



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Aus dem Institut für Molekulare Zellbiologie des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

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

**Die Rolle des Annexin VI
in der rezeptorvermittelten Endozytose von Low Density Lipoproteinen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Axel Seehars

aus Hamburg

Hamburg, 2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 19. Februar 2004

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

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

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

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Priv.Do. Dr. R. Middendorff

**Gewidmet Nicole
für ihre Geduld und Liebe**

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2. Einleitung	2
2.1 Endozytoseprozesse	2
2.1.1 Klathrinabhängige rezeptorvermittelte Endozytose	2
2.1.1.1 Aufnahme von Rezeptor-Liganden-Komplexen in Coated Pits	2
2.1.1.2 Frühes und spätes endozytotisches Kompartiment	4
2.1.1.3 Sortiermechanismen	6
2.1.1.4 Regulatorproteine	7
2.1.2 Caveolae	8
2.1.3 Phagozytose und Pinozytose	10
2.1.4 Einfluss der Lipidzusammensetzung von Membranen auf die rezeptorvermittelte Endozytose	10
2.1.5 Die Rolle des Zytoskeletts bei der rezeptorvermittelten Endozytose	11
2.2 Metabolismus der Lipoproteine	12
2.2.1 Einteilung der Lipoproteine	12
2.2.2 Die LDL-Rezeptorfamilie	13
2.2.3 Stoffwechselwege der Lipoproteine	14
2.2.4 Intrazelluläre Wege der Lipoproteine	15
2.3 Die Annexine	15
2.3.1 Die Annexinproteinfamilie	16
2.3.1.1 Molekulare Strukturen der Annexine	16
2.3.1.2 Vorkommen und intrazelluläre Lokalisation	17
2.3.1.3 Biochemische Eigenschaften und Funktionen	17
2.3.2 Annexin VI	19
2.3.2.1 Molekularstruktur und Isoformen	19
2.3.2.2 Intrazelluläre Lokalisation und Gewebsverteilung	20
2.3.2.3 Biochemische Eigenschaften	20
2.3.2.4 Funktionen und assoziierte Proteine	21
2.4 Bedeutung der Endozytose bei verschiedenen Krankheitsprozessen	23

3. Material und Methoden	24
3.1 Material	24
3.1.1 Geräte	24
3.1.2 Verbrauchsmittel	25
3.1.3 Chemikalien	26
3.1.4 Zellkultur und Bakterien	28
3.1.5 Antikörper	30
3.1.6 Vektoren, Restriktionsendonukleasen und Oligonukleotide	31
3.1.7 Enzyme	32
3.2 Methoden	32
3.2.1 Klonierungen	32
3.2.2 Restriktionsverdau	34
3.2.3 Agarosegelelektrophorese	34
3.2.4 Transformation von Bakterien	34
3.2.5 DNA-Mini- und Maxipräparation	35
3.2.6 Zellkultur	36
3.2.7 Ausplattieren von Zellen	37
3.2.8 Einfrieren und Auftauen von Zellen	37
3.2.9 Transfektion	37
3.2.10 Herstellung einer stabilen Zelllinie	38
3.2.11 Proteinextraktion aus Zellen	38
3.2.12 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry	39
3.2.13 Auftrennung von Proteinen durch Natrium-Dodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
3.2.14 Coomassiefärbung von Proteingelen	41
3.2.15 Silberfärbung von Proteingelen	41
3.2.16 Western Blot	42
3.2.17 Induktionskinetik	42
3.2.18 Isolation von GST-Fusionsproteinen aus Bakterien	43
3.2.19 Bindungsversuche mit GST-Fusionsproteinen	44
3.2.20 Isolierung von humanen LDL	45
3.2.21 Radioaktive Markierung von LDL	45

3.2.22 Aufnahme von ^{125}I -LDL	46
3.2.23 Degradation von ^{125}I -LDL	46
4. Ergebnisse	48
<hr/>	
4.1 Nachweis der Überexpression von Annexin VI und einiger Annexin VI-Mutanten	48
4.2 Nachweis der dosisabhängigen Überexpression von Annexin VI im Western Blot	49
4.3 Aufnahme und Degradation von ^{125}I-LDL in Annexin VI-überexprimierenden Chinesischen Hamsterovarzellen (CHO)	51
4.3.1 Experimente mit CHO-Zellen mit transienter Annexin VI-Überexpression	52
4.3.1.1 Dosisabhängige Internalisation und Degradation von ^{125}I -LDL in Annexin VI-überexprimierenden Zellen	52
4.3.1.2 Relative Aufnahme- und Degradationssteigerung von ^{125}I -LDL in Annexin VI-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu nicht-überexprimierenden Zellen	54
4.3.1.3 Nachweis des LDL-Rezeptor-Expressionslevels in kotransfizierten Zellen	55
4.3.2 Experiment mit CHO-Zellen mit stabiler Annexin VI-Überexpression	56
4.3.2.1 Gesteigerte Aufnahme von ^{125}I -LDL im CHO-Annexin VI-Zellklon	56
4.4 Identifikation von Annexin-VI-bindenden Proteinen mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen	58
4.4.1 Klonierungen	58
4.4.2 Induktion von GST-Fusionsproteinen in transformierten <i>Escherichia coli</i>	59
4.4.2.1 Transformation von kompetenten JM109- <i>Escherichia coli</i> -Bakterien	59
4.4.2.2 Induktionskinetik mit GST-transformierten JM109- <i>Escherichia coli</i> -Bakterien	60

4.4.2.3 Induktionskinetik mit GST-Annexin VI-transformierten JM109-Escherichia coli-Bakterien	61
4.4.2.4 Induktionskinetik mit GST-Anexin VI, GST-del 8-15, GST-del 1-175	63
4.4.3 Isolation von GST-Fusionsproteinen	64
4.4.3.1 Aufreinigung der GST-Fusionsproteine am Beispiel des GST-del 1-175	65
4.4.3.2 Nachweis der GST-Fusionsproteine im Western Blot	66
4.4.3.3 Isolierte GST-Fusionsproteine und Proteinkonzentrationsabschätzung im Proteingel	67
4.4.4 Proteinbindungsversuche	67
4.4.4.1 Etablierung	68
4.4.4.2 Bindung von endogenem Annexin VI an GST-Fusionsproteine	69
4.4.4.3 Titration mit Proteinextrakten	70
4.4.4.4 Bindung von Spektrin an GST-Annexin VI	71
4.4.4.5 Bindung von Dynamin an GST-Annexin VI	72
4.4.4.6 Bindung von Caveolin an GST-Annexin VI	73
4.4.4.7 Thrombinverdau von GST-Fusionsproteinen	73
4.5 Herstellung einer stabilen Zelllinie	75
4.5.1 Nachweis der Überexpression der Caveolin-Mutante CAV3(DGV) im Western Blot	75
5. Diskussion	77
<hr/>	
5.1 Bedeutung des Annexin VI in der rezeptorvermittelten Endozytose	77
5.1.1 Dosisabhängige Stimulation der Aufnahme und Degradation von ¹²⁵ I-LDL durch Annexin VI	77
5.1.2 Bindung von Annexin VI an Dynamin	80
5.1.3 Interaktion von Annexin VI mit Spektrin	82
5.1.4 Assoziation von Caveolin mit Annexin VI	83
5.1.5 Funktion und Lokalisation des Annexin VI beim Endozytosevorgang	84
5.2 Ausblick	88

6. Zusammenfassung	89
7. Literaturverzeichnis	90
8. Anhang	103
8.1 Abkürzungsverzeichnis	103
8.2 Danksagung	105
8.3 Lebenslauf	106
8.4 Erklärung	107

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Trotz vieler Forschungsanstrengungen sind die genauen physiologischen Funktionen einer Gruppe von Ca^{2+} -bindenden Proteinen, den Annexinen, weitgehend unklar. Wegen ihrer Fähigkeit Phospholipide zu binden, wurden sie besonders hinsichtlich einer Aufgabe im intrazellulären Membranverkehr untersucht. Die Annexin VI-betreffenden Studien haben sich dabei bisher auf die Lokalisation, die biochemischen Eigenschaften und Bindungspartner konzentriert. Unter anderem wurde dem Protein eine potenzielle Aufgabe innerhalb der rezeptorvermittelten Endozytose zugewiesen. Relativ wenig Daten resultieren in diesem Zusammenhang aus funktionellen Analysen des zellulären Stoffwechsels, z.B. bei Expression einer Annexin VI-Mutante. In den letzten Jahren wurden allerdings vermehrt Hinweise gesammelt, dass das Annexin VI in der Internalisation von Low Density Lipoproteinen eine förderliche Rolle spielen könnte. Deshalb soll der Einfluss des Proteins auf die rezeptorvermittelte Endozytose an transient und stabil Annexin VI-überexprimierenden CHO-Zellen untersucht werden, die mit radioaktiv markiertem LDL inkubiert werden. Als Parameter für den Stoffwechsel dient dabei die Aufnahme und Degradation des LDL. Sollte sich ein stimulatorischer Effekt des Proteins auf die rezeptorvermittelte Endozytose herausstellen, so ergibt sich die Frage, auf welche Art und Weise es dieses bewerkstelligt. Da im intrazellulären Membranverkehr oftmals Proteine im Komplex oder zumindest enger Kooperation mit anderen Proteinen Aufgaben übernehmen, kann die Identifikation von Interaktionspartnern des Annexin VI Aufschluss über die tatsächliche Funktion des Proteins im zellulären Metabolismus geben. Aus diesem Grund soll ein Proteinbindungsverfahren etabliert werden, das auf GST-Annexin VI-Fusionsproteinen beruht, die mit Hilfe von Glutathion-Sepharose-beads gut separierbar und in Hinsicht auf gebundene Proteine leicht zu untersuchen sind.

2. Einleitung

Die Funktion des Annexin VI innerhalb der rezeptorvermittelten Endozytose sollte in dieser Arbeit anhand zweier in vitro-Modelle untersucht werden. Gegenstand der Forschung war einerseits der Einfluss des Proteins auf die rezeptorvermittelte Aufnahme von Low Density Lipoproteinen und andererseits die Identifikation von Proteinen, die bei derartigen Vorgängen mit dem Annexin VI interagieren. Im folgenden soll ein Überblick über die Mechanismen der Endozytose, die Lipoproteine und die Annexin-Familie gegeben werden.

2.1 Endozytoseprozesse

Unter dem Begriff Endozytose werden bei Säugetieren verschiedene Mechanismen der Aufnahme extrazellulärer Materialien in die Zelle zusammengefasst (Mukherjee et al., 1997). Phagozytose, Pinozytose, klathrinabhängige rezeptorvermittelte und Caveolae-vermittelte Endozytose stellen die wichtigsten Vertreter dar. Sie spielen eine bedeutende Rolle bei der Aufnahme von Nährstoffen, der Regulation der Expression von Zelloberflächenrezeptoren, der Cholesterinhomöostase und vielen anderen physiologischen Vorgängen. Auch Pathogene wie Viren oder Toxine benutzen Endozytosewege, um ins Zellinnere zu gelangen. Schließlich sind Fehlregulationen oder Defekte einzelner Komponenten von Endozytoseprozessen ursächlich beteiligt an Krankheiten wie Diabetes mellitus und Atherosklerose.

2.1.1 Klathrinabhängige rezeptorvermittelte Endozytose

Die klathrinabhängige rezeptorvermittelte Endozytose bewirkt die Aufnahme von Makromolekülen nach deren Bindung an zelloberflächenständige Rezeptoren in sogenannten Coated Pits (Schwartz et al., 1995). Der Ligand wird mit Hilfe verschiedener endosomaler Strukturen seiner intrazellulären Bestimmung zugeführt. Ein Überblick über diesen Endozytoseweg soll in den nächsten Kapiteln gegeben werden.

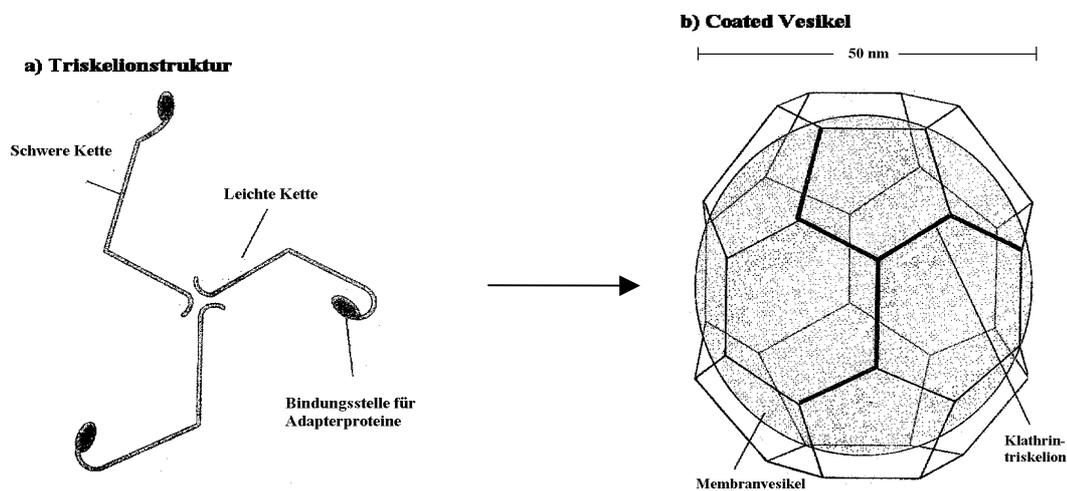
2.1.1.1 Aufnahme von Rezeptor-Liganden-Komplexen in Coated Pits

Die Aufnahme verschiedener Rezeptor-Liganden-Komplexe beginnt in spezialisierten Abschnitten der Plasmamembran, den Coated Pits. Es handelt sich dabei um ins Zellinnere eingestülpte Strukturen einer Größe von ca. 150 nm (Willingham et al., 1981), die in den meisten Zellen 2% der Membranoberfläche ausmachen (Anderson et al., 1976). Zu den Liganden, die an diesen Orten die Zellmembran passieren, gehören das LDL (Brown et al., 1979), das Transferrin (Hanover et al., 1985), das Insulin (Pastan et al., 1981), das EGF (Willingham et

al., 1981) und viele mehr. Einige der zugehörigen Rezeptoren, wie der LDL-Rezeptor, scheinen sich in Coated Pits zu konzentrieren (Anderson et al., 1982). Hingegen gelangt z.B. der sich bevorzugt in Caveolae aufhaltende EGF-Rezeptor (Mineo et al., 1996) erst nach Bindung seines Liganden in entsprechende Membranabschnitte (Dunn et al., 1984). Diese Prozesse werden durch Signalsequenzen innerhalb der zytoplasmatischen Rezeptordomänen vermittelt, die mit Komponenten der Coats interagieren (Kirchhausen, 2000). Sie spielen außerdem eine wichtige Rolle im intrazellulären Verkehr zwischen verschiedenen Endozytosekompartimenten (Wada et al., 1994).

Die Coats setzen sich aus einer hochorganisierten Matrix von Makromolekülen zusammen, die sich in polygonalen Gittern anordnen (Schroder et al., 1991). Die beiden wichtigsten Komponenten dieser Matrix sind das Klathrin und die sog. Adapterproteine (AP). Klathrin besteht aus einer schweren (180 kd) und einer leichten (33-36 kd) Untereinheit, wovon sich jeweils drei Moleküle durch Überlappung zu einer dreibeinigen Formation zusammenfügen (Abb. 1a), (Ungewickel et al., 1981; Pearse et al., 1987). Diese sternähnlich aussehenden sog. Triskelione ordnen sich wabenartig an der inneren Oberfläche der Coated Pits an, um die entstehenden Endozytosevesikel letztendlich wie ein Netz zu umgeben (Abb. 1b), (Heuser et al., 1980). Die heterotetrameren Adapterproteine sind wichtige Klathrin-assoziierte Proteine und

Abb. 1: Triskelion und Coated Vesikel (modifiziert aus Lodish et al., 1996)



vor allem das AP2 wurde in Coated Pits gefunden (Robinson, 1992). Wegen der Position zwischen dem Klathringitter und der Membran des sich ausbildenden Vesikels wird ihnen eine Mediatorfunktion für die Klathrinbindung an die Plasmamembran zugeschrieben. Die β -Untereinheit scheint dazu an Klathrin zu binden, wohingegen die anderen Untereinheiten mit den zytoplasmatischen Domänen von Rezeptoren interagieren können (Ahle et al., 1989; Heuser et al., 1980).

Die Loslösung des Vesikels von der Plasmamembran geschieht mit Hilfe von Dynamin. Diese 100 kd-große GTPase legt sich nach Polymerisation wie ein gewundenes Band um den Hals der Vesikelknospe und nähert die Vesikel-Plasmamembran-Verbindungsstellen einander an (Takei et al., 1995). Der genaue Mechanismus der Coated Pit-Membranfusion und der Abtrennung von der Plasmamembran ist aber noch unklar.

Kurz nach Eintritt in die Zelle verlieren die Vesikel ihren Coat durch ein 70-kd ATP-abhängiges Enzym, das Chaperonprotein hsc70. Durch Bindung von hsc70 an die Klathrin-Leichtketten und Hydrolyse von ATP wird der Klathrinmantel wieder zu Triskelionen depolymerisiert (Braell et al., 1984). Die internalisierten Rezeptoren und Liganden werden an das frühe endozytotische Kompartiment übergeben.

2.1.1.2 Frühes und spätes endozytotisches Kompartiment

Der Transport von Liganden und Rezeptoren zu ihren Zielen innerhalb der Zelle geschieht durch die Endosomen. Es handelt sich dabei um hoch dynamische Zellorganellen, die anhand ihrer intrazellulären Verteilung, der Morphologie, des pH-Werts und bestimmter Markerproteine in frühe und späte endozytotische Kompartimente unterteilt werden (Tab. 1 und Abb. 2).

Tab.1: Einteilung und Eigenschaften der Endosomen (modifiziert aus Mukherjee et al., 1997)

	Frühes endozytotisches Kompartiment		Zwischen-kompartiment	Spätes endozytotisches Kompartiment	
Organell	Sortierende Endosomen	Recycling Endosomen	Endozytotische Carriervesikel	Späte Endosomen	Lysosomen
Morphologie	tubulovesikulär	tubulär	sphärisch mit inneren Membranen	komplex, innere Membranen	tubulär oder wie Späte Endosomen
Verteilung	peripher	verstreut im Zytoplasma oder juxt nukleär	verstreut im Zytoplasma	perinukleär	perinukleär
pH	5.9 - 6.0	6.4 - 6.5	< 6.0	5.0 - 6.0	5.0 - 5.5
Rezeptoren und Membranproteine	Transferrin-Rezeptor und andere Recycling Rezeptoren, Liganden, die für die Lysosomen bestimmt sind	Transferrin-Rezeptor und andere Recycling Rezeptoren		Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, Lysosomale Membran glykoproteine und Lysosom-assoziierte Membranproteine	Lysosomale Membran glykoproteine und Lysosom-assoziierte Membranproteine
GTP-bindende Proteine	Rab4, Rab5, Rab11			Rab7, Rab9	

In den frühen endozytotischen Kompartimenten werden die Sortierenden von den Recycling Endosomen unterschieden:

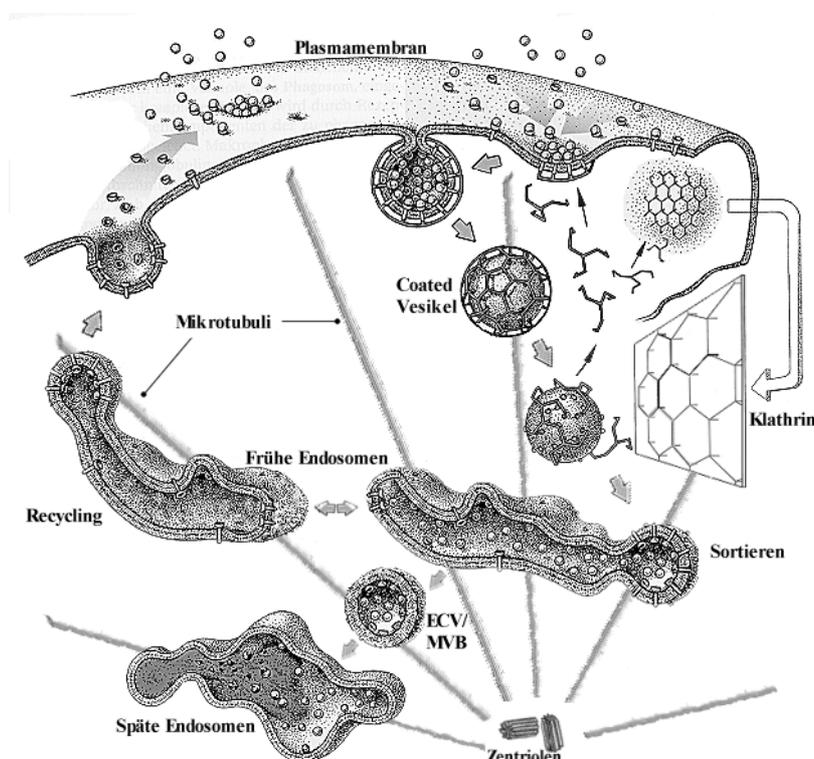
Sortierende Endosomen sind im peripheren Zytoplasma lokalisiert (Gruenberg et al., 1995) und stellen die erste Station für internalisierte Moleküle dar. Sowohl die tubulovesikuläre Membranstruktur (Griffiths et al., 1989) wie auch der relativ niedrige pH-Wert von ca. 6.0 (Sipe et al., 1987) sind für die Sortierfunktion dieser Endosomenpopulation von essentieller Bedeutung. Es kommt zur Trennung von Molekülen, die entweder für den Recyclingweg oder für den Degradationsweg bestimmt sind. Zum Beispiel gelangen Transferrin und sein Rezeptor von hier über die Recycling Endosomen zurück zur Zelloberfläche (Dautry-Varsat et al., 1983), während LDL von seinem Rezeptor abdissoziiert und über die Späten Endosomen die Lysosomen erreicht, wo es degradiert wird (Goldstein et al., 1985). Zur Identifikation werden der Transferrin-Rezeptor oder das LDL, aber auch die Rab-Proteine 4 und 5 benutzt.

Recycling Endosomen finden sich verstreut im Zytoplasma

(Gruenberg et al., 1995) und bilden das Bindeglied zwischen Sortierenden Endosomen und Membranoberfläche im Recyclingweg. Sie sind gekennzeichnet durch eine tubuläre Morphologie (Hopkins, 1983), einen pH-Wert von ca. 6.4 (Yamashiro et al., 1984) und das Fehlen von Molekülen, die in der Zelle normalerweise degradiert werden (Ghosh et al., 1994). Als Markerproteine fungieren vor allem das Transferrin und sein Rezeptor (Yamashiro et al., 1984) sowie die Rab-Proteine 4 und 5 (Bucci et al., 1992; Daro et al., 1996).

Späte Endosomen verteilen sich überwiegend perinukleär. Sie haben einen relativ komplexen Aufbau mit inneren Membranen, die oft als zwiebelartig beschrieben werden. Mit einem pH-Wert von ca. 5.5 bieten sie ein saures Milieu, in dem wahrscheinlich die ersten Hydrolysierungen von internalisiertem Material stattfinden (Mukherjee et al., 1997). Charakteristisch für

Abb. 2: Endosomaler Membrantransport (modifiziert aus Gruenberg et al., 1995)



Späte Endosomen ist das Vorhandensein des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors (Kornfeld, 1992) und das Fehlen von Transferrin (Mukherjee et al., 1997). Zusätzlich werden die Lysosomen-assoziierten Membranproteine (LAMPs) und die Lysosomalen Membranglykoproteine (lgps) (Kornfeld et al., 1989) sowie Rab7 und Rab9 gefunden (Lombardi et al., 1993; Feng et al., 1995).

Die perinukleär gelegenen Lysosomen haben einen ähnlich komplexen Aufbau wie die Späten Endosomen (Holtzman, 1989). Der pH-Wert zwischen 5.5 und 5.0 (Mukherjee et al., 1997) gewährleistet den lysosomalen Enzymen die optimale Umgebung für eine maximale Aktivität hinsichtlich der Degradation von internalisierten Molekülen (Barrett et al., 1972). Während LAMPs, Igps, Rab7 und Rab9 ebenfalls Markerfunktion übernehmen, fehlt der Mannose-Phosphat-Rezeptor (Kornfeld et al., 1989).

Unklarheit herrscht noch über die Zuordnung einer weiteren Endosomenpopulation, welche wegen ihres Aussehens Multivesikuläre Körper (MVB) (Dunn et al., 1986; Jäckle et al., 1994) bzw. wegen ihrer vermuteten Funktion Endozytotische Transportvesikel (ECV) (Gruenberg et al., 1989) genannt wurden. Diese sphärisch aussehenden und mit inneren Membranen ausgestatteten Organellen stellen eventuell ein Stadium zwischen frühem und spätem endozytotischen Kompartiment dar.

2.1.1.3 Sortiermechanismen

Das Sortieren von aufgenommenen Rezeptoren und Liganden zwecks Recycling oder Degradation wird mit physikalischen und signalvermittelten Mechanismen begründet. Physikalisches Sortieren basiert auf den Eigenschaften der Organellen wie Geometrie oder pH-Wert sowie auf der Assoziation von Molekülen mit der Membran oder der Flüssigkeit im Lumen. Auch die Größe und Löslichkeit von Partikeln stellt einen wichtigen Faktor dar. LDL zum Beispiel dissoziiert durch den niedrigen pH-Wert von seinem Rezeptor und akkumuliert anschließend in der löslichen Fraktion des vakuolären Teils der Sortierenden Endosomen. Die Größe des Lipoproteins, sie beträgt 22 nm (Brown et al., 1986), verhindert dabei den Wegtransport mit den im Durchmesser nur ungefähr doppelt so großen Tubuli der sich abtrennenden Recyclingfraktion (Mukherjee et al., 1997). Auf der anderen Seite werden Membrankomponenten wohl grundsätzlich erst einmal dem Recyclingweg zugeführt. Rezeptormutanten, deren zytoplasmatischen Domänen verkürzt worden waren, wurden zwar langsam internalisiert, dafür aber effizient recycled (Jing et al., 1990). Der tubulovesikuläre Aufbau der Sortierenden Endosomen bietet einen dazu passenden Erklärungsansatz: Bis zu 80% der Membranoberfläche befindet sich in den Tubuli (Marsh et al., 1986), weswegen sich auch die Mehrzahl

der Membranrezeptoren dort aufhalten. Kommt es nun zu fortgesetzten Abknospungen von Membranteilen, deren Bestandteile recycled werden, so bleiben in den Sortierenden Endosomen am Ende die Moleküle, die den Degradationsweg beschreiten sollen (Dunn et al., 1989). Hingegen beruhen signalvermittelte Mechanismen zur Sortierung wahrscheinlich auf bestimmten Aminosäuresequenzen in den transmembranären oder zytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren. Zum Beispiel wurde eine Dileucinsequenz in der zytoplasmatischen Domäne des Mannose-Phosphat-Rezeptors dafür verantwortlich gemacht, dass das Molekül in die Späten Endosomen gelangt (Johnson et al., 1992). Sequenzen der 2. Domäne des LDL-Rezeptors (siehe Kapitel 2.2.2) werden auf der anderen Seite für das Recycling des Rezeptors zurück an die Membranoberfläche benötigt (Davis et al., 1987).

2.1.1.4 Regulatorproteine

Die Eigenschaften und Funktionen endozytotischer Organellen werden wesentlich mitbestimmt durch integrale Membranproteine oder membranassoziierte Proteine. Als wichtigste Vertreter sollen hier die Coat-Proteine, die Rab-Proteine und die sogenannten Vesikelfusionskomplexe dargestellt werden.

Im intrazellulären Organellenverkehr sind zumindest 2 Coat-Typen von größerer Bedeutung: Klathrin-Coats und COP-Coats (Kirchhausen, 2000).

Klathrin-Coats mit den Adapterproteinen AP1 bzw. AP2 sind bekannt vom Trans-Golgi-Netzwerk und der Zellmembranoberfläche. Inzwischen wurden sie auch an Tubuli des frühen endosomalen Systems entdeckt (Stoorvogel et al., 1996), dort allerdings mit einem eigenen Adapterprotein, dem AP3 (Dell'Angelica et al., 1997). Über die genaue Funktion herrscht Unklarheit. Die Coat-Proteine COP bilden normalerweise einen Mantel um Transportvesikel des Golgi-Apparats. Komponenten des COP-1 wurden aber auch mit Frühen Endosomen assoziiert gefunden (Aniento et al., 1996). Über die genaue Aufgabe ist ebenfalls wenig bekannt.

Unter Vesikelfusionskomplexen werden eine Reihe von Proteinen verstanden, die durch wechselseitige Interaktion eine spezifische Fusion von Membrankompartimenten vermitteln helfen (Chen et al., 2001). Sie wurden beschrieben für den Verkehr von Vesikeln in Synapsen, am Endoplasmatischen Retikulum und am Golgi-Apparat (Hicke et al., 1990; Südhof, 1995). Das Modell sieht vor, dass bestimmte Proteine, nämlich NSF und SNAPs, Teil einer generellen Fusionsmaschinerie darstellen, während sogenannte SNAP-Rezeptoren, SNAREs, für die spezifische Erkennung zusammengehöriger Membranabschnitte zuständig sind. Im endozytotischen Recyclingweg ist inzwischen ein Homolog eines SNARE-Proteins aus

synaptischen Vesikeln identifiziert worden (McMahon et al., 1993). Deswegen wird auch für den endozytotischen Vesikelverkehr eine Beteiligung von Fusionskomplexen vorgeschlagen. Rab-Proteine stellen eine Familie niedermolekularer GTPasen dar, die an fast allen Arten von Membranverkehr beteiligt sind (Pfeffer, 1994; Zerial et al., 2001). Verschiedene Mitglieder der Familie wurden auch an endozytotischen Organellen gefunden (siehe Tab.1): Rab4 und Rab5 sind assoziiert mit Frühen Endosomen (Daro et al., 1996; Bucci et al., 1994), Rab11 findet sich hauptsächlich im Recycling Kompartiment (Ullrich et al., 1996), Rab7 und Rab9 repräsentieren Markerproteine für Späte Endosomen (Feng et al., 1995; Lombardi et al., 1993). Zwar wurden allen diesen Proteinen schon gewisse Funktionen zugeordnet, ihre generelle Aufgabe ist aber noch nicht klar. Eine attraktive Hypothese besagt, dass sie helfen, die passenden SNARE-Proteine innerhalb von Vesikelfusionskomplexen zusammenzubringen, um die Fusion unterschiedlicher Membrankompartimente zu bewirken. Hinweise dafür wurden schon für den Biosyntheseweg gesammelt (Ikonen et al., 1995; Stow et al., 1995). Im Hinblick auf regulatorische Eigenschaften innerhalb der rezeptorvermittelten Endozytose stellt das Rab5 das wohl am besten charakterisierte Rab-Protein dar. Es ist beteiligt am Transport klathrinummantelter Vesikel von der Plasmamembran zu Frühen Endosomen und ein wichtiger Faktor für die homotypische Verschmelzung Früher Endosomen (Gorvel et al., 1991; Bucci et al., 1992). Andere Daten sprechen sogar für eine Aufgabe bei der Bildung von Klathrin-Vesikeln, da Rab5 bei in-vivo-Versuchen die Halbwertszeit von Klathrin-Coated Pits an der Plasmamembran modulierte (Gorvel et al., 1991) sowie in-vitro für die Vesikelformation benötigt wurde (McLauchlan et al., 1998).

Auf Mitglieder der Annexinproteinfamilie, denen ebenfalls Aufgaben innerhalb des endozytotischen Membranverkehrs zugeschrieben werden, wird später in dieser Arbeit (Kapitel 2.3.1.3) eingegangen.

2.1.2 Caveolae

Caveolae sind omegaförmige Membraninvaginationen einer Größe von 50–80 nm (Van Deurs et al., 1993), die u.a. in Adipozyten, Fibroblasten und Endothelzellen gefunden wurden (Severs, 1988; Simionescu, 1983). Ihre zytoplasmatische Oberfläche ist von zarten Filamenten bedeckt, welche in elektronenmikroskopischen Bildern oft wie ein gestreifter Überzug aussehen (Rothberg et al., 1992). Neben der Morphologie werden sie anhand einer Vielzahl biochemischer Eigenschaften beschrieben, wovon die wichtigsten das Vorkommen des Markerproteins Caveolin, eine charakteristische Lipidzusammensetzung sowie eine Konzentration bestimmter Rezeptoren und Signaltransduktionsmoleküle darstellen (Tab. 2).

Tab.2: Molekulare Bestandteile von Caveolae

<u>Molekülklasse</u>	<u>Molekülname</u>	<u>Referenz</u>
Lipid	Ganglioside	Smart et al., 1995
	Sphingomyelin	Brown et al., 1992
	Cholesterin	Smart et al., 1996
	Phospholipide	Fridriksson et al., 1999
Membranrezeptor	Platelet Derived Growth Factor	Liu et al., 1996
	Insulin	Goldberg et al., 1987
	Epidermal Growth Factor	Smart et al., 1995
	Scavenger-Rezeptor-B1	Babitt et al., 1997
Signaltransduktion	Proteinkinase C α	Lisanti et al., 1994
	Adenylatzyklase	Wagner et al., 1972
	Phosphoinositide	Hope et al., 1996
	H-Ras	Roy et al., 1999

Die genaue Funktion der Caveolae ist noch unklar, allerdings werden bedeutsame Rollen innerhalb verschiedener physiologischer und auch pathologischer Vorgänge diskutiert:

Wegen der Konzentration verschiedener Signaltransduktionsmoleküle wird ihnen eine Schlüsselstellung innerhalb der Signaltransduktion zugerechnet (Anderson, 1998).

Im Lipidtransport fungieren sie als wichtige Durchgangsstation: Neusynthetisiertes Cholesterin (Smart et al., 1996) und auch Cholesterin, das von Low Density Lipoproteinen an die Zelle abgegeben wurde (Fielding et al., 1996), passieren Caveolae, um aus der Zelle ausgeschleust zu werden. Das cholesterinbindende Markerprotein Caveolin-1 (Murata et al., 1995) fungiert dabei wahrscheinlich als Teil eines intrazellulären Lipidtransportsystems (Smart et al., 1994). Die Lokalisation des Scavenger-Rezeptors-B1 (SR-B1) in Caveolae unterstreicht die wichtige Position dieser Membranstruktur im Lipidverkehr (Babitt et al., 1997), denn SR-B1 vermittelt einerseits selektiv die Aufnahme von Lipiden aus HDL in die Zelle und ist gleichzeitig wohl auch für den zellulären Cholesterinefflux zuständig (Krieger, 1999).

Eine weitere wesentliche Aufgabe der Caveolae besteht in der Internalisation von Molekülen, und zwar unabhängig vom rezeptorvermittelten, klathrinabhängigen Weg. Hierbei werden 2 Mechanismen unterschieden: Der Transzelluläre Transport und die Potozytose.

Transzellulärer Transport findet vor allem in Endothelzellen statt. Aus Caveolae entstehen dabei Vesikel, die Moleküle wie Insulin oder Albumin durch die Zelle transportieren (Simionescu et al., 1973; Schnitzer et al., 1994). Kontrovers behandelt wird die Frage, ob es durch Caveolae sogar zur Bildung transzellulärer Kanäle kommt, durch die der Transport kleiner

Moleküle von der einen Zellseite zur anderen stattfinden kann (Frokjaer-Jensen, 1980; Predescu et al., 1994).

Als Pinozytose wird der Mechanismus bezeichnet, durch den extrazelluläre Moleküle in Caveolae konzentriert werden, um sie anschließend zu internalisieren und ans Zytoplasma oder das endoplasmatische Retikulum abzugeben (Anderson, 1993; Kartenbeck et al., 1989). Der Endozytosemechanismus scheint dabei prinzipiell ähnlich dem klathrinabhängigen abzulaufen (Schnitzer et al., 1995). Zu den aufgenommenen Molekülen gehören z.B. das 5-Methyltetrahydrofolat (Anderson et al., 1992), virale Pathogene (Anderson et al., 1996), Cholesterin (Anderson, 1998) und das Cholera toxin (Parton et al., 1994).

2.1.3 Phagozytose und Pinozytose

Phagozytose, auch "Zellfressen" genannt, steht für rezeptor- und aktinabhängige Aufnahme von großen Partikeln und Mikroorganismen in eine Zelle (Rabinovitch, 1995). Es findet klathrinunabhängig vor allem in spezialisierten Zellen des Monozyten-Phagozyten-Systems statt (Falkow et al., 1992). Dabei wird ein Partikel entweder direkt über Rezeptoren der Phagozytenoberfläche erkannt oder vorher mit Opsoninen wie Immunglobulinen oder Komplementkomponenten ummantelt, die dann mit spezifischen Rezeptoren interagieren (Greenberg et al., 1993). Durch eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts umgibt die Fresszelle den Partikel mit Pseudopodien und es entsteht ein frühes Phagosom (Swanson et al., 1995). In der Zelle tritt das Phagosom wahrscheinlich noch in Wechselwirkung mit einigen Organellen des endozytotischen und exozytotischen Membranverkehrs, um letztendlich den Großteil des Inhalts nach Verschmelzung mit einem Lysosom zu degradieren (Beron et al., 1995).

Der Begriff Pinozytose, "Zelltrinken", beschreibt die Internalisation von kleinen Molekülen und Flüssigkeit in die Zelle. Der Vorgang geschieht klathrinunabhängig und wird meist durch die Aufnahme von sog. fluid-phase Markern wie Horse-Radish-Peroxidase (HRP) gemessen (Mukherjee et al., 1997). Der genaue Mechanismus dieses Endozytosewegs ist nicht bekannt.

2.1.4 Einfluss der Lipidzusammensetzung von Membranen auf die rezeptorvermittelte Endozytose

Die Bildung spezialisierter Domänen durch bestimmte Lipide der Zellmembran gehört zu den wichtigen Modulationspunkten der rezeptorvermittelten Endozytose.

Das Membranphospholipid Phosphatidylinositol kann an verschiedenen Stellen seiner Inositolkopfgruppe phosphoryliert werden und bildet dadurch die Familie der Phosphoinositide. Einzelne Phosphoinositide besitzen regulatorische Aufgaben während einiger Stadien des

Endozytosevorgangs. Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat bindet zum Beispiel β -Arrestine, die mit Klathrin und AP2 assoziieren, um die Aufnahme von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu vermitteln (Gaidarov et al., 1999). Phosphatidylinositol-3-Phosphat hingegen interagiert mit dem frühendosomal Markerprotein EEA1 und spielt damit eventuell eine Rolle bei der Fusion von Frühen Endosomen (Burd et al., 1998).

Ein anderes Lipid, dem eine Rolle im endosomal Membranverkehr zugeschrieben wird, ist die Lysobisphosphatidsäure. Dieses ist strukturell verwandt zum Cardiolipin, verfügt über ein Glycerylphosphorylglycerin-Rückgrat und wird vor allem in Späten Endosomen und Lysosomen gefunden. Das Lipid bildet möglicherweise Mikrodomänen an inneren Membranen von Späten Endosomen und ist dadurch an Sortierfunktionen beteiligt (Kobayashi et al., 1998).

2.1.5 Die Rolle des Zytoskeletts bei der rezeptorvermittelten Endozytose

Moleküle, die per rezeptorvermittelter Endozytose aufgenommen und in der Zelle degradiert werden, legen auf dem Weg zu ihrem intrazellulären Ziel eine nicht unbeträchtliche Strecke zurück. Von der Zelloberfläche werden sie durch Frühe und Späte Endosomen bis in perinukleäre Bereiche transportiert, was eine Beteiligung von Elementen des Zytoskeletts nahelegt. Tatsächlich konnten bereits einige Stellen innerhalb des Vorgangs der rezeptorvermittelten Endozytose identifiziert werden, an denen es zu Interaktionen mit dem Zytoskelett kommt.

Die Innenseite der Zellmembran ist von einem Spektrin-Aktin-Zytoskelett ausgekleidet, welches während der Abknospung von Coated Vesikeln wahrscheinlich eine Reorganisation erfährt: Einerseits wurde in polarisierten Zellen gezeigt, dass die Endozytose zumindest an der apikalen Seite von Substanzen blockiert werden kann, die eine Depolymerisation von Aktin bewirken (Gottlieb et al., 1993). Andererseits verliert an Orten der Vesikelbildung die Zellmembran bis zu 50% ihres Spektringehalts (Kamal et al., 1998).

Das Spektrin-Aktin-Zytoskelett selbst wird wiederum durch bestimmte Verbindungsmoleküle mit Proteinen der Zellmembran verknüpft. Zu diesen Molekülen gehören v.a. die Ankyrine, deren entdeckte Fähigkeit zur Assoziation mit Klathrin von Michaely et al. (1999) als notwendige Bedingung für den Abknospungsprozess betrachtet wird.

Mikrotubuli sind erforderlich für die Wanderung von Vesikeln in Richtung Zentrum (Aniento et al., 1993). Es wird angenommen, dass sie Bahnen bilden, an denen sich die Vesikel entlang bewegen (Robinson et al., 1996). Auch die Fusion von Frühen mit Späten Endosomen scheint ohne die Anwesenheit von Mikrotubuli nicht möglich zu sein (Aniento et al., 1993).

Mikrofilamente (Murphy et al., 1996) und diverse Motorproteine wie Myosin oder Dynein (Valetti et al., 1997; Aniento et al., 1993) sind wohl ebenfalls für fehlerfreien Membranverkehr von großer Bedeutung.

2.2 Metabolismus der Lipoproteine

Lipide stellen nicht nur die wichtigsten Energieträger des menschlichen Organismus dar, sie sind auch wichtige Bestandteile zellulärer Membranen, einiger Hormone und anderer biologisch aktiver Moleküle. Nach Verdauung und Resorption im Gastrointestinaltrakt werden Nahrungslipide über das Lymphsystem und den Blutkreislauf in die unterschiedlichen Gewebe transportiert. Wegen ihrer hydrophoben Eigenschaften geschieht dies in Form von Lipoproteinen.

2.2.1 Einteilung der Lipoproteine

Lipoproteine sind sphärische Gebilde, die sich aus unterschiedlichen Anteilen Protein, auch Apolipoprotein genannt, und Lipiden zusammensetzen. Prinzipiell umschließt eine hydrophile Hülle, bestehend aus Phospholipiden, freiem Cholesterin und Apolipoprotein, einen hydrophoben Kern, der vor allem Triglyceride und Cholesterinester enthält. Es werden 5 Lipoproteinklassen anhand Größe, Dichte, Zusammensetzung und elektrischer Ladung unterschieden (Gotto et al., 1986) (Tab. 3).

Tab. 3: Lipoproteinklassifizierung (modifiziert aus Löffler et al., 1997 und Dörner, 1998)

	Durchmesser (nm)	Dichte (g/ml)	Lipid/ Proteinverhältnis	Apolipoproteine	rel. elektroph. Mobilität
Chylomikronen	75-1200	<0,96	98/2	AI, AIV, CI-CIII, E, B48	0 (Start)
VLDL	30-80	0,96-1,006	90/10	CI-CIII, E, B100	α 2 (prä- β)
IDL	25-35	1,006-1,019	83/17	B100, E	β
LDL	18-25	1,019-1,063	78/22	B100	β
HDL	5-12	1,063-1,21	50/50	AI, AII, AIV, CI- CIII, E	α 1

VLDL=Very Low Density Lipoprotein, IDL=Intermediate Density Protein, LDL=Low Density Lipoprotein, HDL=High Density Lipoprotein

Die Vielzahl der Apolipoproteine verdeutlicht deren zentrale Stellung im Lipoproteinstoffwechsel. Sie fungieren nicht nur als Transportvehikel für die Lipide, sondern auch als Kofaktoren von Enzymen und als Bindungspartner für Zelloberflächenrezeptoren.

2.2.2 Die LDL-Rezeptorfamilie

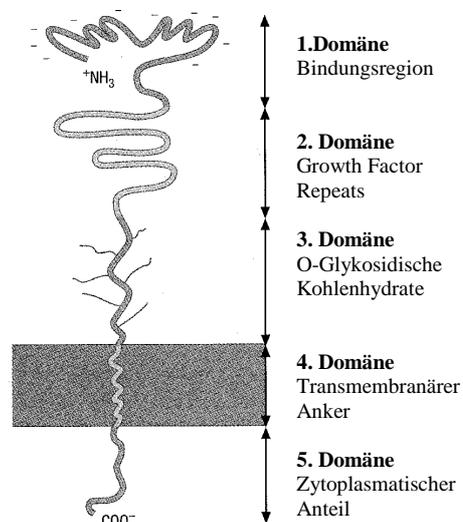
Im Lipoproteinstoffwechsel gibt es eine Reihe wichtiger Rezeptoren, welche die spezifische Bindung und Aufnahme von im Blutkreislauf zirkulierenden Lipoproteinen bewirken. Eine Reihe von Rezeptoren werden auf Grund ihrer Strukturähnlichkeit zur LDL-Rezeptor-Familie zusammengefasst. Dazu gehören der 1973 entdeckte LDL-Rezeptor (Brown et al, 1986), LRP (Herz et al., 1988), GP 330 (Raychowdhury et al., 1989), der VLDL-Rezeptor (Takahashi et al., 1992), LR 11 (Yamazaki et al., 1996) LR8B (Novak et al., 1996) und der Apo-E-Rezeptor-2 (Kim et al., 1996).

Alle diese Rezeptoren bestehen aus 5 Domänen:

Das aminoternale Ende übernimmt die Ligandenbindung. Diese Domäne beinhaltet zum einen Wiederholungen einer cysteinreichen Sequenz und zum anderen eine hoch konservierte Aminosäurefolge, die "Complement Type Repeat" genannt wird (Russel et al., 1989). In der zweiten Domäne kommen wiederum cysteinreiche Wiederholungssequenzen vor, die als "Growth Factor Repeats" bezeichnet werden und voneinander durch Spacerregionen getrennt sind. Dieser Teil ist wichtig für die intrazelluläre pH-abhängige Dissoziation von Ligand und Rezeptor (Davis et al., 1987). Während der kurzen dritten Domäne Stützfunktionen zugerechnet werden, dient die vierte der Verankerung des Rezeptors in der Membran. Das C-terminale Ende reicht in den Intrazellulärraum und weist eine Sequenz aus den Aminosäuren Asp-Pro-Val-Tyr auf. Diese Aminosäurefolge, auch als NPXY-Sequenz bezeichnet, vermittelt einerseits die Konzentration des Rezeptors in den Coated Pits und andererseits auch dessen Recycling (Chen et al., 1990).

Stellvertretend für die anderen Rezeptoren soll auf den LDL-Rezeptor genauer eingegangen werden (Abb.3): Der LDL-Rezeptor besteht aus 839 Aminosäuren und besitzt im SDS-PAGE ein Molekulargewicht von 115 kd (Goldstein et al., 1985). Die N-terminale Domäne ist 292 Aminosäuren lang und bindet ApoB₁₀₀ und ApoE. Auf die 400 Aminosäuren zählende 2. Domäne folgen 58 Aminosäuren innerhalb der 3. Domäne. Durch 22 hydrophobe Aminosäuren wird der Rezeptor anschließend in der Membran verankert. Die zytoplasmatische C-terminale Domäne setzt sich aus 50 Aminosäuren zusammen und bewirkt die Konzentration des Rezeptors in den Coated Pits. Der LDL-Rezeptor nimmt eine Schlüsselstellung bei der Regulation der

Abb. 3: Struktur des LDL-Rezeptors (aus Löffler et al., 1997)



Cholesterinhomöostase sowohl im Intrazellularraum wie auch im Blutplasma ein (Brown et al., 1986). Mutationen in seiner Sequenz sind die häufigste Ursache für die familiäre Hypercholesterinämie, bei der Betroffene frühzeitig unter atherosklerotischen Gefäßveränderungen leiden (Hobbs et al., 1997). Zusätzlich spielt er auch eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von VLDL, Chylomikronen und Chylomikronen-Remnants (Yamada et al., 1988, Ishibashi et al., 1993, Mahley et al., 1999).

2.2.3 Stoffwechselwege der Lipoproteine

Im Lipoproteinmetabolismus wird zwischen einem exogenen und einem endogenen Stoffwechselweg unterschieden.

Den exogenen Weg beschreiten Lipide, die mit der Nahrung aufgenommen wurden. Sie werden nach Verdau und Resorption in den Enterozyten zusammen mit einigen Apolipoproteinen zu Chylomikronen verpackt, als die sie über die Lymphbahnen in den Blutkreislauf gelangen. Im Blut nehmen sie aus dem HDL stammende Apolipoproteine auf, wodurch ihre Eigenschaften verändert werden. Die endothelständige Lipoproteinlipase kann nun für die Hydrolyse der in den Chylomikronen vorhandenen Triglyceride sorgen (Olivecrona et al., 1993), so dass die Fettsäuren freigesetzt werden und von anderen Geweben aufgenommen werden können. Die entstehenden Chylomikronen-Remnants gelangen über den Blutweg zur Leber. Dort werden sie durch den LDL-Rezeptor oder das LRP in die Hepatozyten aufgenommen und schließlich abgebaut.

Im endogenen Stoffwechselweg befinden sich Lipide, die vom Körper synthetisiert wurden. Hauptproduktionsstätte ist die Leber, von wo sie mit VLDL die Zirkulation erreichen. Intravaskulär erfolgt durch die endothelständige Lipoproteinlipase die Hydrolyse des VLDL zu IDL, aus welchem in der Leber nach mehreren biochemischen Umwandlungen das LDL hervorgeht. Das LDL ist das Lipoprotein mit dem größten Cholesterinanteil und versorgt die extrahepatischen Gewebe mit diesem Lipid. Es wird mit Hilfe des Apolipoproteins B₁₀₀ durch den LDL-Rezeptor aufgenommen und intrazellulär abgebaut.

Nichthepatische Zellen sind unfähig, überschüssiges Cholesterin abzubauen, weswegen die toxischen Wirkungen einer Akkumulation verhindert werden müssen. Hierzu dient das aus der Leber stammende HDL, das den Rücktransport von Cholesterin zur Leber bewerkstelligt. Das Cholesterin kann dort zur Bildung von Gallensäuren benutzt und dadurch eliminiert werden (Löffler et al., 1997, Schwandt et al., 2001).

2.2.4 Intrazelluläre Wege der Lipoproteine

Wegen der herausragenden Bedeutung des LDL für diese Arbeit soll zum Aspekt der intrazellulären Wege der Lipoproteine ausschließlich auf die intrazelluläre Metabolisierung des LDL eingegangen werden.

LDL bindet über das Apolipoprotein B₁₀₀ an den LDL-Rezeptor, der sich mit Hilfe seiner NPXY-Sequenz der zytoplasmatischen Domäne in einem Coated Pit eingefunden hat. Der Rezeptor-Ligand-Komplex wird durch einen klathrinummantelten Vesikel internalisiert und an Sortierende Endosomen übergeben. Hier kommt es durch den niedrigen pH-Wert zur Dissoziation des LDL-Rezeptors vom LDL. Der Rezeptor gelangt in die tubulären Ausläufer, die sich letztendlich von den Sortierenden Endosomen abtrennen und die Recycling Endosomen bilden. Über diese Endosomenfraktion gelangt der Rezeptor zurück zur Membranoberfläche, wo er für die erneute Bindung des Lipoproteins zur Verfügung stehen kann. Das LDL akkumuliert hingegen als Teil der löslichen Fraktion im vakuolären Abschnitt der Sortierenden Endosomen und gelangt über die Endozytotischen Carriervesikel in die Späten Endosomen. Eventuell beginnen schon in diesem Zellkompartiment die ersten Degradationsprozesse, die auf jeden Fall in den Lysosomen ihren Abschluss finden. Dabei wird das Apolipoprotein B₁₀₀ durch lysosomale Proteasen gespalten sowie die Cholesterinester durch eine lysosomale saure Lipase hydrolysiert. Das freiwerdende Cholesterin wird im Zytoplasma entweder reverestert und in Lipidtröpfchen gespeichert oder zur Biosynthese z.B. von Membranbestandteilen weiter verwendet (Löffler et al., 1997, Schwandt et al., 2001).

Allerdings wird nicht alles LDL über den oben beschriebenen Weg degradiert. Ein Teil der Lipoproteine beschreitet nämlich einen Weg, der "Retroendozytose" genannt wird. Hierbei bleibt LDL in den Frühen Endosomen an seinem Rezeptor gebunden und wird an die Zelloberfläche zurücktransportiert (Greenspan et al., 1984).

2.3 Die Annexine

Die Annexine stellen eine Familie von Proteinen dar, die durch 2 Merkmale charakterisiert sind: 1. Eine hochkonservierte Aminosäuresequenz, die als Annexin-Wiederholung bezeichnet wird, und entweder vier- oder achtmal pro Annexin wiederholt wird. 2. Eine Ca²⁺-abhängige Bindung an vorzugsweise negativgeladene Phospholipide. Trotz intensiver Forschungsbemühungen aus verschiedenen Richtungen ist die physiologische Aufgabe der Annexine noch weitgehend unklar.

2.3.1 Die Annexinproteinfamilie

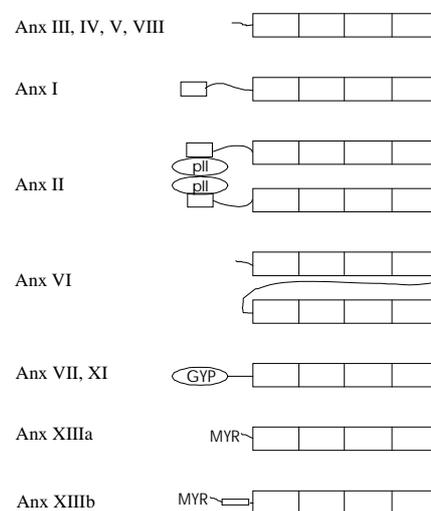
2.3.1.1 Molekulare Strukturen der Annexine

Zur Zeit sind 13 Mitglieder der Annexinfamilie bekannt, die mit römischen Ziffern durchnummeriert werden. Sie alle bestehen aus einer N-terminalen Domäne und einem Annexinkern, der bei den Annexinen II und VI doppelt vorliegt (Abb. 4). Der Annexinkern ist eine hochkonservierte Domäne, die aus 4 sich wiederholenden und nacheinander geschalteten Segmenten gebildet wird, jede 70 – 80 Aminosäuren lang (Glenney et al., 1985; Weber et al., 1986). Diese Segmente werden Annexin-Wiederholungen genannt und zeigen im intra- und intermolekularen Bereich große Sequenzhomologien (Morgan et al., 1995). Kristallstrukturanalysen ergaben folgerichtig eine charakteristische und weitgehend übereinstimmende Faltung der Kerne verschiedener Annexine (Gerke et al., 1997). Sie nehmen die Form einer kompakten, leicht gekrümmten Scheibe ein, in der die 4 Wiederholungen 4 unterschiedliche Domänen ausbilden. Die Wiederholungen 1 und 4 sowie 2 und 3 lassen durch Interaktionen hydrophober Seitenketten 2 Module entstehen, die in der Mitte durch eine hydrophile Pore getrennt sind (Huber et al., 1992).

Im gefalteten Molekül umfasst jede Annexin-Wiederholung 5 α -Helices, die sich zu einer rechtsgewundenen Superhelix anordnen. Zwischen den Helices befinden sich kurze Schleifen, von denen diejenigen, die auf der mehr konvexen Seite der gekrümmten Scheibe liegen, an der Komplexbindung mit Ca^{2+} beteiligt sind (Huber et al., 1990). Trotz der sehr ähnlichen Strukturen variieren die Anzahl und die exakten Orte der Ca^{2+} -Bindungsstellen zwischen den Annexinen (Gerke et al., 1997).

Die funktionelle Spezifität der einzelnen Annexine wird vermutlich durch die unterschiedlichen N-terminalen Domänen hervorgerufen, die den Annexinkernen vorausgehen. Sie sind bei vielen nicht länger als 19 Aminosäuren, erreichen aber bei den Annexinen VII und XI auch über 100 (Raynal et al., 1994). Die Sequenzen sind hoch variabel und die räumliche Anordnung bis auf einige Ausnahmen noch unbekannt. U.a. werden die N-terminalen Domänen für eine intramolekulare Beeinflussung des Kerns verantwortlich gemacht, wodurch die Ca^{2+} - und Phospholipidbindungsfähigkeit des Moleküls beeinflusst werden könnte (Powell et al.,

Abb. 4: Struktur der Annexine (modifiz. aus Gerke et al., 1997)



Die Rechtecke symbolisieren die Annexin-Wiederholungen.

Charakteristika der N-terminalen Domänen:

Kleine Rechtecke stehen für amphipatische α -Helices, die Elipsen mit der Beschriftung pII bezeichnen Bindungsstellen für S100-Proteinliganden und MYR bedeutet Myristoylierung. GYP bezeichnet das reichliche Vorhandensein von Glycin (G), Prolin (P) und Tyrosin (Y).

1987; Ando et al., 1989). Zum Teil tragen sie potentielle Phosphorylierungsstellen für signaltransduzierende Proteinkinasen, was ebenfalls die Bindungsfähigkeit für Phospholipide verändern könnte (Raynal et al., 1994). Die überwiegende Zahl der bis jetzt an verschiedenen Annexinen gefundenen Proteinbindungsstellen lokalisieren sich ebenfalls am N-Terminus.

Sonderstellungen nehmen die Annexine II und VI ein, da sie aus 2 Annexinkernen bestehen. Beim Annexin II beruht dies auf einer Komplexbildung von 2 Molekülen des S100 Proteins p11 mit 2 Molekülen Annexin II. Die Stabilisierung dieser Interaktion wird von hydrophoben Resten bewerkstelligt, die sich beim Annexin II in der N-terminalen Domäne und beim p11 am C-Terminus befinden (Gerke et al., 1997). Auf das Annexin VI wird später (Kapitel 2.3.2.1) eingegangen.

2.3.1.2 Vorkommen und intrazelluläre Lokalisation

Das Vorkommen von Annexinen ist für eine große Anzahl Organismen beschrieben, bis jetzt wurden sie in Vertebraten, Insekten, Nematoden und Pflanzen gefunden. Dabei wird in jedem Zelltyp zumindest ein Familienmitglied exprimiert, meistens kommt es zu einem relativ gewebsspezifischen Muster der Expression verschiedener Annexine. Einige Mitglieder der Familie, wie die Annexine I, II und VI, werden in sehr vielen Zelltypen angetroffen, andere hingegen, dazu gehören die Annexine VIII und XIII, beschränken sich auf nur sehr wenige. Insgesamt scheint das Expressionsniveau von Annexinen umso höher zu sein, je weiter die Zelle differenziert ist.

Viele Annexine wurden bei Lokalisationsstudien mit zellulären Membranen assoziiert gefunden. Plasmamembran (Annexine I-VII, XIII) und endozytotische Membranen (Annexine I, II, IV-VI) stehen diesbezüglich im Vordergrund, teilweise wurden sie aber auch an exozytotischen Membranen (Annexine II, XIII) sowie dem endoplasmatischen Retikulum (Annexine V, VI) und einigen anderen Orten gefunden (Gerke et al., 1997).

2.3.1.3 Biochemische Eigenschaften und Funktionen

Eine der zentralen biochemischen Eigenschaften der Annexine ist die Ca^{2+} -abhängige Fähigkeit zur Bindung negativ geladener Membranphospholipide. Dazu gehören Phospholipide, deren Kopfgruppe entweder Phosphatidsäure, Phosphatidylserin oder Phosphatidylinositol darstellen (Raynal et al., 1994). Zusätzlich können sie eine Ca^{2+} -abhängige Aggregation von Membranoberflächen, z.B. von Phospholipidvesikeln, bewirken. Hierbei ist nicht klar, ob die Familienmitglieder mit 4 Wiederholungen 2 Phospholipidbindungsstellen besitzen oder ob sie eine Selbstassoziation durchführen, so dass 2 Moleküle 2 verschiedene Membranoberflächen

binden (De-La-Fuente et al., 1995; Meers et al., 1992; Creutz, 1992). Bei einigen Annexinen wurde die Fähigkeit zur Polymerbildung jedenfalls nachgewiesen (Raynal et al., 1994). Zumindest für die Annexine II und VI ist bekannt, dass sie 2 Lipidbindungsstellen in einem Molekül vereinigen. Relativ große Unterschiede zwischen den einzelnen Annexinen gibt es sowohl bezüglich der Ca^{2+} -Konzentrationen, die zur Phospholipidbindung notwendig sind, als auch bezüglich der Potenz, Membranen zu aggregieren. Die Annexine I und II brauchen lediglich submikromolare Ca^{2+} -Konzentrationen, Annexin V hingegen Konzentrationen im mittleren mikromolaren Bereich zur halbmaximalen Bindung (Gerke et al., 1997).

Die Identifikation von Proteinbindungspartnern lieferte weitere Hinweise über mögliche Funktionen der Annexine. Zu den bis jetzt bekannten Proteinen, die an einzelne Annexine binden, zählen Mitglieder der S100-Proteinfamilie (Erikson et al., 1984), Zytoskelettproteine sowie Elemente extrazellulärer Strukturen. Bei den Zytoskelettproteinen handelt es sich um F-Aktin, das an die Annexine I, II und VI bindet (Glenney et al., 1986; Gerke et al., 1984; Glenney et al., 1986), und Mitglieder der Spektrinfamilie, die mit Annexin II und VI interagieren (Gerke et al., 1984; Watanabe et al., 1994). An Elementen extrazellulärer Strukturen wurden Kollagen, das mit Annexin V assoziiert (Pfäffle et al., 1988), Tenascin C (Chung et al., 1994) und Tissue Plasminogen Activator (Hajjar et al., 1994), die mit Annexin II in Wechselwirkung treten, und das Apolipoprotein A1, welches die Annexine I und VII bindet, gefunden (Brownawell et al., 1996).

Annexine wurden mit vielen verschiedenen biologischen Vorgängen in Verbindung gebracht. Wenigstens einzelnen Annexinen wurden Aufgaben innerhalb der Endo- und Exozytose, im transmembranären Ionentransport, bei Entzündungsvorgängen und bei der Blutgerinnung zugerechnet.

Die Vermutung, dass Annexine im endo- und exozytotischen Membranverkehr eine Rolle spielen könnten, basieren auf mehreren Beobachtungen. Die Lokalisation vieler Annexine und die Fähigkeiten zur Bindung an Membranphospholipide und zur Aggregation von Membranen, legen eine Rolle im Andockungs- und Fusionsprozess von endo- und exozytotischen Vesikeln nahe. Dazu passt auch, dass einige mit Bestandteilen des Zytoskeletts interagieren können. Im Mittelpunkt des Interesses standen in diesem Zusammenhang die Annexine I, II, VI und XIIIb (Gerke et al., 1997).

Ein relativ umstrittenes Forschungsfeld ist die Implikation der Annexine mit der Funktion des Ionenkanals. Zwar wurde in einigen in-vitro-Studien gezeigt, dass insbesondere die Annexine I, V und VII transmembranär selektiv Ca^{2+} -Ionen leiten können. Auch die Analyse der räumlichen Struktur, bei der eine zentrale Pore in der Mitte als Leitweg für Ionen gefunden und die

Begrenzung der Pore durch saure Aminosäuren für eine Kationenselektivität verantwortlich gemacht wurden, sprechen für diese Möglichkeit. Andererseits wurde für bestimmte Moleküle, die im physiologischen Rahmen auf keinen Fall Ionenkanalfunktion haben können, schon gezeigt, dass sie in-vitro Ionen über Membranen leiten. Da Experimente dazu an lebenden Zellen noch fehlen, muss dieses Gebiet innerhalb der Annexinforschung noch mit Zurückhaltung betrachtet werden (Gerke et al., 1997).

Antiinflammatorische und antikoagulatorische Eigenschaften wurden für einzelne Annexine auch schon beschrieben, allerdings gibt es noch keinen Aufschluss darüber, ob Annexine überhaupt in nennenswertem Maße sezerniert werden. Deswegen ist eine physiologische Bedeutung unsicher (Gerke et al., 1997).

2.3.2 Annexin VI

Das Annexin VI wurde 1984 erstmals aus einer Plasmamembranpräparation menschlicher Lymphozyten isoliert (Owens et al., 1984). Die Annexin-Familie war noch nicht bekannt, weswegen das Protein damals und in den darauffolgenden Jahren unter verschiedenen Namen, wie z.B. Calelectrin (Südhof et al., 1988) oder p68 (Moss et al., 1990) in der Literatur auftauchte. Erst mit der Entdeckung weiterer Proteine ähnlicher Struktur und Sequenz wurde klar, dass es sich um eine Genfamilie handelt, in die das Annexin VI einzuordnen ist.

2.3.2.1 Molekularstruktur und Isoformen

Humanes Annexin VI besitzt ein Molekulargewicht von 68 kd und besteht aus insgesamt 674 Aminosäuren. Im Gegensatz zu den meisten anderen Annexinen setzt es sich aus 2 Annexinkernen und dementsprechend 8 Annexin-Wiederholungen zusammen. Die beiden Kerne werden durch ein Verbindungssegment einer Länge von 44 Aminosäuren verbunden, während die Abschnitte zwischen den Annexin-Wiederholungen von variabler Länge sind. Der ersten Wiederholung geht eine Sequenz aus 24 Aminosäuren voraus, dabei handelt es sich um die N-terminale Domäne (Südhof et al., 1988). Wegen der auffälligen Sequenzhomologie zwischen den beiden Annexinkernen wird angenommen, dass das Annexin VI durch Genduplikation aus einem Vorläuferprotein mit 4 Wiederholungssegmenten entstanden ist (Smith et al., 1994).

In Kristallstrukturanalysen zeigt sich das Protein in 2 scheibenförmige Hälften geteilt. Jede Hälfte besteht aus 4 Domänen, die sich aus 5 α -Helices (A-E) zusammensetzen. Die Helices ordnen sich im Raum zu einer rechtshändigen Superhelix an. Kurze Schleifen verbinden die

Helices und diejenigen zwischen Helix A und B sowie D und E werden als potentielle Bindungsorte von Ca^{2+} angesehen. Diese Orte befinden sich allesamt an der leicht konvexen Seite der Annexinkerne und ermöglichen wahrscheinlich die Bindung an Membranphospholipide (Avila-Sakar et al., 1998; Driessen et al., 1992).

Das oftmals beobachtete Auftauchen einer Doppelbande im SDS-PAGE führte zur Entdeckung zweier Isoformen des Annexin VI. Die cDNAs unterscheiden sich durch ein 18 Nukleotide umfassendes Insert, das für 6 Aminosäuren am Beginn der 7. Wiederholungsdomäne codiert. Geringe biochemische Differenzen (Moss et al., 1990; Kaetzel et al., 1994) machen es möglich, dass die beiden Isoformen auch unterschiedliche Funktionen besitzen. Erste Hinweise dafür wurden bereits gefunden (Fleet et al., 1999).

2.3.2.2 Intrazelluläre Lokalisation und Gewebsverteilung

Annexin VI konnte bis jetzt in fast allen Zelltypen nachgewiesen werden. Die Liste umfasst u.a. hämatopoetische Zellen, Hepatozyten, Muskelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen (Owens et al., 1984; Weinman et al., 1994; Hazarika et al., 1991). Allein in der Plattenepithelkarzinomzelllinie A431 (Smythe et al., 1994) und in Erythrozyten von Säugetieren (Clark et al., 1991) scheint das Protein nicht exprimiert zu werden.

Ebenso breit gefächert ist offensichtlich die intrazelluläre Verteilung des Annexin VI. Zwar wurde es auffallend häufig an der Plasmamembran lokalisiert (Owens et al., 1984; Tagoe et al., 1994), doch auch Leberzellmitochondrien (Rainteau et al., 1995), sarkoplasmatisches Retikulum von quergestreiften Muskelzellen (Hazarika et al., 1991) und Phagosomen einer Makrophagenzelllinie (Desjardins et al., 1994) gehören zu den ermittelten Aufenthaltsorten des Proteins. Trotz einiger Kontroversen scheint das Protein auch mit dem endozytotischen Kompartiment assoziiert zu sein: In Rattenleberendosomen wurde eine spezifische Anreicherung gefunden (Jäckle et al., 1994), in Rattenhepatozyten (Ortega et al., 1998) und WIF-B-Zellen (Pons et al., 2000) lokalisierte es sich an apikalen Endosomen und in normalen Rattennierenzellen kolokalisierte es mit dem prälysosomalen Marker Igp120 (Pons et al., 2000).

2.3.2.3 Biochemische Eigenschaften

Gleichzeitig mit der erstmaligen Isolierung des Annexin VI aus einer Lymphozytenplasmamembran wurde auch dessen Fähigkeit zur Ca^{2+} -Bindung festgestellt (Owens et al., 1984). Diese scheint Voraussetzung zu sein für die Bindung verschiedener Phospholipide und Fettsäuren. Das Protein zeigte in Bindungsversuchen eine ausgeprägte Affinität vor allem für negativgeladene Phospholipide wie Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin und Cardiolipin

sowie Phosphatidylethanolamin. Hingegen konnte keine Assoziation mit den positivgeladenen Phospholipiden Phosphatidylcholin und Sphingomyelin detektiert werden (Edwards et al., 1987). Auch Fettsäuren wie Arachidonsäure, Palmitinsäure und Oleinsäure wurden als Interaktionspartner identifiziert (Edwards et al., 1990). Zwar wurden in den entsprechenden in-vitro-Versuchen teilweise Ca^{2+} -Konzentrationen benötigt, die oberhalb des physiologischen intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels lagen. Doch lassen die Existenz von Zellkompartimenten mit höheren Ca^{2+} -Konzentrationen oder die Anwesenheit von Interaktionspartnern, die die Ca^{2+} -Sensitivität des Annexin VI erhöhen, die physiologische Relevanz offen (Creutz, 1992).

In anderen in-vitro-Versuchen förderten einige Annexine die Aggregation und Fusion von Phospholipidvesikeln. Im Gegensatz dazu hatte das Annexin VI interessanterweise einen inhibitorischen Effekt (Blackwood et al., 1990).

Polymerbildungen wurden für mehrere Annexine berichtet und auch Annexin VI scheint dazu in der Lage. Zwar herrscht Unklarheit über das Ausmaß der Ca^{2+} -abhängigen Selbstassoziation, die sowohl in Lösung als auch an Membranoberflächen beobachtet wurde. Doch wurde die physiologische Funktion darin vermutet, Membrankontakte zu erleichtern (Zaks et al., 1991).

Eine weitere wichtige biochemische Eigenschaft ist die Fähigkeit zur Bindung einiger Proteine. Hierfür wird gemeinhin die N-terminale Domäne verantwortlich gemacht, da sie für jedes Annexin spezifisch ist. Allerdings liegen nur wenig konkrete Daten über die tatsächlichen Bindungsregionen innerhalb des Proteins vor.

2.3.2.4 Funktionen und assoziierte Proteine

Die Identifikation einiger Proteine, die mit Annexin VI interagieren, gaben verschiedenen Forscherteams Anlass, Annexin VI Rollen in unterschiedlichen biologischen Prozessen zuzuordnen. Dazu gehören die Modulation von Ionenkanälen, antiinflammatorische Eigenschaften, Aufgaben innerhalb der Signaltransduktion, Funktionen im Membranverkehr und in der Verknüpfung des Zytoskeletts mit Membranen.

Die selektive Modulation eines Ca^{2+} -Kanals wurde bei in-vitro-Versuchen an schweren Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums entdeckt. Annexin VI führte hier Ca^{2+} -abhängig zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit und einer verlängerten mittleren Öffnungszeit. Gleichzeitig wurde das Protein immunologisch im intraluminalen Raum von schweren Vesikeln des Sarkoplasmatischen Retikulums lokalisiert. Deswegen schlugen die Autoren vor, dass das Protein eine physiologisch wichtige Rolle bei der Kopplung von Erregung und Kontraktion in Muskelzellen besitzt (Diaz-Munoz et al., 1990).

Mögliche antiinflammatorische Eigenschaften beruhen auf der Fähigkeit, Arachidonsäure zu binden. Eventuell kommt es dadurch indirekt zu einer Inhibition der Phospholipase A2, durch die normalerweise inflammatorisch wirksame Metaboliten entstehen. Auf der anderen Seite gibt es keine Hinweise einer aktiven Sekretion des Proteins, was für antiinflammatorische Aufgaben Voraussetzung wäre. Somit ist eine derartige physiologische Rolle fraglich (Edwards et al., 1990).

Die Interaktion mit mehreren Proteinen, die wohldefinierte Funktionen innerhalb der zellulären Signaltransduktion besitzen, machen es möglich, dass das Annexin VI selbst Aufgaben innerhalb dieser biologischen Prozesse übernimmt. Unter anderem wurden Assoziationen mit der Proteinkinase C (Schmitz-Pfeiffer et al., 1998), dem Ras-spezifischen GTPase-aktivierenden Protein P120^{GAP} (Davis et al., 1996) sowie einer 56 kd-Proteinkinase in aktivierten Jurkatzellen (Dubois et al., 1995) gefunden. Eine präzise Funktion konnte dem Protein aber bisher nicht nachgewiesen werden.

Die weitaus meisten Bemühungen in der Annexin VI-Forschung konzentrieren sich auf potenzielle Aufgaben innerhalb des intrazellulären Membranverkehrs und der Verknüpfung von Membranen mit dem Zytoskelett. Dieses basiert hauptsächlich auf 2 Gegebenheiten: Einerseits wurden Elemente des Zytoskeletts oder damit assoziierte Proteine als Bindungspartner identifiziert. Andererseits ergaben viele Lokalisationsstudien, dass sich der bevorzugte Aufenthaltsort des Proteins an der Zellmembran oder intrazellulären Membransystemen befindet. In den letzten Jahren wurde deswegen verstärkt nach Funktionen vor allem innerhalb endozytischer Prozesse gesucht.

Bei in-vitro Versuchen an isolierten Plasmamembranen konnte gezeigt werden, dass mit Annexin VI-befreitem Zytosol keine Abknospung von Coated Pits mehr stattfand. Annexin VI allein führte nur zu einer mäßigen Knospungsaktivität, hingegen die Zugabe von Annexin VI zum Annexin VI-befreiten Zytosol zu voller Aktivitätswiederherstellung (Lin et al., 1992).

Als mögliche Interaktionspartner bei derartigen Vorgängen kommen Moleküle in Frage, welche die physikalischen Veränderungen während des Abknospungsprozesses vermitteln. Spektrin und Aktin stellen in diesem Zusammenhang die beiden wichtigsten Zytoskelettelemente dar, die bis jetzt als Bindungspartner des Annexin VI identifiziert worden sind (Watanabe et al., 1994; Hosoya et al., 1992). Auf der anderen Seite ko-immunpräzipitierte Annexin VI bei Charakterisierungsstudien von Klathrinvesikeln auch mit Dynamin, welches für den letzten Schritt der Vesikelabtrennung von der Plasmamembran zuständig ist (Turpin et al., 1997).

Darüber hinaus gehen Interpretationen, die dem Protein sogar Steuerungsfunktionen innerhalb des endozytischen Membranverkehrs zuweisen. In einer Studie wurde die Bedeutung der

Bindung des Annexin VI an Spektrin für das Abknospen der Coated Pits von der Plasmamembran erkannt. Bei der Blockade dieser Interaktion trat eine offensichtlich neue Population von Endosomen auf, die auf ihrem intrazellulären Weg vermutlich fehlgeleitet wurde. Das mit diesen Endosomen transportierte LDL wurde nachweislich nicht mehr der Degradation zugeführt. Daraus wurde geschlossen, dass durch das Abknospen ohne das Annexin VI den Endosomen eine wichtige Information für die Wechselwirkung mit den intrazellulären Zytoskelettstraßen fehlte (Kamal et al., 1998).

2.4 Bedeutung der Endozytose bei verschiedenen Krankheitsprozessen

Die verschiedenen Endozytosewege ermöglichen den Eintritt von Molekülen in die Zelle und sind deswegen für einen reibungslosen Ablauf des Zellstoffwechsels essentiell. Defekte oder Fehlregulationen können dementsprechend zu Zellschädigungen und Krankheiten führen.

Ein erhöhter Serumcholesterinspiegel stellt einen wichtigen Faktor in der Entstehung der Atherosklerose dar. Bei der familiären Hypercholesterinämie (Hyperlipoproteinämie Typ II) kommt es durch genetisch bedingte Mutationen im LDL-Rezeptor oder im Apoprotein B100 zu einer verminderten oder nicht mehr vorhandenen Internalisation von LDL. Der Serumcholesterinspiegel kann exzessiv hohe Werte annehmen und betroffene Patienten besitzen ein erhöhtes Risiko, frühzeitig an kardiovaskulären Ereignissen zu versterben (Löffler et al., 1997).

Viren und Toxine gelangen über verschiedene Endozytosemechanismen in die Zelle, um dort den physiologischen Zellstoffwechsel zu verändern. So bindet z.B. das Diphtherietoxin über sein B-Fragment an die Plasmamembran der Zelle und bewirkt dadurch die klathrinabhängige Endozytose. Durch einige Modifikationen gelangt das Molekül über die Endosomenmembran ins Zytoplasma, wo es mit Hilfe des A-Fragments seine pathogene Wirkung auf die Proteinsynthese ausüben kann (London, 1992). Hingegen stellen beim Cholera-toxin (Parton, 1994) oder dem Simian Virus 40 (Anderson et al., 1996) wahrscheinlich Caveolae die Eintrittspforte zur Zelle dar.

Auch bei den Prionenkrankheiten und beim Morbus Alzheimer stehen die Endozytoseprozesse im Mittelpunkt des Forschungsinteresses (Mukherjee et al., 1997). Bis jetzt liegen aber noch nicht genügend Ergebnisse vor, um die genaue Rolle zu definieren.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

	<u>Firma</u>
Agarosegelelektrophoresekammer	Bio-rad
Auto-Gamma Cobra 2 Counter	Packard
Autoradiographiekammer mit Verstärkerfolien	Rego
Bioclav	Schütt
End-über-End-Schüttler Reax 2	Heidolph
Gelelektrophoresekammer für Minigele	Biometra
Gelelektrophoresekammer P10 DS	Peqlab
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf
Inkubator mit Schüttelvorrichtung B6420	Heraeus Instruments
Kühlzentrifuge Universal 16 R	Hettich
Magnetrührer mit Heizung Ikamag RH	Janke & Kunkel
Mikroskop Axiovert 100 mit Ph3 Plan-Apochromat 63er Objektiv	Zeiss
pH Meter Φ 50	Beckmann
Photometer Lambda 20	Perkin Elmer
Pipettierhilfe Accujet	Brand
Powersupply Frigostat	Desaga
Präzisionspipetten	Eppendorf
Schüttler Certomat TC-2	B-Braun Biotech
Sonifier B12	Branson Sonic Power
Trans-Blot Zelle	Bio-rad
Ultrazentrifuge TL-100	Beckmann
UV-Detektor mit Digitalkamera	Intas
Vortexer Ika-Vibor-Fix VF2	Janke & Kunkel
Zellinkubator IR1500	Flow Laboratories
Zellkultur-Werkbank	Baker

Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus Instruments
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge J2HC	Beckmann
Zentrifuge Universal 16 R	Hettich
Zentrifuge Varifuge RF	Heraeus Christ

3.1.2 Verbrauchsmittel

	<u>Firma</u>
Deckgläschen (20 x 20 mm)	Superior
Dialyseschlauch	Serva
Einmalspritzen (1ml)	Becton Dickinson
Gel-Blotting-Papier GB 002	Schleicher & Schüll
Injektionskanülen Sterican 27 G	Braun
Messküvetten halb-mikro (10 x 10 x 45 mm)	Greiner Labortechnik
PD 10 Säule	Pharmacia Biotech
Pipetten (Glas)	Brand
Pipetten (Plastik)	Becton Dickinson
Pipettenspitzen	Greiner Labortechnik
Plasmid-Maxipräparationskit	Quiagen
Protran Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schüll
Quick-Seal-Röhrchen	Beckmann
Reagenzgläser (3,5 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße	Greiner Labortechnik
Röntgenfilm Biomax MR (18 x 24 cm)	Kodak
Sterilfilter (0,45 µm)	Nunc
Zählröhrchen (5 ml) PP test tube und Verschlüsse	Packard
Zellschaber	Costar
Zentrifugenbecher	Beckmann

3.1.3 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, waren alle Chemikalien von höchstem Reinheitsgrad.

	<u>Firma</u>
2-Mercaptoethanol	Serva
Acrylamid(30%)-Bisacrylamid(0,8%)	Boehringer Mannheim
Agarose	Bio-Rad
AgNO ₃ (Silbernitrat)	Merck
Albumin Standard (2mg/ml)	Pierce
Ammonium Persulfat (AP)	Bio-Rad
Benzamide	Sigma
Borsäure	Merck
Bovines Serum Albumin	Sigma
CaCl ₂ (Calciumchlorid)	Merck
Chloroform	Merck
CuSO ₄ (Kupfersulfat)	Merck
Dithioerythritol (DTT)	Sigma
ECL-Chemoluminiszenz-Kit	Pharmacia Biotech
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Merck
Ethanol (CH ₃ CH ₂ OH)	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
Ethylenglykol-bis-N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA)	Sigma
Ficoll (Typ 400-D1)	Sigma
Fugene 6 Transfection Reagent	Boehringer Mannheim
Glutathion Sepharose 4B	Pharmacia Biotech
Glutathion	Sigma
Glycerol	Sigma
Glycin	Sigma
HCl (Salzsäure)	Merck
Hefeextrakt	Difco
Heparin	Roche
Iodmonochlorid	Merck

Isopropanol (2-Propanol)	Merck
Kaliumacetat	Merck
Kaliumbromid	Merck
Kaliumiodid	Merck
Kaliumnatriumtartrat	Merck
KCl (Kaliumchlorid)	Merck
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck
Methanol (CH ₃ OH)	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad
Na ₂ CO ₃ (Natriumcarbonat)	Merck
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O (di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat)	Merck
NaCl (Natriumchlorid)	J.T. Baker
NaOH (Natronlauge)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Non-Fat Dry Milk (Milchpulver)	Bio-Rad
One Phor-all Plus-Puffer	Pharmacia Biotech
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Merck

Zur Herstellung des Proteaseninhibitorcocktails (PIC) wurden die folgenden Antiproteasen eingesetzt:

Antipain	Calbiochem
Chymostatin	Calbiochem
Leupeptin	Calbiochem
Pepstatin A	Calbiochem

Als Proteingrößenmarker wurden verwendet:

Biotinylierter Proteinmarker (Western Blot) [35 µg/ml]	Biolabs
Bovines Leber-Annexin VI [0,5 mg/ml]	Biodesign International
Rainbow Coloured Protein Weight Markers RPN 756	Pharmacia Biotech

Als DNA-Größenmarker wurde verwendet:

Lambda DNA-HindIII / Φ X-174 DNA-HincII [500 μ g/ml]	Pharmacia Biotech
---	-------------------

Als Radiochemikalie wurde verwendet:

125 I-Iod (3,7 Mbq/ μ l)	Amersham Life Science
-----------------------------------	-----------------------

Zum Färben wurden folgende Reagenzien benutzt:

Bromphenolblau (3',3'',5',5''-Tetrabromophenolsulfonephthalein)	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G-250	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck
Ponceau-S Lösung 0,2% in 3% TCA	Serva
Protein-Silberfärbekit	Pharmacia Biotech

3.1.4 Zellkultur und Bakterien

Die Zelllinie CHO-K1 (Puck et. al., 1968) wurde für transiente und stabile Gentransferexperimente, Proteinextraktionen und radioaktive Aufnahme- und Degradationsexperimente benutzt.

Firma

Zellkulturmedien:

DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
F12 (HAM) Nutrient Mixture	Gibco-Brl
FCS (Fötale Kälber Serum)	Gibco-Brl
Geneticin G-418 Sulfat	Gibco-Brl
L-Glutamin	Gibco-Brl
PBS Dulbeccos	Gibco-Brl
Penicillin/Streptomycin	Gibco-Brl
Trypsin-EDTA Lösung	Gibco-Brl

Zellkulturmaterial:

Cryoröhrchen (1,8 ml)	Nunc
Mehrfachkulturschalen (6-well + 12-well)	Costar
Gewebekulturschalen (Ø 14,5 cm)	Nunc
Plastikzentrifugenröhrchen (15 ml + 50 ml)	Falcon/Becton-Dickinson
Zählkammer	Thomae
Zellkulturflaschen (72 cm ² + 162 cm ²)	Costar

Der kompetente Bakterienstamm E. coli JM 109 (Yanish-Peron et al., 1985) wurde für Transformationen, Klonierungen, Präparationen von Plasmid-DNA und Proteinextraktionen benutzt. Der Stamm wurde kommerziell bei der Firma Promega erworben.

Material für Bakterienkultur:

Bakterienkulturschalen (9 cm)	Costar
Sterile Röhrchen (17,0/100 mm)	Greiner Labortechnik
Einmal Impfschlingen	Nunc

Medien und Chemikalien zur Bakterienkultur:

Agar	Difco
Ampicillin	Sigma
Hefeextrakt	Difco
Isopropyl β -D-Thiogalactosidase (IPTG)	Pharmacia Biotech
Trypton	Difco

3.1.5 Antikörper

Primäre Antikörper in Western Blots:

Bezeichnung/Firma	Ursprung	Antigen	Herkunft	Verdünnung
AB3718	Schaf	Synthetisches Peptid des Annexin VI N-Terminus: MAKIAQGAMYR aus <i>Rattus norvegicus</i> (Grewal et. al., 2000)	Polyklonal (Affinitätsgereinigt)	1:250
1CO908	Kaninchen	Annexin VI aus Endosomenfraktionen (Ortega et. al., 1998)	Polyklonal	1:100
D 25520/Becton Dickinson	Maus	Dynamin	Monoklonal	1:1000
S1515/Sigma	Kaninchen	humanes Spektrin	Polyklonal	1:400
3F10/Roche	Ratte	Hämagglutinin	Monoklonal	1:500
#711/Prof. Dr. J. Herz (Dallas)	Kaninchen	LDL-Rezeptor	Polyklonal	1:500
C13630/Becton Dickinson	Kaninchen	Caveolin	Polyklonal	1:7500

Sekundäre Antikörper zur Immundetektion in Western Blots:

Firma

Hase-anti-Schaf F(ab')₂-Fragmente HRP-konjugiert

Jackson Immuno
Research

Ziege-anti-Hase F(ab')₂-Fragmente HRP-konjugiert

Jackson Immuno
Research

Ziege-anti-Maus F(ab')₂-Fragmente HRP-konjugiert

Jackson Immuno
Research

Ziege-anti-Ratte F(ab')₂-Fragmente HRP-konjugiert

Jackson Immuno
Research

Als Antikörper gegen den biotinylierten Protein-Marker wurde verwendet:

Anti-Biotin-Antikörper HRP-konjugiert Sigma

3.1.6 Vektoren, Restriktionsendonukleasen und Oligonukleotide

Firma

Vektoren:

pCMVSPORT-βgal	Gibco-Brl
pGEX-KG	Pharmacia Biotech
pGEMT-easy	Promega
pcDNA3.1+	Invitrogen
pCMVhLDLR	Arbeitsgruppe Beisiegel

Restriktionsendonukleasen:

Enzym	Konzentration	Schnittstelle	Firma
AspI	10000 U/ml	G↓GTACC	Boehringer
HindIII	18000 U/ml	A↓AGCTT	Pharmacia Biotech
XbaI	11000 U/ml	T↓CTAGA	Pharmacia Biotech
BamHI	10000 U/ml	G↓GATCC	Pharmacia Biotech
NcoI	5000 U/ml	C↓CATGG	Pharmacia Biotech

Oligonukleotide:

Zur Konstruktion und Sequenzierung von Annexin VI- und Mutanten-exprimierenden Vektoren wurden die folgenden Oligonukleotide verwendet:

Name	Position/Firma (Ratten Annexin VI cDNA)	Sequenz
Anx1-Primer	+1-23	5'-ATGGCCAAAATAATAGCACAGGGTGC-3'
Anx2-Primer	+1998-2019	5'-GTCTTCTCCACCACAGAGCGC-3'
Anx15-Oligo	+1-21/44-53	5'-GCAAGCTTGCCGCCACCATGGCCAAAATAGCACA- GGGTACGACTTCGC-3'
Anx16-Oligo	+1-53	5'-GCAAGCTTGCCGCCACCATGGCCAAAATAGCACA- GGGTGGCATGGCCCGAGGC-3'
T7-Primer	Pharmacia Biotech	5'-GGGCGAATTGGGCCCAGCGTCGCATGCTCCCGGC- CGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATT-3'
SP6-Primer	Pharmacia Biotech	5'-AGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCAT- ATCCTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGT- GATT-3'

3.1.7 Enzyme

	<u>Firma</u>
E. coli DNA-Polymerase I (Klenow-Polymerase) [2,000 U/ml]	Boehringer
T4 DNA-Ligase [6,200 U/ml]	Promega
Taq DNA Polymerase [5,000 U/ml]	Pharmacia Biotech
Thrombin Protease [>7,500 U/mg]	Pharmacia Biotech

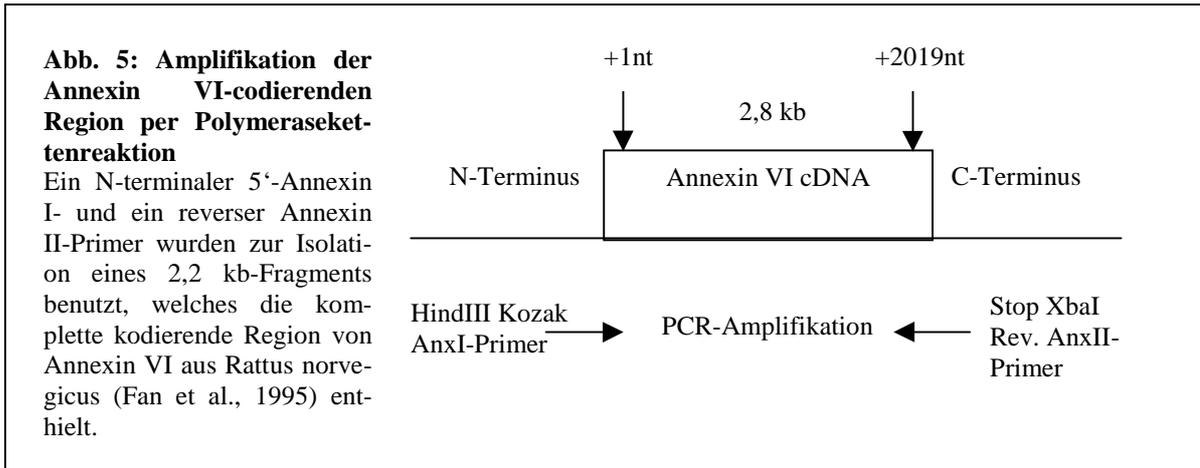
3.2 Methoden

3.2.1 Klonierungen

Rekombinante Plasmide wurden nach den Standardmethoden von Sambrook et al. (1989) hergestellt und charakterisiert.

Erzeugung von Annexin VI-Expressionsvektoren:

Die gesamte Annexin VI-cDNA wurde aus einer Rattenleber Genom-Bibliothek (Uni-Zap XR) der Firma Stratagene isoliert (Abb. 5).



Nach der Subklonierung in einen pGEMT-easy Vektor wurde das PCR-Fragment mit Hilfe eines T7- und eines reversen SP6-Primers sequenziert. Der anschließende Verdau mit den Enzymen Xba und HindIII ergab ein Annexin VI-Fragment, welches in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1+ kloniert wurde und somit die pcDNAanx6 lieferte. Zur Expressionskontrolle diente ein Cytomegalievirus-Promoter.

Herstellung der Mutanten von Annexin VI:

C-terminale Deletionsmutante 1-175:

Die pcDNAanx6 wurde AspI-verdaut, mit der Klenow Polymerase behandelt und dann einem HindIII-Verdau unterzogen. Das dabei entstehende Hd-(Asp-)Fragment wurde isoliert und mit dem pcDNA3.1+-Vektor religiert. Dieses lieferte del 1-175.

N-terminale Deletionsmutante del 8-15:

Zur Konstruktion dieser N-terminalen Mutante wurde die Annexin VI cDNA mit dem Anx15-Primer amplifiziert. Dieses 5'-Oligonukleotid enthielt eine interne Deletion von 22 Nukleotiden, entsprechend del 8-15. Auf die Subklonierung in den pGEMT-Vektor und anschließende Sequenzierung folgte ein HindIII-XbaI-Verdau. Das isolierte Fragment wurde in den pcDNA3.1+-Vektor kloniert.

N-terminale Punktmutante aaTyr→Ala:

Für diese N-terminale Mutante wurde als 5'Primer in der Polymerasekettenreaktion ein Oligonukleotid (Anx16-Primer) verwendet, das als zehnte Aminosäure ein Alanin codiert.

3.2.2 Restriktionsverdau

1 µg DNA wurde mit Restriktionsenzymen der Firma Pharmacia Biotech unter Zugabe von einer vom Hersteller vorgegebenen Menge 10 x One-Phor-All plus Puffer (100 mM Magnesiumacetat, 100 mM Tris-acetat, 500 mM Kaliumacetat) verdaut. Durch Zugabe von Aqua bidest wurde das Volumen auf 10 µl erhöht und anschliessend für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Eine Agarosegelelektrophorese diente der Auftrennung der DNA-Fragmente.

3.2.3 Agarosegelelektrophorese

Den Proben wurde zum Beschweren 1,5 µl Probenpuffer hinzugegeben, der sich aus 1 x TBE (90 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA) 0,05% Bromphenolblau und 8,75% Ficoll zusammensetzte. Als Größenmarker wurde ein Lambda DNA-HindIII-Marker (Pharmacia) benutzt.

Ein einprozentiges Agarosegel wurde zur Auftrennung von DNA-Fragmenten benutzt. Hierzu wurde 1 g Agarose in 100 ml 1 x TBE unter Erwärmung aufgelöst. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurde fluoreszierendes Ethidium-Bromid zugegeben, dessen Endkonzentration bei 0,85 µg/ml lag. Das Gemisch wurde nun in einen Schlitten gegossen und ein Kamm zur Ausbildung von Taschen aufgesteckt. Die weitere Abkühlung ergab die vollständige Polymerisation der Agarose, so dass der Kamm entfernt und der Schlitten in die Elektrophoresekammer überführt werden konnte. Hier wurde die Agarose mit 1 x TBE bedeckt und mit den Proben beladen. Eine Spannung von 60 Volt für 1,5 bis 2 Stunden erbrachte eine ausreichende Laufstrecke in Richtung Anode, um die bei neutralem pH negativ geladenen DNA-Fragmente aufzutrennen. Die Ethidiumbromid/DNA-Komplexe wurden unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

3.2.4 Transformation von Bakterien

Die Transformation von Bakterien wurde nach den Standardmethoden von Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

Kompetente *Escherichia coli*-Bakterien vom Stamm JM109 wurden bei – 80°C gelagert und vor der Transformation für 10 Minuten auf Eis aufgetaut. 25 µl der Bakteriensuspension wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und 10 bis 100 ng DNA zugegeben. Eine zwanzigminütige Inkubation auf Eis diente der Inhibition der Zellwandsynthese, so dass die DNA ungehindert in die Zellen aufgenommen werden konnte. Die nachfolgende einminütige Erwärmung auf 42°C in einem Heizblock führte zur Induktion der Zellwandsynthese. Danach wurden die Bakterien wieder für 2 Minuten auf Eis gelegt. Mit Hilfe von 600 µl LB (Luria Bertani)-

Medium (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl in 1 Liter Aqua dest; pH = 7.0) wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37°C in einem Schüttelinkubator vermehrt. Zwei ampicillinhaltige (100 µg/ml) LB-Agar-Bakterienkulturschalen wurden nun mit 200 bzw. 400 µl der Bakteriensuspension beimpft. Autoklavierter LB-Agar enthielt 15 g Agar in 1 Liter LB-Medium. Die Schalen wurden nach zehnminütiger Trocknung bei Raumtemperatur umgedreht bei 37°C über 12 Stunden inkubiert, so dass am nächsten Morgen sichtbare, vereinzelt stehende Bakterienkolonien zu sehen waren. Die Platten wurden luftdicht abgeschlossen und bei 4°C gelagert.

3.2.5 DNA-Mini- und Maxipräparation

Gemäß den Standardmethoden von Birnboim et al. (1979) wurden transformierte und selektionierte *Escherichia coli* (JM 109) benutzt, um mittels Mini- und Maxipräparation Plasmid-DNA zu gewinnen. Für diese Verfahren wurden Kits der Firma Qiagen benutzt.

Minipräparation:

Eine ausgewählte Bakterienkolonie wurde über Nacht in 1,5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium bei 37°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde dann für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert und das entstandene Pellet in 200 µl Puffer 1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA und 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Mit Hilfe von 200 µl des Quiagen-Puffers 2 (0,2 M NaOH, 1% Natriumdodecylsulfat) wurden die Bakterien auf Basis einer pH-Wert-Steigerung lysiert. Die fünfminütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur bewirkte zusätzlich zweierlei: Das Natriumdodecylsulfat solubilisierete die Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellmembranen und das NaOH denaturierte die chromosomale und Plasmid-DNA. Zur Neutralisation wurden 200 µl eisgekühlter Quiagen-Puffer 3 aus 3 M Kaliumacetat zugegeben, was wegen der erhöhten Salzkonzentration auch noch die genomische DNA, Zelltrümmer und Proteine zur Präzipitation brachte. Hingegen renaturierte die kleinere kovalent geschlossene Plasmid-DNA, die somit in Lösung blieb. Zur Trennung der beiden Fraktionen wurde das Gemisch 10 Minuten auf Eis gelegt und dann für 10 Minuten bei 13000 rpm in einer Heraeus Biofuge 13 zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die darin befindliche Plasmid-DNA mit zweifachem Volumen Ethanol absolut gefällt und für 15 Minuten bei 13000 rpm pelletiert. Eine Waschung mit 70% Ethanol diente der Entfernung präzipitierter Salze und der Löslichkeitserhöhung. Es folgten eine erneute Zentrifugation, eine Lufttrocknung des Pellets und die Resuspension dieses Pellets in 30-50 µl Aqua bidest. Bei hoher Effizienz ergab die Präparation 5-8 µg Plasmid-DNA, die bei -20°C gelagert wurde.

Die in der Minipräparation gewonnene Plasmid-DNA wurde nach Restriktionsenzymverdau in der Agarosegelelektrophorese kontrolliert, bevor eine Maxipräparation begonnen wurde.

Maxipräparation:

1 ml Bakterienkultur wurde in 200 ml ampicillinhaltigem Medium für 12-16 Stunden bei 37°C geschüttelt (120 rpm), was eine Dichte von ca. 1×10^9 Zellen pro ml ergab. Anschließend wurde die Suspension mit jeweils 10 ml der beschriebenen Quiagen-Puffer 1,2 und 3 behandelt. Der Plasmid-DNA-haltige Überstand wurde nun in eine mit Quiagen-QBT-Puffer (750 M NaCl, 50 mM MOPS (3-N-morpholinopropansulfonsäure), 15% Isopropanol und 0,15% Triton X-100) equilibrierte Quiagen-tip-Säule gegeben. Die Säule war mit Diethylaminoethanol beschichteten Silikat-Partikeln bestückt. Diese Partikel traten, abhängig von pH-Wert und Salzkonzentration, mit den Phosphatgruppen der Plasmid-DNA in Wechselwirkung. Zur Entfernung von RNA- und Proteinresten wurde die Säule zweimal mit 30 ml Quiagen-QC-Puffer (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Isopropanol; pH 7.0) gewaschen. Zur Elution der gebundenen DNA wurden 15 ml des Quiagen-QF-Puffers verwendet, der aus 1,25 M NaCl, 50 mM Tris, 15% Isopropanol (pH 8.5) bestand. Auf die Fällung mit 10,5 ml Isopropanol folgte eine dreißigminütige Zentrifugation bei 15000 rpm. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 100 µl Aqua bidest aufgenommen. Die Ausbeute betrug 0,5-2 mg DNA.

3.2.6 Zellkultur

Adhärente CHO-Zellen wurden in 72 cm²- oder 162 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Sie waren dazu mit 15 ml bzw. 30 ml Nährmedium bedeckt, das aus F12 (HAM) Nutrient Mixtu-re, 10% fötalem Kälberserum, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin bestand. Bei Zellklonen war dem Nährmedium zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks noch zusätzlich 1 mg/ml G-418 beigemischt. Für günstige Umgebungsbedingungen sorgte ein Zellinkubator, der eine Temperatur von 37°C, einen Luft-CO₂-Gehalt von 5% und gesättigte Luftfeuchtigkeit bot. Nach 2 bis 3 Tagen Wachstum und Vermehrung der Zellen im Zellinkubator mussten die Zellen ausgedünnt werden. Hierzu wurden die Zellen in einer sterilen Zellkulturwerkbank von ihrem alten Nährmedium befreit, einmal kurz mit PBS gewaschen und anschließend für eine Minute mit 5 ml bzw. 10 ml Trypsin-EDTA angedaut. Zum Stoppen der Proteolyse wurden 10 ml bzw. 20 ml Nährmedium zugegeben und die suspendierten Zellen je nach Bedarf ausgedünnt.

3.2.7 Ausplattieren von Zellen

2 Tropfen suspendierter Zellen wurden in eine Zählkammer überführt und quantifiziert. Entsprechend der ermittelten Zellzahl pro 1 ml wurde ein Aliquot in 6-well- oder 12-well-Mehrfachkulturschalen gegeben, welches mit Nährmedium auf ein Endvolumen von 2 ml bzw. 1,5 ml aufgefüllt wurde.

3.2.8 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Suspendierte Zellen wurden in Plastikzentrifugenröhrchen bei 1800 rpm für 5 Minuten in einer Eppendorf 5810 R abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Gefrierlösung (80% Nährmedium, 10% DMSO, 10% fötales Kälberserum) resuspendiert und anschliessend in Cryoröhrchen gegeben. Die Cryoröhrchen wurden mehrere Stunden lang bei 4°C vorgekühlt, bevor sie bei -80°C eingefroren wurden. Nach 3 Tagen erfolgte ein Transfer in flüssigen Stickstoff.

Zum Wiederauftauen wurden die Cryoröhrchen für 90 Sekunden bei 37°C erwärmt und der Inhalt in 10 ml Nährmedium aufgenommen. Es folgte eine Zentrifugation über 3 Minuten bei 1800 rpm, worauf der Überstand verworfen und das Pellet in Nährmedium resuspendiert wurde. Die Zellsuspension wurde zur Kultur wieder in eine Zellkulturflasche überführt.

3.2.9 Transfektion

Transiente Gentransferexperimente an CHO-Zellen wurden mit Fugene 6 Transfektionsreagenz (Boehringer) durchgeführt. Bei dieser Substanz handelte es sich um eine nicht-liposomale Mischung aus Lipiden in 80% Ethanol. Ein Gentransfer fand an Zellen statt, die 24 Stunden zuvor in eine 12-well Schale oder in eine 6-well Schale ausplattiert worden waren. Dabei hatte die Anzahl, gemäß der unterschiedlichen Grundfläche der Löcher, 1×10^5 /well bzw. 2×10^5 /well betragen, was dann zum Zeitpunkt der Transfektion eine etwa 80%ige Konfluenz ergab. Das Fugene 6 Reagenz wurde in F12 Nutrient Mixture überführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde tröpfchenweise auf die zu transfizierende Plasmid-DNA gegeben und für weitere 15 Minuten inkubiert. Die Löcher der Mehrfachkulturschalen wurden nun mit der aus Lipid-DNA-Komplexen bestehenden Lösung beträufelt und leicht geschüttelt. Vor weiterer Verwendung wurden die Zellen 16-24 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Verhältnis von DNA (μg) : Fugene 6 (μl) : F12 Nutrient Mixture (μl) betrug 1 : 2 : 100. Bei einer Mehrfachkulturschale mit 6 Löchern wurden 2 μg DNA/well, bei einer Mehrfachkulturschale mit 12 Löchern wurde 1 μg DNA/well transfiziert.

3.2.10 Herstellung einer stabilen Zelllinie

Zur Herstellung einer stabilen Zelllinie wurden $1,5 \times 10^6$ CHO-Zellen in eine Gewebekulturschale ausplattiert und mit 15 ml Nährmedium, bestehend aus F12 (HAM) Nutrient Mixture, 10% fötalem Kälberserum, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin, bedeckt. Nach einer Inkubation über 24 Stunden bei 37°C waren die Zellen zu ca. 80% konfluent. Es erfolgte deshalb die Transfektion mit 10 µg DNA und erneut eine Inkubation über 24 Stunden bei 37°C. Die Zugabe von Geneticin G-418 Sulfat in einer Konzentration von 1 mg/ml führte in den nächsten Tagen zu einem massiven Zellsterben und zu einer Selektion von Zellen, die die transfizierte DNA fest in ihr chromosomales Erbgut integriert hatten. Das Zellmedium inklusive des Geneticin G-418 Sulfat wurde innerhalb von 6 Tagen noch dreimal gewechselt, bis es zur gut sichtbaren Ausbildung resistenter Zellklone kam. Aus 12 dieser an unterschiedlichen Orten gewachsenen Zellklone wurden jeweils einige wenige Zellen abgesaugt und in 12-well-Mehrfachkulturschalen, die mit 1,5 ml Nährmedium inkl. Geneticin G-418 Sulfat gefüllt waren, überführt. Nach siebentägiger Vermehrung unter mehrmaligem Wechsel des Geneticin G-418 Sulfat-haltigen Mediums hatte sich in allen Mehrfachkulturschalenlöchern ein konfluenter Zellrasen entwickelt. Per Trypsin-Andau wurden die Zellen in Suspension gebracht und ca. 80% eines jeden wells einer Proteinextraktion unterzogen. Die Proteine wurden in der Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Expression des transferierten Gens mit Hilfe von Western Blot und Immundetektion untersucht.

3.2.11 Proteinextraktion aus Zellen

Proteinextraktion aus Zellen in Mehrfachkulturschalen:

Zum Nachweis der Überexpression von Proteinen durch Gentransferexperimente wurden CHO-Zellen in Mehrfachkulturschalen ausgesät und 24 Stunden später transfiziert. Etwa 16-24 Stunden danach wurde das Nährmedium abgenommen und die Zellen kurz mit PBS (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂HPO₄; pH 7.3) gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Schaber vom Boden der Löcher abgelöst, in einem kleinen Volumen PBS resuspendiert und in einen Zentrifugenbecher überführt. Eine dreiminütige Zentrifugation bei 1800 rpm in einer Eppendorf Zentrifuge 5810 R ergab ein Zellpellet, das zur Lysierung in 200 µl Solubilitätspuffer aufgenommen wurde. Dieser Puffer (pH 7.4) beinhaltete 1% Triton X-100, 50 mM Tris, 2 mM CaCl₂, 80 mM NaCl und zusätzlich PIC (Proteaseninhibitorcocktail: 1 mM Pepstatin A, 10 mM Chymostatin, 10 mM Leupeptin, 10 mM Antipain) im Verhältnis von 1:1000. PIC ist eine Mischung aus Antiproteasen und soll die Wirkung freigesetzter intrazellulärer Proteasen möglichst gering halten. Die Zelllyse fand für 30 Minuten bei

Raumtemperatur statt, anschliessend wurde für 3 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und der proteinreiche Überstand abgenommen.

In eine 12-well Kulturschale wurden 1×10^5 Zellen/well ausplattiert. Zum Transfektionszeitpunkt ergaben sich dadurch ca. $1,5\text{-}2 \times 10^5$ Zellen und bei der Proteinextraktion ca. $3\text{-}4 \times 10^5$ Zellen/well. Dies ergab eine Proteinextraktionsmenge von ca. 200–300 $\mu\text{g/well}$. Transfiziert wurde in eine 12-well Mehrfachkulturschale 1 μg DNA pro well. Für 6-well Kulturschalen sind alle angegebenen Werte zu verdoppeln.

Proteinextraktion aus Zellen in Gewebekulturschalen:

Zur Proteinextraktgewinnung für GST-Fusionsprotein-Bindungsversuche wurden CHO-Zellen auf Gewebekulturschalen (\varnothing 14 cm) subkultiviert. Nach ca. 48 Stunden Inkubation bei 37°C hatten sie eine fast 100%ige Konfluenz, was ca. $1\text{-}2 \times 10^7$ Zellen entsprach. Nach einer kurzen Waschung in PBS wurden die Zellen mit ca. 5 ml PBS bedeckt und mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst. Die Zellsuspension wurde in einen Zentrifugenbecher überführt, für 5 Minuten bei 2400 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet in 2 ml Lysispuffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100; pH 7.4) aufgenommen. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde das Zelllysate in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und in einer Hettich Universal 16 R bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt. Aus einer Gewebekulturschale resultierten ca. 10 mg Protein.

3.2.12 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden nach der Methode von Lowry et al. (1951) durchgeführt. Dazu wurde der Probe ein Aliquot entnommen, je nach erwarteter Proteinkonzentration zwischen 2 und 100 μl , und mit Aqua bidest auf ein Volumen von 400 μl aufgefüllt. Es folgte die Zugabe von 1 ml Lowry-Lösung, die sich aus 3% Na_2CO_3 in 0,15 N NaOH (A), 2% Kaliumnatriumtartrat (B) und 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (C) zusammensetzte. Das Verhältnis von A : B : C betrug dabei 65 : 1 : 1. Die Proben wurden gevortext, 10 Minuten inkubiert und dann mit 125 μl Folinreagenz, das im Verhältnis 1 : 1 mit Aqua bidest verdünnt war, versetzt. Nach dreißigminütiger Inkubation wurden die Proben in Photometerküvetten umgefüllt und mit einem Lambda 20 Photometer bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen. Standardisiertes Rinderalbumin mit einer Konzentration von 2 mg/ml diente der Ermittlung einer Eichgeraden, deren Steigung die Umrechnung von der Extinktion auf die Konzentration der Proben erlaubte.

3.2.13 Auftrennung von Proteinen durch Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Vorbereitung der Proben:

Die Proben wurden, wenn nötig, mit Aqua bidest in ihrem Volumen angeglichen und mit Probenpuffer versetzt. Dieser bestand aus 0,1 M Tris-HCl (pH 6.8), 2% Natriumdodecylsulfat, 20% Glycerol, 1% 2-Mercaptoethanol und 0,1% Bromphenolblau, und reduzierte und beschwerte die Proben. Durch fünfminütiges Erhitzen bei 92°C wurden die Proteine denaturiert und die Polypeptide an Natriumdodecylsulfat gebunden. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben kurz abzentrifugiert.

Bei allen Gelen wurde als Größenmarker ein Rainbow Marker RPN 756 (Amersham) mitaufgetragen, bei Gelen, die für das Western Blotting-Verfahren vorgesehen waren, zusätzlich noch ein Biotinylierter Protein Marker (Biodesign Int.).

Gelelektrophorese:

Die Auftrennung von Proteinen per SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli et al. (1970) durchgeführt. Dabei wurde ein diskontinuierliches Gelsystem verwendet, bestehend aus einem unteren Trenngel und einem oberen Sammelgel.

Zur Herstellung eines 10% Trenngels für ein großes Elektrophoresesystem (Peqlab, Höfer) wurde ein Ansatz von 30 ml benötigt. Dieser setzte sich aus 10 ml 30%-Acrylamid-0,8%-Bisacrylamid, 7,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8.8), 11,8 ml Aqua bidest, 0,6 ml 10% Natriumdodecylsulfat und 0,2 ml 10% Ammonium Persulfat. Zur Polymerisationsbeschleunigung und Stabilisierung der von Ammonium Persulfat freigesetzten Radikale wurden noch 10 µl TEMED hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde zwischen 2 Glasplatten gegossen und mit Isobutanol überschichtet. Isobutanol verhinderte einerseits eine luftbedingte Inhibition der Polymerisation und bewirkte andererseits eine Glättung der Oberfläche. Nach vollendeter Polymerisation des Trenngels wurde das Isobutanol weggeschüttet und die Oberfläche des Trenngels mehrmals mit Aqua bidest und zuletzt einmal mit Obergelpuffer gewaschen. Die Herstellung von 20 ml eines 3,5% Sammelgels bedurfte 2,4 ml 30%-Acrylamid-0,8%-Bisacrylamid, 5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6.8), 12,1 ml Aqua bidest, 0,2 ml 10% Natriumdodecylsulfat, 0,3 ml 10% Ammonium Persulfat und 10 µl TEMED. Dieser Ansatz wurde auf die Oberkante des Trenngelpolymers gegossen und zur Bildung von Probenkammern ein Kamm eingesetzt. Nach Polymerisation wurde dieser Kamm wieder entfernt und die Kammern mit Laufpuffer gespült. Dieser Laufpuffer stellte die Elektrodenlösung dar und bestand aus 0,25 M Tris, 0,2 M Glycin und 1% Natriumdodecylsulfat (pH 8.8). Die Proben wurden nun in die Kammern überführt,

mit Laufpuffer überschichtet und das Gelsystem geschlossen und mit der Stromquelle verbunden. Die Stromstärke von 20 mA pro Gel wurde verwendet, um die Sammlung und den Durchlauf der Proteine in dem oberen Gel zu erreichen. Die Probenauftrennung wurde bei 40 mA durchgeführt und dauerte ca. 3-4 Stunden.

Bei Verwendung des Biometra-Gelsystems wurden Ansätze verwendet, die die Hälfte der oben angegebenen Volumina ausmachten. Während sich die Proteine im Sammelgel befanden, betrug die Stromstärke 5 mA, zur Auftrennung wurden 10mA über 2 Stunden benötigt.

3.2.14 Coomassiefärbung von Proteingelen

Proteingele wurden nach der Auftrennung gemäß Methodik von Sambrook et al. (1989) einer Coomassie Brilliant Blue G-250 Färbung unterzogen. In allen nachfolgend aufgeführten Lösungen wurde das Proteingel sanft auf einem Schüttler hin- und herbewegt. Zuerst wurde das Gel für 10 Minuten in einer Mischung aus 25% Isopropanol und 10% Essigsäure fixiert. Es folgte eine halbstündige Färbung in 0,06% Coomassie G-250 und 10% Essigsäure. Zuletzt wurde in 5% Methanol und 7% Essigsäure entfärbt, wobei beste Ergebnisse nach 24 Stunden erreicht wurden. Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt.

3.2.15 Silberfärbung von Proteingelen

Proteingele wurden mit Hilfe des Färbekits der Firma Amersham Pharmacia Biotech silbergefärbt. In allen nachfolgend aufgeführten Lösungen wurde das Proteingel sanft auf einem Schüttler hin- und herbewegt. Das Proteingel wurde nach der Elektrophorese für 30 Minuten in 250 ml Fixationslösung, bestehend aus 100 ml Ethanol, 25 ml Essigsäure und 125 ml Aqua bidest eingelegt. Es folgte die halbstündige Behandlung mit der Sensitizing-Lösung, die sich aus 75 ml Ethanol, 1,25 ml 25% Glutardialdehyd, 10 ml 5% Natriumthiosulfat, 17 g Natriumazetat und 164 ml Aqua bidest zusammensetzte. Das Gel wurde anschließend 6 x 5 Minuten lang mit Aqua bidest gewaschen und dann der Silberreaktion unterzogen. Diese fand in 25 ml 2,5% Silbernitrat, 0,1 ml 37% Formaldehyd und 225 ml Aqua bidest statt. Nach erneutem Waschen über 2 x 1 Minute in Aqua bidest wurde das Gel für 2 bis 5 Minuten in die Entwicklungslösung aus 6,25 g Natriumkarbonat, 0,05 ml 37% Formaldehyd und 250 ml Aqua bidest gelegt. Zum Beenden der Entwicklung wurde eine Stopplösung aus 3,65 g EDTA-Na₂•2 H₂O in 250 ml Aqua bidest benutzt. Die Dokumentation geschah per Scanner.

3.2.16 Western Blot

Das Western Blotting wurde nach dem Verfahren von Towbin et al. (1979) durchgeführt. Dazu wurde in eine mit Blottingpuffer gefüllte Plastikwanne sandwichartig das Proteingel auf die Nitrocellulose-Membran, umgeben von 4 Blatt Blottingpapier und 2 Polstern in eine zu klappbare Transferplastik gelegt. Der Blottingpuffer bestand aus 3% Borsäure und 20% Methanol (pH 9.0). Eine Trans-blot Zelle wurde mit Blottingpuffer gefüllt und die Transferplastik hineingesteckt. Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde über mindestens 4 Stunden bei einer Stromstärke von 250 mA vollzogen. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran 10 Minuten lang mit Ponceau-S gefärbt und mit Aqua bidest und PBS wieder entfärbt.

Die anschließende ECL Immunodetektion richtete sich nach der Methode von Whitehead et al. (1979). Zuerst wurde die Nitrocellulose-Membran über 60 Minuten in eine Blockinglösung gelegt und dabei leicht geschüttelt. Die Blockinglösung setzte sich aus 0,1% Tween und 10% Milchpulver in PBS zusammen und minimierte die unspezifische Antikörperbindung. Danach wurde die Membran 90 Minuten lang bei Raumtemperatur mit dem 1. Antikörper behandelt, der in 0,1% Tween und 5% BSA in PBS gelöst war. Die Verdünnung des 1. Antikörpers basierte dabei auf Erfahrungswerten. Es erfolgte nun ein dreimaliges Waschen der Membran über jeweils 10 Minuten in 0,1% Tween in PBS und anschließend eine 45 Minuten lange Behandlung mit dem zweiten Antikörper. Dieser kovalent an Meerrettich-Peroxidase gebundene Anti-IgG-Antikörper war ebenfalls mit der Blocking-Lösung verdünnt. Vor der eigentlichen Immundetektion wurde die Membran noch je dreimal mit PBS, 0,3% Tween bzw. PBS 0,1% Tween gewaschen. Mit Hilfe eines ECL Chemolumineszenz-Kits der Firma Amersham wurde Luminol von der an dem 2. Antikörper gebundenen Meerrettich-Peroxidase oxidiert. Eine maximale Lichtemission im Wellenlängenbereich von 428 nm führte dadurch zu einer quantifizierbaren Schwärzung eines Röntgenfilms. Der Höhepunkt dieser Chemolumineszenzreaktion wurde nach 5 bis 20 Minuten erreicht.

3.2.17 Induktionskinetik

Zur Maximierung der Expression von GST-Fusionsproteinen wurden transformierte *Escherichia coli* JM109 Induktionskinetiken unterzogen. Dazu wurde eine Bakterienkolonie von einer ampicillinhaltigen LB-Agar-Kulturschale in 4 ml ampicillinhaltiges LB-Medium überführt und über 12 Stunden bei 37°C in einem Inkubator bei 180 rpm geschüttelt. Als Kontrolle wurde ein Röhrchen mit 4 ml ampicillinhaltigem LB-Medium mitgeführt, um Kontaminationen des Mediums auszuschließen. 1 ml der Bakterienkultur wurde nun zu 20 ml ampicillin-

haltigem LB-Medium gegeben und erneut in den Schüttelinkubator gegeben. Die Vermehrung der Bakterien wurde solange durchgeführt, bis die halbstündliche photometrische Messung der Suspension bei einer Wellenlänge von 600 nm eine optische Dichte zwischen 0,5 und 0,8 ergab. Die Bakterienkultur wurde danach auf 4 sterile Röhrchen gleichmäßig verteilt, mit unterschiedlichen Mengen des Induktorstoffs Isopropyl- β -D-Thiogalactosidase versetzt und wiederum in den Schüttelinkubator gestellt. Zu bestimmten Zeiten erfolgte die Entnahme von 1 ml. Diese Fraktion wurde 3 Minuten lang bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 100 μ l 20% Probenpuffer (siehe Kapitel 3.2.13) versetzt. Nach dreiminütiger Erhitzung auf 92°C wurden die Proben bis zum Auftrag auf ein Proteingel auf Eis gelagert.

3.2.18 Isolation von GST-Fusionsproteinen aus Bakterien

Zur Isolation von GST-Fusionsproteinen aus transformierten *Escherichia coli* JM109 wurde eine Bakterienkolonie von einer ampicillinhaltigen LB-Agar-Kulturschale in 5 ml ampicillinhaltiges LB-Medium überführt. Nach einer Vermehrung über 12 Stunden in einem 37°C Schüttelinkubator wurde je 1 ml der Bakteriensuspension zu jeweils 100 ml ampicillinhaltigem LB-Medium in Erlenmeyerkolben gegeben. Diese wurden in dem Inkubator solange geschüttelt, bis die halbstündliche photometrische Messung der Bakteriensuspensionen eine optische Dichte zwischen 0,5 und 0,8 ergab. Die Bakterien wurden dann in einer Beckmann J2HC 5 Minuten lang bei 5000 rpm abzentrifugiert und pro Pellet in 2 ml PBS inkl. PIC (1000:1) resuspendiert. Die folgende Solubilisierung der Bakterienzellwände vollzog sich in 2 Schritten: Zuerst wurden die Bakterien 3 x 10 Sekunden lang bei 60 Watt sonifiziert. Um eine zu starke Wärmeentwicklung zu verhindern, waren die Bakterien von Eis umgeben und zwischen den einzelnen Behandlungsschritten wurde jeweils 1 Minute gewartet. Als zweites wurden jeweils 250 μ l 10% Triton X-100 zu jeder Bakteriensuspension gegeben und eine halbe Stunde bei 4°C in einem End-über-End-Schüttler bewegt. Die Trennung von Zellproteinen und Zellwandfragmenten wurde nach Umfüllung in Reaktionsgefäße durch zehnmünütige Zentrifugation in einer Hettich-Zentrifuge bei 4°C erreicht. Der proteinhaltige Überstand wurde anschließend in neue Reaktionsgefäße überführt.

Für die weiteren Arbeitsschritte wurden pro 1,5 ml Proteinlösung 300 μ l Glutathion-Sepharose 4B-PBS-Suspension benötigt. Dazu wurden 200 μ l in Ethanol befindlichem Glutathion-Sepharose 4B aus der Herstellerflasche in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei 2600 rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Ethanolüberstands wurde mit 1 ml PBS inkl. PIC gewaschen und wieder für 5 Minuten bei 2600 rpm zentrifugiert. Der Über-

stand wurde verworfen und die Glutathion Sepharose 4B in 200 μ l PBS inkl. PIC aufgenommen, was durch das Eigenvolumen der Sepharose zu 300 μ l Volumen führte.

Pro 1,5 ml bakterieller Proteinlösung wurden 300 μ l Glutathion Sepharose 4B-PBS zugegeben und die Mischung 30 Minuten bei 4°C End-über-End gerollt. Die nicht an die Sepharose gebundenen Proteine wurden durch Zentrifugation über 5 Minuten bei 2600 rpm in den Überstand gebracht und verworfen. Zur vollständigen Entfernung aller nichtgebundenen Proteine wurde die Sepharose noch dreimal mit 500 μ l PBS inkl. PIC gewaschen und der Überstand nach Zentrifugation über 5 Minuten bei 2600 rpm verworfen. Zum Pellet wurden dann 150 μ l Elutionspuffer gegeben. Dieser bestand aus 10 mM Glutathion in 50 mMol Tris (pH 8.0). Die Elution wurde 10 Minuten lang bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei die Reaktionsgefäße alle 2 Minuten leicht bewegt wurden. Eine fünfminütige Zentrifugation ergab einen GST-Fusionsprotein-haltigen Überstand, der abgenommen und in neue Reaktionsgefäße überführt wurde. Die Konzentration der GST-Fusionsproteine wurde über Coomassie- oder Silbergele abgeschätzt, auf denen zusätzlich Albumin in bekannten Konzentrationen aufgetragen waren.

3.2.19 Bindungsversuche mit GST-Fusionsproteinen

In Bindungsversuchen wurden zuerst die GST-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose 4B gekoppelt. Dazu wurden äquimolare Mengen der unterschiedlichen GST-Fusionsproteine in Reaktionsgefäße überführt, 50 μ l Glutathion-Sepharose 4B und zur Denaturierung 100 mM Dithioerythritol zugegeben. Der Ansatz wurde mit PBS auf 1000 μ l Volumen aufgefüllt und über 2 Stunden bei 4°C im End-über-End-Schüttler gerollt. Eine 5 Minuten lange Zentrifugation in der Biofuge 13 bei 3500 rpm führte zu einem aus Glutathion-Sepharose 4B bestehenden Pellet. Der Überstand wurde verworfen und die Sepharose dreimal mit 1000 μ l Lysispuffer gewaschen. Zu dem Sepharosepellet wurden anschließend 300-800 μ g CHO-Proteinextrakte gegeben und wiederum über 2 Stunden bei 4°C in einem End-über-End-Schüttler gerollt. Die Zentrifugation über 5 Minuten bei 3500 rpm ergab die Trennung von nichtbindenden Proteinen im Überstand und den GST-Fusionsproteinen mit gebundenen Proteinen im Sepharosepellet. Der Überstand wurde abgenommen und in anderen Reaktionsgefäßen aufbewahrt. Das Sepharosepellet wurde noch dreimal mit 1000 μ l PBS gewaschen und dabei kurz gevortext. Zur Ablösung der gebundenen Proteine von den GST-Fusionsproteinen wurden 25 μ l 10% SDS zur Sepharose gegeben und die Mischung für 3 Minuten bei 92°C inkubiert. Die Abtrennung der Sepharose wurde durch kurze Zentrifugation bei 13000 rpm erreicht. Ein Aliquot des Überstands sowie der Lösung mit nichtgebundenen Proteinen wurde im SDS-PAGE und Western Blot mit Immundetektion analysiert.

3.2.20 Isolierung von humanen LDL

Die Isolierung und Präparation von humanen Low Density Lipoproteinen wurden nach der Methode von Havel et al. (1953) durchgeführt. Nichthyperlipämischen Spendern wurden insgesamt 2000 ml Blut abgenommen. Nach Zugabe von 500 µl Benzamidin geronn dieses für 45 Minuten bei Raumtemperatur in einem Glasröhrchen. Der Serumanteil wurde durch Zentrifugation bei maximaler Umdrehungszahl in einer Heraeus-Christ-Laborzentrifuge abgetrennt und volumenbestimmt. Zu 1000 ml Serum wurden nun 5 ml 4% EDTA-Lösung (pH 7.4) gegeben, um kalziumabhängige Proteasen zu inhibieren. Die Addition von je 5 ml 2% Gentamycin-Sulfat-Lösung und 4% Natriumazid-Lösung (pH 7.4) bewirkte Keimfreiheit. Drei aufeinanderfolgende Ultrazentrifugationen im Kaliumbromidgradienten führten anschliessend zur Separation des LDL. Dazu wurde die Eigendichte des Serums von 1,006 g/ml durch Zugabe von 27,75 g Kaliumbromid pro 1000 ml auf 1,025 g/ml gesteigert. Das Gemisch wurde in Quick-seal-Röhrchen in einem 60 Ti-Rotor 20 Stunden bei 38000 rpm ultrazentrifugiert und anschließend von dem IDL- und VLDL-haltigen Überstand separiert. Die Bodenfraktion, bestehend aus LDL und HDL wurde auf Eis gelagert und erneut volumenbestimmt. Mit Hilfe von 36,932 g Kaliumbromid pro 1000 ml Serum wurde die Dichte von 1,025 g/ml auf 1,050 g/ml erhöht und das Gemisch für weitere 20 Stunden bei 38000 rpm ultrazentrifugiert. Der LDL-reiche Überstand mit einer Dichte von 1,050 g/ml wurde von der HDL-haltigen Bodenfraktion getrennt und einer weiteren Aufreinigung unterzogen. Diese bestand aus einer weiteren zwanzigstündigen Ultrazentrifugation bei 38000 rpm. Der LDL-reiche Überstand wurde gegen PBS dialysiert und bei 4°C gelagert.

3.2.21 Radioaktive Markierung von LDL

LDL wurde nach der Iodmonochlorid-Methode von McFarlane (1958) mit 125 Iod radioaktiv markiert. Dazu wurden 800 µl einer 1 M Glycin-Lösung (pH 10.0) zu 1 ml LDL einer Konzentration von 5 mg/ml gegeben. Es folgte die Addition von 6 µl einer 125 I-Stocklösung zu 200 µl Glycin-Lösung, was der LDL-Glycin-Lösung beigefügt wurde. Die 125 I-Stocklösung hatte eine Aktivität von 3,7 MBq/µl. Der Ansatz wurde mit 40 µl Iodmonochlorid-Lösung, bestehend aus 0,1% Iodmonochlorid in 10 ml 0,1 M HCl, 2 M NaCl über 90 ml Chloroform, versetzt und 3 Minuten auf einem Schüttler bei geringer Frequenz inkubiert. Auf eine mit PBS equilibrierte PD 10-Säule wurden 2 ml markiertes LDL, dann 1 ml und dann noch mal 2 ml PBS gegeben. Das erste Eluat, bestehend aus 1 ml PBS, wurde verworfen, das zweite Eluat aus 2 ml gereinigtem 125 I-LDL wurde aufgefangen. Ein zweiter Durchlauf dieses Volumens durch eine PD-10-Säule bewirkte die Entfernung restlicher freier Radioaktivität. Unter-

schiedliche Präparationen lieferten in der Regel ^{125}I -LDL einer Proteinkonzentration zwischen 0,5-0,7 mg/ml und einer spezifischen Radioaktivität von 180–300 cpm/ng. Ungefähr 95% des iodierten LDL waren mit Trichloressigsäure ausfällbar.

3.2.22 Aufnahme von ^{125}I -LDL

Radioktive Aufnahmeexperimente mit ^{125}I -LDL wurden 24 Stunden nach transientem Gentransfer an $3\text{-}4 \times 10^5$ CHO-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden vom Nährmedium befreit, mit PBS gewaschen und 30 Minuten mit 1% BSA in F12-Medium bei 37°C vorinkubiert. Dies reduzierte die Anzahl unspezifischer Bindungsstellen. Nach Transfer auf Eis wurden die Zellen mit ^{125}I -LDL überschichtet, wobei pro $3\text{-}4 \times 10^5$ Zellen eine Aktivität von einer Million counts pro Minute zur Anwendung kamen. Als Medium für den radioaktiven Liganden wurde gekühltes F12 mit 1% BSA benutzt. Die Aufnahme wurde in einem doppelten Versuchsansatz ermittelt, während ein dritter Ansatz der Bestimmung der unspezifischen Aufnahme diente. Dazu wurde zusätzlich zum markierten noch unmarkiertes LDL in fünfzigfachem Überschuss zugegeben. Es folgte die Internalisation des LDL während einer sechsständigen Inkubation bei 37°C . Die CHO-Zellen wurden schließlich vom Medium befreit und dreimal mit eisgekühltem PBS gewaschen. Zur Ablösung oberflächengebundenen ^{125}I -LDL wurden sie ferner einmal für 5 Minuten mit Heparin in PBS gewaschen, dessen Konzentration 20 Einheiten/ml betrug. Vor der Überführung in Zählröhrchen wurden die Zellen mit 1 ml 1 N NaOH innerhalb von 30 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Mit Hilfe eines Gamma Counters wurde die aufgenommene Radioaktivität bestimmt, wobei die Werte anschließend entsprechend der Zellproteinkonzentration korrigiert wurden. Dazu wurde ein Aliquot von 100 μl aus dem Lysat entnommen und einer Lowry-Proteinbestimmung unterzogen. Die rezeptorvermittelte Internalisation war das rechnerische Resultat der Mittelung der Doppelwerte und Subtraktion des Wertes für die unspezifische Aufnahme.

3.2.23 Degradation von ^{125}I -LDL

Die Degradation von LDL wurde nach der sechsständigen Inkubation der Zellen bei 37°C anhand von 100 μl Medium bestimmt. Das Aliquot wurde mit 100 μl 2% BSA in 1 ml eisgekühlte 3 M Trichloressigsäure gegeben und ausgiebig bei hoher Frequenz gevortext. Während der folgenden 10 Minuten Inkubation auf Eis präzipitierten die Proteine. Mit Hilfe von 250 μl einer 0,7 M Silbernitratlösung wurde freies ^{125}I -LDL gebunden, was durch eine darauffolgende fünfminütige Zentrifugation in einer Heraeus-Zentrifuge bei 13000 rpm mitsamt den gefällten Proteinen pelletiert wurde. 1 ml des Überstands wurde in Zählröhrchen überführt und

die Radioaktivität im Gamma Counter ermittelt. Die Proteinkonzentration des Zelllysats führte zu einem Korrekturfaktor, mit dem der Degradationswert berechnet werden konnte.

4. Ergebnisse

Die Rolle des Annexin VI bei der rezeptorvermittelten Endozytose wurde im Rahmen dieser Arbeit auf zwei verschiedenen Ebenen untersucht.

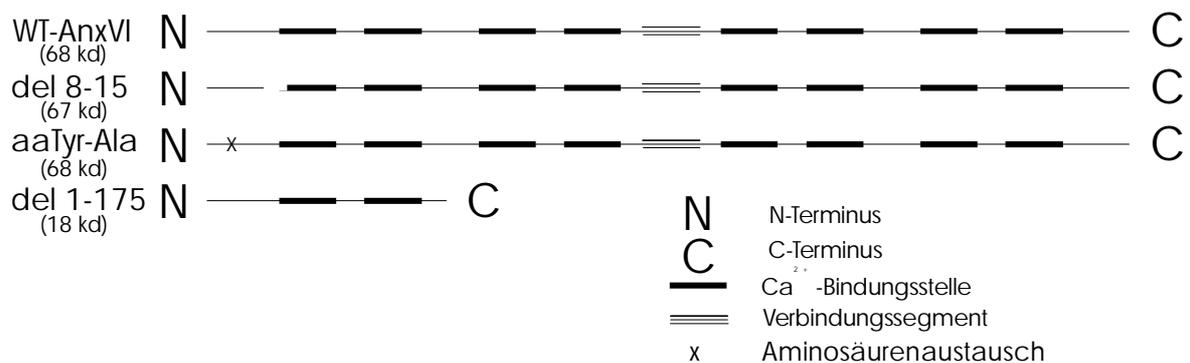
Im ersten Teil der Arbeit wurde die Aufnahme und Degradation von radioaktiv markiertem LDL in Zellen mit transienter und stabiler Annexin VI-Überexpression analysiert.

Die Identifikation möglicher intrazellulärer Interaktionspartner des Annexin VI hatte der zweite Teil der Arbeit zum Inhalt. Als Versuchssystem wurden hierfür GST-Annexin VI-Fusionsproteine benutzt. Nach der Isolation aus induzierten Bakterienkulturen dienten sie der Etablierung von Proteinbindungsversuchen. Mögliche Annexin VI-bindende Proteine wurden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern in Western Blots mit Immundetektion identifiziert.

4.1 Nachweis der Überexpression von Annexin VI und einiger Annexin VI-Mutanten

Der folgende Versuch diente dem Nachweis der Überexprimierbarkeit von Annexin VI und den Annexin VI-Mutanten del 8-15, del 1-175 und aaTyr→Ala, deren Strukturen in Abbildung 6 skizziert sind, in CHO-Zellen.

Abb. 6: Strukturübersicht von Annexin VI-Wildtyp und Annexin VI-Mutanten



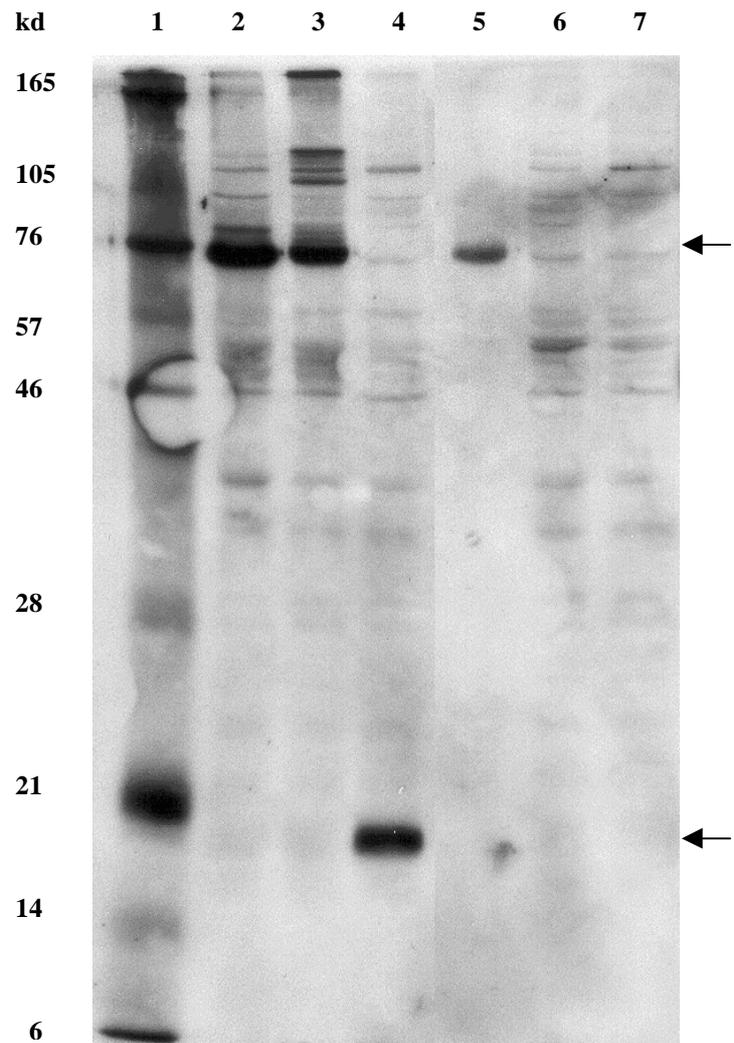
Dazu wurden CHO-Zellen in 6-well-Mehrfachkulturschalen ausplattiert und jedes well mit 2 µg DNA transfiziert. Als Negativkontrolle wurden CHO-Zellen auf gleiche Weise mit β-Galactosidase-DNA transfiziert. Die Zellproteine wurden mit Hilfe von Solubilitätspuffer gewonnen, einer Konzentrationsbestimmung unterzogen und anschließend per Western Blot-Verfahren und Immundetektion auf die Expression der Proteine hin untersucht (Abb. 7).

Abb. 7: Überexpression von Annexin VI und Annexin VI-Mutanten

Pro Spur wurden 60 µg Zellprotein in reduziertem Zustand auf ein 12% Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Proteingrößenmarker wurde ein biotinylierter Proteinmarker, als Positivkontrolle Bovines Annexin VI und als Negativkontrolle Proteinextrakte aus β -Galactosidase-transfizierten Zellen benutzt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Blots mit dem Kaninchen-Anti-Annexin VI-Antikörper inkubiert. Zu sehen ist die ECL-Detektion.

Spuren:

- 1: Biotinylierter Proteinmarker
- 2: Annexin VI
- 3: del 8-15
- 4: del 1-175
- 5: 1 µg Bovines Annexin VI
- 6: aaTyr→Ala
- 7: β -Galactosidase



Sowohl Annexin VI-Wildtyp (68 kd) und Annexin VI-del 8-15 (67 kd) als auch Annexin-VI-del 1-175 (18 kd) sind in den jeweiligen Spuren als deutliche Signale zu erkennen. Da es in der Negativkontrolle nicht zu ähnlichen Signalen in den jeweiligen Proteingrößenordnungen kommt, ist die Überexpression gezeigt. Allein die Mutante aaTyr→Ala (68 kd) lässt sich nicht nachweisen.

4.2 Nachweis der dosisabhängigen Überexpression von Annexin VI im Western Blot

Mit nachfolgendem Versuch sollte festgestellt werden, ob steigende Mengen transfizierter Annexin VI-Wildtyp-DNA auch zu einer gesteigerten Annexin VI-Wildtyp-Expression in CHO-Zellen führt. Es wurden CHO-Zellen in 6-well-Mehrfachkulturschalen ausplattiert und mit bis zu 2,4 µg DNA transfiziert. Die Zellproteine wurden mit Hilfe von Solubilitätspuffer gewonnen, einer Konzentrationsbestimmung unterzogen und anschließend per

Western Blot-Verfahren und Immundetektion auf die Expression des Proteins hin untersucht (Abb. 8).

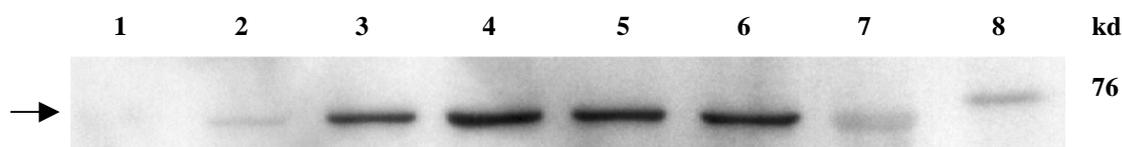


Abb. 8: Dosisabhängige Überexpression von Annexin VI in CHO-Zellen

Pro Spur wurden 10 μg Zellprotein in reduziertem Zustand auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Proteingrößenmarker wurde ein biotinylierter Proteinmarker und als Positivkontrolle Bovines Annexin VI verwendet. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Blots mit dem Schaf-Anti-Annexin VI-Antikörper inkubiert. Zu sehen ist die ECL-Detektion.

Spuren:

1: keine transfizierte DNA

2: 0.2 μg Annexin VI-DNA + 1.8 μg β -Galactosidase-DNA

3: 0.8 μg Annexin VI-DNA + 1.2 μg β -Galactosidase-DNA

4: 1.2 μg Annexin VI-DNA + 0.8 μg β -Galactosidase-DNA

5: 1.8 μg Annexin VI-DNA + 0.2 μg β -Galactosidase-DNA

6: 2.4 μg Annexin VI-DNA

7: 1 μg Bovines Annexin VI-Protein

8: Biotinylierter Proteinmarker

Wie in der Abbildung zu sehen, kommt es in der erwarteten Laufhöhe von 68 kd zu einem stärker werdenden Signal in den Spuren 1 bis 4 und danach zu einem ungefähr gleichbleibend starken Signal (Spuren 5 und 6). Zur Objektivierung wurde der Röntgenfilm einer computergestützten densitometrischen Analyse zugeführt und die mittlere optische Dichte bestimmt (Tab. 4).

Tab. 4: Quantifizierung der Annexin VI-Expression in transfizierten CHO-Zellen

Annexin VI-DNA [μg]	Mittlere optische Dichte	Relativ
0	0.056	1.0
0.2	0.110	1.96
0.8	0.197	3.52
1.2	0.234	4.18
1.8	0.203	3.62
2.4	0.210	3.75

Bovines Annexin VI-DNA [μg]	Mittlere optische Dichte
1	0.279

Die graphische Darstellung verdeutlicht die Steigerung der Expression des Annexin VI (Abb. 9).

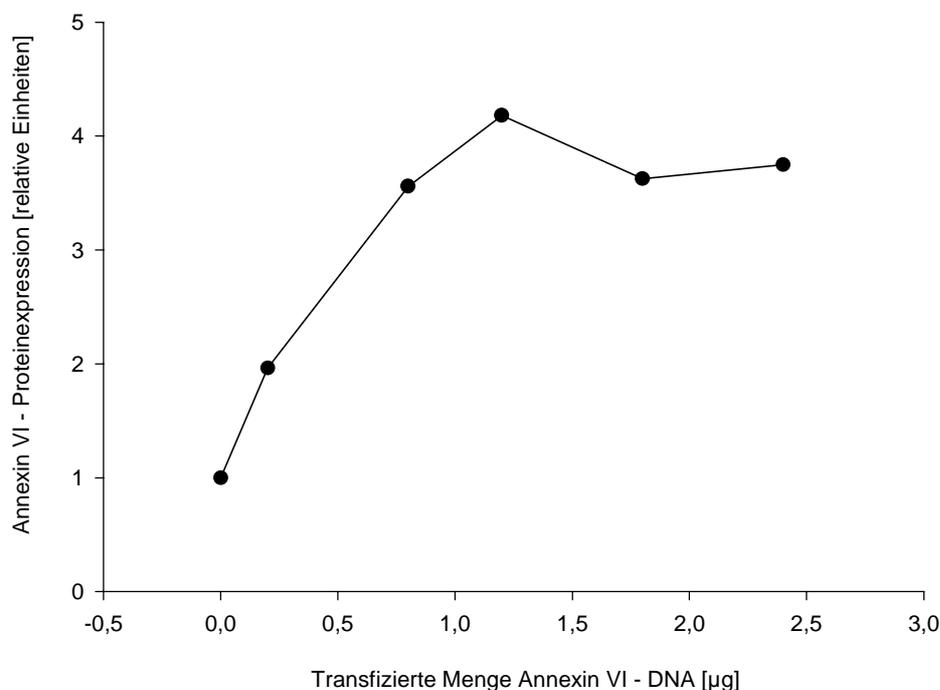


Abb. 9: Dosisabhängige Steigerung der Expression des Annexin VI
Als Bezugswert für die relative Darstellung diente der Wert für die Transfektionsmenge 0 µg Annexin VI-DNA, welcher gleich 1 gesetzt wurde.

Es kommt anfangs zu einem annähernd linearen Anstieg, bis dann im Bereich höherer Transfektionsmengen das Expressionsniveau ungefähr gleich bleibt.

4.3 Aufnahme und Degradation von ^{125}I -LDL in Annexin VI-überexprimierenden Chinesischen Hamsterozellen (CHO)

Die möglichen Konsequenzen der Annexin VI-Überexpression auf die rezeptorvermittelte Endozytose wurden mit Hilfe der Aufnahme und Degradation von ^{125}I -LDL in Zellen studiert. Es wurden CHO-Zellen benutzt, die Annexin VI entweder transient oder stabil überexprimierten.

4.3.1 Experimente mit CHO-Zellen mit transienter Annexin VI-Überexpression

4.3.1.1 Dosisabhängige Internalisation und Degradation von ^{125}I -LDL in Annexin VI-überexprimierenden Zellen

Zur Analyse des Einflusses des Annexin VI auf die Endozytose wurden CHO-Zellen mit steigenden Mengen Annexin VI sowie einer konstanten Menge LDL-Rezeptor-DNA transfiziert und einem sechsständigen Aufnahme- und Degradationsexperiment unterzogen. Die LDL-Rezeptorüberexpression war nach den Erfahrungen der Arbeitsgruppe Grewal notwendig, um die Änderungen im Zellstoffwechsel sichtbar zu machen. Abbildung 10 zeigt,

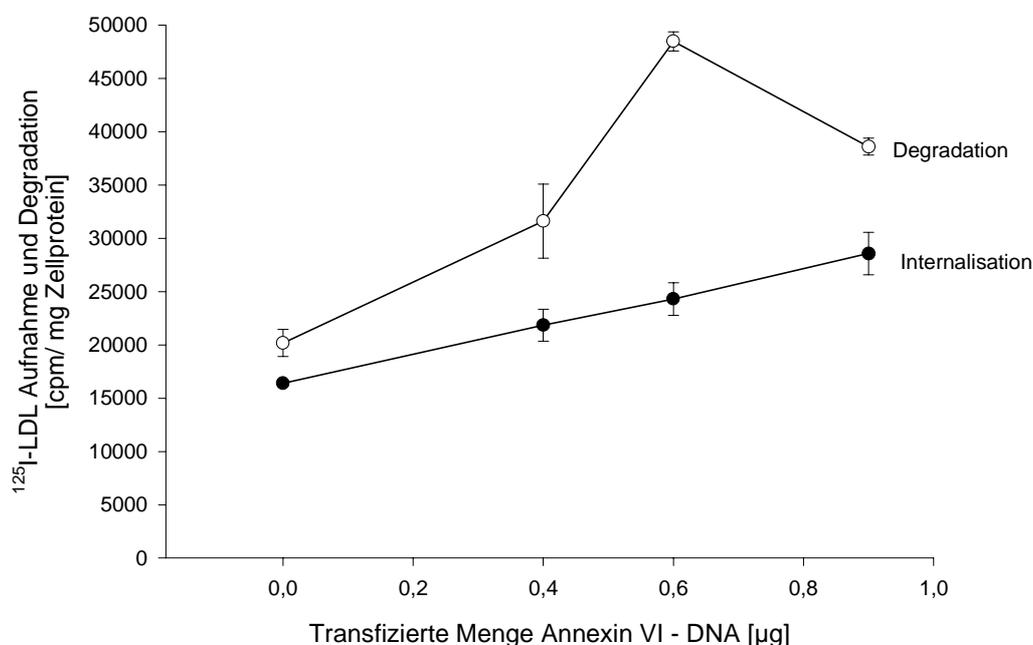


Abb. 10: Dosisabhängige Internalisation und Degradation von ^{125}I -LDL in Annexin VI-überexprimierenden CHO-Zellen

1×10^5 CHO-Zellen/well wurden in Mehrfachkulturschalen ausplattiert und mit insgesamt $1 \mu\text{g}$ DNA transfiziert. Die DNA setzte sich zusammen aus:

Ansatz 1: $0.1 \mu\text{g}$ LDL-Rezeptor + $0.9 \mu\text{g}$ β -Galactosidase

Ansatz 2: $0.1 \mu\text{g}$ LDL-Rezeptor + $0.5 \mu\text{g}$ β -Galactosidase + $0.4 \mu\text{g}$ Annexin VI

Ansatz 3: $0.1 \mu\text{g}$ LDL-Rezeptor + $0.3 \mu\text{g}$ β -Galactosidase + $0.6 \mu\text{g}$ Annexin VI

Ansatz 4: $0.1 \mu\text{g}$ LDL-Rezeptor + $0.9 \mu\text{g}$ Annexin VI

Die Zellen wurden für das sechsständige Aufnahme- und Degradationsexperiment mit ^{125}I -LDL einer Aktivität von 1×10^6 /well überschichtet. Die Abbildung stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Doppelbestimmungen dar.

dass es sowohl bei der Aufnahme wie auch bei der Degradation von ^{125}I -LDL zu einer annähernd linearen Steigerung kommt. Der Versuch konnte noch zweimal mit fast identischen Ergebnissen wie der oben gezeigte reproduziert werden. Die Mittelung der relativen Werte bezüglich der Aufnahme- und Degradation von ^{125}I -LDL aller 3 Versuche zeigt Abbildung 11.

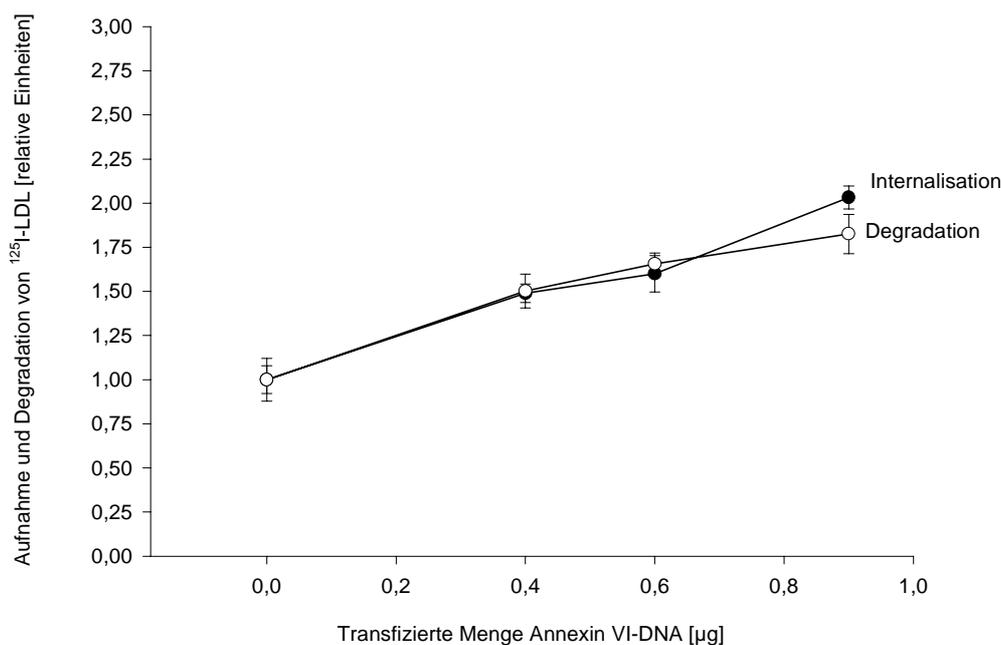


Abb. 11: Dosisabhängige Internalisation und Degradation von ^{125}I -LDL in Annexin VI-überexprimierenden CHO-Zellen – Mittelung aus 3 Versuchen

Aus 3 voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen wurden die Aufnahme- und Degradationswerte in relativen Einheiten dargestellt. Als Bezugswert diente dabei der Aufnahme- bzw. Degradationswert bei 0 µg transfizierter Menge Annexin VI-DNA, welcher gleich 1 gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aller 3 Versuche.

Zu sehen ist ein fast identischer, linear ansteigender Kurvenverlauf der Aufnahme und Degradation von ^{125}I -LDL. Bei einer transfizierten Menge von 0,6 µg Annexin VI-DNA hat die Aufnahme bzw. Degradation von ^{125}I -LDL um ca. 50% zugenommen und bei 0,9 µg Annexin VI-DNA haben sich die beiden Werte jeweils ungefähr verdoppelt. Dieses weist auf einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Annexin VI und der Aufnahme- und Degradationsfähigkeit von LDL durch CHO-Zellen hin.

4.3.1.2 Relative Aufnahme- und Degradationssteigerung von ^{125}I -LDL in Annexin VI-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu nicht-überexprimierenden Zellen

Als nächstes sollte herausgefunden werden wie sich ein steigendes Substratangebot an ^{125}I -LDL auf die Aufnahme und Degradation auswirkt, je nachdem ob Annexin VI überexprimiert wird oder nicht. CHO-Zellen wurden mit Annexin VI-DNA transfiziert und mit steigenden Mengen ^{125}I -LDL in einem sechsständigen Aufnahme- und Degradationsexperiment inkubiert. Als Vergleich wurden CHO-Zellen verwendet, die Annexin VI nicht überexprimierten (Abb. 12).

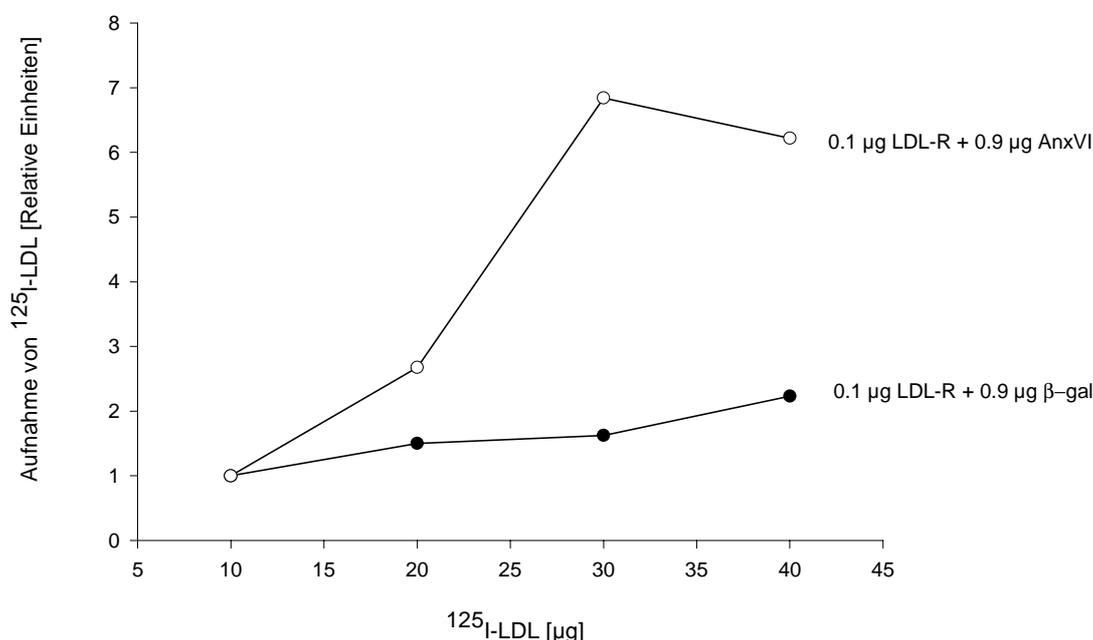


Abb. 12: Relative Aufnahmesteigerung von ^{125}I -LDL in Annexin VI-überexprimierenden CHO-Zellen

100000 CHO-Zellen/well wurden in Mehrfachkulturschalen ausplattiert und mit 1 μg DNA/well transfiziert. Der Versuchsansatz 1 wurde mit 0.1 μg LDL-Rezeptor-DNA + 0.9 μg Annexin VI-DNA transfiziert, Versuchsansatz 2 mit 0.1 μg LDL-Rezeptor-DNA + 0.9 μg β -Galactosidase-DNA. Im sechsständigen Aufnahme- und Degradationsversuch wurden die Zellen dann mit 10 μg , 20 μg , 30 μg und 40 μg ^{125}I -LDL inkubiert. Zu sehen ist die Aufnahme von ^{125}I -LDL in Abhängigkeit von der Menge des angebotenen ^{125}I -LDL als Substrat. Als Bezugswert für die Beschreibung in relativen Einheiten diente der Aufnahmewert bei 10 μg , welcher gleich 1 gesetzt wurde. Alle Werte ergaben sich aus der Mittelung von Doppelwerten, die Standardabweichungen waren so gering, dass sie nicht dargestellt werden.

Die Annexin VI-überexprimierenden CHO-Zellen zeigen eine starke Steigerung der Aufnahme von ^{125}I -LDL, je mehr ^{125}I -LDL ihnen angeboten wird. Bei 40 μg ^{125}I -LDL, also der vierfachen Substratmenge bezüglich des Ausgangswerts, beläuft sich die Aufnahme auf

ungefähr ein sechsfaches des Ausgangswerts. Hingegen steigert sich die Aufnahme in den CHO-Zellen, die Annexin VI nicht überexprimieren, nur um ca. das zweifache. Die Degradation lieferte ähnliche Verhältnisse, weswegen auf die Darstellung verzichtet wird. Überraschenderweise war die absolute Aufnahme und Degradation für die ersten beiden Substratmengen in den Annexin VI-überexprimierenden Zellen geringer als in den CHO-Zellen, die Annexin VI nicht überexprimierten. Da als mögliche Ursache eine verminderte LDL-Rezeptorexpression aufgrund der DNA-Kotransfektion gelten konnte, sollte die LDL-Rezeptorexpression per Western Blot überprüft werden.

4.3.1.3 Nachweis des LDL-Rezeptor-Expressionslevels in kotransfizierten Zellen

Zur Überprüfung der LDL-Rezeptorexpression bei Kotransfektion von CHO-Zellen mit dem LDL-Rezeptor und Annexin VI wurden CHO-Zellen mit insgesamt 1 µg DNA/well transfiziert. Mit Hilfe des Solubilitätspuffers wurde eine Proteinextraktion durchgeführt, wovon ein Aliquot per Proteingelektrophorese und anschließendem Western Blot mit Immundetektion analysiert wurde (Abb. 13).

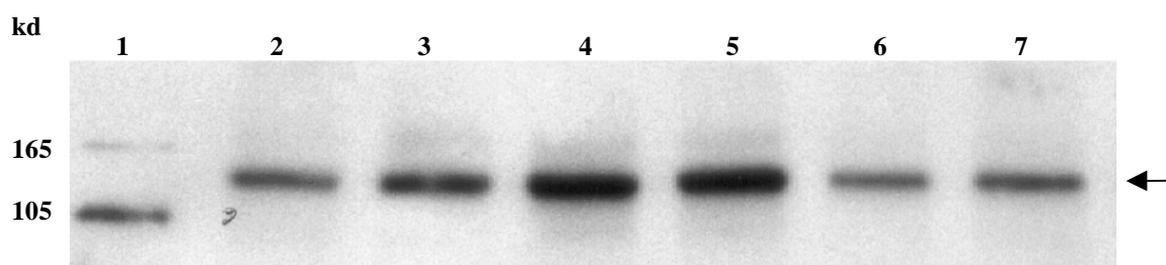


Abb. 13: LDL-Rezeptorexpression bei Kotransfektion

Pro Spur wurde ein 10 µl Aliquot in reduziertem Zustand auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Proteingrößenmarker wurde ein biotinylierter Proteinmarker benutzt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Blots mit dem Kaninchen-Anti-LDL-Rezeptor-Antikörper inkubiert. Zu sehen ist die ECL-Detektion.

Spuren:

1: Biotinylierter Proteinmarker

2: 0.1 µg LDL-Rezeptor-DNA + 0.4 µg Annexin-VI-DNA + 0.5 µg β-Galactosidase-DNA

3: 0.2 µg LDL-Rezeptor-DNA + 0.4 µg Annexin-VI-DNA + 0.4 µg β-Galactosidase-DNA

4: 0.4 µg LDL-Rezeptor-DNA + 0.4 µg Annexin-VI-DNA + 0.2 µg β-Galactosidase-DNA

5: 0.6 µg LDL-Rezeptor-DNA + 0.4 µg Annexin-VI-DNA

6: 0.1 µg LDL-Rezeptor-DNA + 0.9 µg β-Galactosidase-DNA

7: 0.1 µg LDL-Rezeptor-DNA + 0.9 µg Annexin VI-DNA

Offensichtlich kommt es bei steigenden Mengen transfizierter LDL-Rezeptor-DNA auch zu einer verstärkten Expression des Rezeptors (Spuren 2-5). Dabei scheint die Anwesenheit anderer gleichzeitig transfizierter DNA's keine Rolle zu spielen. Auch in den Spuren 6 und 7, in denen die Verhältnisse des in Kapitel 3.3.1.2 beschriebenen Versuchs widergegeben sind, kommt es zu keinem deutlichen Unterschied im Expressionsniveau des LDL-

Rezeptors. Somit ist die absolut gesehen niedrigere ^{125}I -LDL-Aufnahme in Annexin VI-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Zellen ohne Annexin VI-Überexpression nicht auf ein geringeres Expressionsniveau des LDL-Rezeptors zurückzuführen.

4.3.2 Experiment mit CHO-Zellen mit stabiler Annexin VI-Überexpression

Bisher wurde die Steigerung der Aufnahme des ^{125}I -LDL bei Annexin VI-Überexpression nur in CHO-Zellen nachgewiesen, in denen das Annexin VI transient überexprimiert wurde. Um festzustellen, ob der gleiche Effekt auch an Zellen zu belegen ist, in denen Annexin VI stabil überexprimiert wird, wurde ein CHO-Annexin VI-Zellklon der Arbeitsgruppe Grewal für ein radioaktives Aufnahmeexperiment benutzt.

4.3.2.1 Gesteigerte Aufnahme von ^{125}I -LDL im CHO-Annexin VI-Zellklon

Annexin-VI-CHO-Zellen sowie Wildtyp-CHO-Zellen wurden ausplattiert und mit steigenden Mengen LDL-Rezeptor-DNA transfiziert. Das Ergebnis des radioaktiven Aufnahmeversuchs zeigt Abbildung 14.

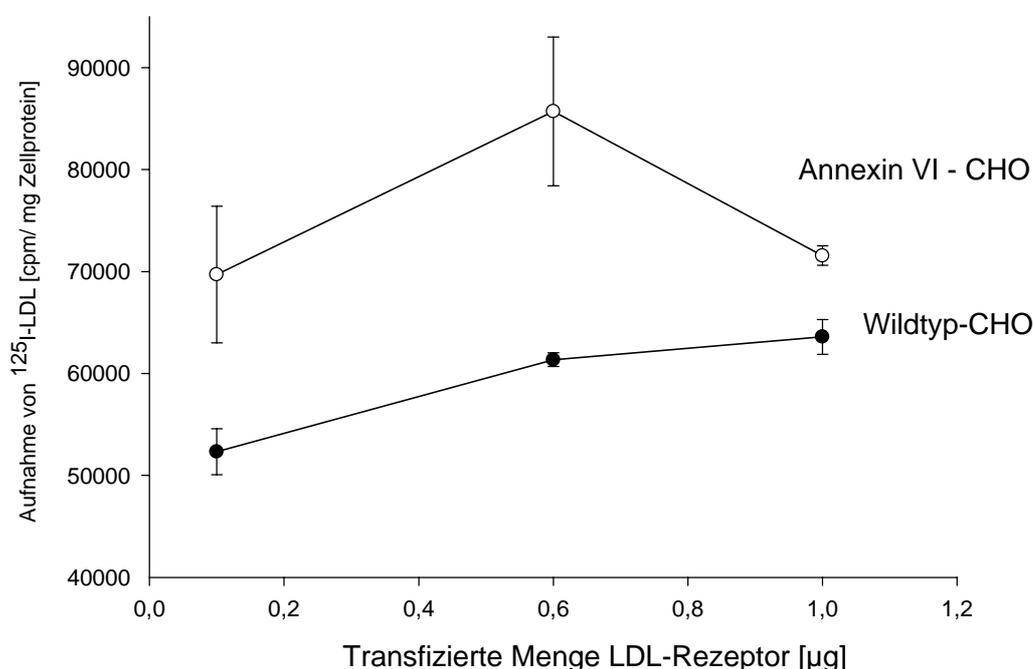


Abb. 14: Gesteigerte Aufnahme von ^{125}I -LDL im CHO-Annexin VI-Zellklon
100000 CHO-Zellen/well wurden in Mehrfachkulturschalen ausplattiert und mit insgesamt 1 μg DNA transfiziert. β -Galactosidase-DNA stellte den an 1 μg fehlenden Anteil dar. Die Zellen wurden für das sechsstündige Aufnahmeexperiment mit ^{125}I -LDL einer Aktivität von 1×10^6 /well überschichtet. Die Abbildung stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Doppelbestimmungen dar.

Verglichen mit den Wildtyp-CHO-Zellen zeigen die Annexin VI-CHO-Zellen eine bis zu 40%ige Steigerung der Aufnahme von ^{125}I -LDL. Somit ist die gesteigerte Aufnahme von ^{125}I -LDL sowohl in CHO-Zellen nachgewiesen, die Annexin VI transient überexprimieren wie auch in CHO-Zellen, die Annexin VI stabil zur Überexpression bringen. Außerdem scheint die absolut gesehen geringere ^{125}I -LDL-Aufnahme des in Kapitel 4.3.1.2 beschriebenen Versuchs doch durch die Kotransfektion bedingt zu sein, auch wenn der genaue Mechanismus nicht bekannt ist.

4.4 Identifikation von Annexin-VI-bindenden Proteinen mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen

Zum weiteren Verständnis der Rolle des Annexin VI im Rahmen der rezeptorvermittelten Endozytose ist es wichtig, die intrazellulären Interaktionspartner des Proteins zu kennen. Durch Proteinbindungsstudien mit Hilfe von GST-Annexin-VI-Fusionsproteinen sollen mögliche Bindungspartner identifiziert werden.

4.4.1 Klonierungen

Die Plasmide für die GST-Fusionsproteine wurden mit dem pGEX-KG-Vektor der Firma Pharmacia erzeugt:

pGEX-KG-Annexin VI:

Die pcDNAanx6 wurde NcoI- und XbaI-verdaut und das Annexin VI-Fragment isoliert. Ein NcoI-XbaI-geschnittener pGEX-KG-Vektor wurde mit dem Annexin VI-Fragment ligiert und lieferte pGEX-KG-Annexin VI. (Abb. 15)

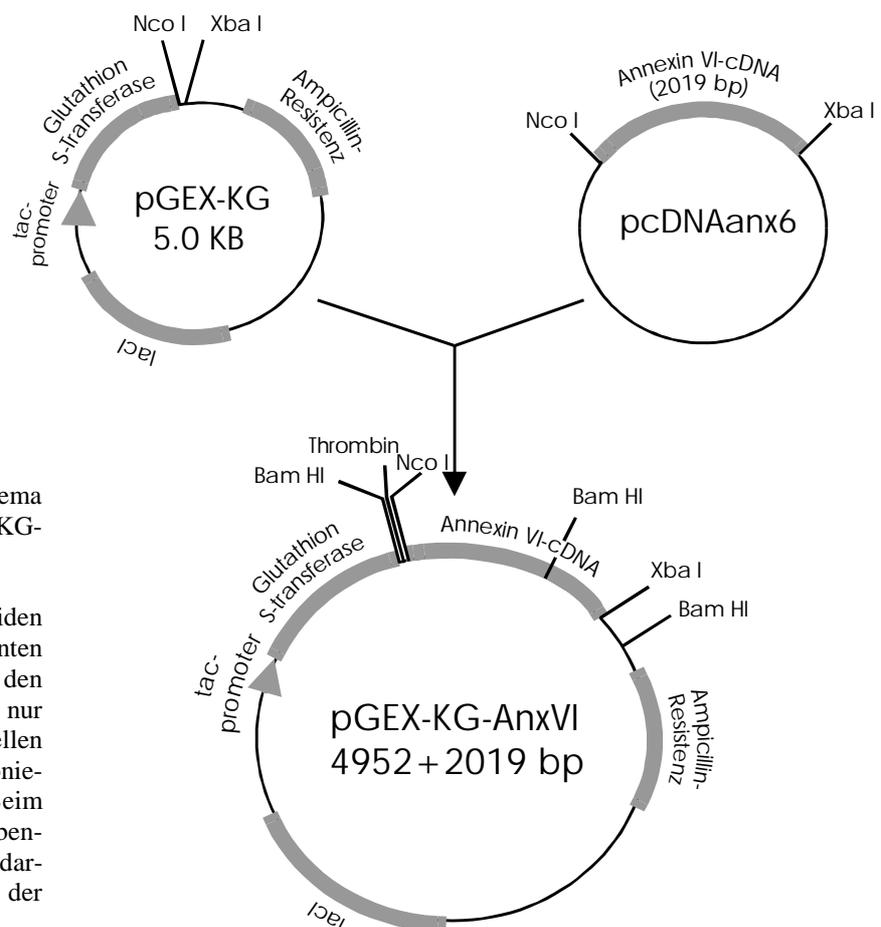


Abb. 15: Vereinfachtes Schema der Erzeugung des pGEX-KG-Annexin VI-Vektors

Zu sehen sind oben die beiden Ausgangsplasmide und unten das Klonierungsprodukt. Bei den Ausgangsplasmiden sind nur die Restriktionsschnittstellen dargestellt, die für die Klonierung benutzt wurden. Beim pGEX-KG-AnxVI sind ebenfalls nur die Schnittstellen dargestellt, die im Rahmen der Arbeit verwendet wurden.

pGEX-KG-del 1-175:

Zur Konstruktion dieses Plasmids wurde die pcDNAanx6 erst AspI-verdaut und dann, nach Behandlung mit der Klenow-Polymerase, HindIII-verdaut, was ein 530 bp Hd[AspI]-del 1-175-Fragment ergab. Der pGEX-KG-Vektor wurde XbaI-verdaut, mit der Klenow-Polymerase behandelt und dann mit NcoI nachgeschnitten. Das entstandene NcoI-[XbaI]-Fragment wurde mit dem del 1-175-Fragment religiert, dieses ergab pGEX-KG-del 1-175.

pGEX-KG-del 8-15:

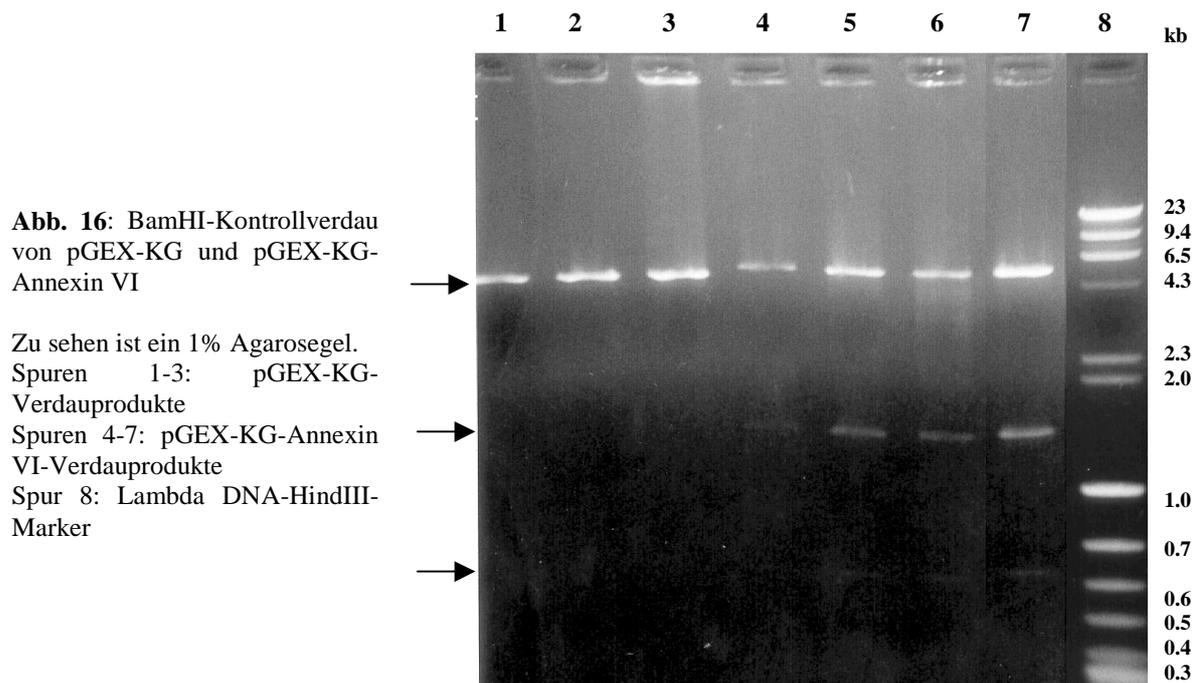
Diese Klonierung erfolgte identisch dem Wildtyp, es fehlten lediglich die Aminosäuren 8-15.

4.4.2 Induktion von GST-Fusionsproteinen in transformierten Escherichia coli

Kompetente E. coli-Bakterien sollten mit den pGEX-KG-Plasmiden transformiert werden, um per Induktion große Mengen GST-Fusionsproteine zu erhalten.

4.4.2.1 Transformation von kompetenten JM109-Escherichia coli-Bakterien

Mit ca. 100 ng der jeweiligen Ligationsprodukte wurden 25 µl-Aliquots des E. coli-JM109-Bakterienstamms transformiert. LB-Agar-Bakterienkulturschalen wurden mit den jeweiligen transformierten Bakterien beimpft, so dass einzeln stehende Bakterienkulturen entstanden. Von diesen wurden einzelne gepickt, vermehrt und dann einer DNA-Minipräparation unterzogen. Nach Verdau der extrahierten Plasmide wurden die Fragmente in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. (Abb. 16 und 17).



Beim pGEX-KG-Plasmid wurden Fragmente der Größe 4,8 kb und 160 bp erwartet. In den Spuren 1-3 ist das größere Fragment gut zu erkennen, das kleinere Fragment befindet sich unterhalb der Nachweisgrenze.

Der Verdau des pGEX-KG-Annexin VI-Plasmids sollte Fragmente der Größe 4,9 kb, 1,5 kb und 0,6 kb ergeben. Zumindest in den Spuren 5-7 sind diese zu erkennen.

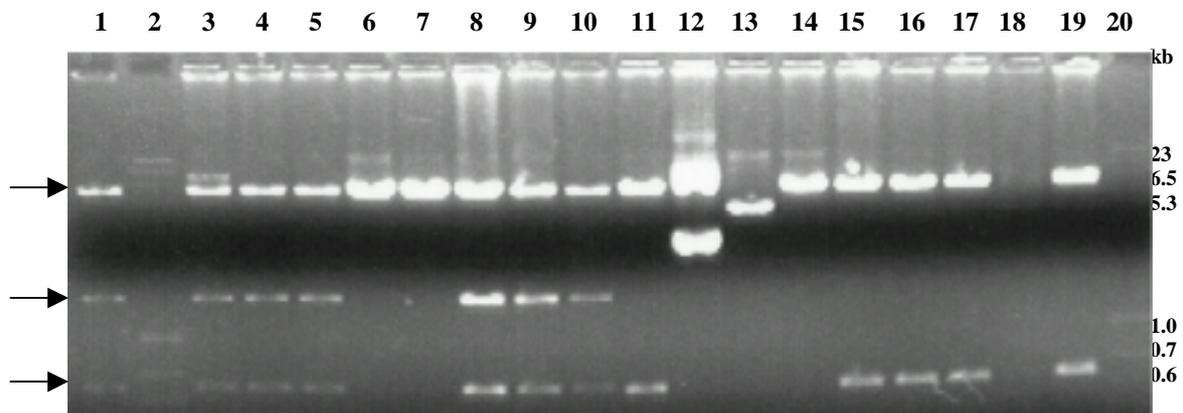


Abb. 17: BamHI-Kontrollverdau von pGEX-KG-del 8-15 und pGEX-KG-del 1-175

Zu sehen ist ein 1% Agarosegel.

Spuren 1 und 3-9: pGEX-KG-del 8-15

Spuren 11-19: pGEX-KG-del 1-175

Spuren 2 und 20: Lambda DNA-HindIII-Marker

Bei pGEX-KG-del 8-15 wurden Fragmente der Größe 4,9 kb, 1,5 kb und 0,6 kb erwartet. In den Spuren 1, 3-5 und 8-10 sind diese zu sehen. Hingegen sollte der Verdau von pGEX-KG-del 175 2 Fragmente der Größen 4,9 kb und 0,6 kb ergeben, wozu das Bild der Spuren 11, 15-17 und 19 paßt.

4.4.2.2 Induktionskinetik mit GST-transformierten JM109-Escherichia coli-Bakterien

Die Induzierbarkeit der pGEX-KG-Plasmide mit Isopropyl- β -D-Thiogalactosidase (IPTG) wurde ausgenutzt, um eine verstärkte Expression der GST-Fusionsproteine zu erzielen. Mit Hilfe von Induktionskinetiken sollte herausgefunden werden, wo die idealen Bedingungen liegen, um eine möglichst hohe Ausbeute an GST-Fusionsproteinen zu erreichen.

Dazu wurden zuerst die GST-transformierten Bakterien in einer Induktionskinetik hinsichtlich der optimalen Induktionsdauer und IPTG-Konzentration untersucht (Abb. 18).

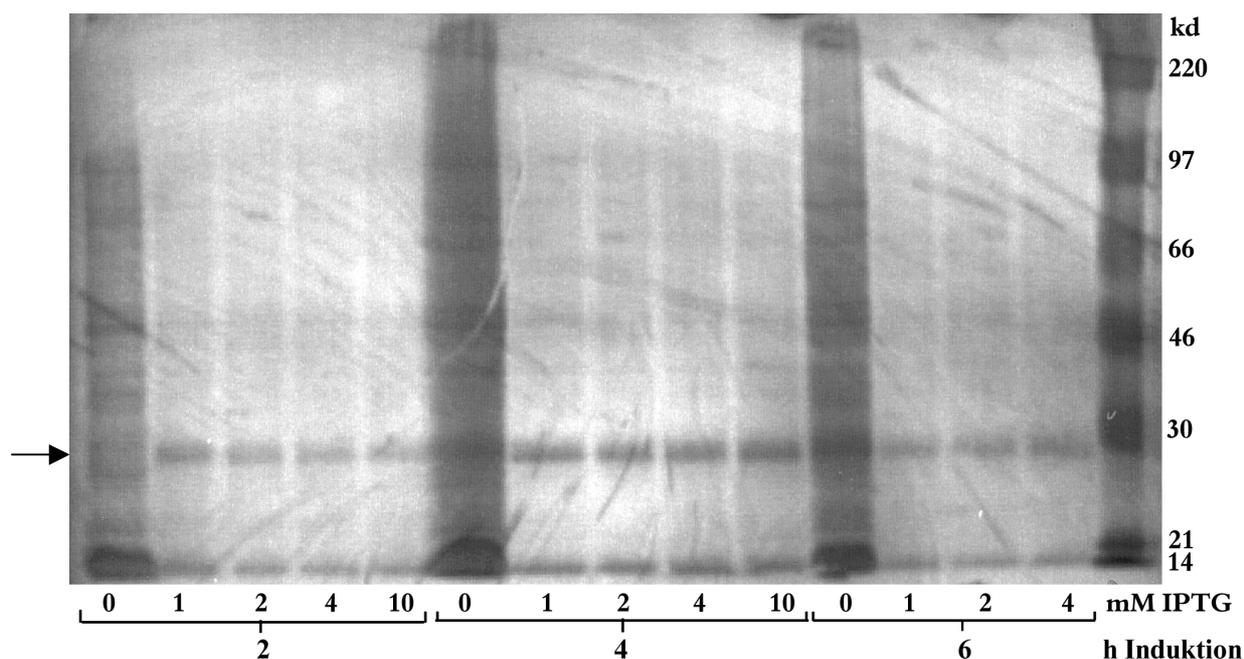


Abb. 18: Induktionskinetik mit GST-transformierten E.coli-Bakterien
 Pro Spur wurden 60 μ l Aliquots der in 100 μ l Probenpuffer lysierten Bakterienpellets aufgetragen. Zu sehen ist ein coomassiegefärbtes 10% SDS-PAGE. Als Proteingrößenmarker wurde (äußerst rechts zu sehen) ein Rainbow Coloured Protein Weight Marker verwendet. In der unter dem Bild befindlichen Beschriftungszeile sind die Induktionszeiträume [h] mit den IPTG-Konzentrationen [mM] beschrieben.

In allen Spuren, deren Proben aus IPTG-versetzten Kulturen stammen, ist eine verstärkte Bande unterhalb der 30 kd-Marke zu erkennen, welche das 26 kd-große GST vertreten sollte. Die relativ stärkste Bandenintensität besteht in den Spuren, deren Proben für 4 Stunden induziert wurden. Daraus folgt, dass das Optimum der Induktion von GST nach einer Induktionsdauer von ca. 4 Stunden erreicht ist. Gleichzeitig scheinen die hier gewählten IPTG-Konzentrationen keinen unterschiedlichen Einfluß auf die Induktionsstärke zu haben, weswegen in nachfolgenden Versuchen IPTG in Konzentrationen von höchstens 1 mM benutzt wurden.

4.4.2.3 Induktionskinetik mit GST-Annexin VI-transformierten JM109-Escherichia coli-Bakterien

Auch das 94 kd große GST-Annexin VI sollte hinsichtlich seiner Induzierbarkeit getestet und gleichzeitig per Western Blot mit Immundetektion spezifisch nachgewiesen werden. GST-Annexin VI-transformierte Bakterienkulturen wurden deshalb mit 0,5 mM und 1 mM IPTG über 2, 4 und 6 Stunden induziert (Abb. 19).

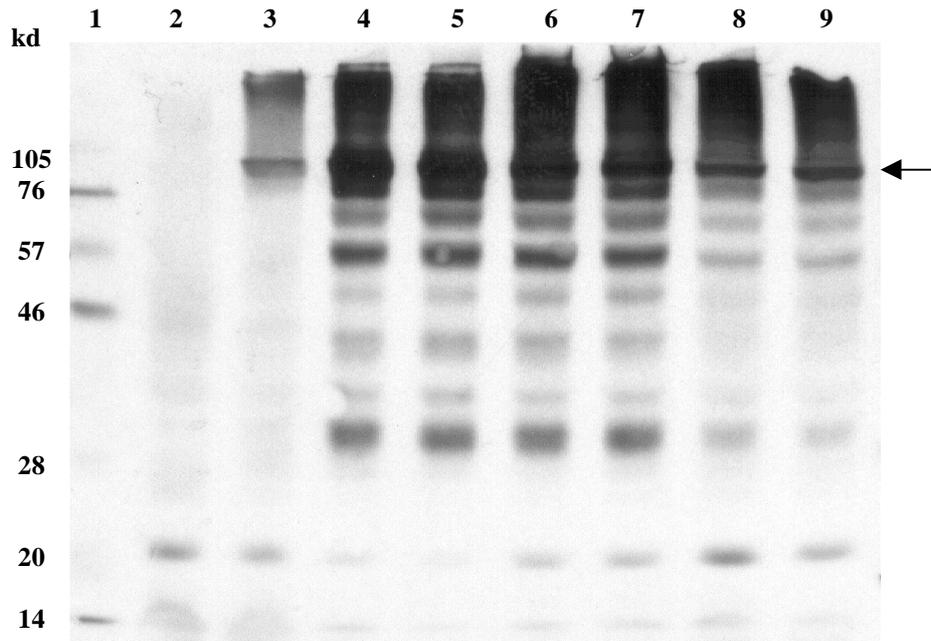


Abb. 19: Induktionskinetik von GST-Annexin VI

Pro Spur wurden 10 μ l Aliquots der in 100 μ l Probenpuffer lysierten Bakterienpellets in ein 10% SDS-PAGE aufgetragen. Als Proteingrößenmarker wurde ein biotinierter Proteinmarker und als Negativkontrolle eine GST-Induktionsprobe benutzt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Blots mit dem Schaf-Anti-Annexin VI-Antikörper inkubiert. Zu sehen ist die ECL-Detektion.

Spuren:

- 1: Biotinierter Proteinmarker
- 2: GST ohne Induktion
- 3: GST-Annexin VI ohne Induktion
- 4: GST-Annexin VI mit 0.5 mM IPTG nach 2 Stunden Induktion
- 5: GST-Annexin VI mit 1 mM IPTG nach 2 Stunden Induktion
- 6: GST-Annexin VI mit 0.5 mM IPTG nach 4 Stunden Induktion
- 7: GST-Annexin VI mit 1 mM IPTG nach 4 Stunden Induktion
- 8: GST-Annexin VI mit 0.5 mM IPTG nach 6 Stunden Induktion
- 9: GST-Annexin VI mit 1 mM IPTG nach 6 Stunden Induktion

In allen GST-Annexin VI-Spuren ist ein Signal in Höhe von ca. 90 kd zu sehen, welches in der Negativkontrolle nicht vorkommt. Dies bedeutet, dass das GST-Annexin VI-Fusionsprotein tatsächlich exprimiert wird und der Schaf-Anti-Annexin VI-Antikörper das Fusionsprotein erkennt. Allerdings kommt es noch zu vielen weiteren Signalen, was auf mehreren Gegebenheiten beruhen kann: Bei den Signalen oberhalb vom GST-Annexin-VI-Signal könnte es sich um Komplexbildungen des Proteins handeln, bei den Signalen darunter um Teilprodukte des Proteins, die durch Syntheseabbrüche zustande gekommen sind. Genauso könnten bakterielle Proteine, die vom Antikörper in Kreuzreaktionen erkannt werden, die Signale hervorrufen. Die stärkste Induktion kommt offenkundig nach 2 Stunden Induktion mit 1 mM IPTG zustande.

4.4.2.4 Induktionskinetik mit GST-Anexin VI, GST-del 8-15, GST-del 1-175

Gleichermaßen wurden die GST-Annexin VI-Mutanten einer Induktionskinetik zugeführt. Die Bakterien wurden 2, 4 und 6 Stunden mit 0,5 mM IPTG induziert (Abb. 20).

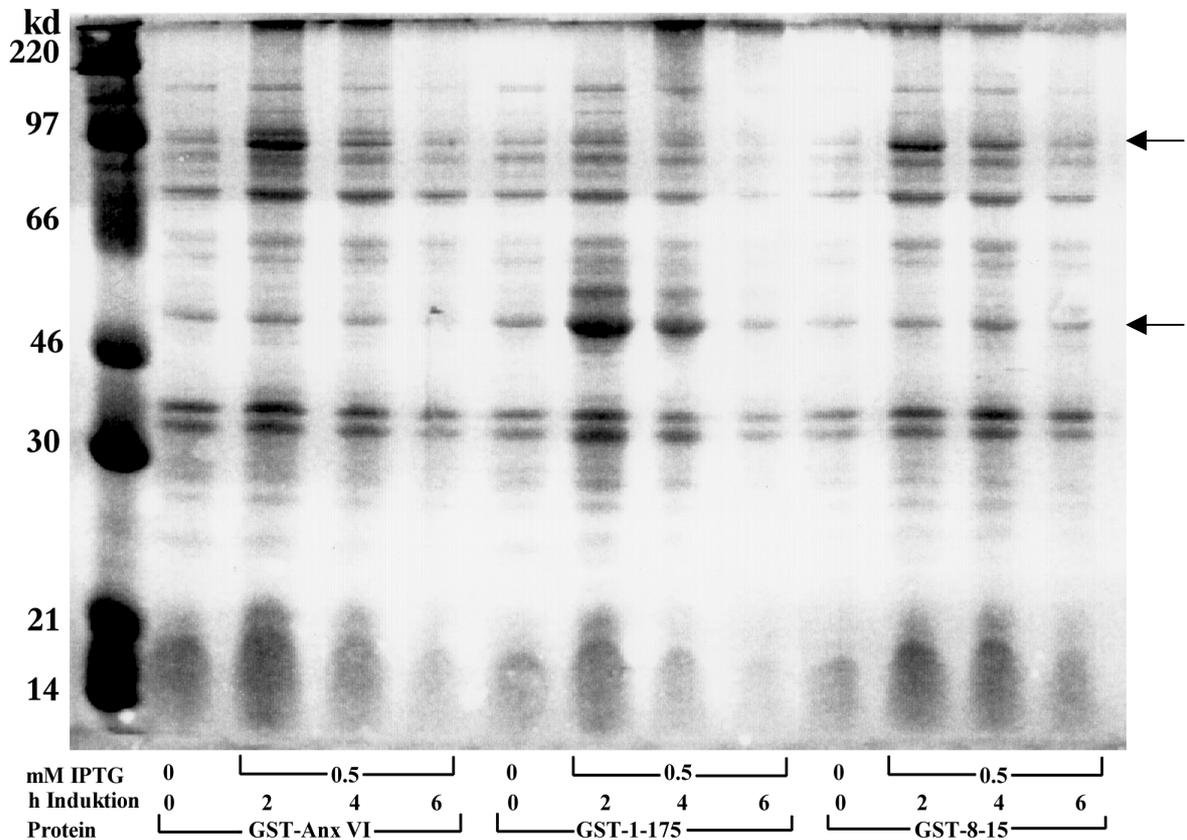


Abb. 20: Induktionskinetik mit GST-AnxVI, GST-del 1-175 und GST-del 8-15
In jede Spur wurden Aliquots der in 100 μ l Probenpuffer lysierten Bakterienpellets aufgetragen. Zu sehen ist ein Coomassie-gefärbtes 10% SDS-PAGE. Als Proteingrößenmarker wurde ein Rainbow Coloured Protein Weight Marker verwendet (äußerst links).

GST-Annexin VI und GST-del 8-15 haben eine Größe von ca. 94 kD und GST-del 1-175 hat eine Größe von ca. 46 kD. In den Spuren mit den 2-Stunden-Induktionsproben sind deutlich verstärkte Banden in den angegebenen Größenordnungen zu erkennen.

Um zu beweisen, dass es sich tatsächlich um die genannten Proteine handelte, wurden die 2-Stunden-Induktionsproben noch einmal für einen Western Blot mit Immundetektion benutzt (Abb. 21).

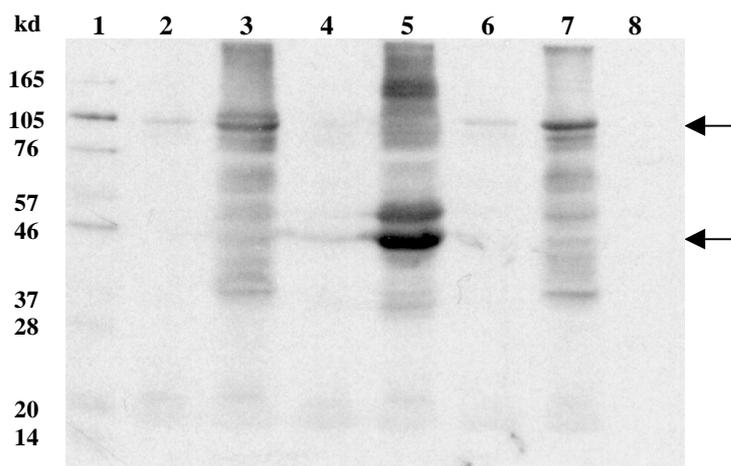


Abb. 21: Nachweis der GST-Annexin VI-Mutanten im Immuno-Blot

Pro Spur wurden 10 µl Aliquots der in 100 µl Probenpuffer lysierten Bakterienpellets in ein 10% SDS-PAGE aufgetragen. Als Proteingrößenmarker wurde ein biotinylierter Proteinmarker und als Positivkontrolle Bovines Annexin VI benutzt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Blots mit dem Kaninchen-Anti-Annexin VI-Antikörper inkubiert. Zu sehen ist die ECL-Detektion.

Spuren:

- 1: Biotinylierter Proteinmarker
- 2: GST-Annexin VI ohne Induktion
- 3: GST-Annexin VI nach 2 Stunden Induktion mit 0,5 mM IPTG
- 4: GST-del 1-175 ohne Induktion
- 5: GST-del 1-175 nach 2 Stunden Induktion mit 0,5 mM IPTG
- 6: GST-del 8-15 ohne Induktion
- 7: GST-del 8-15 nach 2 Stunden Induktion mit 0,5 mM IPTG
- 8: 1 µg Bovines Annexin VI (wurde nach längerer Entwicklung sichtbar)

Alle 3 Proteine sind in den 2-Stunden-Induktionsproben als deutliche Signale zu identifizieren, wobei wiederum eventuelle Komplexbildungen und partielle Syntheseprodukte bzw. kreuzreagierende bakterielle Proteine zusätzliche Signale zu bewirken scheinen.

Somit ließen sich auch die beiden GST-Annexin VI-Mutanten induzieren, wobei die optimalen Bedingungen bei einer 2-Stunden-Induktion mit 0,5 mM IPTG angetroffen wurden.

4.4.3 Isolation von GST-Fusionsproteinen

Da nach den Induktionen der Bakterien nicht nur die GST-Fusionsproteine, sondern auch viele andere Proteine extrahiert wurden, mussten die GST-Fusionsproteine isoliert werden. Dies geschah mit Hilfe von Glutathion-Sepharose-beads. Diese beads setzten sich zusammen aus Glutathion, das die Bindung des GST ermöglichte, und einem Sepharoseanteil, der über seine große Dichte eine Abzentrifugation in Reaktionsgefäßen erlaubte (Abb. 22).

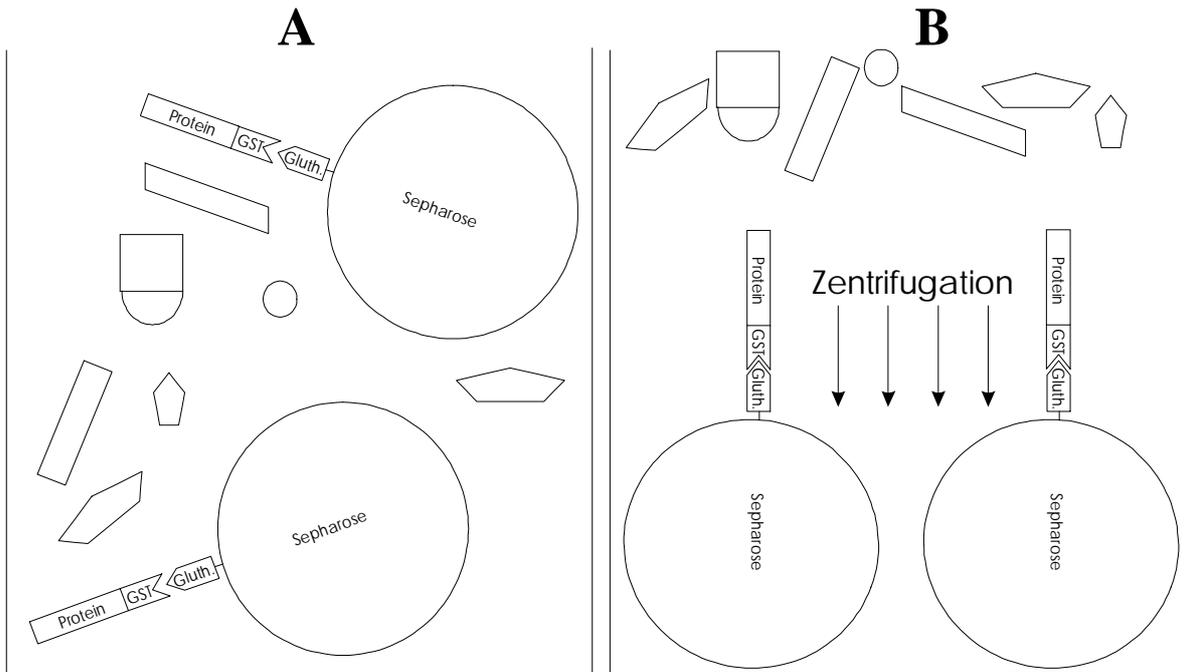


Abb. 22: Schema der Isolierung von GST-Fusionsproteinen mit Hilfe von Glutathion-Sepharose-beads. Schema A gibt die Verhältnisse vor der Zentrifugation wieder, Schema B danach.

4.4.3.1 Aufreinigung der GST-Fusionsproteine am Beispiel des GST-del 1-175

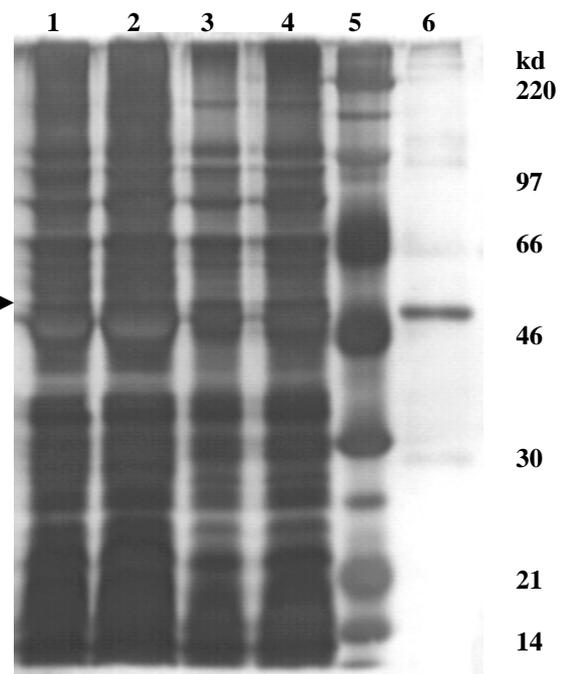
Die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine ließ sich in mehrere wichtige Teilschritte aufgliedern. Die wichtigsten waren: 1. Lyse der Bakterien per Sonifikation, 2. Lyse der Bakterien per Triton X-100, 3. Separation der bakteriellen Proteinfraction per Zentrifugation, 4. Separation der GST-Fusionsproteine per beads und 5. Ablösung der GST-Fusionsproteine von den beads mit Hilfe des Elutionspuffers. Die Aufreinigung von GST-del 1-175 soll hier repräsentativ für alle GST-Fusionsproteine dokumentiert werden (Abb. 23).

Abb. 23: Aufreinigung von GST-del 1-175

Pro Spur wurden Aliquots der jeweiligen Aufreinigungsschritte in reduziertem Zustand auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Zu sehen ist eine Silberfärbung. Als Proteingrößenmarker wurde ein Rainbow Coloured Protein Weight Marker verwendet.

Spuren:

- 1: 10 µl Aliquot des Sonifikationslysats
- 2: 10 µl Aliquot des Tritonlysats
- 3: 5 µl Aliquot der bakt. Proteinfraction
- 4: 10 µl Aliquot der bakt. Proteinfraction nach beads-Zugabe und Zentrifugation
- 5: Rainbow Coloured Protein Weight Marker
- 6: 12 µl Aliquot des von den beads abgelösten Materials



Wie im Polyacrylamid-Gel von links nach rechts zu sehen kommt es zu einem sich klarer herausstrukturierenden Bandenmuster, was den Fortgang der Aufreinigung widerspiegelt. In den Spuren 4 und 6 ist dann deutlich der spezifische Isolierungseffekt der Glutathion-Sephrose-beads zu erkennen: Während sich in Spur 4 der nicht an die beads gebundene, durch die Zentrifugation in den Überstand geratene Proteinanteil zu sehen ist, findet sich in Spur 6 der spezifisch an die beads gebundene Proteinanteil, der nur von einer Bande vertreten wird. Die Laufhöhe dieser Bande liegt im Bereich von 46 kd, wie für GST-del 1-175 erwartet.

4.4.3.2 Nachweis der GST-Fusionsproteine im Western Blot

Zum spezifischen Nachweis wurden isolierte GST-Fusionsproteine auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen, das mit Silber gefärbt wurde und die gleichen Proben wurden dann noch für einen Western Blot mit Immundetektion verwendet (Abb. 24 und 25).

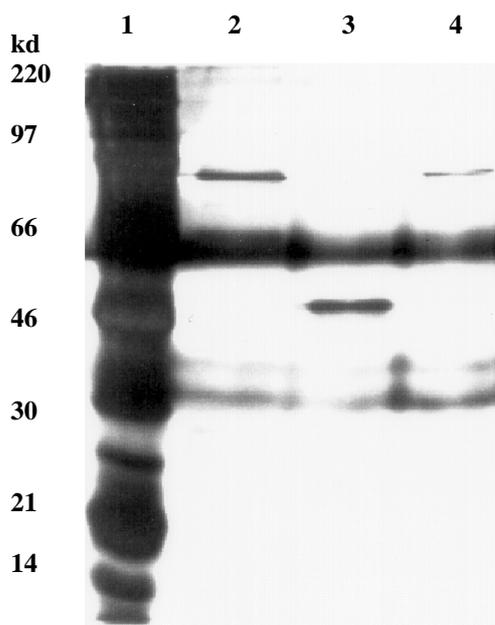


Abb. 24: Nachweis der isolierten GST-Fusionsproteine

Pro Spur wurden Aliquots der aufgereinigten GST-Fusionsproteinlösungen in reduziertem Zustand auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Zu sehen ist das silbergefärbte Gel.

Spuren:

- 1: Rainbow coloured Protein Weight Marker
- 2: GST-Annexin VI
- 3: GST-del 1-175
- 4: GST-del 8-15

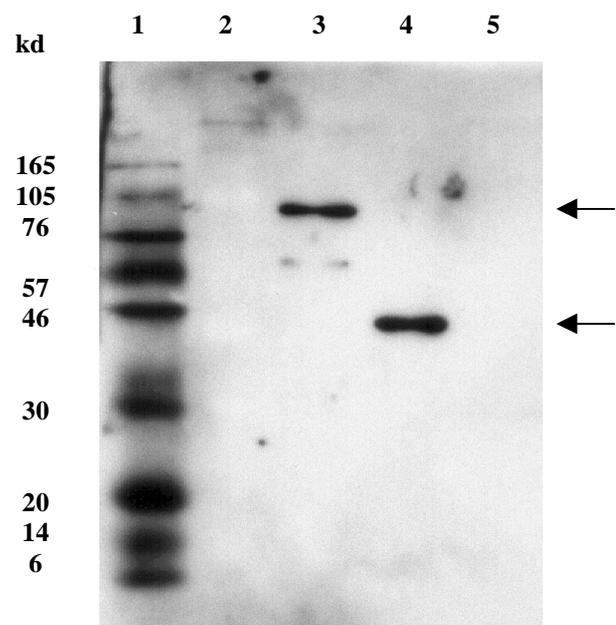


Abb. 25: Nachweis der isolierten GST-Fusionsproteine

Pro Spur wurden Aliquots der aufgereinigten GST-Fusionsproteinlösungen in reduziertem Zustand auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Proteingrößenmarker wurde ein biotinylierter Proteinmarker benutzt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Blots mit dem Schaf-Anti-Annexin VI-Antikörper inkubiert. Zu sehen ist die ECL-Detektion.

Spuren:

- 1: Biotinylierter Proteinmarker
- 2: Rainbow Coloured Protein Weight Marker
- 3: GST-Annexin VI
- 4: GST-del 1-175
- 5: GST-del 8-15

In dem silbergefärbten Proteingel ist in den Spuren 3-5 jeweils eine einzige Bande zu erkennen, die in ihrer Laufhöhe den erwarteten Größen der GST-Fusionsproteine entsprechen. Im Immunoblot lassen sich hingegen nur das GST-Annexin VI und das GST-del 1-175 spezifisch nachweisen. Das Fehlen des GST-del 8-15 ist auf die mangelnde Affinität des Schaf-Anti-Annexin VI-Antikörpers zum del 8-15 zurückzuführen, was sich mit früheren Erfahrungen der Arbeitsgruppe Grewal deckt.

Mit diesem Versuch konnte somit gezeigt werden, dass die Isolierung aller GST-Fusionsproteine mit den Glutathion-Sepharose-beads spezifisch möglich ist.

4.4.3.3 Isolierte GST-Fusionsproteine und Proteinkonzentrationsabschätzung im Proteingel

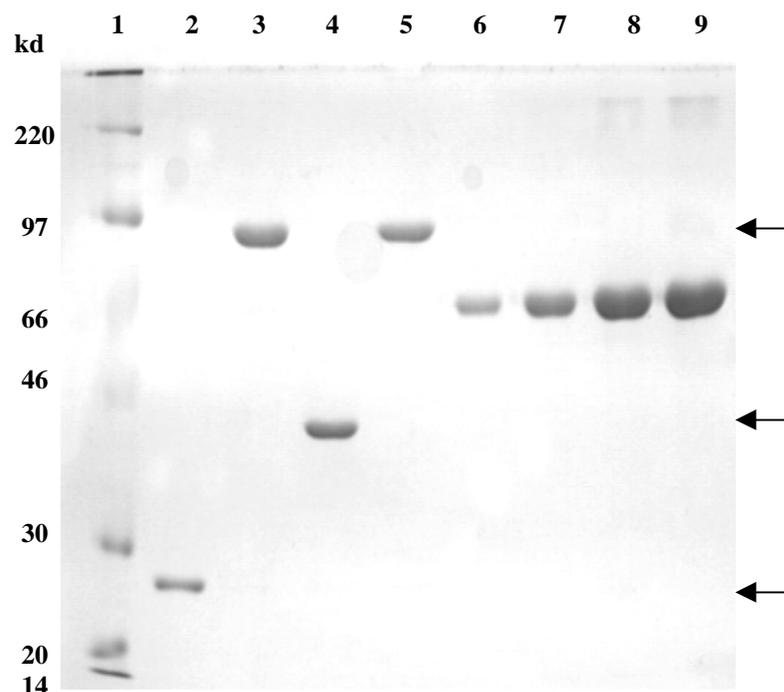
Die Proteinkonzentrationen der isolierten GST-Fusionsproteine wurden mit Hilfe von Proteingelen abgeschätzt, auf denen gleichzeitig Albumin in bekannten Konzentrationen aufgetragen wurde (Abb. 26).

Abb. 26: Konzentrationsabschätzung der GST-Fusionsproteine auf einem Proteingel.

Pro Spur wurden Aliquots der aufgereinigten GST-Fusionsproteinlösungen und Bovines-Serum-Albumin-Lösungen bekannter Konzentrationen in reduziertem Zustand auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Zu sehen ist die Coomassie-Färbung des Gels.

Spuren:

- 1: Rainbow Coloured Protein Weight Marker
- 2: GST
- 3: GST-Annexin VI
- 4: GST-del 1-175
- 5: GST-del 8-15
- 7: 4 µg BSA
- 8: 8 µg BSA
- 9: 12 µg BSA



Die aufgetragenen Proteinmengen von GST-Annexin VI, GST-del 1-175 und GST-del 8-15 liegen in diesem Beispiel bei ca. 4 µg, die von GST bei ca. 2 µg.

4.4.4 Proteinbindungsversuche

Nach Isolation ausreichender Mengen der verschiedenen GST-Fusionsproteine wurde mit der Etablierung von Proteinbindungsversuchen begonnen.

4.4.4.1 Etablierung

Die Methode der Proteinbindungsversuche ließ sich in mehrere Schritte aufteilen:

1. Kopplung der GST-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose-beads, 2. Inkubation der gekoppelten GST-Fusionsproteine mit Proteinextrakten, 3. Separation der gekoppelten GST-Fusionsproteine einschließlich gebundener Proteine von nichtbindenden Proteinen, 4. Ablösung der gebundenen Proteine von GST-Fusionsproteinen. Die Etablierung soll hier anhand der Dokumentation der Teilschritte eines Proteinbindungsversuchs mit GST und GST-Annexin VI gezeigt werden (Abb. 27). Eingesetzt wurden entsprechend den molaren Massen 75 µg GST und 250 µg GST-Annexin VI sowie 390 µg Proteinextrakte.

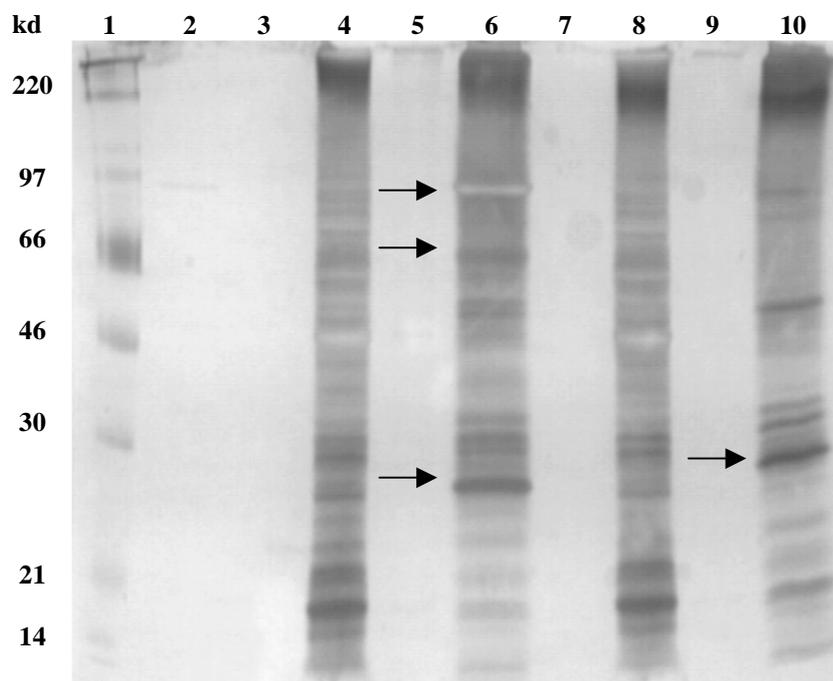


Abb. 27: Etablierung der Proteinbindungsversuche

Pro Spur wurden 10 µl Aliquots in reduziertem Zustand auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Zu sehen ist das silbergefärbte Proteingel.

Spuren:

- | | | |
|--|---|----------------|
| 1: Rainbow Coloured Protein Weight Marker | | |
| 2: Überstand mit Fusionsproteinen, die nicht an beads gekoppelt wurden | } | GST-Annexin VI |
| 3: Wascheluate mit nicht an beads gekoppelten Fusionsproteinen | | |
| 4: Nichtbindende Proteine | | |
| 5: Wascheluate mit nichtbindenden Proteinen | | |
| 6: Bindende Proteine | | |
| 7: Überstand mit Fusionsproteinen, die nicht an beads gekoppelt wurden | } | GST |
| 8: Nichtbindende Proteine | | |
| 9: Wascheluate mit nichtbindenden Proteinen | | |
| 10: Bindende Proteine | | |

Die Analyse der einzelnen Spuren ergibt folgendes: In Spur 2 ist als einziges eine Bande etwas unterhalb der 97 kd Marke sichtbar, was nicht an die beads gekoppeltes GST-Annexin VI darstellen dürfte. Die Spuren 3, 5 und 9 zeigen keine Banden, die jeweiligen

Waschschritte scheinen also zur Entfernung des jeweiligen Proteinmaterials geführt zu haben. In der Spur 7 ist ebenfalls keine Bande zu erkennen, die Kopplung des GST an die beads scheint somit vollständig gewesen zu sein. Die reichhaltigen Bandenmuster in den Spuren 4 und 8 spiegeln das nichtgebundene Material wider, wohingegen die Spuren 6 und 10 die an GST-Annexin VI bzw. an GST gebundenen Proteine zeigen. Wichtig für die weitere Interpretation sind die beiden letztgenannten Spuren, deren Bandenmuster darüber Aufschluss gibt, ob sich tatsächlich Proteine an das Annexin VI gebunden haben. Die Spur 10 mit dem bindenden Proteinmaterial des GST stellt dabei die an die Sepharose oder an das GST bindenden Proteine dar, die theoretisch bei allen an beads gekoppelten GST-Fusionsproteinen vorkommen sollten. Durch Subtraktion dieser Banden aus dem Bandenmuster der Spur 6 bleiben Banden von den Proteinen übrig, die in diesem Versuch an das Annexin VI gebunden haben. Die Negativbande etwas unterhalb der 97 kd Marke (mit Pfeil markiert) sollte das eingesetzte GST-Annexin VI vertreten, hingegen gibt es eine starke Bande im Bereich der 66 kd Marke (mit Pfeil markiert), die in Spur 10 nicht zu erkennen ist. Im Bereich von 25 kd gibt es sowohl in Spur 6 wie in Spur 10 eine verstärkte Bande (mit Pfeil markiert). Allerdings scheint die Bande in Spur 10 etwas höher zu laufen und da genau in diesem Bereich das GST zu erwarten ist, könnte es sich bei der Bande in Spur 6 ebenfalls um ein spezifisch an das GST-Annexin VI gebundenes Protein handeln. So lässt sich noch über ein paar weitere Banden spekulieren, ob sie Annexin VI-bindende Proteine darstellen. Zur weiteren Untersuchung wurden deshalb spezifische Antikörper eingesetzt, um bindende Proteine zu identifizieren.

4.4.4.2 Bindung von endogenem Annexin VI an GST-Fusionsproteine

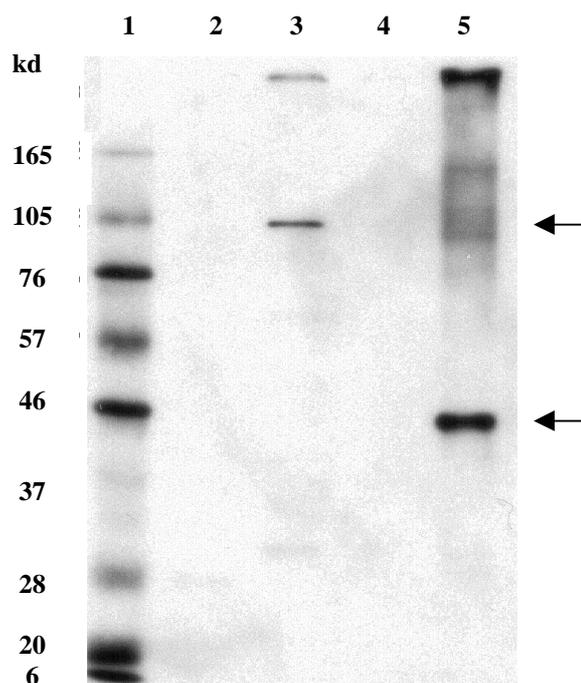
Mit folgendem Bindungsversuch sollte herausgefunden werden, ob Annexin VI an das GST-Annexin VI-Fusionsprotein bindet. Bei gleichzeitig fehlender Bindung an GST wäre dies ein Hinweis darauf, dass Annexin VI intrazellulär Oligomere bildet. Auch die GST-Annexin VI-Mutanten wurden eingesetzt, um eventuelle Unterschiede zum Wildtyp feststellen zu können (Abb. 28). 30 µg GST, 100 µg GST-Annexin VI bzw. GST-del 8-15 und 49 µg GST-del 1-175 sowie 780 µg Proteinextrakte wurden für diesen Versuch verwendet.

Abb. 28: Bindung von endogenem Annexin VI an GST-Fusionsproteine

Pro Spur wurden 4,5 µl Aliquots des bindenden Proteinmaterials der einzelnen Ansätze in reduziertem Zustand auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Proteingrößenmarker wurde ein biotinylierter Proteinmarker benutzt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Blots mit dem Schaf-Anti-Annexin VI-Antikörper inkubiert. Zu sehen ist die ECL-Detektion

Spuren:

- 1: Biotinylierter Proteinmarker
- 2: GST-Ansatz
- 3: GST-Annexin VI-Ansatz
- 4: GST-del 8-15-Ansatz
- 5: GST-del 1-175-Ansatz



Signale sind in Spur 3 unterhalb der 105 kd-Marke zu sehen und in Spur 5 auf Höhe der 46 kd-Marke. Dabei sollte es sich um die eingesetzten GST-Fusionsproteine GST-Annexin VI bzw. GST-del 1-175 handeln. Dass es in Spur 4 nicht zu einem äquivalenten Signal wie in Spur 3 kommt, liegt wieder an der fehlenden Affinität des Schaf-Anti-Annexin VI-Antikörpers zum del 8-15. Ansonsten sind keine Signale zu sehen, vor allem nicht in Höhe von 68 kd, was gegen eine Bindung von endogenem Annexin VI an die GST-Fusionsproteine spricht.

4.4.4.3 Titration mit Proteinextrakten

Durch eine Inkubation des GST-Annexin VI mit steigenden Mengen an Proteinextrakten sollte herausgefunden werden, ob die Bindung einiger Proteine auf Konzentrationsabhängigkeiten beruht. Eingesetzt wurden dazu 4 µg GST und jeweils 14 µg GST-Annexin VI. An Proteinextrakten wurden 390 µg, 780 µg, 1950 µg und 3900 µg verwendet (Abb. 29).

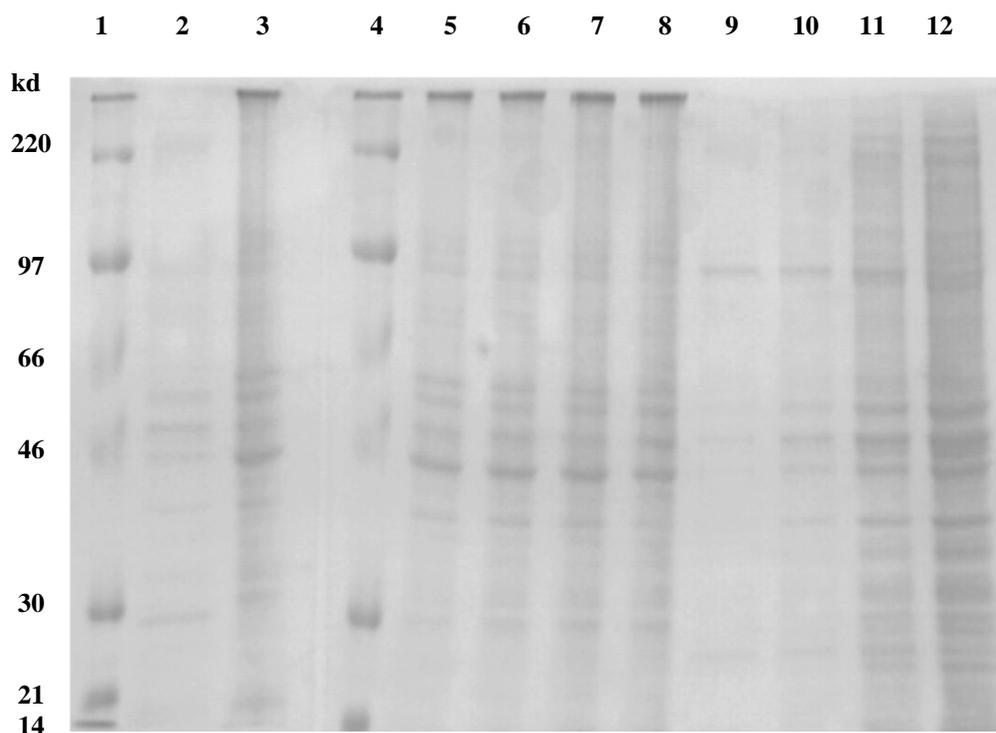
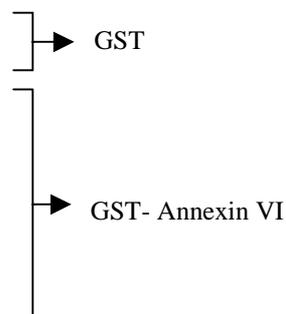


Abb. 29: Titration des GST-Annexin VI mit Proteinextrakten

Pro Spur wurden 12 µl Aliquots in reduziertem Zustand auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Zu sehen ist das coomassiegefärbte Proteingel.

Spuren:

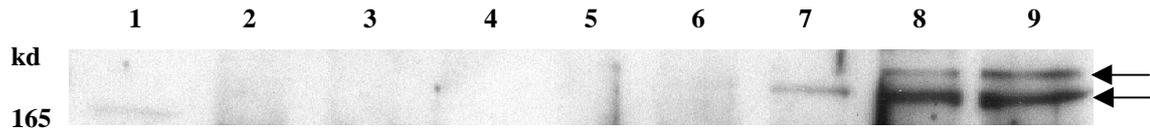
- 1 + 4: Rainbow Coloured Protein Weight Marker
- 2: Bindende Proteine, 390 µg Proteinextrakte
- 3: Nichtbindende Proteine, 390 µg Proteinextrakte
- 5: Nichtbindende Proteine, 390 µg Proteinextrakte
- 6: Nichtbindende Proteine, 780 µg Proteinextrakte
- 7: Nichtbindende Proteine, 1950 µg Proteinextrakte
- 8: Nichtbindende Proteine, 3900 µg Proteinextrakte
- 9: Bindende Proteine, 390 µg Proteinextrakte
- 10: Bindende Proteine, 780 µg Proteinextrakte
- 11: Bindende Proteine, 1950 µg Proteinextrakte
- 12: Bindende Proteine, 3900 µg Proteinextrakte



Soweit erkennbar scheint es nicht zu einem zusätzlichen Auftreten von Proteinbanden mit höheren Mengen Proteinextrakten im GST-Annexin VI-bindenden Proteinmaterial zu kommen. Viel mehr verstärken sich alle Proteinbanden, außer einer unterhalb von 97 kd, was GST-Annexin VI darstellen dürfte, proportional der eingesetzten Proteinextrakte. Offensichtlich kommt es nicht zu konzentrationsabhängigen Bindungsphänomenen.

4.4.4.4 Bindung von Spektrin an GST-Annexin VI

Die Eluate mit bindenden und nichtbindenden Proteinen aus dem Titrationsversuch mit GST-Annexin VI wurden verwendet, um herauszufinden, ob Spektrin an GST-Annexin VI bindet (Abb. 30).

**Abb. 30:** Bindung von Spekttrin an GST-Annexin VI

Pro Spur wurden 5 μ l Aliquots in reduziertem Zustand auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Proteingrößenmarker wurde ein biotinylierter Proteinmarker benutzt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Blots mit dem Kaninchen-Anti-Spekttrin-Antikörper inkubiert. Zu sehen ist die ECL-Detektion

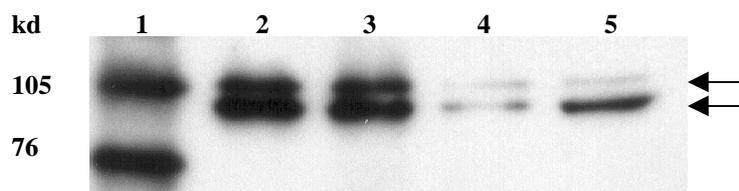
Spuren:

- 1: Biotinylierter Proteinmarker
- 2: Nichtbindende Proteine, 390 μ g Proteinextrakte
- 3: Nichtbindende Proteine, 780 μ g Proteinextrakte
- 4: Nichtbindende Proteine, 1950 μ g Proteinextrakte
- 5: Nichtbindende Proteine, 3900 μ g Proteinextrakte
- 6: Bindende Proteine, 390 μ g Proteinextrakte
- 7: Bindende Proteine, 780 μ g Proteinextrakte
- 8: Bindende Proteine, 1950 μ g Proteinextrakte
- 9: Bindende Proteine, 3900 μ g Proteinextrakte

In den Spuren 7, 8 und 9 kommt es oberhalb der 165 kd-Marke zu einer Doppelbande, die mit zunehmender Proteinextraktmenge an Stärke gewinnt. Da Spekttrin aus 2 Polypeptiden mit 280 und 246 kd besteht, könnte es sich bei dieser Doppelbande um Spekttrin handeln. Ob es sich jedoch um eine spezifische Bindung an den Annexin VI-Teil des GST-Annexin VI handelt, ist, wegen des Fehlens der Negativkontrolle GST, nicht mit Sicherheit zu sagen.

4.4.4.5 Bindung von Dynamin an GST-Annexin VI

In einem weiteren Proteinbindungsversuch wurden 30 μ g GST sowie 100 μ g GST-Annexin VI eingesetzt und beides mit je 800 μ g Proteinextrakten inkubiert (Abb. 31).

**Abb. 31:** Bindung von Dynamin an GST-Annexin VI

Pro Spur wurden 10 μ l Aliquots in reduziertem Zustand auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Blots mit dem Maus-Anti-Dynamin-Antikörper inkubiert. Zu sehen ist die ECL-Detektion

Spuren:

- 1: Biotinylierter Proteinmarker
- 2: Nichtbindende Proteine von GST
- 3: Nichtbindende Proteine von GST-Annexin VI
- 4: Bindende Proteine von GST
- 5: Bindende Proteine von GST-Annexin VI

In allen Spuren sind Doppelbanden in Höhe der 105 kd-Marke zu sehen, was für Dynamin zu erwarten war. Die Spuren 2 und 3 zeigen im Verhältnis zu den Spuren 3 und 4

jeweils ein deutliches Signal. Dies lässt darauf schließen, dass der größere Teil der Dynaminmoleküle aus den Proteinextrakten nicht an die GST-Fusionsproteine gebunden hat. Das relativ schwache Signal in Spur 4 spricht für eine relativ geringe Bindung an GST, wohingegen das weitaus stärkere Signal in Spur 5 eine spezifische Interaktion mit dem Annexin VI-Teil des GST-Annexin VI-Fusionsproteins bedeutet.

4.4.4.6 Bindung von Caveolin an GST-Annexin VI

Durch nachfolgenden Proteinbindungsversuch sollte herausgefunden werden, ob Caveolin mit GST-Annexin VI interagiert. Dazu wurden 30 µg GST und 100 µg GST-Annexin VI mit jeweils 800 µg Proteinextrakten inkubiert (Abb. 32).

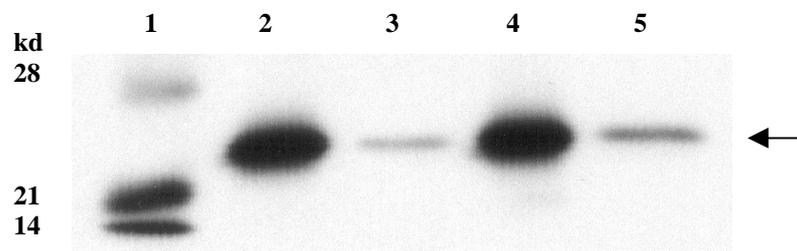


Abb. 32: Bindung von Caveolin an GST-Annexin VI

Pro Spur wurden 10 µl Aliquots in reduziertem Zustand auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Blots mit dem Kaninchen-Anti-Caveolin-Antikörper inkubiert. Zu sehen ist die ECL-Detektion.

Spuren:

- | | | |
|---------------------------------|---|------------------|
| 1: Biotinylierter Proteinmarker | } | → GST |
| 2: Nichtbindende Proteine | | |
| 3: Bindende Proteine | } | → GST-Annexin VI |
| 4: Nichtbindende Proteine | | |
| 5: Bindende Proteine | | |

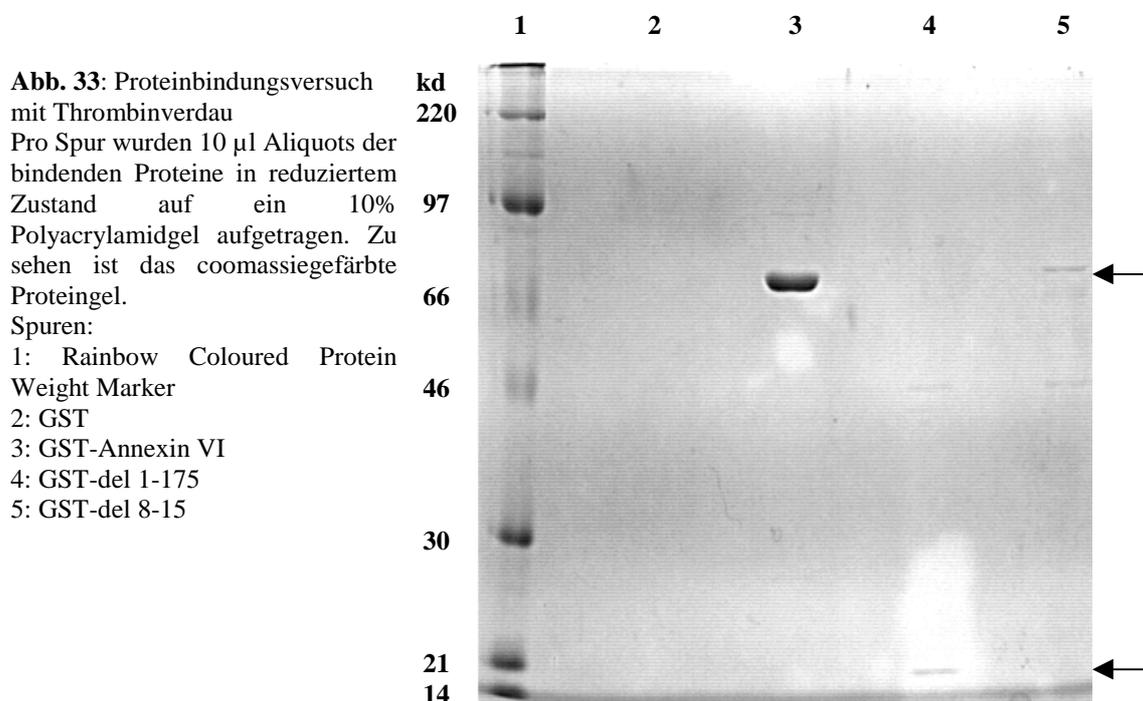
In allen Spuren, in denen Versuchsproben aufgetragen sind, kommt es zu einem Signal oberhalb der 21 kd-Marke, was mit der erwarteten Laufhöhe des Caveolin übereinstimmt.

In den Spuren 2 und 4 sind sehr starke Signale zu erkennen, das bedeutet, dass ein Großteil des Caveolins der Proteinextrakte nicht mit den GST-Konstrukten interagiert. Das bindende Proteinmaterial des GST-Annexin in der Spur 5 zeigt ein mindestens doppelt so starkes Signal wie das des GST in Spur 3. Somit ist es zu einer Assoziation des Caveolin mit dem Annexin VI-Teil des GST-Annexin VI gekommen.

4.4.4.7 Thrombinverdau von GST-Fusionsproteinen

Die GST-Fusionsproteine lassen sich mit Hilfe von Thrombin zwischen dem GST und dem nachfolgenden Protein zerschneiden (siehe auch Abb. 15). Das an das Glutathion-Sepharose-bead gebundene GST kann dann per Zentrifugation von dem zu untersuchenden

Protein mitsamt gebundenem Proteinmaterial separiert werden. Dadurch ist es möglich, die bei den Nachweisen bindender Proteine störende unspezifische Bindung an das GST bzw. an die Sepharose auszuschalten. Zur Etablierung dieser Methode wurde ein Proteinbindungsversuch durchgeführt mit 30 μg GST, 49 μg GST-del 1-175, 100 μg GST-Annexin VI und 100 μg GST-del 8-15. Alle GST-Fusionsproteine wurden mit jeweils 800 μg Proteinextrakten inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Sepharose-bead-Pellets zur Ablösung der gebundenen Proteine jedoch nicht in SDS aufgeköcht, sondern mit 3 μl Thrombin, das in 50 μl PBS aufgenommen worden war, über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Die Sepharose-beads mit dem daran gebundenen GST wurden abzentrifugiert und Aliquots des Überstands im SDS-PAGE analysiert (Abb. 33).



In dem GST-Ansatz konnte es wegen der fehlenden Schnittstelle nicht zum Thrombinverdau kommen, so dass alle Proteine, die unspezifisch an das GST oder an die Glutathion-Sepharose-beads gebunden hatten, im Pellet geblieben sein sollten. Erwartungsgemäß sind in Spur 2 keine Proteinbanden zu erkennen. Die starke Bande in Spur 3 dürfte auf Annexin VI zurückgehen, welches durch den Thrombinverdau aus dem GST-Annexin VI freigesetzt worden ist. Bei den anderen schwach erkennbaren Banden könnte es sich um gebundene Proteine zu handeln. In Spur 4 sind 2 Banden in Höhe der 21 kD- und der 46 kD-Marke zu sehen. Die obere schwächere Bande könnte unverdautes GST-del 1-175 darstellen, die untere stärkere Bande hingegen freigesetztes del 1-175. Die Spur 4 weist 2 Banden in Höhe der 66 kD-Marke und der 46 kD-Marke auf. Freigesetztes del 8-

15 könnte durch die obere stärkere Bande vertreten werden, ein bindendes Protein durch die schwächere untere.

Der Verdau von GST-Fusionsproteinen im Rahmen von Proteinbindungsversuchen könnte eine Erfolg versprechende Methode sein, um Probleme der unspezifischen Bindung zu beseitigen. Leider konnte diese Methode im Rahmen der Arbeit nicht weiter verfolgt werden.

4.5 Herstellung einer stabilen Zelllinie

Zur weiteren Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen Annexin VI und Caveolin sollten drei Zelllinien hergestellt werden, die Caveoline stabil überexprimierten. Dazu wurden CHO-Zellen ausplattiert und ein Ansatz mit 10 µg DNA des Caveolin-1, ein zweiter Ansatz mit 10 µg DNA des Caveolin-3 und ein dritter Ansatz mit 10 µg DNA der Caveolin-3-Mutante CAV3(DGV)^{HA} transfiziert. Mit Hilfe von Geneticin G-418 wurden die Zellen selektioniert, die die Fremd-DNA aufgenommen hatten. Einzelne Zellklone wurden gezüchtet und auf die Expression des transfizierten Gens hin überprüft. Lediglich die Caveolin-3-Mutante konnte als stabile Zelllinie etabliert werden.

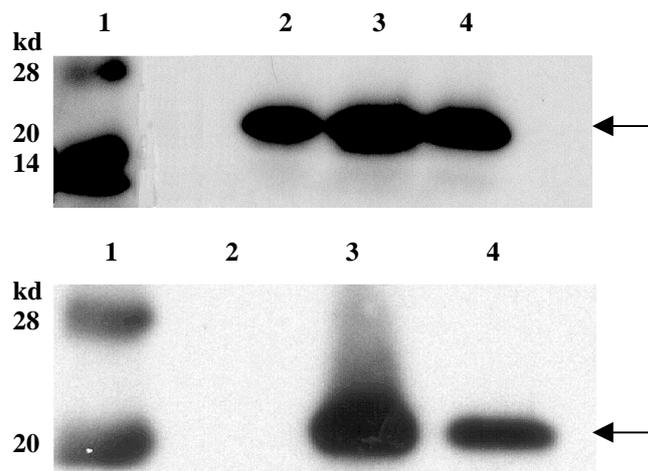
4.5.1 Nachweis der Überexpression der Caveolin-Mutante CAV3(DGV) im Western Blot

Proteinextrakte aus Zellklonen wurden per Western Blot mit Immundetektion auf Expression der Caveolin-Mutante CAV3(DGV) untersucht (Abb. 34).

Abb. 34: Nachweis der Überexpression von CAV3(DGV) im Western Blot

In 2 Ansätzen wurden pro Spur 10 µl Aliquots in reduziertem Zustand auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde der eine Ansatz mit dem Kaninchen-Anti-Caveolin-Antikörper (oben) und der andere mit dem Ratte-Anti-Hämagglutinin-Antikörper inkubiert (unten). Zu sehen ist die ECL-Detektion.

- Spuren:
 1: Biotinylierter Proteinmarker
 2: Proteinextrakte aus CHO-Wildtypzellen
 3: Proteinextrakte aus Klon Nr. 13
 4: Proteinextrakte aus Klon Nr. 14



Alle Signale erscheinen oberhalb der 20 kd-Marke auf gleicher Höhe, was für die Caveolin-Mutante zu erwarten war. Die Signale der Spuren 3 und 4 des mit dem Anti-

Caveolin-Antikörper behandelten Blots sind stärker ausgeprägt, als das Signal in Spur 2. Das heißt, dass die Expression von Caveolinen in den Klonen mit den Nummern 13 und 14 erhöht sein muss. Der spezifische Nachweis gelingt in dem Blot, der mit dem Anti-Hämagglutinin-Antikörper behandelt wurde, da CAV3(DGV)^{HA} über einen Hämagglutinin-tag verfügt, an das dieser Antikörper spezifisch bindet. Während in Spur 2, also bei den CHO-Wildtyp-Proteinextrakten, kein Signal sichtbar ist, kommt es in den Spuren 3 und 4 zu deutlichen Signalen. Der Klon Nr. 13 wurde wegen der offensichtlich höheren Expression für spätere Versuche weiter kultiviert, konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr genutzt werden.

5. Diskussion

5.1 Bedeutung des Annexin VI in der rezeptorvermittelten Endozytose

Die rezeptorvermittelte Endozytose ist ein hochkomplexer biologischer Vorgang, bei dem eine Vielzahl von Molekülen auf geregelte Art und Weise miteinander interagieren, um Stoffe aus dem Extrazellulärraum in das Innere der Zelle zu transportieren. Zwar wurden in den letzten Jahren große Fortschritte bei der Aufklärung der wichtigsten Mechanismen und Komponenten dieses Internalisationsweges gemacht, viele Faktoren sind aber weiterhin unbekannt oder nur unzureichend charakterisiert. Zu letzteren gehören auch einige Mitglieder der Annexinfamilie, denen in verschiedenen Studien Rollen im intrazellulären Membranverkehr zugeordnet wurden. Besonders das Annexin VI wurde wiederholt im Zusammenhang mit der rezeptorvermittelten Endozytose untersucht. Da die Datenlage über die genaue Aufgabe des Proteins in diesem biologischen Prozess jedoch immer noch relativ dürftig ist, sollte es in dieser Arbeit mit Hilfe zweier verschiedener Versuchssysteme weiter studiert werden: Einerseits dienten Aufnahme- und Degradationsexperimente mit radioaktiv markiertem LDL in Annexin VI-überexprimierenden CHO-Zellen der Analyse eines eventuell quantifizierbaren Einflusses auf die rezeptorvermittelte Endozytose. Andererseits wurden Proteinbindungsversuche mit GST-Fusionsproteinen benutzt, um intrazelluläre Interaktionspartner identifizieren zu können.

5.1.1 Dosisabhängige Stimulation der Aufnahme und Degradation von ^{125}I -LDL durch Annexin VI

Der überwiegende Teil des Wissens über das Annexin VI stammt aus Studien, in denen die biochemischen Eigenschaften des Proteins erkundet oder die intrazelluläre Lokalisation bestimmt wurden. Wenige Experimente hatten zum Ziel, funktionelle Daten über den Einfluss des Proteins auf den zellulären Stoffwechsel zu gewinnen und noch weniger Erkenntnisse resultieren aus in-vivo Versuchen. In dieser Arbeit sollten deshalb ein Transfektionssystem sowie stabil Annexin VI-überexprimierende Zellen über die Effekte des Proteins auf die rezeptorvermittelte Endozytose Aufschluss geben.

Die Fähigkeit zur Überexpression des Annexin VI-Wildtyps und einiger Annexin VI-Mutanten mit dem gewählten Transfektionssystem wurde per Western Blot-Analyse eines CHO-Zelllysats überprüft (Abb. 7). Bis auf eine Mutante ließen sich alle Proteine erfolgreich überexprimieren. Dass es sich dabei um spezifische Phänomene handelte, zeigte sich im Fehlen eines korrespondierenden Signals in der Spur des Lysats aus β -Galactosidase-transfizierten CHO-Zellen. Das relativ starke Annexin VI-Signal, z.B. verglichen mit dem

relativ schwachen Signal, das aus der Spur mit 1 µg Bovines Annexin VI entstammte, ließ darauf schließen, dass die Überexpression ziemlich effizient funktioniert hatte oder aber der Antikörper zu diesem Protein eine besonders hohe Affinität besaß. Um das Potential zur Überexpression auszutesten, wurden CHO-Zellen mit steigenden Mengen Annexin VI-Wildtyp transfiziert und das Zelllysate wiederum im Western Blot analysiert (Abb. 8). Es zeigte sich im niedrigen Dosisbereich eine positive Korrelation zwischen der eingesetzten Menge transfizierter DNA und dem Ausmaß der Überexpression. In höheren Dosisbereichen blieb das Annexin VI-Signal ungefähr gleich stark, d.h. es kam zu einem Sättigungseffekt bezüglich der Exprimierbarkeit.

Eine densitometrische Analyse erlaubte die Objektivierung und Quantifizierung des Ergebnisses: Die Proteinexpression konnte durch die Transfektion um mehr als das Vierfache gesteigert werden (Abb. 9). Unter der Annahme, dass die Transfektionseffizienz bei ca. 10-20% lag, d.h., dass nur 10-20% aller ausplattierten Zellen tatsächlich transfiziert wurden (Daten Arbeitsgruppe Grewal) und die Überexpressionssignale des Annexin VI mit dem Signal des Bovines Annexin VI in Beziehung setzt, so lässt sich errechnen, dass innerhalb der 24 Stunden nach Transfektion bis zu ca. $4,9 \times 10^9$ Moleküle Annexin VI pro transfizierter Zelle synthetisiert wurden. Dies entspräche immerhin ca. 50% der gesamten durchschnittlichen Proteinsynthesemenge einer Zelle innerhalb von 24 Stunden.

Der Sättigungseffekt lässt mehrere Erklärungsmöglichkeiten zu: Entweder es kommt bei sehr hohen intrazellulären Annexin VI-Konzentrationen zu zytotoxischen Auswirkungen auf den Zellmetabolismus, so dass transfizierte Zellen zu Grunde gehen und nicht weiter zur Proteinsynthese beitragen können. Hierüber wäre eine Untersuchung der Zellteilungsaktivität aufschlussreich gewesen. Oder es kommt zu einem Mangel an Faktoren auf Transkriptions- oder Translationsebene, weshalb die Annexin VI-Synthese nicht mehr weiter zunehmen kann. Aber auch eine verringerte Halbwertszeit des Proteins bei noch weiter gesteigerter Synthese ließe sich als Grund für die in etwa gleichstarken Signale in der Western Blot-Analyse im Bereich hoher Transfektionsmengen heranziehen.

Das Transfektionssystem wurde nun genutzt, um den Einfluss des Annexin VI auf die rezeptorvermittelte Endozytose zu untersuchen. CHO-Zellen wurden auf die gleiche Art und Weise mit steigenden Mengen Annexin VI-DNA transfiziert. Da nach den Erfahrungen der Arbeitsgruppe Grewal die endogene LDL-Rezeptorexpression dieser Zellen einen limitierenden Faktor dargestellt hätte, wurden sie parallel mit konstanten Mengen LDL-Rezeptor kotransfiziert. Eine ähnliche Vorgehensweise hatten 1992 auch Bucci et al. gewählt. Sie mussten Rab5 zusammen mit dem Transferrinrezeptor exprimieren, um zu demonstrieren, dass Rab5 die

Internalisation von Transferrin induziert. Es ergab sich eine der transfizierten Annexin VI-DNA-Menge proportionale Steigerung der Internalisation und Degradation des Lipoproteins (Abb. 10). Bei der höchsten transfizierten Annexin VI-Menge hatte sich die Aufnahme und Degradation des LDL nahezu verdoppelt, so dass von einer stimulierenden Rolle des Annexin VI für die rezeptorvermittelte Endozytose des Lipoproteins gesprochen werden kann. Interessanterweise ist auch im Bereich höherer Mengen transfizierter Annexin VI-DNA noch kein Sättigungseffekt bezüglich der Aufnahme und Degradation des LDL zu sehen. Dieser Sachverhalt legt die Vermutung nahe, dass noch keine zytotoxischen Wirkungen von den hohen Annexin VI-Konzentrationen und den sich daraus ergebenden intrazellulären Stoffwechselfvorgängen aufgetreten sein dürften. Andererseits lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass das Protein eine stimulatorische Rolle in der Internalisation und Degradation des Lipoproteins zu spielen scheint. Denn entweder bewerkstelligt es alleine die verstärkte Endozytose des LDL oder es werden durch seine Anwesenheit auch andere Faktoren vermehrt zur Expression gebracht, die für die Aufnahme und intrazelluläre Verstoffwechslung des Lipoproteins benötigt werden. Es bleibt festzuhalten, dass offensichtlich sowohl die Aufnahme als auch die Degradation stimuliert werden. Es wäre genauso gut denkbar gewesen, dass das Annexin VI lediglich die Internalisation gefördert hätte, nicht aber die weitere Metabolisierung. Allerdings hätte dieses wahrscheinlich zu zytotoxischen Effekten geführt, da das aufgenommene LDL in der Zelle akkumuliert wäre. Das bedeutet, dass das Protein wohl nicht nur an der Zelloberfläche, sondern auch bei Vorgängen, die weiter intrazellulär stattfinden, eine Rolle spielt.

Der Vergleich der substratabhängigen Aufnahme und Degradation von LDL in Annexin VI-überexprimierenden CHO-Zellen mit CHO-Zellen ohne Annexin VI-Überexpression lieferte ein leicht widersprüchliches Bild zum Ergebnis der dosisabhängigen Aufnahme und Degradation. Zwar kam es in den Annexin VI-überexprimierenden Zellen zu einer sehr viel stärkeren Steigerung der Aufnahme und Degradation des Lipoproteins, je mehr LDL den Zellen angeboten wurde (Abb. 12). Jedoch lag die absolute LDL-Aufnahme und -Degradation in den Annexin VI-überexprimierenden Zellen niedriger als in den Vergleichszellen. Da eventuell eine niedrigere LDL-Rezeptorexpression in den Annexin VI-überexprimierenden Zellen als Ursache für dieses Ergebnis gelten konnte und somit möglicherweise ein Problem der Kotransfektion mit der Annexin VI-DNA vorlag, wurde die LDL-Rezeptorexpression überprüft. Hierbei ergab sich einerseits, dass der LDL-Rezeptor trotz kotransfizierter Annexin VI-DNA dosisabhängig überexprimierbar war. Andererseits wurde deutlich, dass das Expressionsniveau in Zellen, die mit Annexin VI-DNA kotransfiziert worden waren, genauso hoch war wie in Zellen, die mit β -Galactosidase-DNA-kotransfiziert worden waren (Abb. 13).

Somit scheidet eine verringerte LDL-Rezeptorexpression als Ursache aus. Weil die Transfektion von DNA einen äußerst komplexen Vorgang darstellt und immer viele Faktoren, wie z.B. Güte der Zellen, Transfektionseffizienz und Distribution der DNA auf die Zielzellen einen entscheidenden Einfluss auf das Resultat ausüben, konnte ein Problem der Transfektion trotzdem nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Um dieser Unsicherheit aus dem Wege zu gehen, wurde ein stabil Annexin VI-überexprimierender Zellklon der Arbeitsgruppe Grewal mit steigenden LDL-Rezeptormengen transfiziert. Im Vergleich zu Wildtyp-CHO-Zellen konnte eine bis zu 40%-gesteigerte LDL-Aufnahme verzeichnet werden (Abb. 14). Somit wurde auf der einen Seite gezeigt, dass die LDL-Aufnahmesteigerungen nicht nur in transient Annexin VI-überexprimierenden Zellen stattfinden, sondern auch in Zellen, die das Protein permanent in erhöhten Maßen exprimieren. Es wäre in diesem Zusammenhang auch möglich gewesen, dass der stabile Zellklon durch gegenregulatorische Mechanismen einen messbaren Einfluss des Annexin VI auf die Endozytose nur kurzfristig hätte in Erscheinung treten lassen. Offensichtlich liegt in diesen Zellen aber eine zumindest potentiell erhöhte Fähigkeit zur rezeptorvermittelten Endozytose vor. Auf der anderen Seite lässt sich in dem Versuch der substratabhängigen LDL-Internalisation die verringerte absolute Aufnahme in den Annexin VI-kotransfizierten CHO-Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit auf ein Problem der Kotransfektion zurückführen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Annexin VI einen stimulatorischen Einfluss sowohl auf die LDL-Internalisation wie auch die LDL-Degradation ausübt. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den Ergebnissen von Kamal et al. (1998), bei denen eine in Zellen mikroinjizierte dominant-negative Annexin VI-Mutante, der die letzten 6 Annexin-Wiederholungen fehlte, zu einer verminderten LDL-Aufnahme führte. Auf welche Art und Weise es dieses möglicherweise bewirkt, darüber sollten Proteinbindungsstudien Aufschluss geben, mit denen Interaktionspartner des Proteins identifiziert werden konnten.

5.1.2 Bindung von Annexin VI an Dynamin

Um den stimulatorischen Effekt auf die rezeptorvermittelte Endozytose des LDL ausüben zu können, muss das Annexin VI mit bestimmten intrazellulären oder zelloberflächenständigen Strukturen interagieren. Die Identifikation dieser Strukturen ist deshalb von größter Wichtigkeit in Hinsicht auf die weitere Charakterisierung der physiologischen Funktion des Proteins. Da die rezeptorvermittelte Internalisation von Liganden eine Abfolge von physikalischen Ereignissen darstellt, lag es nahe, bei den Annexin VI-Bindungspartnern nach Proteinen zu suchen, die bei derartigen Vorgängen bekanntermaßen eine Rolle spielen.

Dynamin ist eine 100 kd-große GTPase, die bei der Abtrennung der klathrinummantelten Vesikel von der Plasmamembran eine wichtige Funktion übernimmt (De Camilli et al., 1995). Eine derartige Rolle wurde zum ersten Mal bei der Untersuchung der paralytischen Shibiremutante von *Drosophila melanogaster* (Grigliatti et al., 1973) festgestellt. Diese Mutante reagierte auf Temperatursenkung mit einer generalisierten Lähmung, was auf eine temperatursensitive Mutation in der GTP-bindenden Domäne des Fliegendynamins zurückgeführt wurde (Chen et al., 1991). Ultrastrukturelle Analysen ergaben, dass bei erniedrigter Temperatur die Nervenendigungen fast keine synaptischen Vesikel aufwiesen und stattdessen an der Plasmamembran klathrinlose Einschnürungen akkumulierten, die Coated Pits ähnelten (Koenig et al., 1989). Auch neuere Studien, in denen gezeigt wurde, dass bestimmte Dynaminmutanten die klathrinvermittelte Endozytose blockieren, bestätigten die zentrale Stellung des Proteins bei diesem biologischen Prozess (Herskovitz et al., 1993; van der Blik et al., 1993). Inzwischen sind 3 verschiedene Dynamin-Gene identifiziert worden: Dynamin I wird ausschließlich in Neuronen exprimiert (Obar et al., 1990), Dynamin II kommt in allen Geweben vor (Cook et al., 1994; Sonntag et al., 1994) und Dynamin III beschränkt sich auf Hoden, Gehirn, Lunge und Herz (Cook et al., 1996; Nakata et al., 1993). Jedes Dynamin-Gen codiert für mindestens 4 alternativ gespleißte Isoformen (Robinson et al., 1994; Urrutai et al., 1997), so dass alle Zellen wenigstens 4 Dynamin II-Isoformen koexprimieren und z.B. Neurone 12 oder mehr Isoformen aufweisen können. Außerdem ist es möglich, dass noch weitere Dynamin-Familienmitglieder existieren. Zur Zeit ist noch unklar, ob die verschiedenen Dynamin-Genprodukte die gleichen Aufgaben ausführen oder ob sie in unterschiedlichen endozytotischen Prozessen wirken. Auch der genaue Mechanismus, mit dem Dynamin die Loslösung von Vesikeln bewirkt, ist noch nicht genau charakterisiert. In-vitro formt das Protein Ringe und Schläuche (Carr et al., 1997; Hinshaw et al., 1995), was zu der Annahme geführt hat, dass es wie eine Schlinge die Verbindung zwischen dem sich ablösenden Vesikel und seiner Ursprungsmembran verengt. Jedoch gibt es an der GTPase Molekülabschnitte, die zur Rekrutierung anderer Proteine führen können, so dass es eventuell deren eigentliche Aufgabe ist, die Loslösung des Vesikels zu bewirken (Kirchhausen et al., 1999; Sever et al., 1999). Auch die Interaktion mit einigen Phosphatidylinositolen bedarf noch der weiteren Aufklärung hinsichtlich einer Rolle im Abtrennungsprozess der Vesikel von der Plasmamembran (Artalejo et al., 1997; Lee et al., 1999; Salim et al., 1996).

1997 demonstrierten Turpin et al. bei Studien an klathrinummantelten Vesikeln die Ko-Immunitätspräzipitation von Annexin VI mit Dynamin und boten damit einen plausiblen Erklärungsansatz für eine eventuelle Annexin VI-Abhängigkeit der rezeptorvermittelten Endozyto-

se (Lin et al., 1992). Sie schlugen vor, dass das Annexin VI ein wichtiger Faktor für die Stabilisierung von Dynamin-Membraninteraktionen sein könnte, bevor es zur Ablösung des Coated Vesikels kommt.

Für die Proteinbindungsstudien im Rahmen dieser Arbeit wurden Plasmide für GST-Annexin VI-Fusionsproteine erzeugt (Abb. 16 u. 17). Kompetente *E. coli*-Bakterien wurden mit diesen Plasmiden transformiert und deren Induzierbarkeit mit Isopropyl- β -D-Thiogalactosidase ausgenutzt, um im hohen Maße Fusionsproteine zu gewinnen (Abb. 18–26). Die GST-Annexin VI-Fusionsproteine wurden nun zur Etablierung von Proteinbindungsexperimenten verwendet, deren Ablauf wie folgt aussah: Während der Inkubation mit Zellextrakten hatten Proteine die Möglichkeit, an das GST-Annexin VI zu binden und anschließend durch Zentrifugationen von nichtbindenden Proteinen getrennt zu werden (Abb. 27). Nach Auftrennung der bindenden Proteine per Gelelektrophorese wurde versucht, bestimmte Proteine durch spezifische Antikörper zu identifizieren (Abb. 30–32). Da dieses Versuchssystem erst auf seine Zuverlässigkeit hin überprüft werden musste, wurde sich zunächst darauf beschränkt, schon in der Literatur beschriebene mögliche Interaktionspartner des Annexin VI auch mit diesem System zu identifizieren. Dynamin ist eines dieser bekannten potenziellen Interaktionspartner. Es ließ sich eindeutig im Annexin VI-bindenden Material nachweisen (Abb. 31) und könnte somit tatsächlich zu den mit Annexin VI in Wechselwirkung tretenden Molekülen in der Zelle gehören.

5.1.3 Interaktion von Annexin VI mit Spektrin

Ein anderer bekannter Assoziationspartner des Annexin VI ist das Spektrin (Watanabe et al., 1994). Dieses Zytoskelettprotein besteht aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten und bekleidet mit Aktin und anderen Molekülen netzwerkartig die innere Oberfläche vieler Zellen (Bennet, 1990). Die Formerhaltung der Zelle beruht ganz wesentlich auf den Eigenschaften dieses stabförmigen Heterotetramers, denn Mutationen bewirken, z.B. in Erythrozyten, forminstabile Zellen, deren Lebenszeit deutlich verkürzt ist (Tse et al., 1999). Aus einigen Studien resultierte bereits die Vermutung, dass ein Umbau des Spektrin-Aktin-Netzwerks erfolgt, bevor Coated Pits sich abknospen können. Nach der Entdeckung der Bindung des Annexin VI an die NH₂-terminale 28-kd Domäne des β -Spektrin (Watanabe et al., 1994) gelang es Kamal und Mitarbeitern (1998) zu demonstrieren, dass es an Plasmamembranen, von denen sich Coated Pits abtrennen, zu einem signifikanten Annexin VI-abhängigen Verlust von Spektrin kommt. Sie machten dafür eine Calpain-ähnliche Cysteinprotease verantwortlich, die, ihren Modellvorstellungen entsprechend, von Annexin VI aktiviert und zielgenau an die Membran-

regionen gebracht wird, die vom Zytoskelett befreit werden müssen. Dieser Vorgang ermöglichte dann erst den Abtrennungsprozess des Vesikels.

Auch Spektrin wurde mit dem in dieser Arbeit verwendeten Proteinbindungssystem im bindenden Proteinmaterial gefunden (Abb. 30).

5.1.4 Assoziation von Caveolin mit Annexin VI

Das 21-24 kd-große Caveolin ist das wichtigste Markerprotein für Caveolae. Es stellt eines der integralen Membranproteine des caveolären Überzugs dar und besitzt essentielle Bedeutung für die Ausbildung dieser Membranstrukturen (Tang et al., 1996; Rothberg et al., 1992; Fra et al., 1995). Vier Caveolingenprodukte sind in Säugetieren bis jetzt gefunden worden: Caveolin-1 α und -1 β (Glenney et al., 1992; Kurzchalia et al., 1992; Scherer et al., 1995), -2 (Scherer et al., 1996) und -3 (Tang et al., 1996). Jedes enthält eine 33 Aminosäuren lange hydrophobe Domäne, durch die das Protein in der Membran verankert wird, während sowohl das Amino- wie auch das Carboxylende frei ins Zytoplasma reichen (Kurzchalia et al., 1994). Leicht differierende Aminosäuresequenzen und eventuell gewebsspezifische Expressionsmuster lassen vermuten, dass die verschiedenen Caveoline nur bis zu einem gewissen Grade die gleichen Aufgaben erfüllen (Dietzen et al., 1995; Tang et al., 1996).

Das weitaus am häufigsten untersuchte Caveolin ist das Caveolin-1. Es kann über eine konservierte Domäne, die Caveolingerüstdomäne genannt wird (Couet et al., 1997), direkt mit verschiedenen Signalmolekülen (Okamoto et al., 1998), wie z.B. der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (Feron et al., 1998), interagieren. Deswegen wird dem Protein eine wesentliche Rolle in der Modulation verschiedener Signaltransduktionswege nachgesagt (Shaul et al., 1998). Eine ebenfalls sehr wichtige Rolle spielt das Caveolin-1 in der Kontrolle der Cholesterinhomöostase. Es gehört zu den cholesterinbindenden Proteinen (Murata et al., 1995) und seine Expression wird auf Transkriptionsebene durch Cholesterin reguliert (Fielding et al., 1997; Hailstones et al., 1998). Da die Transfektion von Caveolin-1 zu einem erhöhten Cholesterintransport vom endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran führte (Smart et al., 1996; Uittenbogaard et al., 1998), wurde das Protein als Teil eines intrazellulären Cholesterintransportsystems vorgeschlagen.

Die Mechanismen der caveolären Internalisation von Molekülen sind weitgehend ungeklärt. Es gibt aber einige Studien, die eine weitgehende Parallelität mit dem klathrinvermittelten Weg nahelegen: 1. Es bedarf in gleicher Weise wie im klathrinvermittelten Weg einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts, bevor es zur Internalisation von Molekülen kommt (Kellie et al., 1983). 2. Dynamin wurde bei der Untersuchung von Epithelzellen per Immunfluoreszenz

in Caveolae lokalisiert und auch biochemisch-funktionell als essentieller Faktor für caveoläre Endozytose nachgewiesen (Henley et al., 1998). Somit scheint es in Caveolae ebenfalls einen dynaminvermittelten Abtrennungsprozess eines Membranabschnittes vom Plasmalemma zu geben. 3. In endothelialen Caveolae wurden alle diejenigen Moleküle gefunden, die für Vesikelknospung, -andockung und -fusion nötig sind. Dazu gehören VAMP, NSF, SNAP, GTPasen sowie die Annexine II und VI (Schnitzer et al., 1995).

In dieser Arbeit wurde bei Proteinbindungsstudien zum ersten Mal gezeigt, dass es zu einer zumindest indirekten Interaktion zwischen dem in der rezeptorvermittelten Endozytose implizierten Annexin VI und dem caveolären Markerprotein Caveolin kommt. Bei der Analyse der Western-Blot-Signale von Proben eines Proteinbindungsversuchs zeigte sich der spezifisch bindende Caveolinanteil mit einem ungefähr doppelt so starken Signal wie der unspezifisch bindende Anteil (Abb. 32). Gleichzeitig waren die Signale des nichtbindenden Caveolinanteils relativ stark. Dieses kann bedeuten, dass die Assoziation zwischen den beiden Proteinen nicht sehr ausgeprägt ist und deswegen die meisten Caveolinmoleküle nicht an das Annexin VI gebunden haben. Es ist aber auch möglich, dass die Interaktion nur zwischen einer bestimmten Caveolinisoform und dem Annexin VI stattfindet, so dass sich die anderen Caveolinisoformen im nichtbindenden Material befinden. Ob diese Wechselwirkung tatsächlich physiologische Relevanz besitzt, müssen weitere Studien zeigen. Ergebnisse aus Versuchen an Rattenleberendosomen durch Pol et al. (1999) weisen aber in diese Richtung: Sie zeigten, dass Frühe Endosomen Caveolin enthalten und das Frühe Sortierende Endozytotische Kompartiment eventuell als eine Durchgangsstation im intrazellulären Stoffwechselweg des Caveolin fungiert. Da das Annexin VI schon früher als Markerprotein für Rattenleberendosomen nachgewiesen wurde (Jäckle et al., 1994), ist die Überschneidung der intrazellulären Stoffwechselwege der beiden Proteine offensichtlich.

5.1.5 Funktion und Lokalisation des Annexin VI beim Endozytosevorgang

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Annexin VI eine stimulatorische Rolle auf die rezeptorvermittelte Endozytose des Low Density Lipoprotein ausübt. Dabei ließ sich nachweisen, dass durch die Überexpression des Annexin VI nicht nur die an der Zelloberfläche stattfindende Internalisation des LDL gefördert wurde, sondern auch dessen weiter intrazellulär gelegene Degradation.

Dass das Annexin VI einen wichtigen Teil seiner physiologischen Funktion an der Zelloberfläche wahrnimmt, dafür sprechen die vielen Studien, die das Protein an der Zellmembran lokalisiert haben sowie die Fähigkeit zur Membranbindung und die Interaktion mit einigen

zellmembranassoziierten Proteinen. Die bisher wichtigsten Studien legten eine Aufgabe innerhalb der Abtrennung von klathrinummantelten Vesikeln vom Plasmalemma nahe, also dem Vorgang, durch den extrazelluläre Moleküle nach Bindung an einen Rezeptor ins Zellinnere befördert werden. Darauf hin deuten die Ca^{2+} -abhängige Fähigkeit zur Bindung von Membranen und die beschriebenen Interaktionen mit Proteinen wie Dynamin, das als ein Schlüsselement für die Abtrennung von Klathrinvesikeln gilt, oder Zytoskelettkomponenten, wie Aktin oder Spektrin, deren Netzwerk vor einer Vesikelloslösung wohl erst umgebaut werden muss.

Auf der anderen Seite haben sich besonders in den letzten Jahren Hinweise gehäuft, dass das Annexin VI auch in zellkernnäheren Kompartimenten noch wichtige Rollen im Rahmen der rezeptorvermittelten Endozytose spielen könnte: Bei der Blockade des Abknospens von Coated Pits durch einen Cysteinproteaseninhibitor wurde nach initialem Stopp eine vollständige Wiederaufnahme der Internalisation von LDL verzeichnet. Die LDL-Aufnahme besaß dabei die gleiche Kinetik wie vorher. Jedoch wanderte das unter diesen Bedingungen aufgenommene LDL nicht mehr Richtung Zellzentrum und wurde auch nicht mehr degradiert. Das Vorhandensein von doppelt so vielen Coated Pits und zweimal so viel Membranklathrin veranlasste die Autoren zu der Annahme, dass ein neuer Typ von Coated Pits entstanden war. Aus diesen entstünden Endosomen, die wegen des Fehlens von Annexin VI nicht mehr in der Lage seien, LDL zum korrekten Bestimmungsort innerhalb der Zelle zu bringen. Die genaue Aufgabe des Annexin VI wurde darin gesehen, dass es an der Plasmamembran die Aktivität einer Calpain-ähnlichen Protease steuere. Die durch dieses Enzym erzielte Umstrukturierung des Spektrin-Aktin-Zytoskeletts führe zu Spektrin-freien Zonen, von denen sich der neue Vesikel nun ablösen könne. Anschließend fungiere das Annexin VI als eine Art Addressmolekül für den endosomalen Transport (Kamal et al., 1998). In einer neueren Studie wurde die Internalisation von LDL studiert und herausgefunden, dass Annexin VI mit LDL-haltigen endozytotischen Vesikeln assoziiert und zwar einschließlich bis zu deren Eintritt in das prälysosomale Kompartiment. Als Nachweis dienten Sucrosegradienten von fraktionierten CHO-Zellen, die über 5 bzw. über 120 Minuten mit radioaktiv markiertem LDL inkubiert worden waren. Nach 5 Minuten war das Annexin VI vor allem mit Frühen Endosomen, nach 120 Minuten mit Späten Endosomen assoziiert. Dieser Shift in der Lokalisation, der übrigens auch immunfluoreszenztechnisch bestätigt werden konnte, wurde mit der möglichen Funktion des Proteins begründet, endozytierte Liganden an ihr intrazelluläres Ziel zu geleiten. Komponenten des Zytoskeletts stellten dabei die potenziellen Interaktionspartner dar (Grewal et al., 2000).

In NRK-Zellen wurde das Annexin VI sogar überwiegend im prälysosomalen Kompartiment gefunden (Pons et al., 2000) und zwar in partieller Kolo-kalisation mit Spektrin. Es wurde angenommen, dass Spektrin ebenfalls im prälysosomalen Kompartiment vorkommt und dass es hier, analog zum Modell von Kamal und Mitarbeitern, zu einer Interaktion mit Annexin VI kommt. Tatsächlich ließ sich der spätendosomale Verkehr durch den Einsatz eines Calpaininhibitors stören, denn die beobachteten LDL-haltigen Vesikel waren vergrößert und die Degradation von ^{125}I -LDL wurde beeinträchtigt. Weil die gleichen Ergebnisse erzielt wurden, nachdem die pcDNA einer dominant-negativen Annexin VI-Mutante in den Zellkern mikroinjiziert wurde, scheint die Implikation des Annexin VI auch im späten endozytotischen Kompartiment offensichtlich (Pons et al., 2001).

Angesichts dieser Ergebnisse ist es vorstellbar, dass das Annexin VI zyklusartig zwischen dem Zytosol, der Plasmamembran, den Frühen und Späten Endosomen und wiederum dem Zytosol verkehrt, um seine spezifischen Aufgaben bei der rezeptorvermittelten Endozytose zu erfüllen. An glatten Muskelzellen wurde bereits gezeigt, dass das Annexin VI Ca^{2+} -abhängig eine Relokalisation vom Zytosol zur Plasmamembran erfahren kann (Babiychuk et al., 1999). Es könnte also durch ein intrazelluläres Signal, das z.B. durch die Bildung eines Coated Pit nach Konzentration einer gewissen Anzahl bestimmter Liganden innerhalb eines Membranabschnitts verursacht wird, zur Rekrutierung von Annexin VI an die Plasmamembran kommen, was direkt oder indirekt zur Abtrennung des neuen Vesikels führt. Das Annexin VI begleitet dieses Transportorganell dann zielgerichtet in ständiger Wechselwirkung mit Elementen intrazellulärer Zytoskelettstraßen an seinen Bestimmungsort. Der Ligand wird verstoffwechselt und das Annexin VI dissoziiert von dem Transportorganell ab. Es gelangt somit wieder als freies Molekül ins Zytosol, wo es für einen neuen Zyklus zur Verfügung steht.

Eine Mutation im Annexin VI-Gen könnte somit entweder zum Erliegen der Aufnahme von Liganden führen, die per rezeptorvermittelter Endozytose in die Zelle gelangen oder der Transport zum vorgesehenen intrazellulären Ziel könnte misslingen. Eventuell liegt genau an dieser Stelle eine der pathophysiologischen Ursachen für die Erkrankung einiger Menschen an familiärer Hypercholesterinämie, bei denen nachweislich kein Defekt am LDL-Rezeptor oder am ApoB₁₀₀ vorliegt. Denn bei immerhin 15% aller Patienten mit der klinischen Diagnose "Heterozygote Familiäre Hypercholesterinämie" sind der LDL-Rezeptor wie auch sein Ligand, das ApoB₁₀₀, vollkommen intakt (Sun et al., 1997). Norman et al. (1999) stellten in diesem Zusammenhang zwei Patienten mit phänotypisch homozygoter familiärer Hypercholesterinämie vor, bei denen ebenfalls kein Defekt am LDL-Rezeptor- oder ApoB₁₀₀-Gen gefunden werden konnte. Sie konnten zeigen, dass die Zellen dieser Patienten offensichtlich nicht mehr

in der Lage waren, den LDL-Rezeptor mitsamt gebundenem Liganden zu internalisieren. Hingegen spielte sich die rezeptorvermittelte Endozytose von Transferrin weiterhin im physiologischen Maße ab, so dass ein Defekt an einer spezifisch für den LDL-Internalisationsmechanismus zuständigen Komponente vorliegen muss. Hierfür stellen Endozytose-regulierende Proteine wie das Annexin VI aussichtsreiche Kandidaten dar.

Die Tatsache, dass das Annexin VI möglicherweise mit dem caveolären Markerprotein Caveolin interagiert, wirft neue Fragen über die Aufgaben des Proteins auf. Da es schon mit anderen Proteinen, die zusammen als molekulare Transportmaschinerie für Vesikelabknospungen zusammengefasst wurden, in endothelialen Caveolae lokalisiert wurde (Schnitzer et al., 1995), ist denkbar, dass das Protein an diesen spezialisierten Membranabschnitten ähnliche Funktionen ausübt wie in der rezeptorvermittelten Endozytose. Dafür spricht ferner, dass die Internalisation von extrazellulären Molekülen durch Caveolae wahrscheinlich ebenfalls durch die GTPase Dynamin, welches wahrscheinlich zu den Annexin VI-bindenden Proteinen gehört, vermittelt wird (Henley et al., 1998).

Gleichwohl könnte das Annexin VI in Caveolae ebenso an einem ganz anderen zellbiologischen Prozess teilhaben, nämlich der Signaltransduktion. Ras-GTPasen regulieren wichtige molekulare Schlüsselwege, die für das Wachstum und die Differenzierung von Zellen von großer Bedeutung sind (Downward, 1997). Mutierte Ras-Proteine führen zur Zelltransformation und können in vielen verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden (Joneson et al., 1997; Bos, 1989). Caveolin wurde als Ras-bindendes Protein identifiziert (Song et al., 1996), was einen der Gründe darstellt, weshalb Caveolae als wichtige Integationszentren der Signaltransduktion angesehen werden (Anderson, 1998). Ein wichtiger Regulator der Ras-Aktivität ist das p120^{GAP}, welches von Davis und Mitarbeitern (1996) wiederum als Annexin VI-bindendes Protein identifiziert wurde. p120^{GAP} und Annexin VI scheinen außerdem mit Fyn und Pyk2, zwei Tyrosinkinase, die ebenfalls mit der Regulation von Ras assoziiert sind, einen Proteinkomplex zu bilden, dessen genaue Rolle noch nicht definiert wurde (Chow et al., 2000). Nicht auszuschließen ist, dass das Annexin VI in diesem Komplex mit Hilfe seiner Lipidbindungsfähigkeit eine Überbrückungsfunktion übernimmt, um die Moleküle an die Plasmamembran zu rekrutieren und so eine Interaktion mit Ras in Caveolae zu ermöglichen.

Auf der anderen Seite haben Pol et al. (1999) Caveolin-1 auch in Frühen Sortierenden Endosomen gefunden und damit eine Überschneidung der intrazellulären Routen von rezeptorvermittelter und caveolärer Endozytose in den Raum gestellt. Sie mutmaßten, dass es verschiedene Subpopulationen von Caveolae geben könnte, die daran beteiligt seien, Moleküle über verschiedene Wege an ihre intrazellulären Ziele zu transportieren. Zumindest das Cholera-

xin B könnte zu den Molekülen gehören, die einen solchen bis jetzt unbekanntem Weg beschreiten. Kurz nach der Aufnahme durch Caveolae konnte es nämlich in einem tubulovesikulären Kompartiment, was wohl das frühe endosomale Kompartiment darstellte, und in Multivesikulären Körpern nachgewiesen werden. (Tran et al., 1987). Da das Caveolin für den intrazellulären Cholesterintransport verantwortlich gemacht wurde, ist denkbar, dass es auch anderen zu transportierenden Molekülen als Vehikel dient. Beim Transport bestimmter Moleküle in endosomale Kompartimente kommt es möglicherweise zur Interaktion mit Annexin VI, welches dann für das weitere Schicksal des Moleküls zumindest mitverantwortlich sein könnte. Es bedarf weiterer Studien, um derartige Sachverhalte aufzuklären.

5.2 Ausblick

Mit dieser Arbeit wurden weitere Beweise dafür geliefert, dass das Annexin VI eine spezifische Rolle innerhalb der rezeptorvermittelten Endozytose des LDL übernimmt. Trotzdem bleiben aber weiterhin viele Fragen offen. Zwar sind mittlerweile einige Interaktionspartner des Proteins bekannt, in wieweit sie aber auch im physiologischen Rahmen eine Rolle spielen bzw. wie der genaue Ablauf derartiger Wechselwirkungen aussieht, bleibt unklar. Insbesondere für die Aufklärung eines eventuell vorhandenen Mechanismus zur Steuerung von Liganden wie dem LDL an ihr intrazelluläres Ziel bedarf es in zukünftigen Untersuchungen weiterer Anstrengung.

Auch die diskutierte Rolle des Annexin VI innerhalb der caveolären Endozytose sollte weiter erkundet werden. In welchem zellulären Kompartiment es zu der entdeckten Assoziation mit Caveolin kommt, könnte genauso Gegenstand baldiger Forschungsbemühungen sein, wie eine Analyse der caveolären Endozytose im Rahmen einer Annexin VI-Überexpression. Dazu könnten Zelllinien, die stabil Caveolin-Isoformen oder Caveolinmutanten überexprimieren oder auch Transfektionssysteme mit Annexin VI-Mutanten einen wichtigen Beitrag leisten. Mit der Etablierung einer Zelllinie, die stabil eine Caveolin-3-Mutante überexprimiert, ist in dieser Arbeit schon der erste Schritt getan worden. Als Parameter für die caveoläre Endozytose böte sich idealerweise das Choleratoxin an, da es, wie oben berichtet, offensichtlich sowohl den Mechanismus der caveolären Endozytose wie auch den intrazellulären Transport innerhalb von Endosomen benutzt.

6. Zusammenfassung

Die Annexine bilden eine Familie hochkonservierter Proteine, die charakterisiert sind durch ihre Ca^{2+} -abhängige Fähigkeit zur Phospholipidbindung. Sie lassen sich in verschiedenen polarisierten und nicht-polarisierten Zellen nachweisen, in denen sie an einer Vielzahl von Membran-Membran-Interaktionen teilhaben. Das Annexin VI wurde besonders im Zusammenhang mit der rezeptorvermittelten Endozytose untersucht. Es wird vermutet, dass es an der Zellmembranoberfläche durch eine Umorganisation des Spektrin-Aktin-Zytoskeletts und eventuell über eine Interaktion mit Dynamin das Abknospen von Coated Pits erleichtert. Eine dominant-negative Annexin VI-Mutante wurde als hemmend für die Internalisation von LDL beschrieben. Zusätzlich scheint das Annexin VI auch weiter intrazellulär noch Aufgaben zu übernehmen, da Endozytosevesikel, die sich ohne das Protein von der Plasmamembran abgetrennt hatten, nicht mehr Richtung Zellzentrum wanderten und darin enthaltenes LDL nicht mehr degradiert wurde.

Da relativ wenig Ergebnisse aus Experimenten vorliegen, die den direkten Einfluss des Proteins auf den Zellstoffwechsel ergründen wollten, wurden für diese Arbeit Annexin VI-überexprimierende Zellen verwendet, an denen die Aufnahme und Degradation von ^{125}I -markiertem LDL als Parameter für die rezeptorvermittelte Endozytose studiert werden konnten. Sowohl an transient wie auch an permanent Annexin VI-überexprimierenden Zellen ließ sich zeigen, dass das Protein einen stimulatorischen Einfluss auf die Internalisation und Degradation des LDL ausübt.

Wegen der weitgehenden Unklarheit darüber, wie das Annexin VI genau an dem Vorgang der rezeptorvermittelten Endozytose beteiligt ist, wurden im zweiten Teil der Arbeit Proteinbindungsstudien mit Hilfe von GST-Annexin VI-Fusionsproteinen etabliert. Diese Fusionsproteine wurden mit Zellextrakten inkubiert, damit mögliche Interaktionspartner des Proteins daran binden konnten. Spektrin, Dynamin und Caveolin wurden als Assoziationspartner entdeckt. Auf die potenzielle Bedeutung von Interaktionen des Annexin VI mit diesen Proteinen wurde eingegangen und ein Modell entwickelt, das die Funktion des Proteins bei der rezeptorvermittelten Endozytose spezifiziert. Zusätzlich wurde eine mögliche Rolle des Annexin VI im Rahmen der caveolären Endozytose diskutiert.

7. Literaturverzeichnis

- Ahle S, Ungewickell E (1989) Identification of a clathrin binding subunit in the HA2 adaptor protein complex. *J Biol Chem* 264:20089-20093
- Anderson HA, Chen Y, Norkin LC (1996) Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol Biol Cell* 7:1825-1834
- Anderson RG, Kamen BA, Rothberg KG, Lacey SW (1992) Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* 255:410-411
- Anderson RGW (1993) Potocytosis of small molecules and ions by caveolae. *Trends Cell Biol* 3: 69-72
- Anderson RGW (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67:199-225
- Anderson RGW, Goldstein JL, Brown MS (1976) Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:2434-2438
- Anderson RGW, Brown MS, Beisiegel U, Goldstein JL (1982) Surface distribution and recycling of the low density lipoprotein receptor as visualized with antireceptor antibodies. *J Cell Biol* 93:523-531
- Ando Y, Imamura S, Hong YM, Owada MK, Kakunaga T, Kannagi R (1989) Enhancement of calcium sensitivity of lipocortin I in phospholipid binding induced by limited proteolysis and phosphorylation at the amino terminus as analyzed by phospholipid affinity column chromatography. *J Biol Chem* 264:6948-6955
- Aniento F, Emans N, Griffiths G, Gruenberg J (1993) Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J Cell Biol* 123:1373-1387
- Aniento F, Gu F, Parton RG, Gruenberg J (1996) An endosomal β -COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes. *J Cell Biol* 133:29-41
- Artalejo CR, Lemmon MA, Schlessinger J, Palfrey HC (1997) Specific role for the PH domain of dynamin-1 in the regulation of rapid endocytosis in adrenal chromaffin cells. *EMBO J* 16:1565-1574
- Avila-Sakar AJ, Creutz CE, Kretsinger RH (1998) The structure of bovine annexin VI in a calcium-bound state. *Biochim Biophys Acta* 1387:103-116
- Babitt J, Trigatti B, Rigotti A, Smart EJ, Anderson RG, Xu S, Krieger M (1997) Murine SR-BI, 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 EB, Palstra RJTS, Schaller J, Kämpfer U, Draeger A (1999) Annexin VI participates in the formation of a reversible, membrane-cytoskeleton complex in smooth muscle cells. *J Biol Chem* 274:35191-35195
- Barrett AJ (1972) Lysosomal enzymes. In: *Lysosomes: a laboratory handbook*, edited by JT Dingle. Amsterdam: Elsevier, pp 46-135
- Bennet V (1990) Spectrin-based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm. *Physiol Rev* 70:1029-1065

- Beron W, Alvarez-Dominguez C, Mayorga L, Stahl PD (1995) Membrane trafficking along the phagocytic pathway. *Trends Cell Biol* 5:100-104
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- Blackwood RA, Ernst JD (1990) Characterisation of Ca²⁺-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins. *J Biochem* 266:195-200
- Bos JL (1989) Ras oncogenes in human cancer. A review. *Cancer Res* 49:4682-4689
- Braell WA, Schlossman DM, Schmid SL, Rothman JE (1984) Dissociation of clathrin coats coupled to the hydrolysis of ATP: role of an uncoating ATPase. *J Cell Biol* 99:734-741
- Brown DA, Rose JK (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68:533-544
- Brown MS, Goldstein JL (1979) Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:3330-3337
- Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47
- Brownawell AM, Creutz CE (1996) Calcium-dependent binding of the plasma protein apolipoprotein A-I to two members of the annexin family. *Biochemistry* 35:6839-6845
- Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M (1992) The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70:715-728
- Burd CG, Emr SD (1998) Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Mol Cell* 2:157-162
- Carr JF, Hinshaw JE (1997) Dynamin assembles into spirals under physiological salt conditions upon the addition of GDP and gamma-phosphate analogues. *J Biol Chem* 272:28030-28035.
- Chen MS, Obar RA, Schroeder CC, Austin TW, Poodry CA, Wadsworth, Vallee RB (1991) Multiple isoforms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis. *Nature* 351:583-586
- Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 265:3116-3123
- Chen YA, Scheller RH (2001) SNARE-mediated membrane fusion. *Nature* 2:98-106
- Chung CY, Erickson HP (1994) Cell surface annexin II is a high affinity receptor for the alternatively spliced segment of tenascin-C. *J Cell Biol* 126:539-548
- Clark DM, Moss SE, Wright NA, Crumpton MJ (1991) Expression of annexin VI (p68, 67 kDa-calelectrin) in normal human tissues: evidence for developmental regulation in B- and T-lymphocytes. *Histochemistry* 96:405-412
- Cook TA, Mesa K, Urrutia R (1996) Three dynamin-encoding genes are differentially expressed in developing rat brain. *J Neurochem* 67:927-931
- Cook TA, Urrutia R, McNiven MA (1994) Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:644-648

- Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP (1997) Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem* 272:6525-6533
- Creutz CE (1992) The annexins and exocytosis. *Science* 258:924-931
- Daro E, Sluijs PVD, Galli T, Mellman L (1996) Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9559-9564
- Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF (1983) pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2258-2262
- Davis AJ, Butt JT, Walker JH, Moss SE, Gawler DJ (1996) The Ca^{2+} -dependent lipid binding domain of P120^{GAP} mediates protein-protein interactions with Ca^{2+} -dependent membrane-binding proteins. *J Biol Chem* 271:24333-24336
- Davis CG, Goldstein JL, Südhof TC, Anderson RGW, Russel DW, Brown MS (1987) Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* 326:760-765
- De Camilli P, Takei K, McPherson PS (1995) The function of dynamin in endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 5:559-565
- De La Fuente M, Parra AV (1995) Vesicle aggregation by annexin I: role of a secondary membrane binding site. *Biochemistry* 34:10393-10399
- Dell'Angelica EC, Ohno H, Ooi CE, Rabinovich E, Roche KW, Bonifacino J (1997) AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *EMBO J* 16: 917-928
- Desjardins M, Celis JE, van Meer G, Dieplinger H, Jahraus A, Griffiths G, Huber LA (1994) Molecular characterization of phagosomes. *J Biol Chem* 269:32194-32200
- Diaz-Munoz M, Hamilton SL, Kaetzel MA, Hazarika P, Dedman JR (1990) Modulation of Ca^{2+} release channel activity from sarcoplasmic reticulum by annexin VI (67-kDa calcimedlin). *J Biol Chem* 265:15894-15899
- Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM (1995) Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem* 270:6838-6842
- Dörner K (1998) *Klinische Chemie und Hämatologie*. Ferdinand Enke Verlag, 3. Aufl., Stuttgart, SS 143-148
- Downward J (1997) Cell Cycle: routine role for Ras. *Curr Biol* 7:258-260
- Driessen HPC, Newman RH, Freemont PS, Crumpton MJ (1992) A model of the structure of human annexin VI bound to lipid monolayers. *FEBS* 306:75-79
- Dubois T, Soula M, Moss SE, Russo-Marie F, Rothhut B (1995) Potential interaction between annexin VI and a 56-kDa protein kinase in T cells. *Biochem Biophys Res Com* 212:270-278
- Dunn KW, McGraw TE, Maxfield FR (1989) Iterative Fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. *J Cell Biol* 109:3303-3314
- Dunn WA, Hubbard AL (1984) Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by hepatocytes in the perfused rat liver: ligand and receptor dynamics. *J Cell Biol* 98:2148-2159
- Edwards HC, Booth AG (1987) Calcium-sensitive, lipid-binding cytoskeletal proteins of the human placental microvillar region. *J Cell Biol* 105:303-311

- Edwards HC, Crumpton MJ (1990) Ca^{2+} -dependent phospholipid and arachidonic acid binding by the placental annexins VI and IV. *Eur J Biochem* 198:121-129
- Erikson E, Tomaszewicz HG, Erikson RL (1984) Biochemical characterization of a 34-kilodalton normal cellular substrate of pp60v-src and an associated 6-kilodalton protein. *Mol Cell Biol* 4:77-85
- Falkow S, Isberg RR, Portnoy DA (1992) The interaction of bacteria with mammalian cells. *Annu Rev Cell Biol* 8:333-363
- Fan H, Josic D, Lim YP, Reutter W (1995) cDNA cloning and tissue-specific regulation of expression of rat calcium-binding protein 65/67. Identification as a homologue of annexin VI. *Eur J Biochem* 230:741-751
- Feng Y, Press B, Wandinger-Ness A (1995) Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* 131:1435-1452
- Feron O, Saldana F, Michel JB, Michel T (1998) The endothelial nitric oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem* 273:3125-3128
- Fielding CJ, Bist A, Fielding PE (1997) Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3753-3758
- Fielding PE, Fielding CJ (1996) Intracellular transport of low density lipoprotein derived free cholesterol begins at clathrin-coated pits and terminates at cell surface caveolae. *Biochemistry* 35:14932-14938
- Fleet A, Ashworth R, Kubista H, Edwards H, Bolsover S, Mobbs P, Moss SE (1999) Inhibition of EGF-dependent calcium influx by Annexin VI is splice form-specific. *Biochem Biophys Res Com* 260:540-546
- Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG (1995) De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8655-8659
- Fridriksson EK, Shipkova PA, Sheets ED, Holowka D, Baird B, McLafferty FW (1999) Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry. *Biochemistry* 38:8056-8063
- Frokjaer-Jensen J (1980) Three-dimensional organization of plasmalemmal vesicles in endothelial cells. An analysis by serial sectioning of frog mesenteric capillaries. *J Ultrastruct Res* 73: 9-20
- Gaidarov I, Krupnick JG, Falck JR, Benovic JL, Keen JH (1999) Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J* 18:871-881
- Gerke V, Moss E (1997) Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1357:129-154
- Gerke V, Weber K (1984) Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin. *EMBO J* 3:227-233
- Ghosh RN, Gelman DL, Maxfield FR (1994) Quantification of density lipoprotein and transferrin endocytic sorting in HEp2 cells using confocal microscopy. *J Cell Sci* 107:2177-2189
- Glenney J (1986) Phospholipid-dependent Ca^{2+} binding by the 36-kDa tyrosine kinase substrate (calpactin) and its 33-kDa core. *J Biol Chem* 261:7247-7252

- Glenney J (1986) Two related but distinct forms of the Mr 36,000 tyrosine kinase substrate (calpactin) that interact with phospholipid and actin in a Ca^{2+} -dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4258-4262
- Glenney JR (1992) The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles. *FEBS Lett* 314:45-48
- Glenney JR, Tack BF (1985) Amino-terminal sequence of p36 and associated p10: identification of the site of tyrosine phosphorylation and homology with S-100. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7884-7888
- Goldberg RI, Smith RM, Jarett L (1987) Insulin and alpha 2-macroglobulin-methylamine undergo endocytosis by different mechanisms in rat adipocytes: II. Comparison of intracellular events. *J Cell Physiol* 133:213-218
- Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ (1985) Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol* 1:1-39
- Goodson HV, Valetti C, Kreiste (1997) Motors and membrane traffic. *Curr Opin Cell Biol* 9:18-28
- Gorvel JP, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J (1991) Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* 64:915-925
- Gottlieb AT, Ivanov IE, Adesnik M, Sabatini DD (1993) Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 120:695-710
- Gotto AM, Pownall HJ, Havel RJ (1986) Introduction to the plasma lipoproteins. *Method Enzymol* 128:3-41
- Greenberg S, Silverstein SC (1993) Phagocytosis. In: *Fundamental Immunology*, edited by WE Paul. New York: Raven, pp 941-964
- Greenspan P, St Clair RW (1984) Retroendocytosis of low density lipoprotein. Effect of lysosomal inhibitors on the release of undegraded ^{125}I -low density lipoprotein of altered composition from skin fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 259:1703-1713.
- Grewal T, Heeren J, Mewawala D, Schnittgerhans 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
- Griffiths G, Back R, Marsh M (1989) A quantitative analysis of the endocytic pathway in baby hamster kidney cells. *J Cell Biol* 109:2703-2720
- Grigliatti TA, Hall L, Rosenbluth R, Suzuki DT (1973) Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster* XV: a selection of immobile adults. *Mol Gen Genetics* 120:107-114
- Gruenberg J, Griffiths G, Howell KE (1989) Characterisation of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J Cell Biol* 108:1301-1316
- Gruenberg J, Maxfield FR (1995) Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7:552-563
- Hailstones D, Sleer LS, Parton RG, Stanley KK (1998) Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *J Lipid Res* 39:369-379

- Hajjar KA, Jacovina AT, Chacko J (1994) An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J Biol Chem* 269:21191-21197
- Hanover JA, Dickson RB (1985) Transferrin-receptor-mediated endocytosis and iron delivery. In: Pastan IH, Willingham MC (eds) *Endocytosis*. Plenum Press, New York, pp 131-161
- Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH (1953) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 34:1345-1353
- Hazarika P, Kaetzel MA, Sheldon A, Karin NJ, Fleischer S, Nelson TE, Dedman JR (1991) Annexin VI is associated with calcium-sequestering organelles. *J Cell Biochem* 46:78-85
- Henley JR, Krueger EWA, Oswald BJ, McNiven MA (1998) Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 141:85-99
- Herskovits JS, Burgess CC, Obar RA, Vallee RB (1993) Effects of mutant rat dynamin on endocytosis. *J Cell Biol* 122:565-578
- Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK (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
- Heuser JE, Evans L (1980) Three dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J Cell Biol* 84: 560-583
- Hicke L, Schekman R (1990) Molecular Machinery required for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Bioessays* 12:253-258
- Hinshaw JE, Schmid SL (1995) Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* 374:190-192
- Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL (1990) The LDL receptor locus and familial hypercholesterolemia: Mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet* 24:113-170
- Holtzman E (1989) *Lysosomes*. New York: Plenum
- Hope HR, Pike LJ (1996) Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. *Mol Biol Cell* 7:843-851
- Hopkins CR (1983) Intracellular routing of transferrin and transferrin receptors in epidermoid carcinoma A431 cells. *Cell* 35:321-330
- Hosaya H, Kobayashi R, Tsukita S, Matsumura F (1992) Ca²⁺-regulated actin and phospholipid binding protein (68kD-protein) from bovine liver: Identification as a homologue for annexin VI and intracellular localization. *Cell Motil Cytosk* 22:200-210
- Huber R, Schneider M, Mayr I, Romisch J, Paques EP (1990) The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 Å resolution. Implications for membrane binding and calcium channel activity. *FEBS Lett* 275:15-21
- Huber R, Berendes R, Burger A, Schneider M, Karshikov A, Luecke H, Romisch J, Paques E. (1992) Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins. *J Mol Biol* 223:683-704.
- Ikonen E, Tagaya M, Ullrich O, Mentecuccio C, Simons K (1995) Different requirements for NSF, SNAP, and Rab proteins in apical and basolateral transport in MDCK cells. *Cell* 81:571-580

- Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J (1993) Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 92:883-893
- 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
- Jing SQ, Spencer T, Miller K, Hopkins C, Trowbridge LS (1990) Role of the human transferrin receptor cytoplasmic domain in endocytosis: localization of a specific signal sequence for internalization. *J Cell Biol* 110:283-294
- Johnson KF, Kornfeld S (1992) The cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/ insulin-like growth factor-II-receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi. *J Cell Biol* 119:249-257
- Joneson T, Bar-Sagi D (1997) Ras effectors and their role in mitogenesis and oncogenesis. *J Mol Med* 75:587-593
- Kaetzel MA, Pula G, Campos B, Uhrin P, Horseman N, Dedman JR (1994) Annexin VI isoforms are differentially expressed in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* 1223:368-374
- Kamal A, Ying Y, Anderson RGW (1998) Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes. *J Cell Biol* 142:937-947
- Kartenbeck J, Stukenbrok H, Helenius A (1989) Endocytosis of simian virus 40 into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 109:2721-2729
- Kellie S, Patel B, Pierce EJ, Critchley DR (1983) Capping of cholera toxin-ganglioside GM1 complexes on mouse lymphocytes is accompanied by co-capping of α -actinin. *J Cell Biol* 97:447-454
- Kim DH, Iijima H, Goto K, Sakai J, Ishii H, Kim HJ, Suzuki H, Kondo H, Saeki S, Yamamoto T (1996) Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. *J Biol Chem* 271:8373-8380
- Kirchhausen T (1999) Cell biology. Boa constrictor or rattlesnake? *Nature* 398:470-471
- Kirchhausen T (2000) Clathrin. *Annu Rev Biochem* 69:699-727
- Kirchhausen T (2000) Three ways to make a vesicle. *Nature* 2:187-198
- Kobayashi T, Stang E, Fang KS, Moerlose P, Parton RG, Gruenberg J (1998) A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 392:193-197
- Koenig JH, Ikeda K (1989) Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval. *J Neurosci* 9:3844-3860
- Kornfeld S (1992) Structure and function of the mannose 6-phosphate/ insulin-like growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem* 61:307-330
- Kornfeld S, Mellman L (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-B1. *Ann Rev Biochem* 68:523-558

- Kurzchalia TV, Dupree P, Parton RG, Kellner R, Virta H, Lehnert M, Simons K (1992) VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J Cell Biol* 118:1003-1014
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lee A, Frank DW, Marks MS, Lemmon MA (1999) Dominant-negative inhibition of receptor-mediated endocytosis by a dynamin-1 mutant with a defective pleckstrin homology domain. *Curr Biol* 9:261-264
- Lin HC, Moore MS, Sanan DA, Anderson RGW (1992) Reconstitution of clathrin-coated pit budding from plasma membranes. *J Cell Biol* 114:881-891
- Lin HC, Südhof TC, Anderson RGW (1992) Annexin VI is required for budding of clathrin-coated pits. *Cell* 70:283-291.
- Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M (1994) Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* 126:111-126
- Liu P, Ying Y, Ko YG, Anderson RG (1996) Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae. *J Biol Chem* 271:10299-10303
- Lodish H, Baltimore D, Berk A., Zipursky L, Matsudaira P, Darnell J (1996) *Molecular Cell Biology*. 3. ed, New York:Scientific American Books
- Löffler G, Petrides PE (1997) *Biochemie und Pathobiochemie*. 5. Aufl., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, SS 469-479
- Lombardi D, Soldati M, Riederer MA, Goda Y, Zerial M, Pfeffer SR (1993) Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans-Golgi network. *EMBO J* 12:677-682
- London E (1992) How bacterial protein endotoxins enter cells: the role of partial unfolding in membrane translocation. *Mol Microbiol* 6:3277-3282
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with a Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193:165-175
- Mahley RW, Ji Z-S (1999) Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 40:1-16
- Marsh M, Griffiths G, Dean GE, Mellman, Helenius A (1986) Three-dimensional structure of endosomes in BHK-21 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2899-2903
- McFarlane AS (1958) Efficient trace labelling of proteins with iodine. *Nature* 182:53-57
- McLauchlan H, Newell J, Morrice N, Osborne A, West M, Smythe E (1998) A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits. *Curr Biol* Jan 8:34-45
- McMahon HT, Ushkaryov YA, Edelman L, Link E, Binz T, Niemann H, Jahn R, Südhof TC (1993) Cellubrevin is a ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein. *Nature* 364:346-349
- Meers P, Mealy T, Pavlotsky N, Tauber AI (1992) Annexin I-mediated vesicular aggregation: mechanism and role in human neutrophils. *Biochemistry* 31:6372-6382
- Michaely P, Kamal A, Anderson RGW, Bennett V (1999) A requirement for ankyrin binding to clathrin during coated pit budding. *J Biol Chem* 274:35908-35913
- Mineo C, James GL, Smart EJ, Anderson RG (1996) Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. *J Biol Chem* 271:11930-11935

- Morgan RO, Fernandez MP (1995) Molecular phylogeny of annexins and identification of a primitive homologue in *Giardia lamblia*. *Mol Biol Evol* 12:967-979
- Moss SE, Crumpton MJ (1990) Alternative splicing gives rise to two forms of the p68 Ca²⁺-binding protein. *FEBS* 261:299-302
- Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR (1997) Endocytosis. *Physiol Rev* 77:759-803
- Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10339-10343
- Murphy C, Saffrich R, Grummt M, Gournier H, Rybin V, Rubino M, Auvinen P, Lutcke A, Parton RG, Zerial M (1996) Endosome dynamics regulated by a Rho protein. *Nature* 384:427-432
- Nakata T, Takemura R, Hirokawa N (1993) A novel member of the dynamin family of GTP-binding proteins is expressed specifically in the testis. *J Cell Sci* 105:1-5
- Norman D, Sun XM, Bourbon M, Knight BL, Naoumova P, Souta AK (1999) Characterization of a novel cellular defect in patients with phenotypic homozygous familial hypercholesterolemia. *J Clin Inv* 104:619-628
- Novak S, Hiesberger T, Schneider WJ, Nimpf J (1996) A new low density lipoprotein receptor homologue with 8 ligand binding repeats in brain of chicken and mouse. *J Biol Chem* 271:11732-11736
- Obar RA, Collins CA, Hammarback JA, Shpetner HS, Vallee RB (1990) Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin in neurons. *Neuron* 7:461-469
- Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing, preassembled signaling complexes at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273:5419-5422
- Olivecrona T, Liu G, Hultin M, Bengtsson-Olivecrona G (1993) Regulation of lipoprotein lipase. *Biochem Soc Trans.* 21:509-513.
- Ortega D, Pol A, Biermer M, Jäckle S, Enrich C (1998) Annexin VI defines an apical endocytic compartment in rat liver hepatocytes. *J Cell Sci* 111:261-269
- Owens RJ, Crumpton MJ (1984) Isolation and characterisation of a novel 68000-M_rCa²⁺-binding protein of lymphocyte plasma membrane. *J Biochem* 219:309-316
- Owens RJ, Gallagher CJ, Crumpton (1984) Cellular distribution of p68, a new calcium-binding protein from lymphocytes. *EMBO* 3:945-952
- Parton RG (1994) Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. *J Histochem Cytochem* 42:155-166
- Pastan IH, Willingham MC (1981) Receptor-mediated endocytosis of hormones in cultured cells. *Annu Rev Physiol* 43:239-250
- Pearse BMF, Crowther RA (1987) Structure and assembly of coated vesicles. *Annu Rev Biophys Chem* 16:49-68
- Pfäffle M, Ruggiero F, Hofmann H, Fernandez MP, Selmin O, Yamada Y, Garrone R, von der Mark K (1988) Biosynthesis, secretion and extracellular localization of anchorin CII, a collagen-binding protein of the calpactin family. *EMBO J* 7:2335-2342
- Pfeffer SR (1994) Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 6:522-526

- Pol A, Calvo M, Lu A, Enrich C (1999) The „early-sorting“ endocytic compartment of rat hepatocytes is involved in the intracellular pathway of Caveolin-1 (VIP-21). *Hepatology* 29:1848-1857
- Pons M, Ihrke G, Koch S, Biermer M, Pol A, Grewal T, Jäckle S, Enrich C (2000) Late endocytic compartments are major sites of annexin VI localization in NRK fibroblasts and polarized WIF-B hepatoma cells. *Exp Cell Res* 257:33-47
- Pons M, Grewal T, Rius E, Schnitgerhans T, Jäckle S, Enrich C (2001) Evidence for the Involvement of Annexin 6 in the trafficking between the endocytic compartment and lysosomes. *Exp Cell Res* 269(1):13-22
- Powell MA, Glenney JR (1987) Regulation of calpactin I phospholipid binding by calpactin I light-chain binding and phosphorylation by p60v-src. *Biochem J* 247:321-328
- Predescu D, Horvat R, Predescu S, Palade GE (1994) Transcytosis in the continuous endothelium of the myocardial microvasculature is inhibited by N-ethylmaleimide. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3014-3018
- Puck TT, Waldren CA, Jones C (1968) Mammalian cell growth proteins. I. Growth stimulation of fetuin. *Proc Natl Acad Sci USA* 59:192-199
- Rabinovitch M (1995) Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* 5:85-88
- Rainteau D, Mansuelle P, Rochat H, Weinman S (1995) Characterization and ultrastructural localization of annexin VI from mitochondria. *FEBS Lett* 360:80-84
- Raychowdhury R, Niles JL, McCluskey RT, Smith JA (1989) Autoimmune target in Heymann nephritis is a glycoprotein with homology to the LDL receptor. *Science* 244:1163-1165
- Raynal P, Pollard HB (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1197:63-93
- Robinson MS (1992) Adaptins. *Trends Cell Biol* 2:293-297
- Robinson MS (1994) The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 6:538-544
- Robinson MS, Watts C, Zerial M (1996) Membrane Dynamics in Endocytosis. *Cell* 64:13-21
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68:673-682
- Roy S, Luetterforst R, Harding A, Apolloni A, Etheridge M, Stang E, Rolls B, Hancock JF, Parton RG (1999) Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nature Cell Biology* 1:98-105
- Russel DW, Brown MS, Goldstein JL (1989) Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins. *J Biol Chem* 264:21682-21688
- Salim K, Bottomley MJ, Querfurth E, Zvelebil MJ, Gout I, Scaife R, Margolis RL, Gigg R, Smith CI, Driscoll PC, Waterfield MD, Panayotou G (1996) Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J* 15:6241-6250
- Sambrook J, Fritsche EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

- Scherer PE, Tang Z, Chun M, Sargiacomo M, Lodish HF, Lisanti MP (1995) Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. *J Biol Chem* 270:16395-16401
- Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP (1996) Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:131-135
- Schmitz-Pfeiffer C, Browne CL, Walker JH, Bide TJ (1998) Activated protein kinase C α associates with annexin VI from skeletal muscle. *J Biochem* 330:675-681
- Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J (1994) Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: Reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* 127:1217-1232
- Schnitzer JE, Allard J, Oh P (1995) NEM inhibits transcytosis, endocytosis, and capillary permeability: implication of caveolae fusion in endothelia. *Am J Physiol* 268 (Heart Circ Physiol 37): H48-H55
- Schnitzer JE, Liu J, Oh Phil (1995) Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, Annexins, and GTPases. *J Biol Chem* 270:14399-14404
- Schroder S, Ungewickell E (1991) Subunit interaction and function of clathrin-coated vesicle adapters from the Golgi and the plasma membrane. *J Biol Chem* 266:7910-7918
- Schwandt P, Richter WO, Parhofer KG (2001) *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen: Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie der Dyslipoproteinaemien - Prävention der Atherosklerose*. 2. Aufl., Schattauer-Verlag, Stuttgart
- Schwartz AL (1995) Receptor cell biology: Receptor-mediated endocytosis. *Pediatric Res* 38:835-842
- Sever S, Muhlberg AB, Schmid SL (1999) Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* 398:481-486
- Severs NJ (1988) Caveolae: static in-pocketings of the plasma membrane, dynamic vesicles or plain artifact? *J Cell Sci* 90:341-349
- Shaul PW, Anderson RGW (1998) Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol* 275:L843-L851
- Simionescu N (1983) Cellular aspects of transcapillary exchange. *Physiol Rev* 63:1536-1579
- Simionescu N, Simionescu M, Palade GE (1973) Permeability of muscle capillaries to exogenous myoglobin. *J Cell Biol* 57:424-452
- Sipe DM, Murphy RF (1987) High-resolution kinetics of transferrin acidification in BALB/c 3T3 cells: exposure to pH 6 followed by temperature-sensitive alkalization during recycling. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7119-7123
- Smart EJ, Ying YS, Conrad PA, Anderson RG (1994) Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J Cell Biol* 127:1185-1197
- Smart EJ, Ying YS, Mineo C, Anderson RG (1995) A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10104-10108
- Smart EJ, Ying Y, Donzell WC, Anderson RG (1996) A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 271:29427-29435

- Smith PD, Moss SE (1994) Structural evolution of the annexin supergene family. *Trends Genet* 10:241-246
- Smythe E, Smith PD, Jacob SM, Theobald J, Moss SE (1994) Endocytosis occurs independently of annexin VI in human A431 cells. *J Cell Biol* 124:301-306
- Sonntag JM, Fykse EM, Ushkaryov Y, Liu J-P, Robinson PJ, Südhof TC (1994) Differential expression and regulation of multiple dynamins. *J Biol Chem* 269:4547-4554
- Stoorvogel W, Oorschot V, Geuze HJ (1996) A novel class of clathrin-coated vesicles budding from endosomes. *J Cell Biol* 132:21-33
- Stow JL (1995) Regulation of vesicular transport by GTP-binding proteins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 4:421-425
- Südhof TC (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375:645-653
- Südhof TC, Slaughter CA, Leznicki I, Barhon P, Reynolds GA (1988) Human 67-kDa calelectrin contains a duplication of four repeats found in 35-kDa lipocortins. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:664-668
- Sun XM, Patel DD, Knight BL, Soutar AK (1997) Comparison of the genetic defect with LDL-receptor activity in cultured cells from patients with a clinical diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:3092-3101
- Swanson JA, Baer SC (1995) Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol* 5:89-93
- Tagoe CE, Boustead CM, Higgins SJ, Walker JH (1994) Characterization and immunolocalization of rat liver annexin VI. *Biochim Biophys Acta* 1192:272-280
- Takahashi S, Kawarabayasi Y, Nakai T, Sakai J, Yamamoto T (1992) Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9252-9256
- Takei K, McPherson PS, Schmid SL, De Camilli P (1995) Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature* 374:186-90
- Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP (1996) Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 271:2255-2261
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354
- Tse WT, Lux SE (1999) Red blood cell membrane disorders. *Br J Haematol* 104:2-13
- Turpin E, Russo-Marie F, Dubois T, Paillerets C, Alfsen A, Bomsel M (1997) In adrenocortical tissue, annexins II and VI are attached to clathrin coated vesicles in a calcium-independent manner. *Biochim Biophys Acta* 1402:115-130
- Uittenbogaard A, Ying Y, Smart EJ (1998) Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J Biol Chem* 273:6525-6532
- Ullrich O, Reinsch S, Urbe S, Zerial M, Parton RG (1996) Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol* 135:913-924
- Ungewickell E, Branton D (1981) Assembly units of clathrin coats. *Nature* 289:420-422

- Urrutai R, Henley JR, Cook T, McNiven MA (1997) The dynamins: Redundant or distinct functions for an expanding family of GTPases? *Proc Natl Acad Sci USA* 94:377-384
- van der Blik AM, Redelmeier TE, Damke H, Tisdale EJ, Meyerowitz EM, Schmid SL (1993) Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J Cell Biol* 122:553-563
- Van Deurs B, Holm PK, Sandvig K, Hansen SH (1993) Are caveolae involved in clathrin-independent endocytosis? *Trends Cell Biol* 3:249-251
- Wada KA, Mizoguchi A, Kaibuchi K, Shirataki H, Ide C, Takai Y (1994) Localization of rabphilin-3A, a putative target protein for Rab3A, at the sites of Ca^{2+} -dependent exocytosis in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 198:158-165
- Wagner RC, Kreiner P, Barnett RJ, Bitensky MW (1972) Biochemical characterization and cytochemical localization of a catecholamine-sensitive adenylate cyclase in isolated capillary endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 69:3175-3179
- Watanabe T, Inui M, Chen BY, Iga M, Sobue K (1994) Annexin VI-binding proteins in brain. Interaction of annexin VI with a membrane skeletal protein, calspectin (brain spectrin or fodrin). *J Biol Chem* 269:17656-17662
- Weber K, Johnsson N (1986) Repeating sequence homologies in the p36 target protein of retroviral protein kinases and lipocortin, the p37 inhibitor of phospholipase A2. *FEBS Lett* 203:95-98
- Weinman JS, Feinberg JM, Rainteau DP, Gaspera BD, Weinman SJ (1994) Annexins in rat enterocyte and hepatocyte: an immunogold electron-microscope study. *Cell Tissue Res* 278:389-397
- Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJ, Thorpe GH (1979) Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin Chem* 25:1531-46.
- Willingham MC, Pastan IH, Sahagian GG, Jourdain GW, Neufeld EF (1981) Morphologic study of the internalization of a lysosomal enzyme by the mannose-6-phosphate receptor in cultured Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6967-6971
- Yamada N, Shames DM, Takahashi S, Havel RJ (1988) Metabolism of apolipoprotein B-100 in large very low density lipoproteins of blood plasma. Kinetic studies in normal and heritable hyperlipidemic rabbits. *J Clin Invest* 82:2106-2113
- Yamashiro DJ, Tycko B, Fluss SR, Maxfield FR (1984) Segregation of transferrin to mildly acidic (pH 6.4) para-Golgi compartment in the recycling pathway. *Cell* 37:789-800
- Yamazaki H, Bujo H, Kusunoki J, Seimiya K, Kanaki T, Morisaki N, Schneider WJ, Saito Y (1996) Elements of neural adhesion molecules and yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member. *J Biol Chem* 271:24761-24768
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103
- Zaks WJ, Creutz CE (1991) Ca^{2+} -dependent Annexin VI self-association on membrane-surfaces. *Biochem* 30:9607-9615
- Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nature* 2:107-117

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AP	Adapter Protein
Apo	Apolipoprotein
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
COP	Coatomer-Proteine
CHO	Chinese Hamster Ovary
CPM	Counts Per Minute
ECL	Enhanced Chemiluminiscence
ECV	Endozytotische Carriervesikel
EEA1	Early Endosome Antigen-1
EGF	Epidermal Growth Factor
FCS	Fetal Calf Serum
GP330	Glykoprotein 330
GST	Glutathion-S-transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	High Density Lipoprotein
IDL	Intermediate Density Protein
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosidase
kd	Kilodalton
kb	Kilobasenpaare
LAMP	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein
lgp	Lysosomales Membranglykoprotein
LDL	Low Density Lipoprotein
LRP	LDL-Rezeptor Related Protein
MVB	Multivesicular Bodies
NSF	N-ethyl-maleimid-sensitive Fusion Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PKC α	Proteinkinase C α
SNAP	Synaptosome-associated Protein

SNARE	Sobluble NSF Attachment Protein Receptor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SR-B1	Scavenger-Rezeptor-B1
TBE	Trisboratethylendiamintetraacetat
VAMP	Vesikel-assoziiertes Membranprotein
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

8.2 Danksagung

Für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die stets geduldige Unterstützung gilt mein besonderer Dank Priv-Doz. Dr. Thomas Grewal und Walter Tauscher.

Für wissenschaftliche Betreuung und Bereitstellung der technischen und materiellen Voraussetzungen, die diese Arbeit ermöglichten, gebührt mein aufrichtiger Dank Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel und Prof. Dr. Stefan Jäckle.

Desweiteren sei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Zellbiologie ganz herzlich gedankt.

Schließlich danke ich meinem Bruder Karsten für sein Korrekturlesen.

8.3 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Axel Seehars
Geburtsdatum	11. Februar 1975
Geburtsort	Hamburg
Wohnort:	Maikäferstieg 5, 21077 Hamburg
Familienstand	ledig

Schulbildung:

1981-1985	Grundschule Schmallenberg
1985-1994	Städtisches Gymnasium Schmallenberg
31. Mai 1994	Abitur

Zivildienst:

Juli 1994 – Sept. 1995	Ev. Krankenhaus Bethesda, Hamburg
------------------------	-----------------------------------

Studium:

Okt. 1995 – Sept. 1996	Studium der Informatik an der Universität Hamburg
Okt. 1996	Wechsel zum Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
Sept. 1998	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
Sept. 1999	Beginn der Dissertation bei Frau Prof. Dr. Dr. Beisiegel am Institut für Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Sept. 2000	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Sept. 2002	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Okt. 2002 – Sept. 2003	Ausbildung im Rahmen des Praktischen Jahres am Allgemeinen Krankenhaus Harburg und Regionalspital Lachen (Schweiz)
vorauss. Ende 2003	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

8.4 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Axel Seehars