

Tino Schnitgerhans:

Bedeutung von Annexin VI in der Rezeptor-vermittelten Endocytose von Lipoproteinen und funktionelle Charakterisierung von Annexin VI-Mutanten

Abstract

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