesterinabhängige Translokation von Annexin 6 innerhalb der Zellkompartimente von CHO-WT Zellen und fassen die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse noch mal zusammen.

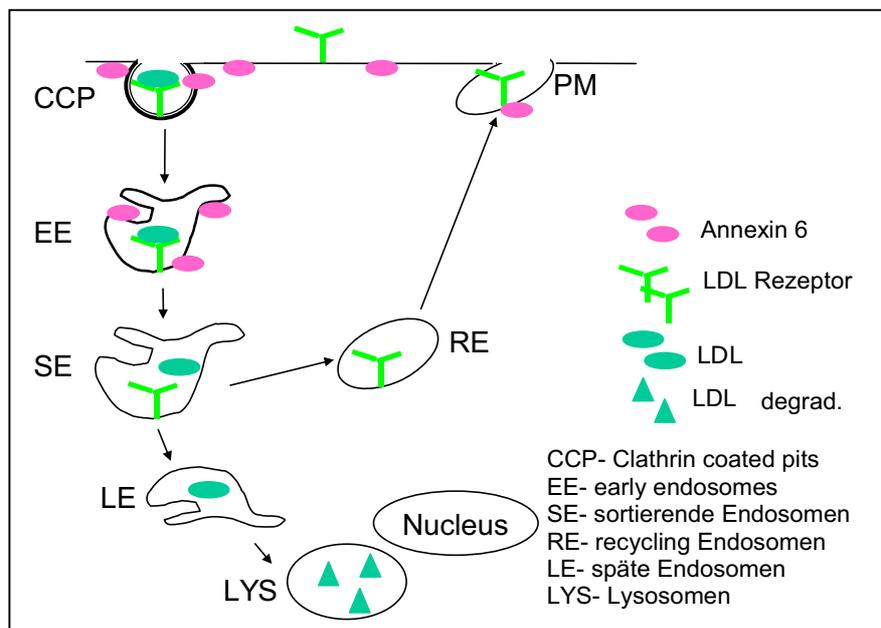


Abb.:4.1 Lokalisation von Annexin 6 in CHO-WT Zellen ohne LDL-Cholesterin Akkumulation

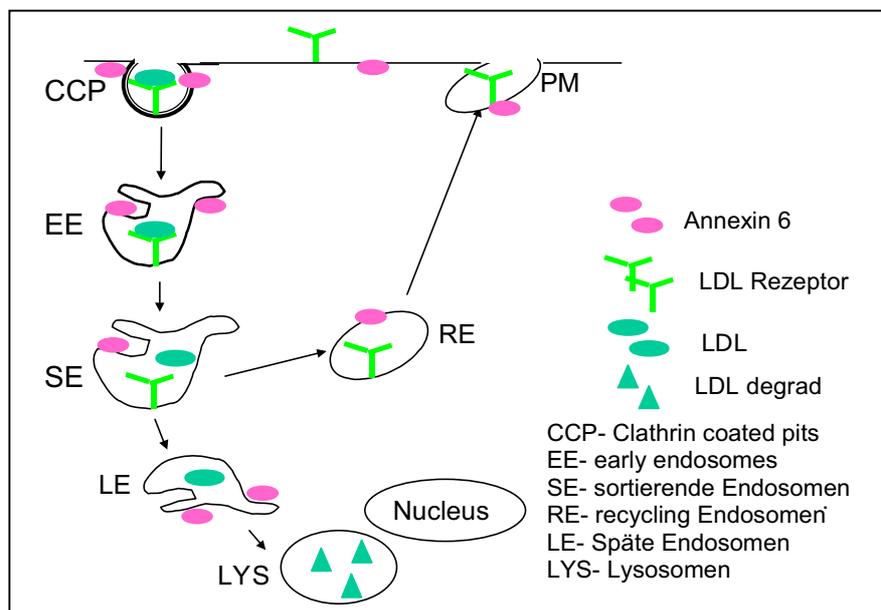


Abb. 4.2: cholesterinabhängige Translokation von Annexin 6 in späte Endosomen

Ohne Cholesterin Akkumulation (Abb. 4.1) findet sich Annexin 6 vornehmlich in der Plasmamembran und dem frühen endosomalen Kompartiment. Das LDL wird rezeptorvermittelt in die Zelle durch Clathrin coated pits unter zu Hilfenahme von

Annexin 6 aufgenommen. Das LDL wandert dann durch die frühen Endosomen (EE) und wird anschließend in den sortierenden Endosomen (SE) vom Rezeptor getrennt. In diesen SE ist Annexin 6 nicht mehr detektierbar. Der LDL-Rezeptor wird durch die rezyklierenden Endosomen (RE) zum erneuten Gebrauch an die Plasmamembran zurück transportiert. Das LDL gelangt über die späten Endosomen in die Lysosomen, in denen es degradiert werden kann.

In LDL-Cholesterin akkumulierten Zellen (Abb. 4.2) verändert sich der Aufenthaltsort von Annexin 6. Zunächst findet auch hier die rezeptorvermittelte LDL-Aufnahme statt. Annexin 6 findet sich auch hier an der Plasmamembran und vermittelt die Aufnahme von LDL und Rezeptor in die Clathrin coated pits. Die LDL-Akkumulation geht einher mit einer hohen Cholesterinkonzentration in den späten Endosomen und korreliert mit der Translokation von Annexin 6 in die späten Endosomen.

Die Akkumulation von Cholesterin in U18666A-behandelten Zellen geht einher mit einer Veränderung der zellulären Strukturen. Es entstehen unter U18666A-Inkubation viel größere und viel mehr späte Endosomen.

Die Immunfluoreszenz-Darstellung der Annexin 6 Verteilung in den U18666A behandelten Zellen zeigen deutliche Translokation von Annexin 6 in späte Endosomen (Abb. 3.6 und 3.7). Dabei scheinen sich Annexin 6-Proteine gleichmäßig auf der Membran der großen späten Endosomen zu verteilen. Da diese Beobachtung nicht für Annexin 2 und Caveolin gemacht wurde, gehen wir davon aus, dass die Translokation von Annexin 6 durch die erhöhte Konzentration von Cholesterin in den späten Endosomen-Membranen zu erklären ist.

#### **4.2.1 Molekulare Mechanismen zur Translokation von Annexin 6 in späte Endosomen**

##### **4.2.1.1 Rolle von Cholesterin**

Es ist nur wenig darüber bekannt, wie die Zellen die intrazelluläre Verteilung von Annexin 6 kontrollieren. Neben Studien über die Abhängigkeit der Verteilung vom pH Wert gibt es weitere Arbeiten, die den Einfluss von Cholesterin beschreiben. Die Arbeitsgruppe um Ayala-Sanmartin untersuchte die Rolle von Cholesterin an einem anderen Annexin-Familienmitglied, Annexin 2. Für ihre Bindungsstudien benutzten sie ein *in vitro* System mit Phosphatidylserin (PS)-reichen Liposomen. In ihren

Studien konnten sie zeigen, dass Annexin 2 gut an PS-reiche Membranen bindet und nach Zugabe von Cholesterin die Bindung verstärkt wurde (Ayala-Sanmartin et al 2001)

Dabei ist unklar, welche Region des Annexins die cholesterin-sensitive Bindung vermittelt.

König et al konnten 2000 zeigen, dass die Bindung von Annexin 2 an Phospholipide über die N-terminale Domäne vermittelt wird und ebenfalls Cholesterin vermittelt funktioniert. Das gilt für die Membranbindung an endosomale Membranen. Sie zeigten, dass die Bindung über die ersten 27 Aminosäurereste an dem N-terminus vermittelt zur Bindung an endosomale Membranen führt und machten dafür einen potentiellen Rezeptor in Form eines Lipids oder Proteins an den endosomalen Membranen verantwortlich (König et al 2000). Die in meiner Arbeit durchgeführten Bindungsstudien mit der Deletionsmutante GSTAnx6<sub>1-175</sub> weisen ebenfalls auf eine cholesterinabhängige N-terminale Signalinduktion hin. Unter LDL-Inkubation konnte gezeigt werden, dass die Bindung von GSTAnx6<sub>1-175</sub> in den Membranen der späten Endosomen zunimmt. Ob diese gesteigerte Bindung nun über einen Rezeptor vermittelt wird, lässt sich aus den durchgeführten Experimenten nicht ablesen.

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten, wie Cholesterin an der Membran wirken könnte.

Cholesterin bindet vornehmlich an Phosphatidylcholin-reiche Domänen, während Annexin 6 im negativ-geladenen Phosphatidylserin seinen Bindungspartner findet. Die Bindung des Cholesterins könnte nun zu einer Konformationsänderung in den Cholesterin-reichen Mikrodomänen führen, was die Bindung von Annexin 6 an Phosphatidylserin erleichtert oder induziert. Des Weiteren muss aber auch an die Möglichkeit der Konformationsänderung von Annexin 6 selber gedacht werden, die für den lysosomalen Transport notwendig sein könnten (Grewal et al 2002).

Zum anderen könnten lokale Veränderungen des pH-Wertes zu Konformationsänderungen führen, die eine erhöhte Affinität von Annexin 6 für späte Endosomen zur Folge haben könnten (Golczak et al FEBS Lett. 2001; Golczak et al FASEB J 2001).

In der Veröffentlichung von Golczak et al beschrieben die Autoren die pH-abhängige Konformationsänderung von Annexin 6 und die Formation von Ionen Kanälen durch Annexin 6 in sauren pH-Bedingungen. Diese Konformationsänderung soll eine

hydrophobe Oberfläche des Proteins zur Folge haben, was die Penetration in Membranen ermöglichen soll. Dafür verantwortlich machen sie eine abnehmende  $\alpha$ -helikale Struktur des Proteins und eine zunehmende  $\beta$ -Faltblatt-Struktur. Ob diese Vorgänge nun intermolekularer oder intramolekularer Natur sind konnten die Autoren nicht angeben (Golczak et al 2001). Ähnliche Ergebnisse über die pH-abhängige Konformationsänderung und die Kanalaktivität konnten bislang durch andere Arbeiten nicht beschrieben werden, weshalb diese Arbeitsgruppe bislang die einzige war, der diese Einflussnahme auf Membranbindung von Annexin 6 gelang.

Im Gegensatz zu unseren Arbeiten deuten neuere Daten von Cuervo et al darauf hin, dass Annexin 6 auch im Lumen von späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert ist.

Cuervo et al zeigten 2000, dass die beiden Annexine 2 und 6 eine KFERQ ähnliche Sequenz haben, die im Chaperon-vermittelten lysosomalen Stoffwechselweg eine Zielsequenz darstellen. Chaperone gelten als „molekulare Anstandsdamen“. Sie haben die Eigenschaft, die Struktur von Proteinen zu stabilisieren, damit sich nicht unerwünschte Proteinaggregate ausbilden können. Sie befinden sich vornehmlich im endoplasmatischen Retikulum aber auch in Lysosomen (Dice 1990).

Cuervo et al konnten zeigen, dass Annexine mit dieser KFERQ ähnlichen Sequenz schneller durch Chaperon vermittelte Autophagie in die Lysosomen degradierten, als Annexine, denen diese Sequenz fehlen, wie die betrachteten Annexine 5 und 11. Verantwortlich für diese Aufnahme ins Lumen der Lysosomen machten sie ein Rezeptor Protein (Cuervo et al 1996).

Es könnte also auch angenommen werden, dass die Aufnahme in die Prelysosomen und späten Endosomen ebenfalls über eine Chaperon vermittelte Aufnahme vermittelt wird, in der die KFERQ Sequenz eine Autophagie-vermittelnde Zielsequenz darstellt.

Zusammenfassend kann man wohl feststellen, dass neben den bekannten Calcium abhängigen und pH-abhängigen Modulatoren für die Bindungseigenschaften von Annexin 6 auch Cholesterin als Einfluss nehmende Größe identifiziert werden konnte.

### 4.3 Cholesterineinfluss auf die Membranaffinität von Annexin 6

Cholesterin ist für den Aufbau und die Fluidität von zellulären Membranen verantwortlich. Es findet sich in den Membranen, die die Zellen nach außen abgrenzen (Plasmamembran) aber auch in den Membranen der einzelnen Zellkompartimente wie z.B. in endosomalen Membranen und Membranen der Lysosomen und des Trans Golgi Netzwerkes.

In zellulären Membranen finden sich cholesterinreiche Zonen, lipid rafts. Sie zeichnen sich darin aus, dass in ihnen eine erhöhte Menge Cholesterin und Sphingolipide nachzuweisen sind und sie resistent gegenüber nicht-ionischen Detergenzien sind. Auch diese rafts finden sich in der Plasmamembran, sowie in Membranen der Biosynthese wie im Golgi-Apparat aber und im endosomalen System (Mukherjee et al 2000).

Eine Sonderform dieser lipid rafts stellen die sogenannten Caveolae dar (Simons et al 1997). Bei ihnen handelt es sich um cholesterinreiche, clathrinfreie Domänen in der Plasmamembran, deren Stützprotein Caveolin heißt (Rothberg et al 1992). Caveolin ist ein kleines, ~ 22 kD schweres Transmembranprotein, das in allen Zellen, die lipid rafts aufweisen nachgewiesen werden kann. Für das Protein Caveolin ist eine direkte Cholesterin-Abhängigkeit gezeigt worden. Es bindet direkt an diese Cholesterin-reichen, Sphingolipid-reichen Domänen. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Gesamtmenge an Cholesterin in den Zellen die Expressionsmenge von Caveolin bestimmt. So haben sehr cholesterinreiche Zellen eine große Menge Caveolin, während weniger cholesterinreiche Zellen über eine geringere Menge Caveolin verfügen. Daraus resultiert dann auch die Menge an Caveolae in der Membran (Fielding 1997, Thyberg 1998, Zhu 1999).

Für andere Zellproteine besteht eine Cholesterin-Sensitivität, wie für das endosomale Protein Annexin 2.

Die Arbeitsgruppe um König geht davon aus, dass die Abhängigkeit zur Bindung von Annexin 2 an Cholesterin und Calcium durch den zweiteiligen Aufbau des Proteins vermittelt wird. Demnach wird die Calcium-unabhängige Bindung an Cholesterin-reiche Domänen über die Annexin spezifische N-terminale Kopfgruppe vermittelt und die Calcium-abhängige Bindung über die konservierte core-Domäne mit ihren Calcium-Bindungsstellen. Auch geht die Arbeitsgruppe von König hierbei von einem

potentiellen Rezeptor in den endosomalen Membranen aus, der die Cholesterin-abhängige Bindung vermittelt (König et al 2000).

Für die Bindung von Annexin 2 an Baby Hamster Kidney (BHK) Zellen konnten Harder et al nachweisen, dass die Assoziation von Annexin 2 an rafts nicht nur von der Calcium-Konzentration, sondern auch vom Gehalt des Cholesterins abhing (Harder et al 1997). Die Arbeitsgruppe stellte bereits 1997 fest, dass Annexin 2 durch Cholesterin Entzug seine Bindung an Membranen verliert. Sie konnten zeigen, dass Chemikalien wie Digitonin und Filipin spezifisch die Bindung von Annexin 2 durch Cholesterinkomplexierung unterbinden konnten und sich Annexin 2 durch Zentrifugation aus dem bindenden Teil in den nicht-bindenden Teil herauslösen ließ. Diese Erkenntnis war in so fern neu, als dass die eigentliche Gemeinsamkeit innerhalb der Annexinfamilie auf dem Dogma beruht, dass eine Calcium- und Phospholipidbindung charakteristisch für die Bindung von Annexinen an Membranen ist. Scheinbar muss das für manche Annexine um Cholesterin erweitert werden.

In Ergänzung dazu konnten Harder et al beobachten, dass der Entzug von Cholesterin zu einer Loslösung sowohl von Annexin 2 als auch von Teilen des Membranskelettes erfolgte. Dazu zählen  $\alpha$ -Actinin, Ezrin und Moesin, welche alle bei der Quervernetzung von Membranen beteiligt sind. Dabei konnte eine unterschiedliche „Cholesterin-Entzug-Sensitivität“ ebenfalls festgestellt werden. Andere Membran- assoziierte Proteine und Proteine des Cytoskelett benötigen sowohl Calcium und Cholesterin zur Aufrechterhaltung der Strukturen.

Für Annexin 6 konnten durch meine und weitere Arbeiten der AG Grewal gezeigt werden, dass es eine cholesterinabhängige intrazelluläre Verteilung und Bindungsaffinität in CHO Zellen gibt. Dabei wurden nicht die lipid rafts untersucht, sondern Zellen wurden isoliert, deren Lysosomen und späte Endosomen mit Cholesterin akkumuliert wurden bzw. wurden Zellen in toto mit LDL beladen, um dann eine gesteigerte Membranaffinität von Annexin 6 nachzuweisen. Es lag nah, dass der Einfluss des LDL auf die Membranaffinität von Annexin 6 durch den hohen Cholesteringehalt vermittelt wurde. Deshalb schlossen sich meine Experimente mit der genaueren Betrachtung der Einflussgröße Cholesterin an.

Es ist noch immer nicht geklärt, ob es unterschiedliche Annexin 6-Pools in der Zelle gibt, die für diese unterschiedliche Lokalisation verantwortlich sind. Jedoch konnte ich die Beobachtungen von der AG Harder für Annexin 6 bestätigen. Meine und

andere Arbeiten der AG Grewal konnte erstmalig zeigen, dass ein Calcium unabhängiger Pool von Annexin 6 besteht, der sehr sensibel auf Cholesterin Entzug reagiert (Abb. 3.23). Das Calcium in den Membranen der Proben wurde durch den Chelator EDTA gebunden. Durch Zentrifugation konnte der nicht-bindende Teil mit dem chelatierten Calcium im Überstand vom bindenden Teil ohne Calcium im Pellet getrennt werden. Somit wurde der Calcium-unabhängige Teil im Pellet isoliert. Indem die Proben mit dem Calcium-Chelator EDTA versetzt wurden, konnte also der Calcium-unabhängige Pool identifiziert werden.

Die von Harder für Annexin 2 beschriebene Calcium-Unabhängigkeit konnte ebenfalls für einen kleinen Teil des Annexin 6-Gesamtpools bestätigt werden (ca. 10-20%). Dadurch konnte der potentielle Einfluß von Calcium auf die Bindung ausgeschlossen werden.

Nach Cholesterin Entzug mittels Digitonin nun verliert der Calcium-unabhängige Teil von Annexin 6 seine bindende Eigenschaft an die Membranen und läßt sich aus den Membranen durch Zentrifugation lösen (Abb. 3.23). Das bekräftigt die These, dass die erhöhte Membranaffinität von Annexin 6 von Cholesterin abhängig ist.

Es konnte damit also gezeigt werden, dass scheinbar auch für Annexin 6 ein Calcium-unabhängiger Pool besteht, der durch Cholesterinentzug seine Membranbindungseigenschaften verliert.

Es wurde weiterhin gezeigt, dass sich eine Abhängigkeit zwischen bindender Annexin 6 Menge und Cholesteringehalt findet.

In Abbildung 3.10 und 3.11 sieht man die deutliche Zunahme der Bindungsaffinität von Annexin 6 an Cholesterin-reiche Membranen. Abbildung 3.11 unterstützt die These, dass Cholesterin der Modulator zur Membranbindung nicht nur in überexprimierenden Zelllinien ist, sondern auch Einfluss auf das endogene Annexin 6 hat. Auch das endogene Annexin 6 zeigt eine cholesterinabhängige Translokation in die späten Endosomen (Abb. 3.11). Addiert man die Signalstärke der Spuren 3 + 4 in den Abbildungen 3.10 bzw. 3.11 kann man sagen, dass sich die Gesamtproteinmenge, die sich in den unbehandelten Zellen in den frühen Endosomen fand nun verteilt ist auf die frühen und die späten Endosomen der behandelten Zellen (Abb. 3.10/3.11).

Somit verlässt Annexin 6 Cholesterin-abhängig seine ursprüngliche Lokalisation an der Plasmamembran und den frühen Endosomen und verteilt sich zunehmend in den späten Endosomen und den Lysosomen.

Die erhöhte Affinität von Annexin 6 für cholesterinreiche Membranen konnte in *in vitro* Experimenten mit isolierten Membranen und sekundärem Annexin 6 bestätigt werden. Dabei dienten Studien mit einem Fusionsprotein, das an Annexin 6 gekoppelt eingesetzt wurde (GSTanx6).

Betrachtet man die Eigenschaften des Fusionsproteins GSTanx6 kann eine Abhängigkeit zwischen Membranaffinität und LDL-Konzentration gezogen werden. In Abbildung 3.15 kann man erkennen, dass die Membranaffinität von GSTanx6 sich in der Anwesenheit von LDL verändert hat. Das besondere Augenmerk liegt dabei auf der Bindung von GSTanx6 an die Membranen der späten Endosomen, die in Reihe 8 ein stärkeres Signal erkennen lassen als in Reihe 4. Ähnliche Ergebnisse wurden mit U18666A behandelten Membranen erzielt (Grewal et al 2002).

Insgesamt konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die Membranbindung in den LDL-beladenen Zellen zugenommen hat, da auch in den Membranen der frühen Endosomen eine stärkere Affinität nachzuweisen ist (Abb. 3.15).

Das Fusionsprotein an sich hat, wie ebenfalls gezeigt werden konnte, keine bindende Eigenschaft an Membranen (Abb. 3.15).

Um die Vermittlung der Membranbindung zu untersuchen, wurden cholesterinabhängige Bindungsstudien mit der Deletionsmutante GSTanx6<sub>1-175</sub> durchgeführt. Bei dieser Mutante ist das Protein Annexin 6 um einen Großteil der core Domäne deletiert worden. Die N-terminale Kopfgruppe, über die die Signaltransduktion vermutet wird, blieb unverändert. Läuft die cholesterinabhängige Bindung wie beim Annexin 2 über den N-terminalen Rest ab, sollte auch hierbei eine höhere Membranaffinität nachzuweisen sein. Erwartet wurde eine schlechte Membranbindung für GSTanx6<sub>1-175</sub> in cholesterinarmen Membranen. Das wurde in den Bindungsexperimenten geprüft. In Abbildung 3.21 sind in Bindungsstudien in Reihen 1 - 4 gezeigt, dass die Bindungsmodalitäten ohne Cholesterin für die Deletionsmutante in Zellysaten wenig günstig sind. Der überwiegende Teil befindet sich im nicht-bindenden Teil, herausgelöst durch die Zentrifugation.

Um zu überprüfen, wie der Einfluss von Cholesterin auf die Membranaffinität von GSTanx6<sub>1-175</sub> wirkt, wurden dann cholesterinakkumulierte Zellysate (unter Zugabe

von Calcium) betrachtet. Es wurde deutlich, dass eine Abhängigkeit zur Präsenz von Cholesterin besteht. Die Membranbindung von GSTanx6<sub>1-175</sub> ist unter Cholesterin Einwirkung besser als ohne. (Abb. 3.22). Da die Calcium-bindende core-Domäne vom Protein abgetrennt wurde, kann sie als Bindungspartner nicht für die Bindung an die Phospholipide dienen. Die gute Membranbindung scheint Calcium-unabhängig zu sein und über den N-Terminus zu erfolgen, der ähnlich bei Annexin 2, Cholesterin-sensitiv zu sein scheint.

Ob die Bindung an die Membranen über einen Rezeptor vermittelt wird, wie es für die Bindung von Annexin 2 vermutet wird lässt sich aus diesen durchgeführten Experimenten nicht nachweisen oder widerlegen.

Aus der Betrachtung der Ergebnisse lässt sich zusammenfassend sagen, dass neben den einflussnehmenden Faktoren Calcium und Phospholipiden eine Abhängigkeit zur Cholesterinmenge in Membranen für die Membranaffinität von Annexin 6 besteht. Unter Cholesterineinfluss scheinen bessere Konditionen in den späten Endosomen zur Annexin 6- Bindung zu bestehen.

Wo diese Akkumulation innerhalb der Membranen nun aber stattfindet, ob isoliert an lipid raft ähnlichen Strukturen und ob daraus folgend die Bindung von Annexin 6 an diesen Strukturen stattfindet, kann aus den Experimenten nicht ersehen werden. Die Bindung an lipid rafts ist hierbei nicht untersucht worden.

In vorläufigen Experimenten in der AG Grewal konnte eine Calcium-abhängige aber Cholesterin -unabhängige Assoziation von Annexin 6 mit Triton X-100 unlöslichen Membranfraktionen nachgewiesen werden. Diese Fraktionen entsprechen den lipid rafts. Das weist darauf hin, dass lipid rafts nicht in Membranen der späten Endosomen aufzufinden sind (T. Grewal, persönliche Mitteilung).

Deutlich wird jedoch, dass eine Cholesterinakkumulation im späten endosomalen Kompartiment zu einer gesteigerten Membranaffinität von Annexin 6 an diese Membranen führt.

#### **4.4 Veränderte Lokalisation von SRB1 in CHOanx6 Zellen**

SRB1 ist ein Rezeptor, der in die Familie der Scavenger-Rezeptoren gezählt wird. Seine Expression korreliert mit dem Cholesterinester Influx aber auch mit dem Cholesterin Efflux in Zellen. Er vermittelt dabei vor allem die Aufnahme und

Weitergabe von HDL in den Zellen. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass er über die Hypophyse reguliert wird und somit in die Steroidhormonsynthese eingreift. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass er ligandenspezifische Bindungsaktivität zeigt.

Liu und Krieger zeigten 2002, dass die SRB1 vermittelte HDL-Bindung eine intrinsische Eigenschaft des Rezeptors darstellt, die durch kein weiteres Protein oder andere zellulären Strukturen abhängig vermittelt wird (Liu et al 2002). Des weiteren zeigten Krieger et al 1995, dass SRB1 anionische Phospholipide bindet. Dabei konnten sie sich gezielt auf Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylinositol (PI) festlegen. Diese beiden Phospholipide sind auch Bindungspartner für Annexin 6.

In den CHOanx6 überexprimierenden Zellen konnte ich zeigen, dass der HDL Rezeptor SRB1 neben seiner ursprünglichen Lokalisation in der Plasmamembran auch in den frühen und späten Endosomen nachzuweisen ist (Abb. 3.24). Außerdem liegt er in einer deglycolysierten Form vor.

Diese Bindung könnte dadurch vermittelt werden, dass in der überexprimierenden Zelllinie es zu Konformationsänderung der zellulären Kompartimente kommen. Es könnte sein, dass die hohe Konzentration von Annexin 6 dazu führt, dass die Zusammensetzung der Membran sich zugunsten von PS und PI ändert. Diese Häufung der beiden Bindungspartner von SRB1 in den Membranen würde dann zu einer vermehrten Bindung an Membranen dieser eigentlich untypischen Kompartimente führen. Dass Annexin 6 dort nicht bindet, obwohl es sich auch um seine Bindungspartner handelt ist wohl damit zu erklären, dass die Translokation von Annexin 6 in das späte endosomale Kompartiment wohl Cholesterin-vermittelt abläuft. Diese Abhängigkeit besteht für SRB1 demnach nicht. Vielmehr scheint die Bindung von SRB1 streng von der Zusammensetzung der Membran abzuhängen.

## Zusammenfassung

Annexin 6 gehört zu einer Familie konservierter Proteine, die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an Phospholipide bindet. An der Zelloberfläche stimuliert Annexin 6 die LDL-Rezeptor-abhängige Endocytose. Innerhalb des endosomalen Membrantransports stimuliert Annexin 6 das targeting von LDL in die Lysosomen. Dies geht einher mit einer Translokation von Annexin 6 in prelysosomale Zellkompartimente. Da neuere Arbeiten auf einen Einfluss von Cholesterin bei der intrazellulären Lokalisation von Annexinen schließen lassen, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von LDL-Cholesterin auf die Lokalisation von Annexin 6 untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein experimentelles System etabliert, das Studien zur Lokalisation von Annexin 6 in Abhängigkeit unterschiedlicher Cholesterinkonzentrationen in endosomalen Kompartimenten erlaubt. Dazu wurde der Wirkstoff U18666A verwendet, welcher die Degradation von LDL und den Abtransport von LDL-Cholesterin aus Lysosomen inhibiert. Subzelluläre Fraktionierungen, Immunfluoreszenzmikroskopie und biochemische Analysen bestätigten eine drastische Cholesterinakkumulation in späten Endosomen von Kontroll- und Annexin 6 überexprimierenden CHO-Zellen. Während in unbehandelten Zellen das Annexin 6 vor allem im Cytosol, der Plasmamembran und in frühen Endosomen lokalisiert ist, kommt es nach U18666A-induzierter Cholesterinakkumulation zu einer Translokation von Annexin 6-Proteinen in späte Endosomen. Westernblot-Analysen endosomaler Membranfraktionen bestätigten diese Ergebnisse. *In vitro* Bindungsstudien von frühen und späten Endosomen (+/- Cholesterin) und rekombinanten Annexin 6 zeigen ebenfalls eine erhöhte Membranbindung von rekombinantem Annexin 6 vor allem an cholesterinreiche späte Endosomen. Im Gegensatz reduziert der Cholesterin Entzug die Membranaffinität von Annexin 6. Studien mit einer C-terminal-Annexin 6-Deletionsmutante weisen darauf hin, dass die Cholesterin-sensitive Bindung von Annexin 6 über seinen N-terminalen Teil vermittelt wird.

Zusammenfassend deuten diese Experimente darauf hin, dass die Konzentration und Verteilung des zellulären Cholesterins die Lokalisation und Reorganisation Calcium-abhängiger und -unabhängiger Pools von Annexin 6 beeinflusst.

**A**

**Anderson, R. (1998)** The caveolar system *Annu. Rev Biochem.* 67: 199-225

**Argarves, K.M., Battey, F.D., MacCalman, C.D., McCrae, K.R., Gavfels, M., Kozarsky, K.F., Chappel, D.A., Strauss, J.F. 3<sup>rd</sup>, Strickland, D.K. (1995)** The very low density lipoprotein receptor mediates the cellular catabolism of lipoprotein lipase and urokinase-plasminogen activator inhibitor type 1 complex *J. Biol. Chem.* 270: 26550-26557

**Ayala-Sanmartin, J. (2001)** Cholesterol Enhances Phospholipid Binding and Aggregation of Annexins by Their Core Domain *Biochemical and Biophysical Research Communication* 283: 72-79

**Ayala-Sanmartin, J., Henry, J.-P., Pradel, L.-A. (2001)** Cholesterol regulates membrane binding and aggregation by annexin 2 at submicromolar Ca<sup>2+</sup> concentration *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes* 1510: 18-28

**B**

**Babitt, J., Trigatti, B., Rigotti, A., Smart, E.J., Anderson, R.G.W., Xu, S., Krieger, M. (1997)** Murine SR-B1, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae *J. Biol. Chem.* 272: 13242-13249

**Babiychuk, E.B., Draeger, A. (2000)** Annexins in Cell Membrane Dynamics: Ca<sup>2+</sup>-regulated Association of Lipid Microdomains *J. Cell Biol.* 150: 1113-1123

**Babiychuk, E.B., Palstra, R.J., Schaller, J., Kämpfer, U., Draeger, A. (1999)** Annexin VI Participates in the Formation of a Reversible, Membrane-Cytoskeleton Complex in Smooth Muscle Cells *J. Biol. Chem.* 274: 35191-35195

**Barter, P. J. and Rye, K. A. (1996)** Molecular mechanisms of reverse cholesterol transport. *Curr. Opin Lipid.* 7: 82-87.

**Bean, A.J., Scheller, R.H. (1997)** Better Late Than Never: A Role For Rab Late in Endocytosis *Neuron* 16: 751-754

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

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

**Benmerah, A., Bayrou, M., Cerf- Bensussan, N., Dautry-Varsat, A. (1999)** Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant *J.Cell Sci.* 112: 1303-1311

**Benmerah, A., Gagnon, J., Begue, B., Megarbane, B., Dautry-Varsat, A., Cerf- Bensussan, N. (1995)** The tyrosine kinase substrate eps15 is constitutively associated with the plasma membrane adaptor AP-2 *J. Cell.Biol.* 131:1831-1838

**Benz, J., Bergner, A., Hofman, A., Demange, P., Göttig, P., Liemann, S., Huber, R., Voges, D. (1996)** *J. Mol. Biol.* 260: 638-643

**Blackwood, R.A., Ernst, J.D. (1990)** Characterisation of Ca<sup>2+</sup>- dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins *Biochem. J.* 266: 195-200

**Brewer, H. B. (1997)** Decreased reverse cholesterol transport from Tangier disease fibroblasts. Acceptor specificity and effect of brefeldin on lipid efflux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1813-1821.

**Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1979)** Receptor mediated endocytosis: Insights from the lipoprotein receptor system *Proc.Natl.Acad.Sci.* 76, No.7, 3330-3337

**Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1983)** Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implication for cholesterol deposition in atherosclerosis *Annu. Rev.Biochem.* 52: 223-261

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

**Burger, A., Berendes, R., Liemann, S., Benz, J., Hofmann, A., Göttig, P., Huber, R., Gerke, V., Thiel, C., Römisch, J., Weber, K. (1996)** *J. Mol. Biol.* 257: 839-847

## **C**

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

**Chavrier, P., Parton, R.G., Hauri, H.P., Simons, K., Zerial, M. (1990)** Localisation of low molecular weight GTP binding proteins to exocytotic and endocytotic compartments *Cell* 62: 317-329

**Chen, W.J., Goldstein, J.L., Brown, M.S. (1990)** NPXY, a sequence often found in cytoplasmatic tails, is required for coated-mediated internalisation of the low density lipoprotein receptor *J. Biol. Chem.* 265: 3116-3123

- Conelly, M. A., Klein, S. M., Azhar, S., Abumrad, M. A. and Williams, D. L. (1999)** Comparison of scavenger receptor CD36 and scavenger receptor B1 (SR-B1) shows that both receptors mediate high density lipoprotein cholesteryl ester selective uptake but SR-B1 exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake. *J. Biol. Chem.* 274: 41-47
- Creutz, C.E., Zaks, W.J., Hamman, H.C., Crane, S., Martin, W.H., Gould, K.L., Oddie, K.M., Parsons, S.J. (1987)** Identification of chromaffin granule-binding proteins. Relationship of the chromobindins to calelectrin, synhibin, and the tyrosine kinase substrates p35 and p36 *J. Biol. Chem.* 262: 1860-1868
- Christoforidis, S., McBride, H.M., Burgoyne, R.D., Zerial, M. (1999)** The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking *Nature* 397: 621-625
- Crumpton, M.J., Dedman, J.R. (1990)** Protein terminology tangle *nature* 345: 212
- Cruz, J.C., Sugii, S., Yu, C., Chang, T.Y. (2000)** Role of Niemann-Pick type C1 protein in intracellular trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol *J. Biol. Chem.* 275: 4013-4021
- Cuervo, A., Gomes, A., Barnes, J., Dice, F. (1996)** Selective Degradation of Annexins by Chaperone - mediated Autophagy *Science* 273: 501-503
- D**
- Darsow, T., Rieder, S.E. Emr, S.D. (1997)** A multispecificity syntaxin homologue, Vamp3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole *J. Cell Biol.* 138: 517-529
- Dautry-Varsat, A., Chiechanover, A., Lodish, H.F. (1983)** PH and the recycling of transferrin during receptor mediated endocytosis *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 80: 2258-2262
- De Diego, I., Schwartz, F., Siegfried, H., Dauterstedt, P., Grewal, Th. et al (2002)** Cholesterol Modulates Membrane Binding and Intracellular Distribution of Annexin 6 *Journal Biol. Chem.* 277: 32187- 32194
- DeGrella, R.F., Simoni, R.D. (1982)** Intracellular transport of cholesterol to the plasma membrane *J. Biol. Chem.* 257: 1425
- de-la-Fuente, M., Parra, A.V. (1995)** Vesicle Aggregation by Annexin I : Role of a Secondary Membrane Binding Site *Biochemistry* 34: 10393-10399

**Desjardins, M., Celis, J.E., Van, M.G., Dieplinger, H., Jahraus, A., Griffith, G., Huber, L.A. (1994)** Molecular characterization of phagosomes *J. Biol. Chem* 269: 32194-32200

**Diakonova, M., Gerke, V., Ernst, J., Liautard, J-P., Van Der Vusse, G., Griffith, G. (1997)** Localisation of five annexins in J744 macrophages on isolated phagosomes *J. Cell Sci.* 110: 1199-1213

**Dice, J.F. (1990)** Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis *Trends Biochem.Sci.* 15: 305-309,1990

**Di Fiore, P.P., Pelicci, P.G., Sorkin, A. (1997)** EH:a novel protein-protein interaction domain potentially involved in intracellular sorting, *Trends Biochem. Sci.* 22: 411-413

**Dipaola, M. and Maxfield, F. R. (1984).** Conformational changes in the receptors for epidermal growth factor and asialoglycoproteins induced by the mildly acidic pH found in endocytic vesicles. *J. Biol. Chem.* 259: 9163-9171

**Drust, D.S., Creutz, C.E. (1988)** Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium *Nature (London)* 331: 88-91

**Du, E.Z., Wang, S.L., Kayden, H.J., Sokol, R., Curtiss, L.K., Dacis, R.A. (1993)** Translocation of apolipoprotein B across the endoplasmic reticulum is blocked in abetalipoproteinaemia *J. Lip. Res.* 37: 1309-1315

**Dupree, P., Parton, R.G., Raposo, G., Kurzchalia, T.V., Simons, K. (1993)** Caveolae and sorting in the *trans*-Golgi network of epithelial cells *EMBO J.* 12: 1597-1605

## **E**

**von Eckardstein, A., Nofer, N. R. and Assmann, G. (2001)** High density lipoproteins and Arteriosclerosis. Role of Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 13-27

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

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

**Ernst, J. (1991)** Annexin III translocates to the periphagosomal region when neutrophils ingest opsonized yeast *J. Immunology* 146: 3110-3114

## **E**

**Fava, R.A., Nanney, L.B., Wilson, D., King, L.J. (1993)** Annexin 1 Localisation in human skin possible associated with cytoskeletal elements in Keratinocyten of the stratum spinosum *J. Invest. Dermatol.* 101:732-737

**Favierperron, B., Lewit-Bentley, A., Russo-Marie, F. (1995)** The High resolution Crystal Structure of Human Annexin III Shows Subtle Differences with Annexin V *Biochemistry* 35: 1740-1744

**Feng, Y., Press, B., Wandinger-Ness, A. (1995)** Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic *J. Cell Biol.* 131: 1435-1452

**Ferro-Novick, S., Novick, P. (1993)** The Role of GTP Binding Proteins in Transport along the Exocytic Pathway *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 575-599

**Fielding, P. E. and Fielding, C. J. (1995)** Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry* 34: 14288-14292.

**Fielding, C. J., Bist, A. and Fielding, P. E. (1997)** Caveolin mRNA levels are upregulated by free cholesterol and downregulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3753-3758

**Fielding, C. J., Fielding, P. E. (2000).** Review. Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochim. Biophys. Acta* 1529: 210-222.

**Fitzgerald, M.L., Mendez, A.J., Moore, K.J., Andersson, L.P., Panjeton, H.A., Freeman, M.W. (2001)** ATP-binding Cassette Transporter A1 Contains an NH<sub>2</sub>-terminal Signal Anchor Sequence That Translocates the Protein's First Hydrophilic Domain to the Exoplasmic Space *J. Biol. Chem.* 276: 15137-15145

**Francis, G. A., Knopp, R. H., Oram, J. F. (1995)** Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease. *J. Clin. Invest.* 96: 78-87.

**Fitzgerald, M.L., Mendez, A. J., Moore, K.J., Andersson, L.P., Panjeton, H.A., Freeman M.W. (2001)** ATP-binding Cassette Transporter A1 Contains an NH<sub>2</sub>-terminal Signal Anchor Sequence That Translocates the Protein's First Hydrophilic Domain to the Exoplasmic Space *J. Biol. Chem.* 276: 15137-15145

**Frolov, A.A., Woodford, J.K., Murphy, E.J., Billheimer, J.T., Schroeder, F. (1996)** Fibroblast membrane sterol kinetic domains: Modulation by sterol carrier protein 2 and liver fatty acid binding protein *J. Lipid Res.* 37: 1862-1874

- Frolov, A., Woodford, J.K., Murphy, E.J., Billheimer, J.T., Schroeder, F. (1996)** Spontaneous and protein-mediated sterol transfer between intracellular membranes *J. Biol. Chem.* 271: 16075-16083
- Frykman, P.K., Brown, M.S., Yamamoto, T., Goldstein, J.L., Herz, J. (1995)** Normal Plasma lipoproteins and fertility in gene-targeted mice homozygous for a disruption in the gene encoding the very low density lipoprotein receptor *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8453-8457
- Futter, C.E., Felder, S., Schlessinger, J., Ullrich, A., Hopkins, C.R. (1993)** Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor *J. Cell Biol.* 120: 77-83
- G**
- Gafvels, M.E., Paavola, L.G., Boyd, C.O., Nolan, P.M., Wittmaack, F., Chawla, A., Lazar, M.A., Bucan, M., Angelin, B.O., Strauss, J.F. (1993)** Cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding the murine homologue of the very low density lipoprotein / apoprotein E receptor: expression pattern and assignment of the gene to mouse chromosome 19 (published erratum appears in *Endocrinology* 1995, Feb: 136(2): 795) *Endocrinology* 135: 387-394
- Gallegos, A.M., Atshaves, B.P., Storey, S., McIntosh, A.L., Petrescu, A., Schroeder, F. (1996)** manuscript submitted for publication *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*: 213: 150- 177
- Gallegos, A.M., Schoer, J., Starodub, O., Kier, A.B., Billheimer, J.T., Schroeder, F. (2000)** A potential role for sterol carrier protein-2 in cholesterol transfer to mitochondria *Chem. Phys. Lipids* 105: 9-29
- Garver, W., Hsu, S.-C., Erickson, R.P., Greer, W.L., Byers, D.M., Heidenreich, R.A. (1997)** Increased expression of caveolin-1 in heterozygous Niemann-Pick type II human fibroblasts *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 236 : 189-193
- Garver, W., Erickson, R.P., Wilson, J.M., Colton, T.L., Hossain, G.S., Kozloski, M.A., Heidenreich, R.A. (1997)** Altered expression of caveolin-1 and increased cholesterol in detergent insoluble membrane fractions from liver in mice with Niemann-Pick disease type C *Biochim. Biophys. Acta* 1361: 272-280
- Geuze, H.J., Slot, J.W., Strous, G.J.A.M., Lodish, H.F., Schwartz, A.L. (1983)** Intracellular site of asialoglycoprotein receptor uncoupling: double immunoelectron microscopy during receptor mediated endocytosis. *Cell*: 32: 277-287
- Gerke, V. (1992)** in S.E. Moss(Ed) *The Annexins* Portland Press, London: 47-59

- Gerke, V., Weber, K. (1984)** Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin *EMBO J.*3: 227-233
- Gerrard, S.R., Levi, B.P., Stevens, T.H. (2000)** Pep12p is a multifunctional yeast syntaxin that controls entry of biosynthetic, endocytic and retrograde traffic into the prevacuolar compartment *Traffic* 1: 259-269
- Gerrard, S.R., Bryant, N.J., Stevens, T.H. (2000)** VPS21 controls entry of endocytosed and biosynthetic proteins into the yeast prevacuolar compartment *Mol.Biol.Cell* 11: 613-626
- Gilmanshin, R., Creutz, C.E., Tamm, L.K. (1994)** Annexin IV reduces the rate of lateral lipid diffusion and changes the fluid phase structure of the lipid bilayer when it binds to negatively charged membranes in the presence of calcium *Biochemistry* 33: 8225-8232
- Ginsberg, H.N. (1997)** Role of lipid synthesis, chaperone proteins and proteosomes in the assembly of apoprotein B containing liposomes from cultured liver cells *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 24: A29-A32
- Golczak, M., Kirilenko, A., Bandorowicz-Pikula, J., Pikula, S. (2001)** Conformational states of annexin VI in solution induced by acidic pH *FEBS Lett.* 496: 49-54
- Golczak, M., Kicinska, A., Bandorowicz-Pikula, J., Buchet, R., Szewczyk, A., Pikula, S. (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: 1083-1085
- Goldstein, J.L., Brown, M.S. (1989)** *The Metabolic Basis of Inherited Disease Vol.6* (eds. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S, Valle, D.) 1215-1250, McGraw Hill, New York
- Goldstein, J.L., Brown, M.S. (1990)** Regulation of the mevalonate pathway *Nature* 343: 425-428
- Gorvel, J.-P., Chavrier, P., Zerial, M., Gruenberg, J. (1991)** Rab5 controls early endosome fusion *in vitro J. Cell Biol.* 64: 915-924

**Gould, K.L., Cooper, J.A., Hunter, T. (1984)** The 46,000-dalton tyrosine protein kinase substrate is widespread, whereas the 36,000-dalton substrate is only expressed at high levels in certain rodent tissues *J. Cell Biol.* 98: 487-497

**Gray, A., Dull, T.J., Ullrich, A. (1983)** Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128.000-molecular weight protein precursor *Nature* 303: 722-725

**DeGrella, R.F., Simoni, R.D. (1982)** Intracellular transport of cholesterol to the plasma membrane *J. Biol. Chem.* 257: 1425

**Grewal, T., Heeren, J., Mewawala, D., Schnitgerhans, T., Wendt, D., Salomon, G., Enrich, C., Beisiegel, U., Jäckle, S. (2000)** Annexin VI Stimulates Endocytosis and Is Involved in the Trafficking of Low Density Lipoprotein to the Prelysosomal Compartment *J. Biol. Chem.* 275: 33806-33813

**Gruenberg, J., Griffith, G., Howell, K.E. (1989)** Characterisation of the early endosome and putative endosomal carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro *J. Cell Biol.* 108: 1301-1316

**Gruenberg, J. (2001)** The endocytic pathway: A mosaic of domains. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2: 721-730

**Gu, F., Gruenberg, J. (1999)** Biogenesis of transport intermediates in the endocytic pathway. *FEBS Letts.* 452: 61-66

## H

**Hamilton, R.L. (1994)** Apolipoprotein B containing plasma lipoproteins in health and disease *Trends Cardiovasc. Med* 4: 131-139

**Hamon, Y., Broccardo, C., Chambenoit, O., Luciani, M-F., Toti, F., Chaslin, S., Freyssinet, J.M., Devaux, P.F., McNeish, P.F., Marguet, D., Chimini, G. (2000)** ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine *Nat. Cell Biol.* 2: 399-406

**Handel, S.E., Rennison, M.E., Wilde, C.J., Burgoyne, R.D. (1991)** Annexin II (calpactin I) in the mouse mammary gland: immunolocalization by light- and electron microscopy *Cell Tissue Res* 264: 549-554

**Harder, T., Kellner, R., Parton, R.G., Gruenberg, J. (1997)** Specific Release of Membrane-bound Annexin II and Cortical Cytoskeletal Elements by Sequestration of Membrane Cholesterol *Mol. Biol. of the Cell* 8: 533-545

**Hazarika, P., Kaetzel, M.A., Sheldon, A., Karin, N.J., Fleischer, S., Nelson, T.E., Dedman, J.R. (1991)** Annexin VI is associated with calcium-sequestering organelles *J. Cell.Biochem.*46: 78-85

**Heegard, C.W., Simonsen, A.C., Oka, K., Kjoller, L., Christensen, A., Madsen, B., Ellgaard, L., Chan, L., Andreasen, P.A. (1995)** Very low density lipoprotein receptor binds and mediates endocytosis of urokinase-type plasminogen activator-type-1 plasminogen activator inhibitor complex *J. Biol. Chem.* 270: 20855-20861

**Herbst, J.J., Opresko, L.K., Walsh, B.J., Lauffenburger, D.A., Wiley, H.S. (1994)** Regulation of postendocytic trafficking of the epidermal growth factor receptor through endosomal retention *J. Biol.Chem.* 269: 12865-12873

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

**Herz, J., Kowal, R.C., Goldstein, J.L., Brown, M.S. (1990)** Proteolytic processing of the 600kD low density lipoprotein receptor related protein (LRP) occurs in a trans golgi compartment *.EMBO J.* 9: 1769-1776

**Higgins, J.L. (1988)** Evidence that during VLDL assembly in rat hepatocytes most of the triacylglycerol and phospholipid are packaged with apo-B in the Golgi complex *FEBS Lett.* 232: 405-408

**Higgins, M.E., Davies, J.P., Chen, F.W., Ioannou, Y.A.; 1999** Niemann Pick C1 is a late endosome – resident protein that transiently associates with lysosomes and the *trans* – Golgi network *Mol.Genet. Metab.*68 1-13

**Hinshaw, J.E., Schmid,S.L. (1995)** Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding *Nature* 374:c190-192

**Hinshaw, J. E. (2000)** Dynamin and its role in membrane fission. *Annu. Rev.Cell Dev. Biol.* 16: 483-51983

**Hobbs, H.H., Russel, D.W., Goldstein, J.S., Brown, M.S. (1990)**The LDL Receptor Locus and familiar hypercholesterolemia: Mutational analysis of a membrane protein *Annu. Rev Genet.* 24: 133-170

**D`Hondt, K., Heese-Peck, A., Riezman, H. (2000)** *Protein an Lipid Requirements for Endocytosis* *Annu.rev. Genet.* 34: 255-295

**Horiuchi, H., Lippe, R., McBride, H.M., Rubino, M., Woodmann, P., Stenmark, H., Rybin, V., Wilm, M., Ashman, K., Mann, M., Zerial, M. (1997)** A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function *Cell* 90: 1149-1159

**Hospattankar, A.V., Law, S.W., Lackner, K., Brewer, H.B. (1986)** Identification of a low density lipoprotein binding domains of human apolipoprotein B100: a proposed consensus LDL receptor-binding domain of apolipoprotein B *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 139: 1078-1085

**Huber, R., Schneider, M., Mayr, I., Römisch, J., Paques, E.-P. (1990)** The Calcium binding sites in human annexinV by crystal structure analysis at 2.0 Å resolution Implications for membrane binding and calcium channel activity *FEBS Lett.* 275: 15-21

## I/J

**Ioannou, Y. (2001)** Multidrug Permeases And Subcellular Cholesterol Transport *Nature rev. Mol. Cell Biol.* Vol 2 657-668

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

**Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., Moya, M. L., Phillips, M. C., Rothblat, G. H., Swaney, J. B. and Tall, A. R. (1997)** Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 272: 20982-20985

**Jian, B., de la Llera-Moya, M., Ji, Y., Wang, N., Phillips, M. C., Swaney, J. B., Tall, A. R. and Rothblat, G. H. (1998)** Scavenger receptor class B type 1 as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors. *J. Biol. Chem.* 273: 5599-5606.

**Johnson, W.J., Chacko, G.K., Phillips, M.C., Rothblat, G.H. (1990)** The efflux of lysosomal cholesterol from cells *Journal of Biol. Chem.:* 265:5546-5553

**Jost, M., Zeuschner, D., Seemann, J., Weber, K., Gerke, V. (1997)** Identification and characterisation of a novel type of annexin-membrane interaction: Ca<sup>2+</sup> is not required for the association of annexin II with early endosomes *J. Cell Sci.* 110: 221-228

**Junker, M., Creutz, C.E. (1994)** Ca(2+)-dependent binding of endonexin (annexin IV) to membranes: analysis of the effects of membrane lipid

composition and development of a predictive model for the binding interaction  
*Biochemistry* 33: 8930-8940

## **K**

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

**Kaetzel, M.A., Chan, H.C., Dubinsky, W.P., Dedman, J.R., Nelson, D.J. (1994)** A role for annexin IV in epithelial cell function. Inhibition of calcium-activated chloride conductance *J. Biol. Chem.* 269: 5297-5302

**Kaplan, M.R., Simoni, R.D. (1985)** Transport of cholesterol from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane et al *J. Cell Biol.* 101: 446-453

**Kawasaki, H., Avila-Sakar, A., Creutz, C.E., Kretsinger, R.H. (1996)** The crystal structure of annexin VI indicates relative rotation of the two lobes upon membrane binding *Biochim. Biophys. Acta* 1313: 277-282

**Kelly, R.B. (1999)** New twist for dynamin [news;comment] *Nat. Cell. Biol.* 1:E8-9

**Kendrick, J.S., Wilkinson, J., Cartwright, I.J., Lawrenz, S., Higgins, J.A. (1998)** Regulation of the assembly and secretion of very low density lipoproteins by the liver *Biol. Chem.* 379: 1033-1040

**Kirchhausen, T. (2000).** Clathrin. *Annu. Rev. Biochem* 6: 699-727

**Koletzko, v. Harnack;** Kinderheilkunde, 11. Auflage, S.173

**Kobayashi, T. (1998)** A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure/function *Nature* 392:193-197

**Kobayashi, T., Beuchat, M. H., Lindsay, M., Frias, S., Palmiter, R. D., Sakuraba, H., Parton, R. G., Gruenberg, J. (1999)** Late endosomal membranes rich in lysobiphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat. Cell Biol.* 1: 113-118

**König, J., Gerke, V. (2000)** Modes of annexin-membrane interactions analyzed by employing chimeric annexin proteins *Biochem. Et Biophys. Acta.* 1498: 174-180

**Kojima, K., Utsumi, H., Ogawa, H., Matsumoto, I (1994)** Highly polarized expression of carbohydrate-binding protein p33/41 (annexin IV) on the apical

plasma membrane of epithelial cells in renal proximal tubulus *FEBS Lett.* 342: 313-318

**Kojima, K., Newton, N.D., Weiss, H.J., Zhao, J., Sims, P.J., Wiedmer, T. (1994)** Production and characterization of transformed B-lymphocytes expressing the membrane defect of Scott syndrome *J.Clin. Invest.* 94: 2237-2244

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

**Kornfeld, S., Mellman, I. (1989)** The biogenesis of lysosomes *Annu. Rev. Cell Biol.* 5: 483-525

**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, 523-558

## L

**Lange, Y., Ye, J., Rigney, M., Steck, T. (2000)** Cholesterol movement in Niemann-Pick type C cells and in cells treated with amphiphiles *J. Biol. Chem.* 275: 17468-17475

**Lawn, R.M., Wade, D.P., Garvin, M.R., Wang, X., Schwartz, K., Porter, J.G., Seilhamer, J.J., Vaughan, A.M., Oram, J.F. (1999)** The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway *J. Clin. Invest.* 104: R25-R31

**Li, G., Stahl, P.D. (1993)** Structure-function relationship of the small GTPase rab5 *J.Biol.Chem.* 268: 24475-24480

**Lin, H.C., Suedhoff, T.C., Anderson, R.G.W. (1992)** Annexin 6 is required for budding of clathrin coated pits *Cell* 70: 283-291

**Liscum, L., Faust, J.R. (1989)** The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one. *J. Biol. Chem.* 264:11796-11806

**Liu, P., Zhang, M., Dwyer, N.K., Christenson, L.K., Fujimoto, T. et al (2002)** MLN64 Mediates Mobilization of Lysosomal Cholesterol to Stereogenic Mitochondria *J.Biol. Chem.* 277: 33300-33310

**Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951)** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 165-175

**Luecke, H., Chang, B.T., Mailliard, W.S., Schlaepfer, D.D. Haigler, H.T. (1995)** Crystal structure of the annexin XII hexamer and implications for bilayer insertion *nature (london)* 378: 512-515

**Lundgren, S., Carling, T., Hjaelm, G., Juhlin, C., Rastad, J., Pihlgren, U., Rask, L. (1997)** Tissue distribution of gp330/megalyn, a putative Ca<sup>2+</sup>-sensing protein *J.Histochem. Cytochem.* 45: 338-392

**Lupashin, V.V., Waters, M.G. (1997)** t-SNARE activation through transient interaction with a rab-like guanosine triphosphatase *Science* 276: 1255-1258

## **M**

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

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

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

**Mayer, A., Wickner, W. (1997)** Docking of Yeast Vacuoles Is Catalyzed by the Ras-like GTPase Ypt7p after Symmetric Priming by Sec18p (NSF) *J. Cell Biol.* 136: 307-317

**Maxfield, F.R., Yamashiro, D.J. (1987)** Endosome acidification and the pathway of receptor mediated endocytosis *Adv.Exp.Med.Biol.* 225: 189-198

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

**Mayran, N., Parton, R.G., Gruenberg, J. (2003)** Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells *EMBO Journal* 22: 3242-3253

**Mendez, A.J., Lin, G., Wade, D.P., Lawn, R.M., Oram, J.F. (2001)** Membrane lipid domains distinct from cholesterol / sphingomyelin-rich rafts are involved in the ABCA-1 mediated secretory pathway *J.Biol. Chem.* 276: 3158-3166

- Meresse, S., Gorvel, J.-P., Chavrier, P. (1995)** The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes *J. Cell Sci.* 108 : 3349-3358
- Michaely, P., Kamal, A., Anderson, R. G. W. and Bennett, V. (1999)** A requirement for ankyrin binding to clathrin during coated pit budding. *J. Biol. Chem.* 27: 35908-35913
- Mikhailenko, I., Krylov, D., Argraves, K.M., Roberts, D.D., Liao, G., Strickland, D.K. (1997)** Cellular internalization and degradation of thrombospondin-1 is mediated by the amino terminal heparin binding domain (HBD). High affinity interaction of dimeric HBD with the low density lipoprotein receptor related protein *J. Biol. Chem.* 272: 6784-6791
- Montaville, P., Neumann, J.-M., Russo-Marie, F., Ochsenbein, F., Sanson, A. (2002)** A New Consensus Sequence for Phosphatidylserine Recognition by Annexins *J. Biol. Chem.* 277: 24684 – 24693
- Mukherjee, S., Ghosh, R.N., Maxfield, F.R. (1997)** Endocytosis *Physiol. Rev.* 77:759-803
- Mukherjee, S., Maxfield, F. R. (2000)** Role of membrane organization and membrane domains in endocytic lipid trafficking. *Traffic* 1: 203-211
- Murata, M. Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T.V., Simons, K. (1995)** VIP21/Caveolin is a cholesterol-binding protein *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10339-10343
- N**
- Nakata, T., Sobue, K., Hirokawa, N. (1990)** Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry *J. Cell Biol.* 110: 13-25
- Naureckiene, S., Sleat, D., Lackland, H., Fensom, A., Vanier, M., Wattiaux, R., Jadot, M., Lobel, P. (2000)** Identification of *HE1* as a second gene of Niemann – Pick disease *Science* 290: 2298-2301
- McNiven, M.A. (1998)** Dynamin: a molecular motor with pinchose action *Cell* 94: 151-154
- Nelson, N. (1987)** The vacuolar proton ATP-ase of eucaryotic cells *Bioessays* 7: 251-254
- Neufeld, E.B., Cooney, A.M., Pitha, J., Dawidowicz, E.A., Dwyer, N.K., Pentchev, P.G., Blanchette-Mackie, E.J. (1996)** Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *J. Biol. Chem.* 271: 21604-21613

**Neufeld, E.B. (1998)** What the Niemann-Pick C gene has taught us about cholesterol transport. In Chang TY, Freeman D.A. Eds. *Intracellular Cholesterol Trafficking Kluwer Acad. Publishers Boston: pp93-121*

**Neufeld, E.B., Wastney, M., Patel, S., Suresh, S., Cooney, A.M., Dwyer, N.K., Roff, C.F. et al 1999** The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of a multiple lysosomal cargo *J. Biol. Chem. 274: 9627-9635*

**Neufeld, E.B., Remaley, A.T., Demosky, S.J., Stonik, J.A., Cooney, A.M., Comly, M., Dwyer, N.K., Zhang, M., Mackie, J.-B., Santamarina-Fojo, S., Brewer, H.B. Jr. (2001)** Cellular Localization and Trafficking of the Human ABCA1Transporter *J. Biol. Chem. 276: 27584-27590*

**Niemeier, A., Gavfels, M., Heeren, J., Meyer, N., Angelin, B., Beisiegel, U. (1996)** Very low density lipoprotein receptor mediates the uptake of human chylomikrons in vitro *J. Lipid Res. 37: 1733-1742*

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

## O

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

**Oram, J.F. (2000)** Tangier disease and ABCA1 *Biochim. Et Biophys. Acta 321-330*

**Ortega, D., Pol, A., Biermer, M., Jackle, S., Enrich, C. (1998)** Annexin VI defines an apical endocytic compartment in rat liver hepatocytes *Journal of Cell Science, Vol 111, Issue 2 261-269*

**Orso, E., Broccardo, C., Kaminski, W.E., Bottcher, A., Liebisch, G., Drobnik, W., Gotz, A., Chambenoit, O., Diedrich, W., Langmann, T., Spruss, T., Luciani, M-F., Rothe, G., Lackner, K.J., Chimini, G., Schmitz (2000)** Transport of lipids from Golgi to plasma membrane is defective in Tangier disease patients and *Abc1*-deficient mice *Nat. Genet. 24: 192-196*

**Owens, R.J., Crumpton, M.J. (1984)** Isolation and characterization of a novel 68,000-Mr Ca<sup>2+</sup>-binding protein of lymphocyte plasma membrane *Biochem.J.219: 309-316*

**P**

**Patterson, M. (2001)** in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 3611-3634 Mc Graw –Hill New York

**Pfeifer, S.M. Furth, E.E., Ohba, T., Chang, Y.L., Rennert, H., Sakuragi, N., Billheimer, J.T., Strauss, J.F.I. (1993)** Sterol carrier protein 2: A role in steroid hormone synthesis? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 47: 167-172

**Pons, M., Ihrke, G., Koch, S., Biermer, M., Pol, A., Grewal, T., Jäckle, S., Enrich, C. (2000)** Late Endocytic Compartments Are Major Sites of Annexin VI Localization in NRK Fibroblasts and Polarized WIF-B Hepatoma Cells *Experimental Cell Research* 257:33-47

**Presley, J.F., Mayor, S., Dunn, K.W., Johnson, L.S., McGraw, T.E., Maxfield, F.R. (1993)** The End2 mutation in CHO cells slows the rate of transferrin receptors from the recycling compartment but bulk membrane recycling is unaffected *J. Cell Biol.* 122: 1231-1241

**R**

**Raynal, P., Pollard, H.B. (1994)** Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins *Biochem. Biophys. Acta* 1197: 63-93

**Remaley, A. T., Schumacher, U. K., Stonik, J. A., Farsi, B. D., Narzih, H., Brewer, H. B. (1997)** Decreased reverse cholesterol transport from Tangier disease fibroblasts. Acceptor specificity and effect of brefeldin on lipid efflux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1813-1821.

**Remaley, A.T., Stonik, J.A., Demosky, S.J., Neufeld, E.B., Bocharov, A.V., Vishnyakova, T.G., Eggerman, T.L., Patterson, A.P., Duverger, N.J., Santamarina-Fojo, S, Brewer, H.B. jun. (2001)** Apolipoprotein Specificity for Lipid Efflux by the Human ABCA1 Transporter *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 280: 818-823

**Rogler, G., Trümbach, B., Klima, B., Lackner, K. J., Schmitz, G. (1995)** HDL-mediated efflux of intracellular cholesterol is impaired in fibroblasts from Tangier disease patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 683-690.

**Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., Anderson, R.G. (1992)** Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats *Cell* 68: 673-682

**Rothman, J.E., Smid, S.L. (1986)** Enzymatic recycling of Clathrin from coated vesicles. *Cell* 46: 5-9

**Rothman, J.E., Söllner, T. (1994)** A rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in the docking of transport vesicles *Cell* 78: 937-948

**Rothman, J.E., Söllner, T.H. (1997)** Throttles and Dampers: Controlling the Engine of Membrane Fusion *Science* 276: 1212-1213

**Rubinstein, A., Bibson, J.C., Paterniti, J.R.J., Kakis, G., Little, A., Ginsberg, H.N., Brown, W.V. (1985)** Effect of heparin-induced lipolysis on the distribution of apolipoprotein E among lipoprotein subclasses. Studies with patients deficient in hepatic triglycerid lipase and lipoprotein lipase *J. Clin. Invest.* 75: 710-721

**Rubino, M., Miaczynska, M., Lippe, R., Zerial, M. (2000)** Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin coated vesicles to early endosomes *J.Biol.Chem.* 275: 3745-3748

**Russel, D.W., Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1989)** Different combinations of cysteine rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins *J. Biol. Chem.* 264: 21682-21690

## **S**

**Saito, A., Pietromonaco, A., Loo, K., Farquhar, M.G. (1994)** Complete cloning and sequencing of "gp330/megalin", a distinctive member of the low-density lipoprotein receptor gene family *Proc.Nat.Acad.Sci. USA:91:* 9725-9729

**Sakai, J., Hoshino, A., Takahashi, S., Miura, Y., Ishii, H., Suzuki, H., Kawarabayasi, Y., Yamamoto, T. (1994)** Structure, chromosome location and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene *J. Biol. Chem.* 269: 2173-2182

**Schimmöller, F., Simon, I., Pfeffer, S.R. (1998)** Rab GTPases, Directors of Vesicle Docking (minireview) *J. Biol. Chem.* 273: 22161-22164

**Schmid, S. L., McNiven, M. A., De Camilli, P. (1998)** Dynamin and its partners: a progress report. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 504-512.

**Schroeder, F., Frolov, A., Schoer, J., Gallegos, A., Atshaves, B.P., Stolowitch, N.J., Scott, A.I., Kier, A.B. (1998)** Intracellular Cholesterol binding proteins, cholesterol transport and membrane domains. In Chang TY, Freeman D.A. Eds. *Intracellular Cholesterol Trafficking Kluwer Acad. Publishers Boston:* pp 213-234

- Schroeder, F., Gallegos, A.M., Atshaves, B., Storey, S., McIntosh, A.L., Petrescu, A.D., Huang, H., Starodub, O., Chao, H., Yang, H., Frolov, A., Kier, A.B. (2001)** Recent Advances in Membrane Microdomains: Rafts, Caveolae, and Intracellular Cholesterol Trafficking (Minireview) *Exper. Biol. And Med.* 226: 873-890
- Seemann, J., Weber, K., Osborn, M., Parton, R.G., Gerke, V. (1996)** The association of annexin I with early endosomes is regulated by Ca<sup>2+</sup> and requires an intact N-terminal domain *Mol. Biol Cell* 7: 1359-1374
- Senda, T., Okabe, T., Matsuda, M., Fujita, H. (1994)** Quick-freeze, deep-etch visualization of exocytosis in anterior pituitary secretory cells: localization and possible roles of actin and annexin II *Cell Tiss. Res.* 277: 51-60
- Sever, S., Muhlberg, A.B., Schmid, S.L. (1999)** Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis *Nature* 398: 481-486
- Sharp, D., Blinderman, L., Combs, K.A., Kienzle, B., Ricci, B., Wagner-Smith, K., Gil, C.M., Turck, C.W., Bouman, M.E., Rader, D.J., Aggerbeck, L.P., Gregg, R.A., Gordon, D.A., Wetterau, J.R. (1993)** Cloning and gene defects in microsomal transfer protein associated with abetalipoproteinaemia *Nature* 365: 65-69
- Simons, K., Ikonen, E. (1997)** Functional rafts in cell membranes *Nature* 387: 569- 572
- Singer- Kruger, B., Stenmark, H., Dusterhoft, A., Philippsen, P., Yoo, J.S. et al (1994)** Role of three rab5-like GTPases Ypt51p, Ypt52p, Ypt53p, in the endocytic and vacuolar protein sorting pathways of yeast *J. Cell Biol.* 125: 283-298
- Singer- Kruger, B., Stenmark, H., Zerial, M. (1995)** Yeast Ypt51p and mammalian Rab5: counterparts with similar function in the early endocytic pathway *J. Cell Sci.* 108: 821-824
- Van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Male, P., Goud, B., Mellmann, I. (1992)** The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway *Cell* 70: 729-740
- Smart, E.J., van der Westhuyzen D.R. (1998)** Scavenger receptors, caveolae, caveolin, and cholesterol trafficking In Chang TY, Freeman DA, Eds. Intracellular Cholesterol Trafficking, *Kluwer Academic Publishers, Boston pp* 253-272

**Smart, E.J., Ying, Y., Donzell, W.C., Anderson, R.G.W. (1996)** A Role for Caveolin in Transport of Cholesterol from Endoplasmic Reticulum to Plasmamembran *J. Biol. Chem.* 271: 29427-29435

**Smythe, E., Smith, P.D., Jacob, S.M., Theobald, J., Moss, S.E. (1994)** Endocytosis Occurs Independently of Annexin VI in Human A431 Cells *J. Cell Biol.* 124: 301-306

**Stenmark, H., Parton, R.G., Steele-Mortimer, O., Lutcke, A., Gruenberg, J., Zerial, M. (1994)** Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis *EMBO J.* 13: 1287-1296

**Stowell, M.H., Marks, B., Wigge, P., McMahon, H.T. (1999)** Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring *Nat. Cell. Biol.* 1: 27-32

## **I**

**Tagoe, C.E., Boustead, C.M., Higgins, S.J., Walker, J.H. (1994)** Characterization and immunolocalization of rat liver annexin VI *Biochim. Biophys. Acta* 1192: 272-280

**Takahashi, S., Kawarabayasi, Y., Nakai, T., Sakai, J., Yamamoto, T. (1992)** Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor like protein with distinct ligand specificity *Proc. Natl. Sci. USA* 89: 9252-9256

**Takahashi, S., Suzuki, J., Kohno, M., Oida, K., Tamai, T., Miyabo, S., Yamamoto, T., Nakai, T. (1995)** Enhancement of the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the very low density lipoprotein receptor by apolipoprotein E and lipoprotein lipase *J. Biol. Chem.* 270: 15747-15754

**Thyberg, J., Calara, F., Dimayuga, P., Nilsson, J. and Regnstrom, J. (1998).** Role of caveolae in cholesterol transport in arterial smooth muscle cells exposed to lipoproteins in vivo and in vitro. *Lab. Invest.* 78: 825-837

**Trigatti, B., Rigotti, A., Krieger, M. (2000)** The role of high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 11: 123-132

**Torrisi, M.R., Lotti, L.V., Belleudi, F., Gradini, R., Salcini, A.E. et al (1999)** Eps15 is recruited to the plasma membrane upon epidermal growth factor receptor activation and localizes to components of the endocytic pathway during receptor internalization *Mol. Biol. Cell* 10: 417-434

**Turgeon, J.L., Cooper, R.H., Waring, D.W. (1991)** Membrane-specific association of annexin I and annexin II in anterior pituitary cells *Endocrinology* 128: 96-102

**Tagoe, C.E., Boustead, C.M., Higgins, S.J., Walker, J.H. (1994)** Characterization and immunolocalization of rat liver annexin VI *Biochim. Biophys. Acta* 1192: 272-280

## U

**Underwood, K.W., Jacobs, N.L., Howley, A., Liscum, L. (1998)** Evidence for a cholesterol transport pathway from lysosomes to endoplasmic reticulum that is independent of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 273: 4266-4274

**Ullrich, O., Horiuchi, C., Bucci, M., Zerial, M. (1994)** Membrane association of rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange *Nature* 368: 157-160

**Urbani, L., Simoni, R.D. (1990)** Cholesterol and vesicular stomatitis virus G protein take separate routes from the transport et al *J. Biol. Chem.* 265: 1919-1923

## V/W

**Vanier, M.T., Rodriguez-Lafrasse, C., Rousson, R., Gazzah, N., Juge, M.-C., Pentchev, P.G., Revol, A., Louisot, P. (1991)** Type C Niemann-Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing. *Biochim. Biophys. Acta* 1096: 328-337

**Vitelli, R., Santello, M., Lattero, D., Chiarello, M., Bifulco, M., Bruni, C.B., Bucci, C. (1997)** Role of the Small GTPase RAB7 in the Late Endocytic Pathway *J. Biol. Chem.* 272: 4391-4397

**Wang, N., Silver, D.L., Costet, D., Tall, A.R. (2000)** Specific Binding of ApoA-I, Enhanced Cholesterol Efflux, and Altered Plasma Membrane Morphology in Cells Expressing ABC1 *J. Biol. Chem.* 275: 33053-33058

**Wang, N., Silver, D.L., Thiele, C., Tall, A.R. (2001)** ABCA-1 functions as a cholesterol efflux regulatory protein *J. Biol. Chem.* 276: 23742-23747

**Weinmann, J.S., Feinberg, J.M., Rainteau, D.P., Gaspera, B.D., Weinmann, S.J. (1994)** Annexins in rat enterocytes and hepatocytes, an immunogold electron microscope study *Cell Tiss. Res.* 278: 389-397

**Weisgraber, K.H., Innerarity, T.L., Harder, K.J., Mahley, R.W., Milne, R.W., Marcel, Y.L., Sparrow, J.T. (1983)** The receptor binding domain of human apolipoprotein E *J. Biol. Chem.* 258: 12348-12351

**Weng, X., Luecke, H., Song, I.S., Kang, D.S., Kim., S.H., Huber, R. (1993)** Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution *Protein Sci.* 2: 448-458

**Wetterau, J.R., Aggerbeck, L.P., Bouma, M.E., Eisenberg, C., Munck, A., Hermier, M., Schmitz, J., Gay, G., Rader, D.J., Gregg, R.E. (1992)** Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinaemia *Science* 258: 999-1001

**Whyte, J.R.C., Munro, S. (2002)** Vesicle tethering complexes in membrane traffic *J. Cell Sci.* 115: 2627-2637

**Willnow, T., Hilpert, J., Armstrong, S.A., Rohlman, A., Hammer, R.E., Burns, D.K., Herz, J. (1996)** Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8460-8464

**Woodman, P. (1998)** Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution *Curr. Biol.* 8: R199-R201

### X/Y/Z

**Yamashiro und Maxfield, F.R. (1987)** Acidification of morphologically distinct endosomes in mutant and wild-type Chinese hamster ovary cells *J. Cell Biol.* 105: 2713-2721

**Yamashiro, D.J., Borden, L.A., Maxfield, F.R. (1989)** Kinetics of  $\alpha$ 2-macroglobulin endocytosis and degradation in mutant and wild-type Chinese hamster ovary cells *J. Cell Physiol.* 139: 377-382

**Yamamoto, T., Hoshino, S., Takahashi, Y., Kawarabayasi, Y., Iijima, H., Sakai, J. (1995)** The role of the very low density lipoprotein receptor in the metabolism of plasma lipoproteins containing ApoE *Ann. NY Acad. Sci.* 748: 217-224

**Yao, Z., Tran, K., McLeod, R.S. (1997)** Intracellular degradation of newly synthesised apolipoprotein B *J. Lipid research* 38: 1937-1953

**Zhu, Y., Liao, H. L., Wang, N. P., Yuan, X., Ma, K. S., Verna, T., Lisanti, M. P. and Stemerman, M. B. (1999)** Regulation of caveolin-1 by low density lipoprotein in human endothelial cells. *Circulation* 100: 694S

**Zerial, M. (1992)** The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway *Cell* 70: 715-728

**Zerial, M., McBride, H. (2001)** Rab proteins as membrane organizers *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2: 107-117

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Aufbau von Lipoproteinen am Beispiel LDL-Partikel.....	Seite 3
Abbildung 1.2: Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie.....	8
Abbildung 1.3: LDL-Regulation u. Cholesterin-Internalisierung mit Folgeregulationen.....	11
Abbildung 1.4: Endosomaler Transport intrazellulär.....	15
Abbildung 1.5: Struktureller Aufbau von Annexinen.....	25
Abbildung 3.1: Cholesterinkonzentration in CHO-WT Zellen (+/-) U18666A.....	57
Abbildung 3.2: Cholesterinkonzentration in CHO-WT Zellen (+/-) LDL.....	58
Abbildung 3.3: Cholesterinkonzentration in CHOanx6 Zellen (-) U18666A.....	59
Abbildung 3.4: Cholesterinkonzentration in CHOanx6 Zellen (+) U18666A.....	59
Abbildung 3.5: Cholesterinkonzentration in CHOanx6 Endosomen (+/-) U18666A	60
Abbildung 3.6: Immunfluoreszenz CHOanx6 Zellen (+/-) U18666A .....	62
Abbildung 3.7: Immunfluoreszenz NRK Zellen (+/-) U18666A.....	64
Abbildung 3.8: $\beta$ -Hexosaminidase Aktivitätsmessung in CHOanx6 Endosomen (+/-) U18666A.....	66
Abbildung 3.9: Phospholipid-/Cholesterinkorrelation in CHOanx6 Endosomen (+/-) U18666A.....	67
Abbildung 3.10: Annexin 6 Verteilung in CHOanx6 Endosomen (+/-) U18666A.....	69
Abbildung 3.11: Annexin 6 Verteilung in CHO-WT Endosomen (+/-) U18666A.....	71
Abbildung 3.12: Silberfärbung von GSTanx6, GST $\Delta$ 8-15, GSTanx6 <sub>1-175</sub> .....	73
Abbildung 3.13: Bindungsverhalten von GST, GSTanx6 an CHO-WT Membranen	73
Abbildung 3.14: Bindungseigenschaften von GST, GSTanx6 an Endosomen (+/-) LDL, (+) 250 $\mu$ M Calcium.....	75
Abbildung 3.15: Bindungseigenschaften von GST, GSTanx6 an Endosomen (+/-) LDL, (+) 50 $\mu$ M Calcium.....	77
Abbildung 3.16: LDL- und Calcium Einfluss auf Caveolin gesamt und Annexin 2...	79
Abbildung 3.17: Bindung von GSTanx6 und GSTanx6 <sub>1-175</sub> an CHO-WT PNS.....	80
Abbildung 3.18: Titration von CHO-WT PNS.....	81
Abbildung 3.19: Membranbindung von GSTanx6 und GSTanx6 <sub>1-175</sub> in Abhängigkeit von Cholesterin.....	82

Abbildung 3.20: Bindung von GSTanx6 <sub>1-175</sub> an CHO-WT frühe Endosomen (+/-) LDL.....	83
Abbildung 3.21: Bindung von GSTanx6 <sub>1-175</sub> an CHO-WT Endosomen (+/-) LDL....	84
Abbildung 3.22: Bindung von GSTanx6 <sub>1-175</sub> an CHO-WT Endosomen (+/-) U18666A.....	85
Abbildung 3.23: Bindungsverhalten von EDTA-resistentem endogenen Annexin 6	86
Abbildung 3.24: Verteilung von SRB1 in CHO-WT und CHOanx6 Zellmembranen	88
Abbildung 4. 1: Annexin 6 Lokalisationen in CHO-WT Zellen ohne LDL- Akkumulation.....	94
Abbildung 4. 2: Cholesterin- abhängige Annexin 6 Translokation.....	94

## 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Aa. – Acrylamid

Abb. – Abbildung

ABCA1 – ATP Binding Cassette Transportprotein Typ 1

ACAT – Acyl-CoA-Cholesterin- Acyltransferase

Anx – Annexin

AP – Ammoniumpersulfat

AP 1/2 – Adaptorprotein 1/2

Apo – Apolipoprotein

AS – Aminosäure

ATP – Adenosintriphosphat

BHK – baby hamster kidney

BMI – body mass index

CHO – Chinese Hamster Ovary

CHOanx6 – CHO Annexin 6 überexprimierende Zellen

CHO-WT – CHO-Wildtyp Zellen

CP – coated pits

CS – Coverslips

DC – Dünnschichtchromatographie

DMSO - Dimethylsulfoxid

EDTA – Ethylendiamintetraacetat

EE – early endosomes (frühe Endosomen)

EEA1 – early endosome antigen 1

EGF – epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)

EH – eps 15 Homologie

ER – endoplasmatisches Retikulum

F – Fraktion

g – Gramm

ges. – gesamt

GFP – Green Fluorescence Protein

GSTanx6 – Annexin 6 gekoppelt an das GST Fusionsprotein

GSTanx6<sub>1-175</sub> – Mutation von Annexin 6 gekoppelt an das GST Fusionsprotein

h – Stunden  
HDL – high density lipoproteins  
HMG-CoA- R /-S –  $\beta$ -Hydroxy-  $\beta$ - Methylglutaryl-CoA- Reduktase/ - Synthase  
HPLC – high performance liquidchromatography / Hochleistungschromatographie  
HRP – horseradish peroxidase  
IgG – Immunglobulin der Gruppe G  
IMF – Immunfluoreszenz  
kD – Kilodalton  
Konz. – Konzentration  
LDL – low density lipoproteins  
LDL-R – LDL-Rezeptor  
LE – late endosomes (späte Endosomen)  
LRP – LDL-Rezeptor related Protein  
Lys – Lysosomen  
mA – Milliampere  
MDCK – Madin-darby canine kidney  
ml – Milliliter  
mRNA – messenger Ribonucleinsäure  
MTP – Microsomales Triglycerid Transfer Protein  
MVB – multivesivular bodies (multivesikuläres Körperchen)  
MW – Molekulargewicht  
ng – Nanogramm  
nm – Nanometer  
NPC – Niemann Pick Typ C Protein  
NRK – normal rat kidney  
Ø – Durchmesser  
P – Pellet  
PBS – Phosphate Buffer Saline  
PFA – Paraformaldehyd  
PIC – Protease Inhibitor Cocktail  
P-Lipide / PL – Phospholipide  
PNS – perinucleärer Supernatant (Überstand)  
RabGDI – Rab 5 Dissoziations-Inhibitor  
RCT – reverser Cholesterintransport

RE – recycling endosomes (rezyclierende Endosomen)  
rpm – rounds per minute (Umdrehungen)  
RT – Raumtemperatur  
SCP – Sterol Carrier Protein  
SDS – Sodium Dodecylsulfat  
SE – sorting endosomes (sortierende Endosomen)  
sER – smooth endoplasmatic reticulum (glattes endoplasmatisches Retikulum)  
SNARE – soluble-NEM-sensitive factor (NSF) accessory protein receptors  
s.o. – siehe oben  
SRB1 – Scavenger Rezeptor Typ 1  
sre – Sterol reguliertes Element  
Temed – N,N,N,N- tetramethylethylendiamin  
TGN – Trans Golgi Netzwerk  
TRL – Triglyceridreiche Lipoproteine  
Ü – Überstand  
U18666A - 3-beta-(2-(diethylamino)ethoxy)androst-5-en-17-one  
vgl. – vergleiche  
VLDL – very low density lipoproteins  
VLDL-R – very low density lipoprotein receptor  
WB – Westernblot  
 $\alpha$  – anti  
 $\alpha$ LBPA – Lysobisphosphatidylsäure  
 $\mu$ m – Mikrometer  
 $\mu$ M – Mikromol

## **Veröffentlichungen**

**De Diego, I., Schwartz, F., Siegfried, H., Dauterstedt, P., Grewal, Th. et al (2002)**  
Cholesterol Modulates Membrane Binding and Intracellular Distribution of Annexin 6  
*Journal Biol. Chem.* 277: 32187- 32194

## **Danksagung**

Ich danke Frau Prof. Beisiegel für ihre Unterstützung, die sie mir im Vorfeld und während meiner Arbeit gab!!!

Vielen Dank an Thomas Grewal für seine exzellente Betreuung, die Unterstützung und den Spaß, den er mir am Forschen vermittelt hat!

Und natürlich einen großen Dank an meine Eltern, die immer an mich geglaubt haben und meine eigene kleine Familie, die in der Zeit der Doktorarbeit durch eine kleine Person bereichert wurde und noch enger zusammengewachsen ist !!!!!