

Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie  
Abt. für Molekulare Zellbiologie  
Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

# **Intrazelluläre Lokalisation und Funktion von Annexin VI**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Medizin  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Miriam Lotz**

geboren am 27.01.1977 in Salzgitter

Hamburg 2003

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss: die/der Vorsitzende/r: Prof. Dr. U. Beisiegel

Prüfungsausschuss: 2.Gutachter/in: Prof. Dr. D. Ameis

Prüfungsausschuss: 3.Gutachter/in: Prof. Dr. St. Jäckle

Datum der Promotionsprüfung: 23. April 2004

## Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>V</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>VIII</i>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Endozytose und Exozytose</b>	<b>1</b>
1.1.1. Plasmamembranen und Clathrin coated pits	2
1.1.2. Frühe und späte Endosomen	4
1.1.3. Lysosomen	7
<b>1.2. Annexine</b>	<b>8</b>
1.2.1. Die Annexinfamilie	8
1.2.2. Die Aufgaben der Annexine in der Endozytose	9
1.2.3. Intrazelluläre Lokalisation und bisher bekannte Funktionen von Annexin VI	13
1.2.4. Die calciumabhängige Phospholipidbindung von Annexin VI	16
<b>1.3. Markerproteine endozytotischer Zellkompartimente</b>	<b>18</b>
1.3.1. Rab 5 und Rab 4 in frühen Endosomen	18
1.3.2. Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor in späten Endosomen und im Golgi Apparat	19
1.3.3. Der LDL-Rezeptor und LRP in coated pits, frühen und rezyklierenden Endosomen	20
<b>1.4. Rezeptorvermittelte Endozytose und intrazellulärer Transport von Lipoproteinen</b>	<b>22</b>
1.4.1. Der exogene Lipidtransport	23
1.4.1.1. LRP vermittelte Aufnahme von Chylomikronen	24
1.4.1.2. LDL-Rezeptor vermittelte Aufnahme von LDL im endogenen Lipidstoffwechsel	25
1.4.1.3. Cholesterolefflux	26
1.4.1.3.1. Scavenger-Rezeptor SRB1 und ABCA1	28
1.4.1.3.2. Die Rolle von Caveolin und Membran-Rafts im Cholesterolefflux	29
<b>1.5. Ziele der Arbeit</b>	<b>32</b>

---

<b>2. Material und Methoden</b>	<b>34</b>
<b>2.1. Material</b>	<b>34</b>
2.1.1. Geräte	34
2.1.2. Verbrauchsmittel	35
2.1.3. Chemikalien	36
2.1.4. Zellkultur und Bakterien	38
2.1.5. Antikörper	40
2.1.6. Vektoren, Restriktionsendonukleasen und Oligonukleotide	41
2.1.7. Enzyme	42
<b>2.2. Methoden</b>	<b>43</b>
2.2.1. Klonierungen	43
2.2.2. Restriktionsverdau	44
2.2.3. Agarosegelelektrophorese	44
2.2.4. Transformation von Bakterien	45
2.2.5. DNA-Mini- und Maxipräparation	46
2.2.6. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen:	47
2.2.7. Zellkultur	48
2.2.8. Ausplattieren von Zellen	48
2.2.9. Einfrieren und Auftauen von Zellen	49
2.2.10. Transfektion	49
2.2.11. Herstellung einer stabilen Zelllinie	50
2.2.12. Proteinextraktion aus Zellen	50
2.2.13. Endosomenpräparation	51
2.2.14. TCA-Fällung	52
2.2.15. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry	52
2.2.16. Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE	53
2.2.17. Coomassiefärbung von Proteingelen	54
2.2.18. Western Blot	55
2.2.19. ECL-Immuno-detection nach Whitehead et al (1979)	55
2.2.20. Bestimmung der $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität	56
2.2.21. Isolierung von humanen LDL	56
2.2.22. Radioaktive Markierung von LDL mit $^3\text{H}$ -Cholesterol	57

---

2.2.23. Herstellung von lipoproteindefizientem Serum _____	57
2.2.24. Effluxbestimmung von <sup>3</sup> H-Chol/LDL _____	58
<b>3. Ergebnisse _____</b>	<b>59</b>
<b>3.1. Charakterisierung endosomaler Membranfraktionen in Annexin VI überexprimierenden Zellen _____</b>	<b>59</b>
3.1.1. Nachweis von Annexin VI _____	59
3.1.1.1. Annexin VI im unbehandelten Gradienten _____	60
3.1.1.2. Annexin VI nach 120 min LDL-Inkubation im Dichtegradienten _____	64
3.1.2. Nachweis von Rab 4 _____	65
3.1.3. Nachweis des LDL-Rezeptors _____	66
3.1.6. Nachweis des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors _____	69
<b>3.2. Vergleich zwischen CHO-Wildtyp-Zellen und CHOanx6 klon-Zellen _____</b>	<b>70</b>
3.2.1. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Endosomen _____	70
3.2.2. Vergleich der Lokalisationen von LRP und Caveolin _____	78
<b>3.3. Etablierung eines Enzymassays zum Nachweis lysosomaler Proteine _____</b>	<b>80</b>
3.3.1. Charakterisierung der $\beta$ -Hexosaminidaseaktivität in den einzelnen Fraktionen des Dichtegradienten _____	80
3.3.2. Vergleich der $\beta$ -Hexosaminidaseaktivität in einem mit LDL inkubierten Gradienten _____	82
<b>3.4. Untersuchung der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Membranbindung von Annexin VI _____</b>	<b>82</b>
3.4.1. Vergleich der Lokalisation von Annexin VI in +/-EGTA behandelten Gradienten _____	83
<b>4. Diskussion _____</b>	<b>87</b>
<b>4.1. Charakterisierung der Lokalisation von Annexin VI im Dichtegradienten _____</b>	<b>87</b>
4.1.1. Die Lokalisation des Annexin 6-Proteins im Vergleich zu Rab 4, dem LDL- Rezeptor, dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, LRP und Caveolin und im Dichtegradienten _____	90
4.1.2. Diskussion der Aussagekraft des Dichtegradienten durch Einbeziehung der Werte der $\beta$ -Hexosaminidaseaktivität _____	93
4.1.3. Veränderung der Lokalisation von Annexin 6 nach 120 min LDL-Inkubation _____	95

---

<b>4.3. Diskussion und Erklärungsansätze zu dem unterschiedlichen H<sup>3</sup>-Cholesterol/LDL-Effluxverhalten von CHO-Wildtyp-Zellen und CHOanx6klon-Zellen</b>	<b>97</b>
<b>4.4. Zusammenfassung</b>	<b>100</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>X</b>
<b>Anhang</b>	<b>XVII</b>

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: EIGENSCHAFTEN DER VERSCHIEDENEN ENDOSOMALEN KOMPARTIMENTE (AUS „ENDOCYTOSIS“ VON MUKHERJEE ET AL., 1997, S.766) .....	7
ABBILDUNG 2: DER STRUKTURELLE AUFBAU DER EINZELNEN ANNEXINE (AUS "ANNEXINS AND MEMBRANE DYNAMICS" VON GERKE UND MOSS, 1997, S.131).....	11
ABBILDUNG 3: EIGENSCHAFTEN UND AUFBAU DER LIPOPROTEINE (AUS „BIOCHEMIE UND PATHOBIOCHEMIE“ VON LÖFFLER UND PETRIDES, 1998, S. 470) .....	23
ABBILDUNG 4: AMPLIFIKATION DER ANNEXIN VI-CODIERENDEN REGION PER POLYMERASEKETTENREAKTION...	43
ABBILDUNG 5: SUCROSEGRADIENT VOR UND NACH ULTRAZENTRIFUGATION .....	61
ABBILDUNG 6: NACHWEIS VON ANNEXIN VI IM UNBEHANDELTEN GRADIENTEN NACH SUBZELLULÄRER FRAKTIONIERUNG VON CHO ANX6-KLON-ZELLEN, NACH SDS-PAGE, WESTERNBLOTTING UND ECL-DETEKTION MIT EINEM PRIMÄREN ANTI-GSTANX6-ANTIKÖRPER UND EINEM SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER GAR-Po.....	64
ABBILDUNG 7: NACHWEIS VON ANNEXIN VI NACH 120 MIN LDL-INKUBATION NACH SUBZELLULÄRER FRAKTIONIERUNG VON CHO ANX6-KLON-ZELLEN, NACH SDS-PAGE, WESTERNBLOTTING UND ECL-DETEKTION MIT EINEM PRIMÄREN ANTI-GSTANX6-ANTIKÖRPER UND EINEM SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER GAR-Po.....	65
ABBILDUNG 8: NACHWEIS VON RAB 4 IM UNBEHANDELTEN GRADIENTEN NACH SUBZELLULÄRER FRAKTIONIERUNG VON CHO ANX6-KLON-ZELLEN, NACH SDS-PAGE, WESTERNBLOTTING UND ECL-DETEKTION MIT EINEM PRIMÄREN POLYKLONALEN KANINCHEN-AK GEGEN RAB 4 UND EINEM SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER GAR-Po .....	66
ABBILDUNG 9: NACHWEIS DES LDL-REZEPTORS IM UNBEHANDELTEN GRADIENTEN NACH SUBZELLULÄRER FRAKTIONIERUNG VON CHO ANX6-KLON-ZELLEN, NACH SDS-PAGE, WESTERNBLOTTING UND ECL-DETEKTION MIT EINEM PRIMÄREN KANINCHENANTIKÖRPER GEGEN DEN LDL-R UND EINEM SEKUNDÄREN GAR-Po-AK (OBEN), NACHWEIS VON ANNEXIN VI IM UNBEHANDELTEN GRADIENTEN NACH SUBZELLULÄRER FRAKTIONIERUNG VON CHO ANX6-KLON-ZELLEN, NACH SDS-PAGE, WESTERNBLOTTING UND ECL-DETEKTION MIT EINEM PRIMÄREN ANTI-GSTANX6-ANTIKÖRPER UND EINEM SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER GAR-Po (UNTEN) .....	67
ABBILDUNG 10: NACHWEIS VON LRP IM UNBEHANDELTEN GRADIENTEN NACH SUBZELLULÄRER FRAKTIONIERUNG VON CHO ANX6-KLON-ZELLEN, NACH SDS-PAGE, WESTERNBLOTTING UND ECL-DETEKTION MIT EINEM PRIMÄREN POLYKLONALEN KANINCHENANTIKÖRPER GEGEN LRP UND EINEM SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER GAR-Po.....	68
ABBILDUNG 11: NACHWEIS VON CAVEOLIN IM UNBEHANDELTEN GRADIENTEN NACH SUBZELLULÄRER FRAKTIONIERUNG VON CHO ANX6-KLON-ZELLEN, NACH SDS-PAGE, WESTERNBLOTTING UND ECL-DETEKTION MIT EINEM PRIMÄREN POLYKLONALEN KANINCHENANTIKÖRPER GEGEN CAVEOLIN UND EINEM SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER GAR-Po.....	69

---

ABBILDUNG 12: NACHWEIS DES MANNOSE-6-P-REZEPTORS IM UNBEHANDELTEN GRADIENTEN NACH SUBZELLULÄRER FRAKTIONIERUNG VON CHO ANX6-KLON-ZELLEN, NACH SDS-PAGE, WESTERNBLOTTING UND ECL-DETEKTION .....	70
ABBILDUNG 13: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME VON FRÜHEN ENDOSOMEN NACH SUBZELLULÄRER FRAKTIONIERUNG VON CHOANX6-KLON ZELLEN, FIXIERT UND PRÄPARIERT WIE BESCHRIEBEN.....	72
ABBILDUNG 14: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME VON SCHWEREN MEMBRANEN NACH SUBZELLULÄRER FRAKTIONIERUNG VON CHOANX6-KLON ZELLEN, FIXIERT UND PRÄPARIERT WIE BESCHRIEBEN.....	72
ABBILDUNG 15: $\alpha$ -TUBULIN IM CHOANX6-KLON, IMMUNFLUORESCENZ VON CARLOS ENRICH (DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE BARCELONA) .....	73
ABBILDUNG 16: $\alpha$ -TUBULIN IM CHO-WILDTYP, IMMUNFLUORESCENZ VON CARLOS ENRICH (DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE BARCELONA).....	73
ABBILDUNG 17: $\alpha$ -AKTIN IM CHOANX6-KLON, IMMUNFLUORESCENZ VON CARLOS ENRICH (DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE BARCELONA).....	74
ABBILDUNG 18: $\alpha$ -AKTIN IM CHO-WILDTYP, IMMUNFLUORESCENZ VON CARLOS ENRICH (DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE BARCELONA).....	74
ABBILDUNG 19: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER AUSSCHNITT AUS EINER CHOANX6-KLON ZELLE ANGEFERTIGT VON CARLOS ENRICH (DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE BARCELONA) .....	75
ABBILDUNG 20: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER AUSSCHNITT AUS EINER CHO-WILDTYP ZELLE ANGEFERTIGT VON CARLOS ENRICH (DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE BARCELONA) .....	76
ABBILDUNG 21: $\alpha$ -CAVEOLIN IM CHOANX6-KLON, IMMUNFLUORESCENZ VON CARLOS ENRICH (DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE BARCELONA).....	77
ABBILDUNG 22: $\alpha$ -CAVEOLIN IM CHOANX6-KLON, IMMUNFLUORESCENZ VON CARLOS ENRICH (DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE BARCELONA).....	77
ABBILDUNG 23: NACHWEIS VON CAVEOLIN IM UNBEHANDELTEN GRADIENTEN NACH SUBZELLULÄRER FRAKTIONIERUNG VON CHO WILDTYP-ZELLEN, NACH SDS-PAGE, WESTERNBLOTTING UND ECL-DETEKTION MIT EINEM PRIMÄREN POLYKLONALEN KANINCHENANTIKÖRPER GEGEN CAVEOLIN UND EINEM SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER GAR-PO.....	78
ABBILDUNG 24: NACHWEIS VON CAVEOLIN IM UNBEHANDELTEN GRADIENTEN NACH SUBZELLULÄRER FRAKTIONIERUNG VON CHO ANX6-KLON-ZELLEN, NACH SDS-PAGE, WESTERNBLOTTING UND ECL-DETEKTION MIT EINEM PRIMÄREN POLYKLONALEN KANINCHENANTIKÖRPER GEGEN CAVEOLIN UND EINEM SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER GAR-PO.....	78
ABBILDUNG 25: NACHWEIS VON LRP IM UNBEHANDELTEN GRADIENTEN NACH SUBZELLULÄRER FRAKTIONIERUNG VON CHO WILDTYP-ZELLEN, NACH SDS-PAGE, WESTERNBLOTTING UND ECL-DETEKTION MIT EINEM PRIMÄREN POLYKLONALEN KANINCHENANTIKÖRPER GEGEN LRP UND EINEM SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER GAR-PO.....	79

---

ABBILDUNG 26: NACHWEIS VON LRP IM UNBEHANDELTEN GRADIENTEN NACH SUBZELLULÄRER FRAKTIONIERUNG VON CHO ANX6-KLON-ZELLEN, NACH SDS-PAGE, WESTERNBLOTTING UND ECL- DETEKTION MIT EINEM PRIMÄREN POLYKLONALEN KANINCHENANTIKÖRPER GEGEN LRP UND EINEM SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER GAR-PO.....	79
ABBILDUNG 27: $\beta$ -HEXOSAMINIDASEAKTIVITÄT IN EINEM UNBEHANDELTEM SUCROSEGRADIENTEN AUS $4-6 \times 10^7$ CHO ANX6 KLON-ZELLEN.....	81
ABBILDUNG 28: $\beta$ -HEXOSAMINIDASEAKTIVITÄT EINES LDL-BEHANDELTEM SUCROSEGRADIENTEN AUS $4-6 \times 10^7$ CHO ANX6 KLON ZELLEN .....	82
ABBILDUNG 29: NACHWEIS VON ANNEXIN VI IM UNBEHANDELTEM GRADIENTEN NACH SUBZELLULÄRER FRAKTIONIERUNG VON CHO ANX6-KLON-ZELLEN, NACH SDS-PAGE, WESTERNBLOTTING UND ECL- DETEKTION MIT EINEM PRIMÄREN ANTI-GSTANX6-ANTIKÖRPER UND EINEM SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER GAR-PO.....	83
ABBILDUNG 30: ANNEXIN VI IM EGTA-BEHANDELTEM GRADIENTEN NACH SUBZELLULÄRER FRAKTIONIERUNG VON CHO ANX6-KLON-ZELLEN, NACH SDS-PAGE, WESTERNBLOTTING UND ECL-DETEKTION MIT EINEM PRIMÄREN ANTI-GSTANX6-ANTIKÖRPER UND EINEM SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER GAR-PO .....	83
ABBILDUNG 31: VERGLEICH DES $^3\text{H}$ -CHOLESTEROL-EFFLUX IM MEDIUM .....	85
ABBILDUNG 32: VERGLEICH DER $^3\text{H}$ -CHOLESTEROLMENGEN IN DEN ZELLEN.....	85

---

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung (en)
ABCA1	ATP-binding cassette transporter
ADP	Adenosindiphosphat
Anx6	Annexin VI
Ap's	Adaptorproteine
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
BHK	Baby Hamster Kidney
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
cAMP	Cyclo-Adenosinmonophosphat
CETP	Cholesterin-Ester-Transfer-Protein
Chol.	Cholesterol
CHO	Chinese Hamster Ovary
CI-MPR	Mannose-6-Phosphat Rezeptor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ECV	Endozytische Carriervesikel
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglycol-bis-N,N,N',N'-tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GaR-Po	Peroxidase labeled Goat ant-Rabbit IgG
GTP	Guanosintriphosphat
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HDL	High Density Lipoprotein
3H	Tritium
HSPG	Heparansulfat-Proteoglycane
HL	Hepatische Lipase
IDL	Intermediate Density Lipoprotein

---

IGF	Insulin-like Growth Factor
LAMPS	Lysosomenassoziierte Membranglykoproteine
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acetyltransferase
LCV	Large Coated Vesicles
LDL	Low Density Lipoprotein
lgps	Lysosomale Membranglykoproteine
Lpl	Lipoproteinlipase
LRP	LDL-receptor related protein
MCV	Medium Coated Vesicles
MVB	Multivesicular bodies
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pic	Proteaseninhibitorcocktail
PNS	Postnuclear Supernatant
RAP	Rezeptor-assoziiertes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
SCV	Small Vesicular Bodies
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SRB 1	Scavenger receptor B1
Tab.	Tabelle(n)
TCA	Trichloressigsäure
TGN	Trans Golgi Network
u.a.	unter anderem
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
z.B.	zum Beispiel

## 1. Einleitung

### 1.1. Endozytose und Exozytose

Intrazelluläre Kommunikation ist eine der wichtigsten Grundlagen der Zellbiologie. Besonders für multizelluläre Organismen ist sie notwendig, damit die Aktivitäten der verschiedenen Zelltypen effektiv koordiniert werden können. Eine zentrale Stellung in diesem Austausch besitzen die Prozesse der Endo- und Exozytose.

Der Begriff der Endozytose wurde erstmals von de Duve im Jahre 1963 benutzt. Er bezeichnete damit die verschiedenen Mechanismen, die von den einzelnen Zellen der Säugetiere im Lauf der Evolution entwickelt wurden, um kleine Moleküle, Makromoleküle und Partikel zu internalisieren und sie zu den speziellen Organellen im Zytoplasma zu geleiten.

Viele wichtige zelluläre Funktionen wie die Aufnahme extrazellulärer Nährstoffe, die Regulation der Expression von Zelloberflächenrezeptoren, die Aufrechterhaltung der Zellpolarität und die Antigenpräsentation werden durch Endozytosemechanismen erzielt. Diese umfassen unterschiedliche Methoden der zellulären Aufnahme extrazellulären Materials wie Pinocytose („Zell-trinken“), Phagozytose („Zell-essen“), sowie clathrinabhängige und clathrinunabhängige rezeptorvermittelte Endozytose (Mukherjee et al., 1997).

Bei der Exozytose dagegen, bei der es sich um einen Ausschleusungsvorgang handelt, werden intrazelluläre Komponenten wie Proteine oder Peptide in Membranvesikel verpackt, zur Plasmamembran transportiert und dort durch Vesikelfusion in den Extrazellulärraum entlassen. In eukaryoten Zellen existieren zwei Formen, die konstitutive und die regulierte Exozytose. Bei der konstitutiven folgt der Vesikelformation die sofortige Fusion mit der Plasmamembran, wohingegen bei der regulierten Form Vesikel im Zytoplasma auf ein Signal warten, bevor die Fusion mit der Plasmamembran initialisiert wird. Konstitutive Exozytose findet in nahezu allen Zelltypen statt, während die regulierte nur in bestimmten Zelltypen wie endokrinen und neuronalen Zellen erfolgt (Donnelly and Moss, 1997).

In den folgenden Abschnitten wird verstärkt auf die clathrinvermittelte Endozytose eingegangen, da sie als theoretische Grundlage für den experimentellen Teil dieser Arbeit notwendig ist. Begonnen werden soll zunächst mit der Beschreibung der Plasmamembranen,

deren Funktion den ersten Schritt der Einschleusung der zu internalisierenden Molekülen darstellt. Dann wird der Weg weiterverfolgt über die Aufnahme des Materials in die frühen und späten Endosomen bis hin in die Lysosomen, in denen letztendlich die Degradation und die Verwertung der Moleküle stattfindet.

### 1.1.1. Plasmamembranen und Clathrin coated pits

Plasmamembranen sind Lipiddoppelschichten und trennen effektiv Zellinnenraum vom Extrazellularraum. Kleine Moleküle können per Diffusion die Membranen passieren, während die Membran für Makromoleküle impermeabel ist und somit deren Transport regulierte Mechanismen zur Verfügung stehen müssen.

Einer dieser Mechanismen stellt die clathrinvermittelte Aufnahme von Rezeptor-Liganden-Komplexen dar. Sind die Moleküle über ihre Rezeptoren an der Plasmamembran gebunden, schnüren sich die coated pits durch Vesikelbildung ab und gelangen so in den Intrazellularraum. Transformieren diese Vesikel jetzt zu sortierenden Endosomen (pH 5.9-6,0), dann werden die Liganden (beispielsweise LDL und Eisen) in das Lumen dieser Organelle entlassen. Daraufhin gelangt die Mehrzahl der membrangebundenen Komponenten (z.B. der LDL-Rezeptor und apo-Transferrin gebunden an den Transferrin-Rezeptor nach der Abgabe von Eisen des Transferrins) in das rezyklierende Kompartiment, von wo aus sie dann zur Zelloberfläche rezykliert werden.

Das Schlüsselereignis dieses Prozesses bildet die Rekrutierung von löslichem Clathrin aus dem Zytoplasma an die Zellmembran, wo es sich in einem Gitter von Hexagons und Pentagons, eine käfigähnliche Struktur formend, ansammelt und in dieser Form ein Membranvesikel umschließt („clathrin-coated pit“). Diese Vesikelbildung ist notwendig, damit ein kontrollierter Transport von Transmembranrezeptoren mit ihren Liganden stattfinden kann. Clathrin-coated pits sind ca. 150 nm große invaginierte Strukturen der Plasmamembran, die zwischen 0,4% ( in Adipozyten) und 3,8 % (in einigen humanen Fibroblasten) der Plasmamembranoberfläche besetzen (Mukherjee et al., 1997). Die zugrundeliegende Clathrineinheit ist ein Triskelion, bestehend aus drei Kopien der schweren Clathrin-Ketten und drei Kopien der leichten Clathrin Ketten. Die Eigenschaft der Clathrin-Triskelionen, sich spontan zu gebogenen Gittern anzuordnen, ist vermutlich für das Abschnüren von Vesikeln aus den Membraneinstülpungen entscheidend (Heuser, 1980). Eine

der bedeutendsten Merkmale der „clathrin coated vesicles“ ist ihre Selektivität. Bestimmte Membranproteine, v.a. Rezeptoren extrazellulärer Liganden wie für Low density Lipoprotein (LDL) und Transferrin sind sehr effizient in Clathrin Coated Pits konzentriert. Im Fall von humanen Fibroblasten sind 60-70 % der LDL-Rezeptoren der Zelloberfläche in coated pits lokalisiert (Anderson et al., 1977). Diese Rezeptoren besitzen meist ein tyrosinhaltiges „Internalisierungssignals“ (NPXY) in der zytoplasmatischen Domäne des Membranproteins. Aus „in vitro“-Studien weiß man, daß das Internalisierungssignal durch Bindung an Proteinkomplexe, sogenannte Adaptor-Proteine (Ap`s), seine Wirkung erzielt. Diese Proteinkomplexe sind ebenfalls Komponenten des „coats“, die eine innere Membran formen und das Clathrin an die Membran binden. Es existieren zwei unterschiedliche Typen dieser Adaptoren in der Zelle. Der erste Typ, assoziiert mit dem Trans-Golgi-Netzwerk, ist das AP-1, während der zweite Adaptor-Typ, das AP2, mit der Plasmamembran assoziiert ist.

Die essentielle Rolle spezifischer zytoplasmatischer Aminosäuresequenzen für die Lokalisation in den Coated Pits wurde erstmals bei einer Analyse einer natürlichen Mutation des humanen LDL-Rezeptors nachgewiesen. Diese Mutation zeichnete sich durch einen Defekt in Bezug auf die rezeptorvermittelte Aufnahme von LDL aus und war durch einen Austausch eines ursprünglich vorhandenen Tyrosinrestes durch einen Cysteinrest im zytoplasmatischen Schwanz ausgezeichnet. In systematischen mutagenen Untersuchungen des humanen LDL-Rezeptors wurde daraufhin gezeigt, daß ein Tyrosinrest oder eine andere aromatische Aminosäure an dieser Position für die Lokalisation des LDL-Rezeptors in coated pits verantwortlich ist (Davis et al., 1987).

Andere Studien zeigten, daß neben NPXY auch leucin-, dileucin- und lysinbasierte Internalisierungsmotive für die clathrinvermittelte zelluläre Aufnahme verwendet werden (Mukherjee et al.,1997).

Das Internalisierungssignal und die Bindung an die Adaptorproteine stellen nicht die einzigen Interaktionen dar, um die Adaptoren aus dem Zytosol an die Plasmamembran zu rekrutieren. Wahrscheinlich ist, daß sowohl ein spezifischer AP-2-Rezeptor auf der Plasmamembran als auch ein AP-1-Rezeptor auf der Membran des Trans-Golgi-Netzwerks existiert, die vermutlich an bestimmte Zielsignale der beiden Adaptorproteinkomplexe binden. M. Robinson und Kollegen konnten zumindest zwei dieser Zielsignale in Untereinheiten von AP-1 und AP-2 feststellen (Robinson et al., 1996). Zusätzlich gibt es Hinweise für eine Regulation dieser Vorgänge durch den sogenannten ADP-Ribosylierungs-Faktor (ARF), der eine Familie

kleiner GTP-bindender Proteine darstellt. Auch spielt die GTPase Dynamin eine wichtige Rolle in der clathrinvermittelten Endozytose. Sie wird nach Untersuchungen von Gugliatti et al. (1973) für die Abschnürung der coated pits zu coated vesikels gefordert, indem sie sich, in eine helicale Struktur geformt, um den „Hals“ der gebildeten Vesikel legt und ihnen somit zu ihrer Abschnürung in das Zytoplasma verhilft.

In einer Studie von Turpin et al. wurde 1998 eine Interaktion zwischen den Proteinen Dynamin Annexin VI gezeigt, die ebenfalls eine wichtige Rolle im Zusammenhang der Vesikelabschnürung zu spielen scheint. Es wurden drei Subtypen von Clathrin Coated Vesikels voneinander getrennt betrachtet, die alle den LDL-Rezeptor enthielten, sich aber in ihrer Größe und Dichte unterschieden. Sie wurden als „large“ (LCV), „medium“ (MCV) und „small coated vesicles“ (SCV) bezeichnet. Immunpräzipitations-Experimente zeigten, daß diese Interaktion von Annexin VI und Dynamin nur in LCVs auftrat, obwohl auch in den SCVs in Vesikeltypen Dynamin und Annexin VI im ausreichenden Maß präsent waren. Vermutlich hängt dieses Phänomen mit der Lipid-Komposition der beiden Vesikeltypen zusammen. Die zytoplasmatische Membranseite der LCVs könnte die einzige sein, die eine Interaktion der beiden Proteine, nach der durch GTP- Bindung und Hydrolyse getriggerten Formänderung des Dynamins, zuläßt. Eine Alternative wäre das Vorhandensein eines dritten Proteins, das nur in den LCVs vorhanden ist und sozusagen eine „Brücke“ zwischen Annexin VI und Dynamin ausbildet. In jedem Fall besteht die Vermutung, daß Annexin VI während der Vesikelabschnürung der Clathrin Coated Vesicles Dynamin reguliert und zielsteuert.

Zwar ist der Prozeß der Endozytose zur Zeit noch nicht gänzlich erklärbar, aber sicher ist, daß für die Invagination Energie in Form von ATP benötigt wird. In ATP-depletierten Zellen zeigte sich das Abschnüren der Vesikel von den Membranen blockiert (Schmid and Carter, 1990).

### 1.1.2. Frühe und späte Endosomen

Nachdem die Rezeptoren mit ihren Liganden via clathrin coated pits in das Zellinnere transportiert wurden, verlieren die Vesikel hier ihre Coats durch ein ca. 70 kD großes ATP-abhängiges Enzym, das sogenannte „Uncoating Enzyme“ (Rothman and Schmid, 1986). Die internalisierten Moleküle werden dann schnell zu „frühen“ oder „sortierenden“ Endosomen

transportiert, in denen durch ATP-abhängige Protonenpumpen ein saures Milieu erzeugt wird (Tycko et Maxfield, 1982). Bei diesem sauren pH-Wert dissoziieren viele Liganden von ihren Rezeptoren und die membrangebundenen Komponenten, wie die Rezeptoren, werden effizient an die Zelloberfläche rezykliert, wo sie erneut für den Transport eingesetzt werden können. Währenddessen wird der größte Teil des in den frühen Endosomen enthaltenen Volumens, einschließlich der entlassenen Liganden, für die Degradierung in den späten Endosomen oder in den Lysosomen vorbereitet. Nicht alle Rezeptor-Liganden folgen dieser Route. Viele werden zu bestimmten alternativen zellulären Zielen geleitet. Transferrin ist z.B. ein Ligand, der mit seinem Rezeptor assoziiert bleibt, während er auf die gleiche Weise wie der LDL-Rezeptor rezykliert wird. Obwohl die meisten Rezeptoren effizient an die Plasmamembran zurück gebracht werden, erfolgt bei einigen auch eine sofortige Degradierung nach ihrer Internalisierung (Herbst et al., 1994). Einen anderen Weg benutzt der CI-MPR. Dieser Rezeptor wird hauptsächlich auf der Plasmamembran, in den frühen und späten Endosomen und im TGN gefunden. Bei einzelnen Rezeptoren wurde ein stetiger Austausch zwischen diesen Lokalisationen festgestellt.

Endosomen sind sehr dynamische Einheiten. Sowohl ihre Form als auch ihre Lokalisation sind die wichtigsten Determinanten ihrer Funktionen. Das frühe Endosomensystem kann in zwei separate Kompartimente unterteilt werden, in sortierende und in rezyklierende Endosomen. Sortierende Endosomen besitzen eine tubulovesikuläre Morphologie mit einer Vesikelfraktion, die typischerweise im Durchmesser 250-400 nm groß ist. Die Tubuli, die von diesen vesikulären Körpern ausgehen, sind 50-60 nm im Durchmesser und bis zu 4µm lang. Eine Konsequenz dieses Aufbaus ist, daß der größte Teil des Volumens in der Vesikelfraktion gelagert ist, wohingegen der Hauptteil der Oberflächenregionen in den Tubuli vorliegt. Diese Verteilung bietet eine effiziente Basis, um Membrankomponenten von löslichem Endosomeninhalt zu trennen.

Das endozytische „Recycling-Kompartiment“, als zweite physikalisch abgrenzbare Fraktion der frühen Endosomen, besteht aus einer reinen Ansammlung von Tubuli mit Durchmessern von ca. 50-70 nm. Da diese Tubuli eine ähnliche Morphologie besitzen wie diejenigen, die vom sortierenden Kompartiment ausstrahlen, ergibt sich die Vermutung, daß die Tubuli, die sich von den Sortierenden Endosomen ablösen, membranassoziierte Komponenten zu dem Recycling-Kompartiment transportieren. In beiden Kompartimenten herrschen unterschiedliche pH-Werte vor, was ein weiteres Indiz für das Vorliegen zweier voneinander

getrennter Komponenten ist. In den sortierenden Endosomen beträgt der pH-Wert 5,9 bis 6,0, im rezyklierenden Kompartiment dagegen herrscht ein pH-Wert von 6,4-6,5 vor.

Im folgenden Abschnitt sollen die definierenden Charakteristika der spezifischen endosomalen Kompartimente dargestellt werden. Durch bestimmte Kriterien kann eine Unterscheidung zwischen frühen und späten Kompartimenten getroffen werden. Frühe Endosomen schließen all die intrazellulären Organellen mit ein, die sich an dem Haupt-Recyclingweg beteiligen. Internalisierte Moleküle müssen diese Portionen des frühen Endosomensystems passieren, um die späten Endosomen zu erreichen. „Sortierende Endosomen“ beinhalten sowohl rezyklierte Moleküle wie Transferrin, als auch Liganden, die wie LDL in der Zelle abgebaut werden sollen. Das sogenannte endozytische „Recycling-Kompartiment“, enthält zwar ebenfalls die rezyklierten Moleküle, aber kaum die Moleküle, die in der Zelle degradiert werden sollen.

Späte Endosomen sind Kompartimente, die in die Verarbeitung der internalisierten Ladungen involviert sind. In ihnen herrscht ein pH-Wert von 5,0-6,0 vor. Sie besitzen kein Transferrin und keine recycling-Rezeptoren mehr, aber beinhalten LDL,  $\alpha_2$ -Makroglobulin und andere Liganden, die nach der Internalisierung degradiert werden sollen. Späte Endosomen werden häufig definiert als Organellen, denen Transferrin und andere Recycling Komponenten fehlen, aber die den CI-MPR enthalten. Da der CI-MPR nie in die Lysosomen eintritt, kann diese Tatsache als Kriterium genutzt werden, zwischen späten Endosomen und Lysosomen zu unterscheiden. Die folgende Tabelle soll noch einmal zusätzlich die Unterschiede zwischen den einzelnen Zellkompartimenten verdeutlichen:

Kompartimente					
	Frühe endozytäre Kompartimente			Späte endozytäre Kompartimente	
Eigenschaften	Sortierende Endosomen	Rezyklierendes Kompartiment	Endozytische Carriervesikel (ECV)/ Multivesikuläre Körper (MVB)	Späte Endosomen	Lysosomen
Verteilung	peripher	Variabel: im Zytoplasma oder juxt nukleär verteilt	Zytoplasma	hauptsächlich perinukleär	hauptsächlich perinukleär
Morphologie	Tubulovesikulär, Zysternen (interne Membranen)	Tubulär mit vesikulären Abschnürungen	Sphärisch mit internen Membranen	Komplexe Strukturen mit internen Membranen (oft Zwiebelähnlich)	Variabel: Tubulär oder den späten Endosomen ähnlich
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“ und für die Lysosomen bestimmte Liganden	Nur Transferrin-Rezeptor ( und andere „recycling-Rezeptoren“), keine für Lysosomen bestimmten Moleküle		M-6-P-Rezeptor, Igps und LAMPs	Lysosomale Membranglykoproteine (Igps) und Lysosomenassoziierte Membranproteine (LAMPS)
GTP-bindende Proteine	Rab 4, Rab 5, Rab 11			Rab 7, Rab 9	

**Abbildung 1: Eigenschaften der verschiedenen endosomalen Kompartimente (aus „Endocytosis“ von Mukherjee et al., 1997, S.766)**

### 1.1.3. Lysosomen

Als letzte Station des Transports der Moleküle auf ihrem Degradationsweg erreichen diese die Lysosomen. Lysosomen, mit einem pH-Wert von 5,0-5,5, beinhalten endozytierte unverdauliche flüssige Phase-Marker wie Dextrane, aber ihnen fehlt der CI-MPR. Daher ergibt sich die Definition der Lysosomen als „CI-MPR-negative Kompartimente“, was zwar sehr hilfreich bei der Abgrenzung gegenüber später Endosomen erscheint, aber eine Änderung der früheren Definition als „Hydrolase-reiche, saure Organelle, die den Katabolismus des internalisierten Materials austragen“, bedeutet. Ein Großteil der Hydrolyse internalisierten

Materials findet vermutlich in Organellen statt, die heute als späte Endosomen klassifiziert werden.

Der Transport des endosomalen Inhaltes zu den Lysosomen scheint durch die Fusion später Endosomen mit vorexistierenden Lysosomen zu funktionieren. Es wurde sogar von bidirektionalem Verkehr des löslichen Materials zwischen späten Endosomen und Lysosomen berichtet (Jahraus et al., 1994). Lysosomale Enzyme, gebunden an den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, betreten direkt vom Trans Golgi Netzwerk kommend die späten Endosomen. Freie Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren werden nach dem Entlassen der lysosomalen Enzyme zum TGN rezykliert. Die Lysosomen, deren Enzyme durch das vorherrschende pH-Optimum hier ihre höchste Aktivität besitzen, degradieren die entlassenen Liganden und speichern das unverdauliche Material.

Der Transport zwischen späten Endosomen und Lysosomen ist abhängig von einer vakuolären Protonenpumpe. Eine pH-Neutralisation durch beispielsweise Bafilomycin A<sub>1</sub> verhindert diesen Transport.

## *1.2. Annexine*

Im folgenden Teil der Arbeit soll die Familie der Annexine vorgestellt und charakterisiert werden. Daraufhin wird verstärkt auf das Annexin VI Protein eingegangen, seine Lokalisation und bisher bekannte Funktionen werden dargestellt und seine Rolle in den beschriebenen endozytischen Vorgängen aufgezeigt.

### 1.2.1. Die Annexinfamilie

Annexine gehören zu einer stetig wachsenden Familie mindestens vierzehn strukturell verwandter Proteine. Das typische Annexin-Protein ist charakterisiert durch zwei maßgebliche Eigenschaften. Seine Polypeptidkette ist in vier (bzw. bei Annexin VI acht)  $\alpha$ -helikale Domänen ähnlicher Struktur mit einem zentralen hydrophoben Kern gefaltet. Das zweite Charakteristikum ist die Ausbildung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Bindungen zu Phospholipiden, vor allem zu sauren Phospholipiden, die ein oder mehrere negative Ladungen aufweisen.

Zehn der bisher entdeckten Annexine wurden in Säugetierzellen gefunden. Zu Beginn wurden sie in höheren Vertebraten und in einer Vielzahl anderer Organismen (von niedrigeren

Vertebraten bis hin zu Insekten, Nematoden und Pflanzen reichend) beschrieben, was für eine breitflächige Verteilung von Annexinen in Eukaryoten spricht (Gerke und Moss, 1997). Repräsentanten der Annexin-Familie werden in weitgehend allen Zelltypen exprimiert, teilweise machen sie über ein Prozent der Proteinmasse der Zelle aus. Obwohl die biochemischen Charakteristika der Annexine bisher extensiv untersucht wurden und ihre molekulare Struktur, in der reinen und in der membrangebundenen Form, detailliert dargestellt werden konnte, bleibt ihre genaue in vivo Funktion dennoch unklar.

### 1.2.2. Die Aufgaben der Annexine in der Endozytose

Annexine wurden impliziert in unterschiedlichste intrazelluläre Zusammenhänge. So vermutet man ihre Funktionen in Membranverkehrprozessen wie Endo- und Exozytose, durch ihre hemmende Wirkung auf die Phospholipase A<sub>2</sub> in Anti-Imflamationsprozessen, in der Blutkoagulation, in der Organisation des Zytoskeletts, der Zelldifferenzierung und der Zellproliferation, in der mitogenen Signaltransduktion und in spannungsregulierten Ionenkanalprozessen (Liemann and Huber, 1997).

Um die einzelnen Funktionen der Proteine deutlich zu machen, soll zunächst ihre molekulare Struktur erläutert werden, um anschließend auf ihre Funktionen im Zellstoffwechsel einzugehen.

Wie bereits erwähnt beinhaltet das Annexin-Protein ein konserviertes Sequenzelement, das „Annexin repeat“, ein Segment von ca. 70 Aminosäuren, das üblicherweise vier ( im Fall von Annexin VI sogar acht) mal wiederholt wird. Diese „repeats“ besitzen eine Sequenzidentität von 25-30 % untereinander und von 45-55% zwischen den verschiedenen Annexinen. Sie alle beinhalten eine charakteristische calcium- und phospholipidbindende Seite, den „endonexin fold“, der durch eine 17 Aminosäuren lange Sequenz kodiert wird. Jede dieser vier kompakten strukturähnlichen Domänen, benannt von I bis VI, ist unterteilbar in fünf  $\alpha$ -Helices (benannt von A bis E), die aus weniger als zwei Umdrehungen einer rechtsgedrehten Superhelix bestehen. Vier dieser Helices sind nahezu (anti-)parallel zueinander orientiert, während die fünfte Helix geradezu rechtwinklig zu ihnen angeordnet ist. Die Domänen I, II, III und IV sind verbunden durch kurze interhelikale Schleifensegmente, wobei die Verbindung zwischen den Domänen I und II verlängert erscheint.

Die vier Domänen sind aufgebaut in einer planen kreisbildenden Anordnung, wobei die Domänen 1 und 4, und 2 und 3, sich gegenseitig annähernde Module bilden, stabilisiert durch hydrophobe Seitenketten-Interaktionen zwischen polaren und ladungstragenden Resten.

Das Zentrum des Moleküls, die repeat Module 1/4 und 2/3 voneinander trennend, ist eine hydrophile Pore, die vermutlich einen Ionenkanal und somit die strukturelle Basis für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Aktivität darstellt, die von einigen Annexinen ( I, II, VI, VII) angenommen wird.

Das Annexin-Kernprotein besitzt eine flache, leicht gebogene Form mit einer konvexen und einer konkaven Seite. Alle Calcium-Ionen, die in verschiedenen kristallinen Strukturen der Annexin-Proteine definiert wurden, sind auf der konvexen Seite lokalisiert, während die N- und C-Termini auf der gegenüberliegenden konkaven Seite plaziert sind. Im Gegensatz zu dem homologen Proteinkern sind die N-Termini der Annexine sowohl in der Sequenz als auch in der Länge (11 bis 196 Reste), unterschiedlich ausgebildet. Dieser N-terminale Schwanz unterliegt verschiedenen post-translationalen Modifikationen und ist vermutlich als regulatorische Domäne verantwortlich für die speziellen Funktionen jedes Annexinmitgliedes. In der folgenden Grafik soll die strukturelle Organisation der verschiedenen Annexine vereinfacht dargestellt werden:

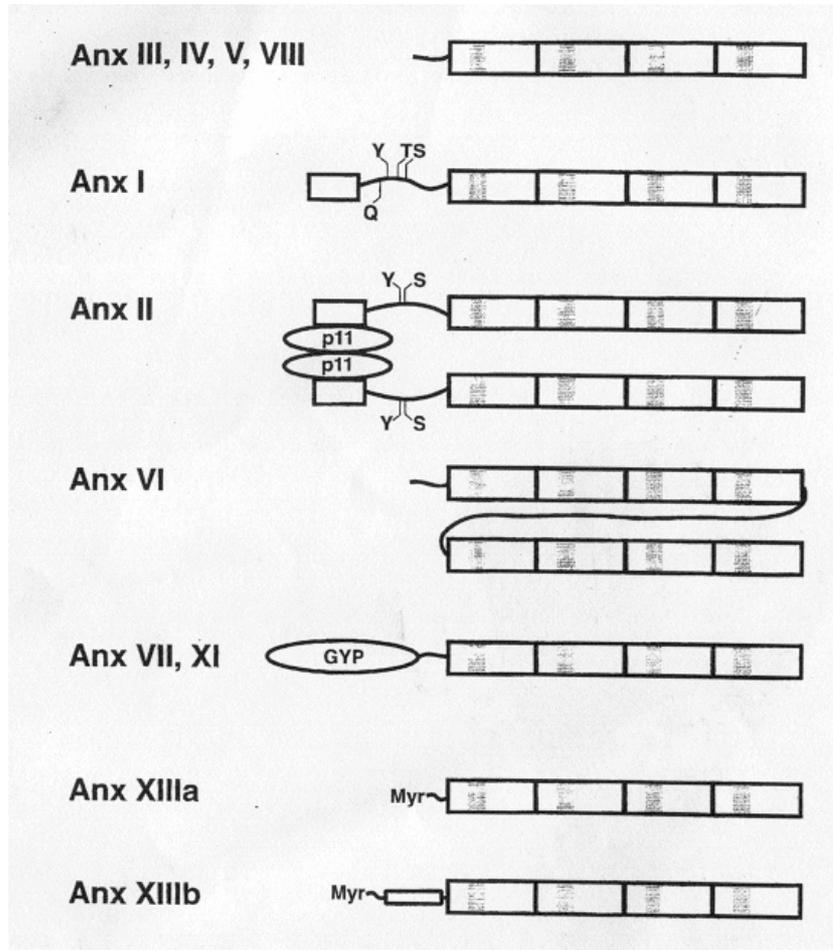


Abbildung 2: Der strukturelle Aufbau der einzelnen Annexine (aus "Annexins and Membrane Dynamics" von Gerke und Moss, 1997, S.131)

Hier werden bekannte Wirbeltier-Annexine nach den strukturellen Eigenschaften ihrer N-terminalen Domänen klassifiziert. Die vier Annexin repeats (acht im Fall von Annexin VI) werden schematisch repräsentiert durch Rechtecke mit einer hochkonservierten Sequenz von 17 Aminosäuren, dem „Annexin fold“ (eingezeichnet in grau). Die vorangestellten N-terminalen Domänen variieren in ihrer Länge zwischen 12 und 19 (Annexine III, IV, V und VIII) und bis zu 200 Aminosäuren (Annexin VI) und zeigen deutliche Strukturunterschiede auf. Z.B. schließen die Annexine I und II amphipatische  $\alpha$ -Helices (kleine Rechtecke) mit ein, die Bindungsstellen für S100 Proteinliganden, Phosphorylierungsstellen für Serin / Threonin und Tyrosin spezifische Proteinkinasen und einen Glutaminrest an Position 18 der Annexin I-Kette, der die Seite für die Transglutaminase-Kreuzverbindung darstellt. In den Annexinen VII und XI ist die lange N-terminale Domäne reich an Glycin-, Tyrosin- und Prolin-Resten, die vermutlich eine Pro- $\beta$ -helix bilden. N-terminale Splicing-Varianten wurden bei verschiedenen Annexinen entdeckt, z.B. bei Annexin XIII (a und b).

Die allgemeinen Eigenschaften der Annexine, insbesondere die calciumabhängige Bindung an saure Phospholipide, wurden präferentiell in zytosolischen Anteilen zellulärer Membranen gefunden, was auf eine Funktion dieser Proteine im Bereich der intrazellulären

membranbezogenen Ereignisse schließen läßt. Die Annexine erfüllen diese Funktionen in erster Linie durch Organisation und Stabilisierung bestimmter Membrandomänen. Die Membranorganisation wird primär gefordert bei Lipidregulationen, einschließlich des Metabolismus von lipid-enthaltenden Inositolphosphaten, Formation oder Modulation von Ionenkanälen und der Organisation von Elementen des Zytoskeletts. Innerhalb dieser Prozesse übt sie insbesondere einen Effekt auf den vesikulären Transport von einem Donor- zu einem Akzeptorkompartiment aus. Auf der Ebene der Plasmamembranen zeichnet sich diese Domänenorganisation beispielsweise in coated pits aus, wo Membranrezeptoren zur zielgerichteten Internalisierung konzentriert vorliegen. Ebenso hat sie eine große Bedeutung in cholesterinreichen „membrane rafts“ in denen bestimmte Lipide, z.B. Glycosphingolipide, und Proteine, wie Caveolin, GPI verankerte Proteine, CD 44, angereichert sind. Eine Membranorganisation erscheint zusätzlich nützlich in frühen Endosomen, um die Moleküle, die für den Transport zu späten Endosomen bestimmt sind, von denen zu trennen, die an die Plasmamembran rezykliert werden sollen.

Als das erste Annexinprotein, Annexin VII, auch bekannt als Synexin, in der Literatur als membranbindendes Protein erkannt wurde, daß Kontakt und Fusion von Membranen vermittelt, konnte man in den folgenden Jahren auch bei einigen anderen Annexinen in detaillierten Analysen Funktionen im intrazellulären Membranverkehr feststellen. „In vitro“ als auch „in vivo“ Studien implizierten einige Annexine in den Transport oder in „Sortier-Ereignisse“ auf dem Endozytoseweg. Annexin I stellt beispielsweise das Hauptsubstrat für die „Epidermal Growth Factor-Rezeptor-kinase“ dar, das bis zur Internalisierung des Rezeptors an Tyr-20 in der N-terminalen Domäne phosphoryliert wird. In Zellreihen, die den EGF Rezeptor überexprimierten (Futter et al., 1993), konnte gezeigt werden, daß die Phosphorylierung von Annexin I durch die Rezeptorkinase in multivesikulären Körpern (MVBs = Multi Vesicular Bodies), endozytischen Kompartimenten die in die Sortierung der zur Degradation bestimmten Rezeptoren involviert sind, stattfindet. Dieser Sortierungsprozess, der den Transport des EGF-Rezeptors zu den internen Vesikeln des MVBs bestimmt, korreliert mit der Tyrosin-Phosphorylierung von Annexin I. Dies scheint auf eine Art und Weise den Mechanismus zu stimulieren, durch den Annexin I an die MVB-Membranen bindet. Allerdings wurde die Lokalisation von membrangebundenem Annexin I durch subzelluläre Fraktionierung und immunohistochemische Methoden bisher immer auf der Plasmamembran und auf Membranen früher Endosomen festgestellt und nicht in

Membranen der späten Endosomen oder der MVBs. Dieser Zusammenhang bleibt bis zu einer absoluten Klärung dieses Phänomens also noch unklar.

Annexin II ist ein weiteres Annexin, das an endosomalen Ereignisse beteiligt ist. Es ist speziell in bestimmten Teilen der Plasmamembran und in zysternalen und tubulären Regionen früher Endosomen unterschiedlicher Zelltypen lokalisiert. In vitro Systeme, die die homotypische Fusion zwischen frühen endosomalen Membranen reproduzierten, zeigten, daß Annexin II eines der wenigen Proteine darstellt, die effizient von einer Spendermembran (Donor) an eine Empfängermembran (Acceptor) übergeben werden. Zudem interferieren Antikörper gegen Annexin II mit einem calciumabhängigen endosomalen Fusionsereignis. In vivo Beweise für die Beteiligung von Annexin II in endozytischen Systemen wurden durch eine transdominante Annexin II Mutante erzielt (Harder et al., 1993).

Annexin IV wird hauptsächlich in polaren Epithelzellen exprimiert und wurde mit der Plasmamembran assoziiert vorgefunden, dabei aber jeweils in verschiedenen Membrandomänen. In Enterozyten und Epithelzellen der Lunge ist das Protein an der basolateralen Plasmamembran konzentriert, während es in renalen Epithelzellen an der apikalen und der basolateralen Plasmamembran und in den epithelialen Zellen des Uterus nur noch in der apikalen Membran zu finden ist. Im Gegensatz zu diesem plasmamembrankonzentrierten Proteinpool wurde eine endosomale Anreicherung von Annexin IV in J774 Makrophagen und BHK-Zellen vorgefunden (Gerke and Moss, 1997).

So wurde zusammenfassend in einigen Studien gezeigt, daß die Annexine I, II, IV und VI in fünf wichtige Schritte des Endozytoseweges impliziert sind: Die Formation von clathrin-coated pits, die periphere Lokalisation früher Endosomen, die Fusion früher Endosomen, die Formation der MVBs und wahrscheinlich das Recycling von Endosomen (Jäckle et al., 1997). Auf die Rolle von Annexin VI im Membranverkehr der Zelle soll jedoch im nächsten Abschnitt eingegangen werden.

### 1.2.3. Intrazelluläre Lokalisation und bisher bekannte Funktionen von Annexin VI

Die intrazelluläre Lokalisation von Annexin VI erscheint teilweise etwas kontrovers. Während es schon auf der Plasmamembran in einer Vielfalt von Zelltypen, einschließlich Lymphozyten und Hepatozyten, lokalisiert wurde, fand man ebenfalls eine Verteilung des Proteins zusammen mit Mitochondrien der Leberzellen, mit dem sarkoplasmatischen Retikulum im Skelettmuskel und mit Strukturen, die am ehesten dem Endoplasmatischen Retikulum

zuzuordnen wären, in Nicht-Muskelzellen. In der subzellulären Fraktionierung wurde Annexin VI auch in Phagosomen von J774 Makrophagen (Desjardins et al., 1994) und gebunden an endosomale Membranen (Jäckle et al., 1994) in Rattenleberzellen lokalisiert. Zusammenfassend lassen diese Daten vermuten, daß Annexin VI auf einer Vielfalt von Zielmembranen vorhanden ist, und daß diese Interaktionen durch Prozesse reguliert werden, die in jedem Zelltyp anders ausfallen.

Die Funktionen von Annexin VI sind in den verschiedenen Zelltypen ebenso weit auseinandergehend. In glatten Muskelzellen beispielsweise ist das Protein beteiligt an der Formation eines reversiblen Membran-Zytoskelett-Komplexes. Das Zytoplasma glatter Muskelzellen weist periodische Banden auf, die die effiziente Überleitung einer kontraktiven Aktivität gewährleisten. Dafür existieren sowohl feste aktin-verankerte Regionen in den Muskelzellen, während elastischere Caveolin-beihaltende „hinge“-Regionen hier die schnelle zelluläre Adaptation an verschiedene Zelllängen erleichtern (Babiyuchuk et al., 1999). Die Stimulation dieser Muskelzellen führt zu einer Relokalisation von Annexin VI aus dem Zytoplasma in das Plasmalemma. Durch die Kombination von Aktomyosin, Annexinen und caveolären Lipiden in der Gegenwart von Calcium erfolgt die Formation eines strukturellen Präzipitates. Die Beteiligung aller drei Komponenten ist dafür erforderlich, was auf eine calciumabhängige Bildung eines Zytoskelett-Membrankomplexes schließen läßt. Diese Tatsache läßt eine Funktion von Annexin VI in Bezug auf die Regulation der Sarkolemmorganisation während glatter Muskelzellkontraktion vermuten.

Dagegen wurde eine calcium-unabhängige Assoziation von Annexin VI mit zellulären Membranen, isoliert aus BHK-Zellen entdeckt. In diesem Fall konnte jedoch keine spezielle Anreicherung in bestimmten Zellkompartimenten bewiesen werden (Ohnishi et al., 1995). Diese Tatsache stellt einen Kontrast zu der Situation in Rattenleberzellen dar, wo Annexin VI in den Fraktionen der frühen Endosomen angereichert ist (Jäckle et al., 1994). Ein in Vitro-Assay, der den Verlust von Clathrin von immobilisierten Plasmamembranen maß, implizierte Annexin VI direkt in Vesikelabschnürungsprozesse (coated pit budding). Die Abschnürung war abhängig von Zytosol, Calcium und ATP, und erwies sich als gehemmt, wenn Zytosol ohne Annexin VI verwendet wurde (Lin et al., 1992). Die Vermutung, daß Annexin VI eine generelle Rolle in der Vesikelformation während der rezeptorvermittelten Endozytose spielt,

wurde relativiert durch die Tatsache, daß in A431 Zellen die rezeptorvermittelte Endozytose Annexin VI unabhängig ist (Smythe et al., 1994).

In einer Studie aus dem Jahr 1998 zeigten Kamal und Kollegen, daß Annexin VI, wenn es an den NH<sub>2</sub>-Terminus des 28 kD großen Proteins Spectrin gebunden ist, genauso aktiv bei der Vesikelabschnürung wirken kann wie Annexin VI im Zusammenhang mit Zytosol. Spectrin besteht aus zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Untereinheiten, die ein zytoskelettales Netzwerk mit Aktin oder anderen Proteinen bilden können, welche die innere Oberfläche vieler Säugetierzellen auskleiden. Die Bindung von Annexin VI an Spectrin verhindert eine Interaktion zwischen Spectrin und Aktin und verursacht zusätzlich über die Aktivierung einer Cysteinprotease „Calpain I“ einen Spectrinverlust an der Membran. Dieser Spectrinverlust an dieser Stelle ist notwendig für die Vesikelabschnürung.

So steht die AnnexinVI -abhängige Abschnürung der Coated Pits in direktem Zusammenhang mit dem Verlust von ca. 50% des Spectrins von der Membran. Dieses Ereignis kann blockiert werden durch den Serin-Protease-Inhibitor N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal (ALLN). Ebenfalls blockiert wird die Aufnahme von LDL nach der Inkubation von Fibroblasten mit diesem Hemmstoff. Sie erholen sich zwar innerhalb von ca. einer Stunde wieder und internalisieren LDL mit ihrer ursprünglichen Kinetik, aber dennoch erscheint der intrazelluläre Weg des internalisierten LDLs unter diesen Bedingungen verändert. Es gelangt nicht mehr zu den Lysosomen im Zellzentrum und wird nicht mehr degradiert. Die Zellen, die mit ALLN behandelt wurden, beinhalten jetzt zweimal so viel Coated Pits und auch doppelt so viel Membranclathrin, was darauf schließen läßt, daß sich stetig neue Coated Pits bilden. Annexin VI wird demnach also für die Entstehung dieser Vesikel nicht gefordert und die Neuentstehung dieser Coated Pits wird auch nicht gehemmt durch die Anwesenheit von ALLN. Auch die Mikroinjektion einer dominant-negativen Annexin VI-Mutante übte den gleichen Effekt wie ALLN auf die LDL-Internalisation aus. Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß Fibroblasten in der Lage sind, zwei verschiedene Typen von Coated Pits herzustellen. Nur für einen Typ benötigen sie die Annexin VI-abhängige Aktivierung einer Cysteinprotease, die das Clathringitter von dem Spectrinmembran-Zytoskelett während des letzten Abschnürungsschrittes trennt. Die anderen Vesikel jedoch formen sich zu Endosomen, die nicht dazu in der Lage sind, LDL zum Zellmittelpunkt zu transportieren und es auf diesem Weg abzubauen (Kamal et al., 1998).

In einer folgenden Studie wurde daraufhin untersucht, ob der Mechanismus der durch die Spektrin- AnnexinVI -Interaktion aktivierten Cysteinprotease, die das Spektrinzytoskelett abbaut, auch in den späten Endosomen wirksam ist, um die Moleküle aus dem prälysosomalen Kompartiment zu entlassen. Denn in der Elektronenmikroskopie hatte sich eine auffällige Kolokalisation von Annexin VI mit einem Markerprotein für Prälysosomen und Lysosomen (Igp 120) in der perinukleären Umgebung in der Zelle gezeigt. Die Ergebnisse dieser Gruppe konnten erneut darstellen, daß die Degradation von LDL besonders in den ALLN behandelten Zellen gehemmt wurde und daß insbesondere auch hier eine Anreicherung von Annexin VI/LDL-beinhaltender Endosomen stattfand. Zusätzlich wurden Zellen mit einem Annexin VI transfiziert, dem die letzten sechs calcium-bindenden Repeats in seiner DNA fehlten. Auch hier zeigte sich die Degradation von LDL stark gehemmt, was auf eine Involvierung von Annexin VI in die Vorgänge hinweist, die zu der LDL-Degradation hinleiten (Pons et al., 2001). Um die Rolle von Annexin VI auch in späteren Stadien des endozytotischen Weges näher zu untersuchen, wurde das Protein in CHO Zellen überexprimiert (Grewal et al., 2000). Obwohl diese Überexpression von Annexin VI allein nicht die Endozytoserate und die Degradation von LDL steigerte, erreichte man dies jedoch durch eine zusätzliche verstärkte LDL-Rezeptorexpression in diesen Zellen. Annexin VI hielt sich während dieser Vorgänge hauptsächlich in den Endosomen auf und blieb auch zu späteren Zeitpunkten der Endozytose mit den LDL-beinhaltenden Vesikeln assoziiert. Nachdem also das Annexinprotein an der Zelloberfläche für die Stimulation der Endozytose verantwortlich ist, bleibt es vermutlich gebunden an die endozytischen Vesikel, um hier den Eintritt der Liganden in das prälysosomale Kompartiment zu regulieren.

#### 1.2.4. Die calciumabhängige Phospholipidbindung von Annexin VI

Immer wieder wird die calciumabhängige Bindung von Annexin VI an negativ geladene Phospholipide endosomaler Membranen erwähnt. Im Gegensatz zu vielen anderen Mitgliedern seiner Familie enthält Annexin VI allein durch seinen physikalischen Aufbau zwei verschiedene Lipidbindungsdomänen. Diese Eigenschaft resultiert aus einer vermutlich genetischen Duplikation des zugrundeliegenden Core Proteins. Denn wie bereits beschrieben finden sich in dem strukturellen Aufbau der Annexine II und VI nicht nur vier Annexin-Repeats, sondern acht. Es existieren demnach die doppelte Menge der Endonexin Folds, die jeweils aus 17 Aminosäuren bestehen und für die calciumbindenden Seiten verantwortlich

sind. Mutationen in der Domäne des Endonexin Folds führten zum Verlust oder zur Beeinträchtigung der Eigenschaft der Calcium- und Phospholipidbindung.

In den calciumbindenden Seiten der Endonexin Folds wird das Calcium an eine Schleife zwischen den Helices A und B mit der Konsensus Sequenz G-X-G-T-{38}-(D/E) gebunden. Hier erlaubt die Wirkung von Glycinen eine relativ enge Schleifengeometrie. Der Koordinationsraum ist eine pentagonale Bipyramide mit einer Hauptketten-Carbonylgruppe und einem Wassermolekül in seinen Vertikalen. Diese Art von Calciumbindungsseiten werden Typ II genannt. Sie stellen vermutlich auch die Phospholipidbindungsseiten dar. Bei der Membranbindung kann das Wassermolekül oder das Sulphat-Ion des Koordinationsraumes durch einen phosphorylierten Sauerstoff des Phospholipides ausgetauscht werden. In allen Annexinen wurde auch ein zweiter Typ einer calciumbindenden Seite gefunden, der Typ III. Dieser zeigt aber eine geringere Calciumaffinität (Liemann and Huber, 1997). Wenn Annexin VI an eine Membran bindet, rotieren seine beiden Hälften, jeweils vier Annexin Repeats beinhaltend, um 90° relativ zu der anderen, um so eine planare Ebene mit der Membran zu erreichen.

Zwar ist der generelle Aufbau des Protein Cores für die unterschiedlichen Annexine sehr ähnlich, aber die Anzahl und die exakte Lokalisation der Calciumseiten variiert und führt somit vermutlich zu den unterschiedlichen Calciumsensitivitäten und Phospholipidspezifitäten innerhalb der Annexinfamilie.

Calcium abhängige annexin-vermittelte Aggregation von Membranvesikeln, z.B. der Verbindung zweier Membranoberflächen ist ein Beweis für die Membranfusionsaktivität, die prinzipiell von Annexinen gezeigt wird. Die Fusionsgeschwindigkeit in einfachen Systemen, aus Membranvesikeln, Annexin-Protein und Calcium bestehend, erwies sich allerdings als ziemlich langsam. Dies zeigt, daß die Annexine nicht per se fusionsvermittelnde Proteine darstellen. Interessanterweise erhöhten bestimmte Komponenten, die cis-ungesättigte Fettsäuren enthielten und die man diesen Systemen zufügte, die Fusionsgeschwindigkeit. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die annexinvermittelte Membranfusion eine physiologische Bedeutung für einen hohen Anteil ungesättigter Fettsäuren in der Zelle innehat.

Die Assoziation von Annexin VI mit endosomalen Membranen ist calciumabhängig, wie die komplette Ablösung des Proteins von den Membranen unter EGTA-Behandlung zeigte (Jäckle et al., 1994). Hierbei wurden endosomale Membranen mit 30 und 100 mM EGTA

über einen Zeitraum von 60 min bei 24°C behandelt. EGTA ist ein Calciumchelator, der das Calcium bindet und so nicht mehr für weitere Reaktionen zur Verfügung stehen läßt. Annexin VI wurde in diesem Experiment vollständig von den endosomalen Membranen getrennt in den Extrakten der löslichen Proteine vorgefunden. Diese Eigenschaft wurde in mehreren Studien immer wieder untersucht und bewiesen (z.B. Ortega et al., 1998).

### *1.3. Markerproteine endozytischer Zellkompartimente*

Zusätzlich zu den Rezeptoren und Liganden, die an der Endozytose beteiligt sind, gibt es bestimmte Moleküle, die die speziellen Charakteristika jedes endozytischen Kompartimentes ausmachen. Hier sind zum Beispiel Moleküle miteingeschlossen, die den internen pH regeln, die die Organellstruktur sowie die Verteilung und Translokation kontrollieren, und Moleküle, die verantwortlich sind für Vesikelanheftung, -fusion und -abschnürung. Aufgrund des extensiven Verkehrs zwischen den endozytischen Kompartimenten erscheint es unwahrscheinlich, daß eines dieser Proteine mit einem bestimmten Kompartiment ausschließlich assoziiert ist. Dennoch dienen einige Membranproteine als brauchbare Marker spezieller Portionen des endozytischen Systems. Um die bisher nicht geklärte Lokalisation von Proteinen zu bestimmen, können sie in verschiedenen Verfahren wie beispielsweise der Immunfluoreszenz genutzt werden, um bei einer Kolokalisation des zu bestimmenden Proteins mit dem Markerprotein direkt auf das Zellkompartiment zu schließen, in dem sie sich aufhalten.

#### *1.3.1. Rab 5 und Rab 4 in frühen Endosomen*

Als eine wichtige Gruppe in der Regulation des Membranverkehrs dienen hier die Rab-Proteine, die eine Familie kleiner GTPasen darstellen. Sie besitzen alle einen Isoprenyl-Anteil, nahe des Carboxy-Terminus der kovalent an einen Cysteinrest gebunden ist (Khosravi-Far et al., 1991 and 1992). Diese Prenylierung verankert die GTP-gebundene Form der Rab-Proteine in den Organellmembranen (Zerial and Stenmark, 1993). Die Bestimmung ihrer Lokalisation ist besonders sinnvoll, um bestimmte Populationen von Endosomen zu identifizieren, da besonders rab-Proteine präferentiell assoziiert mit bestimmten Organell-Typen vorliegen. Frühe Endosomen beinhalten rab 4, rab 5 (Gorvel et. al., 1991; Bucci et al.,

1992; Daro et al., 1996) und rab11. Rab7 und Rab 9 liegen vorrangig in späten Endosomen vor.

Die Rab-Proteine unterliegen einem komplexen Kreislauf von Ereignissen. Sie folgen dem ankommenden Vesikel von ihrem Spenderkompartiment zu ihrem Akzeptorkompartiment und bewegen sich daraufhin wieder von dort zurück zu ihren Anfangspunkt, um in einen neuen Kreislauf einzutreten (Simons and Zerial, 1993).

Rab 5 ist wie beschrieben in frühen Endosomen und auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert. Bei Untersuchungen, ob es in die Kontrolle eines Fusionsereignisses früher Endosomen involviert ist, wurde festgestellt, daß die Fusion dieser Kompartimente durch eine Rab 5-Mutante (rab5lle<sup>133</sup>) gehemmt wurde. Diese Mutante wies keine GTP-Bindungsfähigkeit auf. Das gleiche Ergebnis wurde durch Antikörperinkubation gegen Rab 5 erzielt, trat aber nicht bei dem Einsatz von Antikörpern gegen Rab 2 oder Rab 7 auf. Durch Zytosol, das den überexprimierten Wildtyp von Rab 5 enthielt, konnte dagegen die Fusion früher Endosomen stimuliert werden. Bei Austausch des Wildtyp-Proteins gegen eine Mutante, der die Aminosäuren des 9-Carboxy-Endes fehlten, welche für die GTP-Bindung verantwortlich sind, fand keine Stimulation mehr statt. All diese Ergebnisse zeigten eine Funktion von Rab 5 im Prozeß der Fusion früher Endosomen, die in engem Zusammenhang mit seiner GTP-Bindungsfähigkeit steht (Gorvel et al., 1991).

Rab 4 ist impliziert in den Transport von frühen Endosomen zur Zelloberfläche. Es ist nicht immer vollständig kolokalisiert mit Rab 5, wie in konfokaler Elektronenmikroskopie gesehen wurde. Seine Aufgabe besteht in der Regulation des „recycling“-Prozesses der frühen Endosomen und vor allem des Transferrin-Rezeptors. Rab 5 dagegen ist notwendig für die homotypische Fusion zwischen frühen Endosomen sowie für den generellen Transport zum Kompartiment der frühen Endosomen. Zusätzlich scheint es wichtig zu sein, für das Lösen der Vesikel der Plasmamembran und reguliert vermutlich auch den Transport über die frühen Endosomen hinaus (McCaffrey et al., 2001).

### 1.3.2. Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor in späten Endosomen und im Golgi Apparat

Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor wird häufig als ein Marker für endozytische Kompartimente genutzt. Dieser Rezeptor transportiert lysosomale Hydrolasen aus dem Golgiapparat zu den späten Endosomen. Er wird demnach hauptsächlich in diesen beiden

Zellkompartimenten vorgefunden. Späte Endosomen werden häufig als Organelle bezeichnet, denen Transferrin und andere rezyklierte Komponenten fehlen, aber die den Mannose-6-Phosphatrezeptor beinhalten. Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor tritt nie in die Lysosomen ein.

Zwei verschiedene Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren wurden bisher identifiziert und charakterisiert, der 215 kD große kationen-unabhängige Rezeptor und der 46 kD große kationenabhängige Rezeptor. Das 215 kD große Protein bindet auch IGF-II (insulin-like growth factor) (Kornfeld, 1992). Beide Rezeptoren binden Mannose-6-Phosphat mit einer ähnlichen Affinität. Da exogen zugefügtes Mannose-6-Phosphat nicht die lysosomalen Enzymlevels der Zellen beeinträchtigt, müssen die neu synthetisierten Enzyme direkt über eine intrazelluläre Route zu den Lysosomen geführt werden. Der 215 kD große Rezeptor funktioniert auf beiden Wegen. Er ist sowohl an der intrazellulären Sortierung der lysosomalen Enzyme als auch an der Aufnahme extrazellulärer lysosomaler Enzyme beteiligt. Der 46 kD große Rezeptor nimmt im Gegensatz dazu unter physiologischen Bedingungen nur an den intrazellulären Sortierungsprozessen der lysosomalen Enzyme teil.

### 1.3.3. Der LDL-Rezeptor und LRP in coated pits, frühen und rezyklierenden Endosomen

Der LDL-Rezeptor und das LRP sind für die hochaffine Bindung und Aufnahme von zirkulierenden Lipoproteinen in die Zellen verschiedener Gewebe verantwortlich. Sie liegen in den Coated Pits der Plasmamembran vor und vermitteln die Internalisierung von Molekülen auf dem Endozytoseweg in die frühen und rezyklierenden Endosomen. Alle Mitglieder der LDL-Rezeptor-Familie sind aus 5 verschiedenen Domänen aufgebaut. Das Aminoende besteht aus einer in den verschiedenen Mitgliedern variablen Wiederholung von 40 Aminosäuren. Jede dieser konservierten Sequenzen beinhaltet 6 Cysteine, die durch drei intramolekulare Disulfidbrückenbindungen miteinander verbunden sind. Zwischen diesen Cysteinresten lagern negativ geladene Aminosäurenreste mit der hoch-konservierten Ser-Asp-Glu (SDE)- Sequenz. Diese Struktur wird als „complement-type repeat“ bezeichnet, da sie homolog bei unterschiedlichen Komplementfaktoren auftritt. Diese gesamte Domäne ist für die Ligandenbindung verantwortlich (Russel et al.,1989). Die Mitglieder der LDL-Rezeptor-Familie werden den Typ-1 Membranproteinen zugeordnet, die durch ein extrazelluläres

Aminoende, ein zytoplasmatisches Carboxyende, sowie ein einzelnes Transmembransegment definiert sind. Die intrazelluläre, carboxyterminale Domäne beinhaltet eine Sequenz Asp-Pro-Val-Tyr (NPXY), die sich sowohl für die Bindung des Rezeptors an bestimmte Membranbereiche (Clathrin Coated Pits), als auch für das Recycling des Rezeptors verantwortlich zeigt (Chen et al., 1990).

Der LDL-Rezeptor wird als 120 kD Vorläuferprotein synthetisiert und innerhalb des Golgi-Apparates zum funktionsfähigen Rezeptor von 160 kD modifiziert. Während des Endozytosevorgangs wird das LDL-Molekül, gebunden an den Rezeptor, via Clathrin Coated Pit internalisiert. Nach dem Verlust der Clathrinhülle und der Verschmelzung mit sortierenden Endosomen induziert der erniedrigte pH-Wert Konformationsänderungen, die zur Dissoziation der Liganden von den Rezeptoren führen. Die Rezeptoren sammeln sich dabei in den tubulären Auswüchsen, von denen sich Rezeptor-gefüllte Vesikel abschnüren, die zur Zelloberfläche zurückkehren (Ghosh et al., 1994).

LRP, das „LDL-receptor related protein“, ist 600 kD groß und besteht aus einer 515 kD und einer 85 kD großen Untereinheit. Seine primäre Sequenz besteht aus 4525 Aminosäureresten, die sich in Domänen anordnen. Das 85 kD-Fragment enthält die zytoplasmatische Domäne und den membrandurchspannenden Bereich, der extrazellulär mit der 515 kD-Untereinheit nicht kovalent assoziiert ist. LRP enthält 31 Wiederholungen zur Bindung der Liganden, welche in 4 Abschnitten organisiert sind und 22 Wachstumsfaktor- Wiederholungen, die durch 8 Verbindungsregionen mit jeweils mehreren „YWTD“-Sequenzen getrennt werden. Das zytoplasmatische Ende ist mit 100 Aminosäuren doppelt so lang wie beim LDL-Rezeptor und enthält zwei der „NPXY“-Sequenzen, die den LDL-Rezeptor in die Clathrin Coated Pits dirigieren.

Die Expression von LRP findet primär in den Parenchymzellen der Leber (Herz et al., 1988), in den Neuronalzellen des Gehirns (Wolf et al., 1992) und in den Syncytiotrophoblasten der Plazenta statt. Auch bei der Monocyten-differenzierung wurde er beobachtet, was auf eine Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen schließen läßt (Watanabe et al., 1994, St Clair and Beisiegel, 1997). Dieser Plasmamembranrezeptor ist nicht allein aufgrund seiner Größe einzigartig, sondern vor allem wegen seiner multifunktionalen Eigenschaft der Ligandenerkennung. LRP vermittelt die Bindung und die Endozytose mehrerer strukturell und funktionell unterschiedlicher Liganden, einschließlich der Chylomikronen-Remnants, Apolipoprotein E-reicher  $\beta$ -VLDL, aktivierten  $\alpha_2$ -Mikroglobulins und vieler anderer

Moleküle. Ein 39 kD großes rezeptor-assoziiertes Protein (RAP) an seiner Seite zeigt eine modulierende Aktivität in Bezug auf die Ligandenbindung des Rezeptors. Diese rezeptorvermittelte Endozytose der Liganden in der Leber in vivo und in vitro zeigt die Funktion des LRP in der Reinigung des Plasmas von Proteinen und Lipoproteinen. Auf seine Stellung im Lipoproteinstoffwechsel soll später noch verstärkt eingegangen werden.

#### *1.4. Rezeptorvermittelte Endozytose und intrazellulärer Transport von Lipoproteinen*

In diesem letzten Abschnitt der Einleitung soll nun im Zusammenhang des Lipoproteinstoffwechsels auf die rezeptorvermittelte Endozytose und den intrazellulären Transport der Lipoproteine eingegangen werden. In den letzten Jahren ist die Bedeutung der Regulation des Lipoproteinstoffwechsels durch die Lipoprotein-Rezeptoren detailliert untersucht worden. Genetisch bedingte Defekte, aber auch die Lebens- und Ernährungsweise in der heutigen Zivilisation, können Dysregulationen des Lipoproteinstoffwechsels auslösen. Funktionsstörungen, die zur Akkumulation von Lipoproteinen führen, sind oft mit atherosklerotischen Veränderungen und koronaren Erkrankungen assoziiert, die in der westlichen Welt die häufigste Todesursache darstellen.

In diesem Abschnitt soll zunächst auf die strukturellen Unterschiede der einzelnen Lipoproteine eingegangen werden, um dann im nächsten Schritt ihre Aufgaben und intrazellulären Wege nachzuvollziehen. Lipoproteine sind große sphärische Partikel, die aus einer polaren Hülle von Phospholipiden, freiem Cholesterin und Apolipoproteinen bestehen, welche den hydrophoben Kern aus Triglyzeriden und Cholesterin einschließen. Die geladenen Phosphatgruppen der Phospholipide sowie die Hydroxylgruppen der Cholesterol-Moleküle sind in der Lage, mit den Wasserdipolen des Mediums zu interagieren, so daß Lipoproteine Mizellen bilden. Die Fettsäuren der Phospholipide sowie die Sterolringe des Cholesterins stehen in direktem Kontakt mit sich selbst und dem hydrophoben Zentrum des Partikels (Miller and Small, 1987). Die Lipoproteine können in 5 verschiedene Klassen eingeteilt werden, die sich in der Dichte, in der Größe, der elektrischen Ladung sowie in der Zusammenstellung der Lipide und Apolipoproteine unterscheiden.

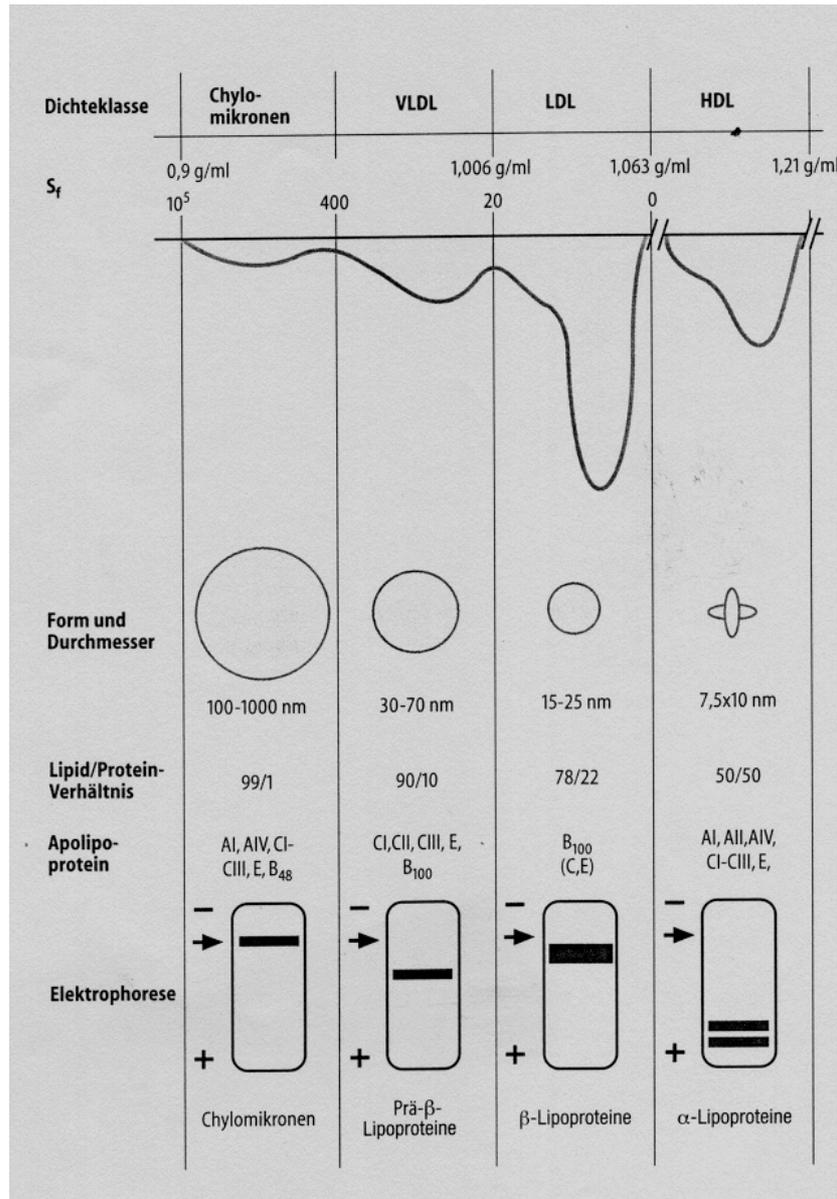


Abbildung 3: Eigenschaften und Aufbau der Lipoproteine (aus „Biochemie und Pathobiochemie“ von Löffler und Petrides, 1998, S. 470)

### 1.4.1. Der exogene Lipidtransport

Der Weg der Lipoproteine wird unterteilt in den exogenen und den endogenen Lipidtransport. Der exogene Lipidtransport beschreibt den Weg der Lipide direkt nach der Nahrungsaufnahme bis zu der Aufnahme der Chylomikronen-Remnants in die Leber. Die Verdauung der Nahrungslipide beginnt bereits im Mund mit der Hydrolyse der langkettigen Fettsäuren aus den Triglyzeriden durch die pharyngeale Lipase (Hamosh et al., 1975). Im Magen folgt daraufhin die Abspaltung kurz- und mittelkettiger Fettsäuren durch die

Magenlipase. Im nächsten Schritt der Verdauung assoziieren die Lipide im Dünndarm mit den Gallensäuren und bilden somit Emulsionen kleinerer Partikel, an deren Oberfläche die Pankreaslipase nun hydrolytisch aktiv wird (Dolphin, 1992). Nach der daraufhin folgenden Dissoziation der Gallensäuren, die über den enterohepatischen Kreislauf wieder in die Leber zurücktransportiert werden, werden die nun freigewordenen freien Fettsäuren und 2-Monoglyzeride von den Enterozyten des Jejunums aufgenommen. Vermutlich läuft dieser Prozeß energieunabhängig über einen Diffusionsgradienten ab, angetrieben durch die schnelle Reveresterung in den Enterozyten (Tso and Balint, 1986). Tierische Fette enthalten zusätzlich Cholesterin-Ester, die durch die Cholesterin-Esterase in nicht veresterte Cholesterine umgewandelt werden. Diese werden über membranständige Proteine in die Zellen transportiert (Thurnhofer et al., 1991). In den Enterozyten findet nun mit Hilfe der internalisierten Lipide die Synthese der Chylomikronen statt. Durch ein spezielles Enzym, die Cytosindeaminidase, wird ein Stopcodon in das primäre Transkript des in der Leber synthetisierten ApoB<sub>100</sub> eingeführt. Daraufhin werden nur 48% des Proteins vom aminoterminalen Ende an synthetisiert, wobei das Protein ApoB<sub>48</sub> entsteht, das ausschließlich auf den Chylomikronen zu finden ist. Während seiner Synthese an den Ribosomen findet eine partielle Lipidierung im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums statt. Dieser Komplex fusioniert, durch einen Enzymkomplex aus dem mikrosomalen Triglyzerid-Transportprotein und der Proteindisulfid-Isomerase katalysiert, mit triglyzeridreichen Lipidtropfen (Wetterau et al., 1992). Nach der Assoziation mit den Proteinen ApoA-I, ApoA-II und ApoA-IV und Phospholipiden in den Golgi Zysternen der Enterozyten werden die fertigen Chylomikronen zunächst in den interstitiellen Raum exozytiert, von wo aus sie dann über die Lymphgefäße in den Ductus thoracicus in die Blutbahn gelangen (Kane, 1996).

#### **1.4.1.1. LRP vermittelte Aufnahme von Chylomikronen**

Sind die Chylomikronen in den Blutkreislauf eingetreten, werden ihre Triglyceride intravaskulär hydrolytisch von der an den Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) der Endothelzellen gebundenen Lipoprotein-Lipase (LpL) abgespalten (Eisenberg et al., 1992). Die entstehenden freien Fettsäuren werden sowohl in den Adipozyten des Fettgewebes gespeichert als auch direkt im Sinn der Energiegewinnung der  $\beta$ -Oxidation in Herz- und Muskelzellen überlassen. Vorübergehend werden freie Fettsäuren auch von Albumin gebunden, dissoziieren aber direkt bei Kontakt mit Zellmembranen wieder, um über

Fettsäure-bindende Proteine in diese Zellen internalisiert zu werden. Neben der Transformation der Chylomikronen durch die Modifikation der Lipoproteinlipase zu den sogenannten Chylomikronen-Remnants ändert sich auch die Zusammensetzung ihrer Apolipoproteine. Schon während des Eintritts in die Blutbahn assoziieren die C-Apolipoproteine und ApoE aus den HDL im Blut mit den Chylomikronen und modulieren deren Eigenschaften (Mahley and Hussain, 1991). Die Assoziation der Chylomikronen-Remnants mit ApoE erhöht dabei wesentlich die Affinität zu den Lipoprotein-Rezeptoren der Leber (Kowal et al., 1989, Beisiegel, 1992). Des weiteren wird angenommen, daß bei der hydrolytischen Abspaltung der Fettsäuren, katalysiert durch das Phospholipid-Transferprotein besonders ApoA-I und Phospholipide als Vorstufe zur intravaskulären HDL-Bildung freigesetzt werden. Die Konzentrationserhöhung der freien Fettsäuren führt zur Ablösung der LpL von den Proteoglykanen der Endothelzellen. Die LpL bleibt an die Chylomikronen-Remnants gebunden, so daß diese Partikel nach vorheriger Bindung an die HSPG der Hepatozyten über das LDL-Rezeptor-Related Protein (LRP) in die Leber aufgenommen werden können (Beisiegel et al., 1991). Diese selektive Aufnahme der Chylomikronen-Remnants wird primär durch die hochaffine Bindung des ApoE an das endozytotisch wirksame LRP erreicht (Beisiegel, 1995). Die Aufnahme ist in diesem Fall unabhängig von ApoB<sub>48</sub>, da die Rezeptorbindungsdomäne im carboxyterminalen Ende des ApoB<sub>100</sub> liegt. Chylomikronen-Remnants werden innerhalb kurzer Zeit in die Hepatozyten endozytiert, wo die auf den Partikeln verbliebenen exogen zugeführten Triglyzeride sowie die Cholesterin-Ester und Oberflächen-Lipide in den intrazellulären Pools zwischengespeichert werden.

#### **1.4.1.2. LDL-Rezeptor vermittelte Aufnahme von LDL im endogenen Lipidstoffwechsel**

Damit den peripheren Geweben Energie in Form von Triglyzeriden und Cholesterin zur Verfügung steht, sekretiert die Leber VLDL. Mit diesem Schritt beginnt der endogene Lipidstoffwechsel. Der Aufbau der VLDL ähnelt dem der Chylomikronen. Allerdings enthalten die VLDL das Protein ApoB<sub>100</sub> als ApoB-Komponente. Auch diese Lipoproteine werden durch die selbe LpL hydrolysiert, die auch für die Lipolyse der Chylomikronen verantwortlich ist. Dabei verwandeln sich die großen VLDL 1-Partikel zunächst in die kleineren VLDL 2-Partikel und werden dann zu IDL. Für die weitere Metabolisierung der IDL zu den LDL ist vermutlich hauptsächlich die HL verantwortlich. Während der hydrolytischen Veränderung zu LDL werden alle Apolipoproteine mit Ausnahme des

ApoB<sub>100</sub> abgegeben. Zusätzlich werden die LDL mit Cholesterin-Estern durch intravaskulären Transfer der Lipide, vornehmlich aus der HDL-Population, angereichert. Dieser Vorgang wird enzymatisch durch das Cholesterin-Ester-Transfer-Protein (CETP) katalysiert (Kunitake et al., 1992). Jeweils ca. 50% der LDL werden über den LDL-R sowohl in die Leber als auch in nicht-hepatische Gewebe über die Bindung des ApoB<sub>100</sub> vermittelt aufgenommen (Brown and Goldstein, 1997). Der tägliche Bedarf eines Menschen an Cholesterin wird allein durch zelluläre Eigensynthese als auch durch die regulierte Rezeptor-vermittelte Endozytose der LDL-Partikel gewährleistet. Diese Vorgänge müssen durch Sterol-regulierte Bindungsproteine streng kontrolliert werden, damit keine intrazellulär zu hohen Cholesterinkonzentrationen entstehen. Der LDL-Rezeptor vermittelt Bindung, Aufnahme und Abbau von LDL und nimmt daher eine besondere Stellung in der Cholesterinhomöostase der Zelle ein (Brown and Goldstein, 1986). Nach dem Transport zur Zelloberfläche konzentrieren sich die LDL-Rezeptoren in den Clathrin Coated Pits. Das Aminoternale Ende beinhaltet 7 direkte Wiederholungen der Cystein-reichen 40 Aminosäuren, die die Bindung von ApoB<sub>100</sub> und ApoE vermitteln. Die Wiederholungen 3-7 sind hierbei für die Bindung des ApoB<sub>100</sub> der LDL an den Rezeptor verantwortlich (Russell et al., 1989). ApoB<sub>100</sub> und ApoE weisen auf Grund unterschiedlicher Größe und Struktur auch ein differenziertes Bindungsverhalten an den Rezeptor auf. ApoE-Moleküle beispielsweise zeigen im Vergleich zu ApoB<sub>100</sub> eine stärkere Affinität insbesondere zur Wiederholung 5 der Ligandenbindungs-Domäne. Bei beiden Apolipoproteinen jedoch wird die Bindung an den LDL-Rezeptor über ein Cluster von positiv geladenen Aminosäuren realisiert, die komplementär zu einem entsprechenden Abschnitt des Rezeptors mit negativ geladenen Aminosäuren sind. Nach der Internalisierung des LDL-Moleküls gebunden an seinen Rezeptor in die Zelle wird durch die pH-Änderung die Dissoziation von Rezeptor und LDL-Partikel erzielt. Der Rezeptor gelangt zurück an die Zelloberfläche. Das LDL-Molekül jedoch verbleibt im Lumen der sortierenden Endosomen. Entsprechend dem weitgehend akzeptierten „Reifungsmodell“ entwickeln sich deren Lumina nach weiterer Ansäuerung zu den prälysosomalen, späten Endosomen (Dunn and Maxfield, 1992). Die Liganden verbleiben im Korpus und werden nach der Fusion mit den Lysosomen degradiert.

#### **1.4.1.3. Cholesterolefflux**

Nach der Beschreibung der Internalisierung des Cholesterins in die Zellen soll nun der Weg erklärt werden, auf dem das überschüssige Cholesterol die Zelle wieder verläßt. Der

Cholesterin-Inhalt der Zellen unterliegt stets einer exakten Kontrolle. Ein essentielles Element dieser Kontroll-Maschinerie stellt ein Cholesterin-Sensor in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums dar (Brown and Goldstein, 1997). Scheinbar reflektiert der Cholesterin-Inhalt des ER exakt den Cholesterin-Status der Zelle. Dies ist bemerkenswert, da der größte Cholesterin-Anteil in der Plasmamembran vorhanden ist und nur geringe Levels im ER existieren (Lange et al., 1999). Außerdem treten nicht alle Änderungen der zellulären Cholesterinmenge auch im ER auf. Neben der Cholesterinsynthese im ER und in den Peroxisomen wird Cholesterin von Lipoprotein-Cholesterinestern in späte Endosomen und Lysosomen und in Lipidtröpfchen („lipid droplets“) entlassen. Um die zelluläre Cholesterin-Homöostase aufrechtzuerhalten, können die Zellen im „reversen Transport“ Cholesterin an extrazelluläre Akzeptoren abgeben, die letztendlich den Transport von peripherem Cholesterin zur Leber gewährleisten. Dabei wird das intrazelluläre freie Cholesterin assoziiert mit den HDL. Die führende Theorie, auf welche Art und Weise HDL die Arterien vor cholesterinbedingten Kalkplaques schützt, besagt, daß es den Überschuß an Cholesterin aus dem Blut und dem Gewebe, einschließlich der cholesterinbeladenen Zellen der atherosklerotischen Plaques, über den Blutweg in die Leber und in andere Gewebe transportiert. Diese übernehmen das gelieferte Cholesterin und gebrauchen es, um daraus Substanzen wie Steroidhormone und Gallensäuren zu synthetisieren. Die HDL-Moleküle bestehen ausschließlich aus nicht veresterten Cholesterinmolekülen, ApoA-I und Phospholipiden. Das auf den HDL vorhandene ApoA-I wird als Kofaktor für die Reaktion mit der LCAT (Lecithin-Cholesterin-Acetyltransferase) benötigt, bei der das freie Cholesterin aus den Zellen an die HDL gebunden wird. Die dadurch neu synthetisierten Cholesterin-Ester können durch das CETP (Cholesterin-Ester-Transfer-Protein) auf andere Lipoproteine übertragen werden, so daß ein Netto-Fluß aus Cholesterin-Estern zur Leber resultiert. Aber auch der direkte Transport der cholesterinangereicherten HDL zur Leber ist möglich.

Inzwischen ist bekannt, daß mindestens zwei verschiedene Wege für die peripheren Zellen existieren, ihr überschüssiges Cholesterin auszuschleusen. Der erste stellt einen passiven wäßrigen Diffusionsweg dar. Cholesterin wird aus dem Plasmamembranpool an extrazelluläre Phospholipide abgegeben, die Akzeptor-Partikel wie HDL beinhalten. Dieser Vorgang geschieht über einen einfachen Konzentrationsgradienten zwischen Membran und Akzeptor (Johnson et al., 1986, Karlin et al., 1987). Der zweite Weg involviert den Transport von Cholesterin zu extrazellulären lipidfreien Apolipoprotein-Akzeptoren wie ApoA-I und

Apolipoprotein E. Beide Möglichkeiten der Ausschleusung funktionieren über unterschiedliche Rezeptoren.

#### *1.4.1.3.1. Scavenger-Rezeptor SRBI und ABCA1*

Der SR-BI (Scavenger-receptor BI) und der ABC-1 (ATP binding cassette transporter) sind beide an Ausschleusungsprozessen des überschüssigen Cholesterins aus der Zelle beteiligt.

In sogenannten knockout-Mäusen, denen das Gen für das Protein SR-BI, fehlt, konnte ein mehr als doppelt so hoher Plasmacholesterinspiegel vorgefunden werden als in gesunden Mäusen. In SR-BI transfizierten CHO Zellen dagegen konnte eine Simulation des Cholesterolefflux durch den Scavenger Rezeptor B TypI gezeigt werden. Die Effluxrate korrelierte dabei mit der Ausprägung der SR-BI Levels in den verschiedenen Zelllinien (Ji et al., 1997). Weitere Experimente ließen vermuten, daß die Fähigkeit von SR-BI in der Stimulation des Cholesterol-Effluxes unabhängig ist von der Bindung eines Liganden an einen Rezeptor. Sie wirkt sich wahrscheinlich in einer Reorganisation von Membrancholesterol-Domänen aus, die die wäßrige Diffusion von Cholesterin zu HDL erleichtern.

Auch ABC1 wurde als ein wichtiger Vermittler im Cholesterol-efflux der Zellen zu den Apolipoproteinen und den HDL hin identifiziert. Smith et al. konnten feststellen, daß die Behandlung von Maus-Makrophagen (RAW) mit 8-bromo-cAMP (cAMP) den Efflux zu ApoA-I und ApoE hin stimulierte (Smith et al., 1996). Die polaren Lipide, wie unverestertes Cholesterin und Phospholipide, werden zu den lipidarmen apo-AI Partikeln transferiert, aus denen dann HDL generieren. Diese nehmen weitere polare Lipide aus dem Metabolismus der apoB-beinhaltenden Lipoproteine auf. Das freie Cholesterin in den HDL wird im Plasma verestert und eventuell an apoB-beinhaltende Lipoproteine und an andere Zellen (via SR-BI) abgegeben, was erneut lipidarme ApoAI-Partikel entstehen läßt. Ob diese „Aktivierung“ lipidarmer Apo-AI-Partikel eine direkte Interaktion zwischen ABC1 und Apo-AI erfordert ist noch unklar (Young et Fielding, 1999).

Das ABC1 Protein besitzt 12 membranspannende Domänen. Seine genaue Lokalisation in der Zelle ist noch nicht geklärt. Man vermutet sie aber wie die seiner Familienmitglieder in der Plasmamembran. Dennoch könnte es ebenfalls in intrazellulären Membranen vorliegen und von dort aus eine indirekte Rolle im Cholesterol-Efflux einnehmen. Um dieser Annahme nachzugehen, untersuchten Mendez et al., ob der ABCA1 vermittelte Lipidefflux die selektive

Entfernung von Lipiden assoziiert mit Membran-Rafts mit sich zieht. Membran-Rafts stellen besondere Plasmamembran-Domänen dar, die verstärkt Cholesterin und Sphingomyelin enthalten. Ihre Ergebnisse jedoch zeigten, daß diese Rafts zwar in den Cholesterol-Efflux zu den HDL involviert sind, aber nicht in den ABC1-vermittelten Transport zu den lipidfreien ApoAI-Molekülen (Mendez et al., 2000). In einer Studie von Chen et al., 2000, konnte zusätzlich eine Interaktion zwischen beiden rezeptor-regulierten Cholesterol-Efflux-Möglichkeiten (SR-BI und ABCA1) festgestellt werden. In verschiedenen Experimenten wurde ersichtlich, daß SR-BI und ABCA1 voneinander getrennte und miteinander konkurrierende Rollen in der Vermittlung des Cholesterol-Efflux zwischen HDL und Makrophagen einnehmen. In nicht-polarisierten Zellen vermittelt SR-BI die Wiederaufnahme von Cholesterol, das aktiv durch ABCA1 ausgeschleust wurde (Chen et al., 2000).

#### *1.4.1.3.2. Die Rolle von Caveolin und Membran-Rafts im Cholesterolefflux*

Der Cholesterol-Efflux der Zellen beträgt normalerweise 0,1% des totalen Cholesterolinhaltes der Zelle pro Minute. Diese Menge wird aufrecht erhalten durch die de novo Synthese, die Aufnahme von Cholesterol über den LDL-Rezeptor und durch andere Moleküle wie beispielsweise den SR-B1. Die größte Menge des Cholesterins in der Plasmamembran ist in der leaflet-Doppelschicht vorhanden, die dem Zytoplasma der Zelle anliegt. Überschüssiges Cholesterin akkumuliert nicht in den Membranen, sondern wird verestert und gespeichert in zytosolischen Lipidtröpfchen.

Die Grundregel der intrazellulären Verteilung von Cholesterin in der Zelle wird durch die hohe Affinität von Cholesterin zu Sphingolipiden und gesättigten Phospholipiden bestimmt, die hoch konzentriert in Plasmamembranen, trans-Golgi-network und endozytischen Membranen vorliegen.

Das ER besitzt ungesättigte Glycerophospholipide, die eine relativ geringe Affinität zu Cholesterol aufweisen. Sphingomyelin und die komplexen Glycosphingolipide werden an der luminalen Oberfläche des Golgi Komplexes synthetisiert und können nicht spontan durch die Golgi Membran oder die Plasmamembran hindurch translozieren. Deshalb sind Sphingolipide an die exo- und endozytischen vesikulären Transportzirkel gebunden und sind nicht in Mitochondrien, Peroxisomen und auch nicht in Lipidtröpfchen vorhanden (Zinser and Daum, 1995). Der Konzentrationsgradient von Sphingolipiden, und dadurch auch von Cholesterin, durch den Golgi Komplex hindurch scheint steil zu sein, da immer mehr Enzyme der

Sphingolipidsynthese sich im trans-Golgi Network aufhalten. Dieser Gradient wird durch den Transport der Sphingolipide zur Plasmamembran aufrecht erhalten. Die Sphingolipide aggregieren ihren strukturellen Eigenschaften nach in der Golgi-Membran. Diese lateralen Domänen, genannt „Rafts“ werden präferentiell nach zwei Prinzipien von dem retrograden Weg ausgeschlossen. Erstens nach einem physikalischen Prinzip, da Sphingolipidmembranen eine niedrigere Bindungskapazität besitzen, und zweitens durch die Trennung der membranspannenden Proteine, die in der Veskulation funktionieren. Diese Sphingolipid-cholesterol-Mikrodomänen auf der Membran wurden bisher impliziert in Prozesse wie Membranverkehr, Signaltransduktion und Zelladhäsion (Simons and Ikonen, 1997). Das fundamentale Prinzip, nach dem diese Rafts ihre Funktionen entfalten, ist eine Trennung oder Konzentration bestimmter Membranproteine und Lipide in Membranmikrodomänen. Diese Domänen fungieren gewissermaßen als Gleise im TGN für die apikalen Membransortierungsprozesse und als Foci für die Rekrutierung und Konzentration der Signalmoleküle in der Plasmamembran.

Der Cholesterin-Transport vom ER zur Zelloberfläche findet relativ schnell statt. Er besitzt eine Halbwertszeit von 10-20 min und ist ein energie- und temperaturabhängiger Prozeß der den Golgi-Apparat mit einbezieht und kein intaktes Zytoskelett erfordert. Heino et al. untersuchten 2000 die Rolle des Golgi Komplexes und der Lipid-Rafts im Transport des Cholesterins zur Zelloberfläche und erkannten, daß zunächst intrazellulär eine Assoziation des neu synthetisierten Cholesterins mit den Rafts stattfindet. Eventuell wird diese Raft-Assoziation bereits im ER initialisiert. Obwohl in Säugetierzellen die Inkorporation der unterschiedlichen Proteine in die Rafts auf dem Level des Golgi Komplexes koordiniert wird, wo Cholesterin und Glycosphingolipide zusammentreffen, findet der initiale Aufbau der Rafts wahrscheinlich schon im ER statt. Eine große Anhäufung in der Proportion des Raft-assoziierten Cholesterols zeigte sich ähnlich in seinem Auftreten auf der Zelloberfläche. Dies ließ vermuten, daß die Verteilung des Cholesterins in Rafts ausgeprägter stabilisiert wird durch die Assoziation des Cholesterins mit den Glycosphingolipiden auf der Plasmamembran.

Viele Studien lassen eine Funktion des Cholesterin-Transportes für Caveolae und ihr charakteristisches Protein Caveolin vermuten. Caveolae sind morphologisch charakterisiert als muldenförmige Invaginationen der Plasmamembran und besitzen Funktionen in der Endo- und Transzytose. Im Gegensatz zu den Clathrin Coated Pits, in denen das Clathrin-Gitter via

Adaptor-Proteine an die zytosolischen Schwänze der membranspannenden Proteine gebunden ist, wird die zytosolische Seite der Caveolae von einem Protein-Oligomer bedeckt, daß direkt mit der Lipidschicht der Membran verbunden ist. Das Protein, Caveolin, besitzt eine Größe von 21-24 kD und beinhaltet eine hydrophile NH<sub>2</sub>- und eine COOH-terminale Domäne, die in das Zytosol hineinragen. Die zentrale Domäne von 33 hydrophoben Aminosäuren dagegen ist in einer Haarnadel-Konfiguration in der Lipidphase der Membran verankert. Die Familie besteht aus den Caveolin-Typen 1 und 3, die eine 85% ige Ähnlichkeit aufweisen, und aus Caveolin Typ 2, dem das NH<sub>2</sub>-Ende der Caveoline 1 und 3 fehlt und das als  $\alpha$ - und als  $\beta$ -Isoform vorliegen kann. Caveolin-1 ist in zahlreichen Zelltypen vorhanden. Caveolin-3 ersetzt Caveolin-1 in Muskelzellen. Der Hauptteil dieser Proteine ist in den Caveolae auf der Zelloberfläche und auf den Golgi-Membranen lokalisiert. Caveolin-2 wird meistens mit Caveolin-1 koexprimiert und ist in der Lage, mit ihm Heterooligomere zu bilden. Die Struktur der Caveolae hängt vom Cholesterin ab. Caveoline wurden als Cholesterin-bindende Proteine entdeckt, die in Detergenzien-resistenten Membran-Remnants vorliegen, die generell als Abkömmlinge sphingolipid-cholesterol-haltiger Rafts interpretiert werden. Typische Raft-Marker wie Glycosylphosphatidylinositol Proteine und Glycosphingolipide wurden unter speziellen Bedingungen in Caveolae entdeckt. Dies und andere indirekte Beweise lassen vermuten, daß Caveolae spezielle Sphingolipid-Cholesterin-Rafts sind. In der Golgi-Membran besitzt Caveolin-1 eine Rolle in Lipid- und Proteinsortierungsprozessen zur apikalen Plasmamembran hin. Zusätzlich hat die interessante Entdeckung zytosolischer Signalmoleküle in den Caveolae zu einer Vermutung geführt, nach der Caveolae Zelloberflächen-Domänen darstellen, in denen die Signale teilweise durch den physikalischen Zustand der Lipide reguliert werden. Viele der Signal-Moleküle an der zytosolischen Oberfläche der Plasmamembran tragen gesättigte C14 und C16 Acyl-Ketten, während prenylierte Proteine ausgeschlossen sind. Dies läßt die Existenz von bestimmten Lipid-Domänen in der in der zytosolischen Oberfläche vermuten. Eine der ungeklärten Fragen, die die Struktur der Caveolae betrifft, beschäftigt sich damit, wie Caveolin, das sich auf der zytoplasmatischen Oberfläche befindet, die Sphingolipid-Cholesterin-Rafts auf der exoplasmatischen Oberfläche erkennt. Vielleicht erkennt es eine cholesterolreiche zytosolische Lipid-Domäne oder interagiert direkt mit dem hydrophoben Teil der Sphingolipide oder des Cholesterins in der gegenüberliegenden Monolayer. Caveolin bindet je ein Molekül Cholesterin und seine Membranbindung ist cholesterolabhängig (Murata et al., 1995). Außerdem wurde Caveolin in

löslichen Komplexen mit Cholesterin und „Chaperones“ im Zytosol gefunden, was auf eine Rolle von Caveolin im intrazellulären Cholesteroltransport schließen läßt. Der Ursprung dieser Komplexe ist unklar. Obwohl neu synthetisiertes Caveolin mit diesen „Chaperones“ kotranslational komplexieren könnte und dann gelöstes Cholesterin aufnehmen könnte, scheint dies unwahrscheinlich, da die Anwesenheit von Caveolin in diesen Komplexen die Alkylierung erfordert, die erst als späteres membranassoziiertes Ereignis stattfindet. Wie also diese Caveolin-Komplexe Cholesterin speziell von dem ER erhalten und auf welchem Weg sie es zu den Caveolae transportieren, in denen es noch über eine Stunde bis zur Ausschleusung festgehalten wird, bleibt unklar.

### *1.5. Ziele der Arbeit*

In dieser Arbeit sollte zunächst die Veränderung der intrazellulären Lokalisation von Annexin VI unter unterschiedlichen Bedingungen betrachtet werden. Nach dem Verfahren von Gorvel et al., 1991, sollte dazu ein Sucrosegradientenverfahren zur Auftrennung einzelner Membranfraktionen der CHOanx6 Zellen angewendet werden. In diesem Gradienten konnte dann nach Auftragen der Proteine auf ein SDS-Page mittels Westernblotting-Verfahren das Annexin-Protein detektiert werden und seine Lokalisation innerhalb der Zelle deutlich gemacht werden. Nach der Untersuchung seiner Lokalisation im unbehandelten Gradienten sollte dann eine Änderung der Lokalisation unter Induktion des Endozytoseweges durch die Inkubation mit LDL (0', 120' LDL-Inkubation) untersucht werden. Um genaueren Aufschluß darüber zu erreichen, welche Fraktionen welchen Zellkompartimenten der Zelle entsprechen, wurden im nächsten Arbeitsschritt bestimmte charakteristische Markerproteine in diesem Gradienten detektiert und deren Lokalisation mit der von Annexin VI unter den verschiedenen Ausgangsbedingungen verglichen. Zur weiteren Untersuchung und Abklärung der einzelnen Fraktionen des Gradienten soll ein Enzymassay für den Nachweis lysosomaler Enzymaktivität etabliert und auf diesen Gradienten angewendet werden. Dafür soll die  $\beta$ -Hexosaminidaseaktivität in jeder Fraktion gemessen und die unterschiedlichen Werte gegeneinander aufgetragen werden.

Um die charakteristische calciumabhängige Membranbindung von Annexin VI auch in diesem Verfahren deutlich zu machen, sollte der Gradient mit EGTA behandelt werden und die auftretenden Veränderungen erklärt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Annexin VI-überexprimierende Zellreihe mit der ursprünglichen CHO-Wildtyp-Reihe verglichen werden. Dabei wurde von elektronenmikroskopischen Aufnahmen ausgegangen, die einen Unterschied der Zellen in Bezug auf die Lokalisation ihres Caveolins darstellten. Mittels des bereits zuvor angewendeten Verfahrens sollten daraufhin auch die Lokalisationen der Proteine Caveolin und des LRP in beiden Zellreihen nachgewiesen und miteinander verglichen werden.

Im abschließenden Teil der Arbeit sollte dann in radioaktiven Experimenten eventuelle Unterschiede in dem Cholesteroleffluxverhalten beider Zellreihen untersucht und Erklärungsansätze geliefert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

Agarosegelelektrophoresekammer	Bio-rad
Bioclav	Schütt
Inkubator mit Schüttelvorrichtung B6420	Heraeus Instruments
Trans-Blot Zelle	Bio-rad
UV-Detektor mit Digitalkamera	Intas
End-über-End-Schüttler Reax 2	Heidolph
Gelelektrophoresekammer für Minigele	Biometra
Gelelektrophoresekammer P10 DS	Peqlab
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf
Kühlzentrifuge Universal 16 R	Hettich
Magnetrührer mit Heizung Ikamag RH	Janke & Kunkel
Mikroskop Axiovert 100 mit Ph3 Plan-Apochromat 63er Objektiv	Zeiss
pH Meter $\Phi$ 50	Beckmann
Photometer Lambda 20	Perkin Elmer
Pipettierhilfe Accujet	Brand
Powersupply Frigostat	Desaga
Präzisionspipetten	Eppendorf
Schüttler Certomat TC-2	B-Braun Biotech
Ultrazentrifuge TL-100	Beckmann
Vortexer Ika-Vibor-Fix VF2	Janke & Kunkel
Zellinkubator IR1500	Flow Laboratories
Zellkultur-Werkbank	Baker
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus Instruments
Zentrifuge J2HC	Beckmann
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf

---

Zentrifuge Varifuge RF	Heraeus Christ
Zentrifuge Universal 16 R	Hettich

### 2.1.2. Verbrauchsmittel

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

### 2.1.3. Chemikalien

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

Acrylamid(30%)-Bisacrylamid(0,8%)	Boehringer Mannheim
Agarose	Bio-Rad
AgNO <sub>3</sub> (Silbernitrat)	Merck
Albumin Standard (2mg/ml)	Pierce
Ammonium Persulfat (AP)	Bio-Rad
Benzamide	Sigma
Bovines Serum Albumin	Sigma
Borsäure	Merck
CaCl <sub>2</sub> (Calciumchlorid)	Merck
Chloroform	Merck
CuSO <sub>4</sub> (Kupfersulfat)	Merck
Dithioerythritol (DTT)	Sigma
Essigsäure (CH <sub>3</sub> COOH)	Merck
Ethanol (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> 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	Sigma
Glutathion Sepharose 4B	Pharmacia Biotech
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
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck
2-Mercaptoethanol	Serva
Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )	Merck
NaCl (Natriumchlorid)	J.T. Baker
Natriumcitrat	Merck
$\text{Na}_2\text{CO}_3$ (Natriumcarbonat)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat)	Merck
$\text{NaN}_3$	Merck
NaOH (Natronlauge)	Merck
Non-Fat Dry Milk (Milchpulver)	Bio-Rad
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad
'1,2-bis(2-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid tetrakis(Acetylmethylester)(BABTA-AM)	Sigma
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/ ΦX-174 DNA-HincII [500 µg/ml]	Pharmacia Biotech
---	-------------------

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

#### 2.1.4. Zellkultur und Bakterien

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

Zellkulturmaterial:

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
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 <sup>2</sup> + 162 cm <sup>2</sup> )	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 $\beta$ -D-Thiogalactosidase (IPTG)	Pharmacia Biotech
Trypton	Difco

## 2.1.5. Antikörper

Primäre Antikörper in Western Blots:

<b>Bezeichnung/ Firma</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Antigen</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Verdünnung</b>
AB3718	Schaf	Synthetisches Peptid des Annexin VI N-Terminus: MAKIAQGAMYR aus Rattus norvegicus (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	Dynamamin	Monoklonal	1:1000
#711/ Dr. J. Herz (Dallas)	Kaninchen	LDL-Rezeptor	Polyklonal	1:500
C13630/ Becton Dickinson	Kaninchen	Caveolin	Polyklonal	1:7500
Santa Cruz Technology	Kaninchen	Rab 4	Polyklonal	1:500
Santa Cruz Technology	Kaninchen	Rab 5	Polyklonal	1:500
Prof. Braulke		Mannose-6-Phosphat-Rezeptor		
Santa Cruz Technology	Kaninchen	LRP	Polyklonal	1:1000

Sekundäre Antikörper zur Immundetektion in Western Blots:

Hase-anti-Schaf F(ab') <sub>2</sub> -Fragmente HRP-konjugiert	Jackson Immuno Research
Ziege-anti-Hase F(ab') <sub>2</sub> -Fragmente HRP-konjugiert	Jackson Immuno Research
Ziege-anti-Maus F(ab') <sub>2</sub> -Fragmente HRP-konjugiert	Jackson Immuno Research
Ziege-anti-Ratte F(ab') <sub>2</sub> -Fragmente HRP-konjugiert	Jackson Immuno Research

Als Antikörper gegen den biotinylierten Protein-Marker wurde verwendet:

Anti-Biotin-Antikörper HRP-konjugiert	Sigma
---------------------------------------	-------

### 2.1.6. Vektoren, Restriktionsendonukleasen und Oligonukleotide

Vektoren:

pGEMT-easy	Promega
pcDNA3.1+	Invitrogen

Restriktionsendonukleasen:

Enzym	Konzentration	Schnittstelle	Firma
AspI	10,000 U/ ml	G↓GTACC	Boehringer
HindIII	18,000 U/ ml	A↓AGCTT	Pharmacia Biotech
XbaI	11,000 U/ ml	T↓CTAGA	Pharmacia Biotech
Eco	20,000 U/ml	G↓AATTC	Amersham Pharmacia
Bgl I	12,000 U/ml	GCCNNNN↓NGGC	Amersham Pharmacia
Kpn	12,000 U/ml	GGTAC↓C	Amersham Pharmacia

## Oligonukleotide

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

Name	Sequenz
Anx1-Primer	5'-ATGGCCAAAATAATAGCACAGGGTGC-3'
Anx15-Oligo	5'- GCAAGCTTGCCGCCACCATGGCCAAAATAG CACA-GGGTACGACTTCGC-3'
Anx17-Oligo	5`GCTCTAGATCAAGCATAATCTGGAACATC ATATGGATAGTCTTCTCACTCACAACATCG-3`
Anx18-Oligo	5`GCTCTAGATCAAGCATAATCTGGAACATC ATATGGATAGTCTTCTCCACCACAGAGCGC- 3`

## 2.1.7. Enzyme

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

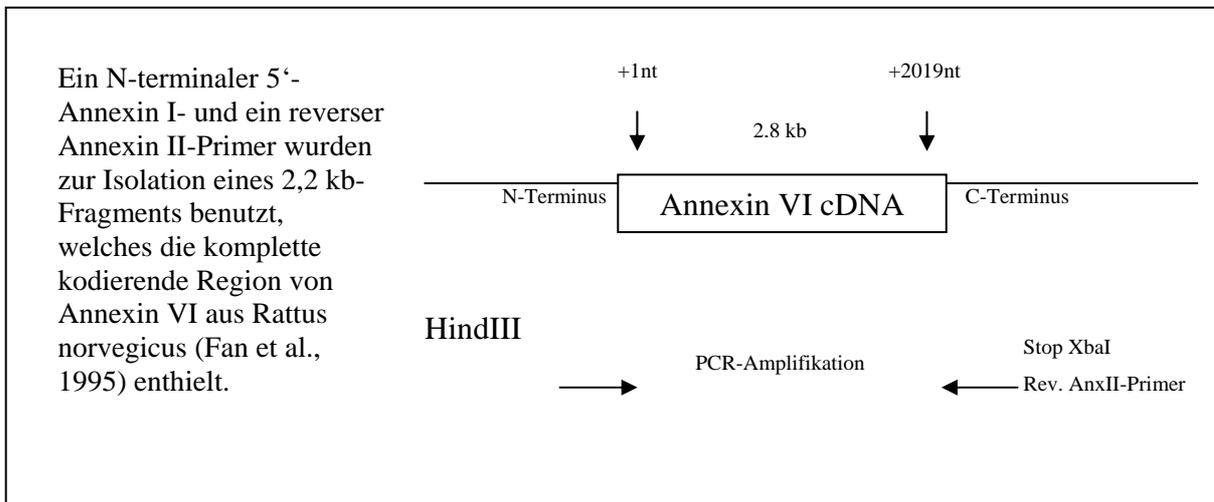
## 2.2. Methoden

### 2.2.1. 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 (siehe Abb.).



**Abbildung 4: Amplifikation der Annexin VI-codierenden Region per Polymerasekettenreaktion**

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:

Deletionsmutante del 1490-HA:

Der Expressionsvektor der Rattenannexin 6 Deletionsmutante pcDNA<sub>1-175</sub> wurde mit einem 542bp HDIII-Asp1 Annexin6 cDNA Fragment konstruiert, daß die Codierungssequenzen von Position +1 bis zur Position +527 beinhaltet, aber dem 6 der 8 „repeats“ am carboxy-terminalen Ende fehlen. Das DNA-Fragment wurde isoliert, von dem Gel gereinigt und in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1+ (Invitrogen) kloniert.

Deletionsmutante aa8-15-HA:

Eine N-terminale Mutante wurde konstruiert, in der die Aminosäuren 8 bis 15 deletiert wurden, da zwei potentielle Phosphorylierungs-Stellen (Tyr an Pos. 10 und Ser an Pos. 13) innerhalb dieser Region auf Signaltransduktionsmechanismen hinweisen.

### 2.2.2. 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.

### 2.2.3. 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.

#### 2.2.4. Transformation von Bakterien

Die Transformation von Bakterien wurden nach der im Buch ‚Molecular Cloning‘ (Maniatis et al, 2<sup>nd</sup> Ed.,1989) beschriebenen Methode durchgeführt.

Kompetente *Escherichia coli* Zellen 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.

### 2.2.5. 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 solubilisierte 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:

Eine 1 ml Bakterienkultur wurde in 200 ml ampicillinhaltigem Medium für 12-16 Stunden bei 37°C geschüttelt (120 rpm), was eine Dichte von  $1 \times 10^9$  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 mM 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.

#### 2.2.6. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen:

Die Extraktion erfolgte nach dem QUIAEX Agarose Gel Extraction Protocol und ist durchführbar zur Elution von 40 –50 kb DNA-Fragmenten aus 0,3-2 % Standard-Gelen oder schnell schmelzenden Agarose-Gelen in TAE oder TBE-Puffern. Zuerst wurden die DNA-Fragmente mit einem scharfen Skalpell in kleinstmöglichem Umfeld aus dem Agarose-Gel geschnitten. Nach Feststellung des Gewichts fügte man dann in einem Eppendorf-Tube das dreifache Volumen des Gewichts des Agaroseausschnittes an Puffer QXI auf das Agarosefragment. Nach 30 sekündigem Vortexen und Zupipettieren von 10µl QUIAEX bei einer zu erwartenden DNA-Menge von <math><2\mu\text{g}</math> ( bei einer Menge von 2-10µg =>30µl QUIAEX II, pro 10µg mehr erwarteter DNA-Menge wurden zusätzlich 30µl QXII eingesetzt) wurden die Proben erneut gevortext und für 10 min zur vollständigen Auflösung der Gelreste und zur DNA-bindung auf den Heizblock bei 50°C gestellt. Es mußte stets die Farbe des Tubeinhaltes kontrolliert werden, da diese Reaktion pH-abhängig stattfindet und in dem Puffer ein Farb-pH-Indikator integriert ist. Die effizienteste Elution erreicht man bei einem pH zwischen 7,0 und 8,5. Dann folgte eine 30 sekündige Zentrifugation und ein vorsichtiges Abpipettieren des Überstandes. Ein zweimaliger Waschschrift zur Entfernung von Salzkontaminationen folgte, indem jeweils 500 µl Puffer PE zu dem Pellet pipettiert wurde und nach kurzem Vortexen die

Tubes je 30 Sekunden zentrifugiert und der Überstand vorsichtig verworfen wurde. Das Pellet wurde daraufhin 10-15 min luftgetrocknet und dann in 20µl 10mM-Tris-HCl, pH 8,5 oder in Wasser durch Vortexen resuspendiert. Die Inkubationszeit war abhängig von der Größe des zu eluierenden Fragments: DNA Fragmente < 4 kb wurden für 5 min bei Raumtemperatur belassen, Fragmente von 4-10kb für 5 min bei 50°C und Fragmente >10 kb für 10 min bei 50°C. Nach 30 sekundiger Zentrifugation wurde der Überstand, der jetzt die eluierte DNA enthalten sollte, abpipettiert.

### 2.2.7. Zellkultur

Adhärente CHO-Zellen wurden in 72 cm<sup>2</sup>- oder 162 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen kultiviert. Sie waren dazu mit 15 ml bzw. 30 ml Nährmedium bedeckt, das aus F12 (HAM) Nutrient Mixture, 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-CO<sub>2</sub>-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.

### 2.2.8. Ausplattieren von Zellen

2 Tropfen suspendierter Zellen wurden in eine Zählkammer überführt und dort quantifiziert. Entsprechend der ermittelten Zellzahl pro 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.

### 2.2.9. 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 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, wofür der Überstand verworfen und das Pellet in Nährmedium resuspendiert wurde. Die Zellsuspension wurde zur Kultur wieder in eine Zellkulturflasche überführt.

### 2.2.10. 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,  $1 \times 10^5$ / well bzw.  $2 \times 10^5$ / 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 ( $\mu\text{g}$ ) : Fugene 6 ( $\mu\text{l}$ ) : F12 Nutrient Mixture ( $\mu\text{l}$ ) betrug 1 : 2 : 100. Bei einer Mehrfachkulturschale mit 6 Löchern wurden 2  $\mu\text{g}$  DNA/ well, bei einer Mehrfachkulturschale mit 12 Löchern wurde 1  $\mu\text{g}$  DNA/ well transfiziert.

### 2.2.11. 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 im SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression des transferierten Gens mit Hilfe von Western Blot und Immundetektion untersucht.

### 2.2.12. 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 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  $\mu$ l Solubilitätspuffer aufgenommen wurde. Dieser Puffer ( pH 7.4) beinhaltete 1% Triton X-100, 50 mM Tris, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 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 sollte die Wirkung freigesetzter intrazellulärer Proteasen moeglichst gering halten. Die Zellyse 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  $1 \times 10^5$  Zellen/ well ausplattiert. Zum Transfektionszeitpunkt ergaben sich dadurch ca.  $1,5-2 \times 10^5$  Zellen und bei der Proteinextraktion ca.  $3-4 \times 10^5$  Zellen/ well. Dies ergab eine Proteinextraktionsmenge von ca. 200 – 300  $\mu$ g/ well. Transfiziert wurde in eine 12-well Mehrfachkulturschale 1  $\mu$ g DNA pro well. Für 6-well Kulturschalen sind alle angegebenen Werte zu verdoppeln.

### 2.2.13. Endosomenpräparation

Die Endosomenpräparation wurde nach dem Verfahren von Gorvel et al (1991) durchgeführt. Vier mit der jeweiligen Zellreihe konfluierend bewachsenen Zellkulturflaschen (162cm<sup>2</sup>) wurden zwei mal je für fünf Minuten mit sterilem PBS gewaschen und nach Füllen mit 15 ml Inkubationsmedium(bei CHO: F12 mit 10mM Hepes) fünf Minuten bei Raumtemperatur belassen. Dann wurde das Inkubationsmedium ausgetauscht gegen 15 ml Inkubationsmedium mit Substrat (z.B. LDL/EGTA) und für die jeweilige Versuchszeit (0', 5', 60', 120') im Zellinkubator belassen. Darauf folgte erneutes kurzes zweimaliges Waschen mit PBS/BSA (PBS+0,5%BSA) auf Eis und schließlich ein Füllen der Flaschen mit je 20ml HB-Puffer+Pic (250mM Sucrose, 3mM Imidazol, pH 7,4). Auf Eis wurden die Zellen von der Oberfläche gekratzt und in zwei 50ml Falcons überführt. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 2200 rpm wurde der Überstand verworfen, das Pellet in je 2ml HB-Puffer+Pic resuspendiert. und zur Zerstörung der Zellwände ca.15 mal durch eine G23-Kanüle gezogen. Nach Kontrolle der Zellpartikel in der Neubauer Zählkammer folgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 3400 rpm. Hier wurde nun das Pellet verworfen,der Überstand (postnuclear supernatant,PNS) in einen Sucrosegradienten eingefügt. Für diesen Gradienten wurden je in vier 15ml Falcons vorgelegt:

- 1) 840µl PNS+1160µl 62% Sucroslösung(62% Sucrose, 3mM Imidazol)
- 2) 3ml 35% Sucroslösung (35% Sucrose, 3mM Imidazol)
- 3) 2ml 25% Sucroslösung (25% Sucrose, 3mM Imidazol)
- 4) 3 ml HB-Puffer+Pic

Mit der Pasteurpipette wurden nun diese Inhalte vorsichtig in einem Beckmann 89mm Zentrifugenröhrchen schichtweise aufeinander getropft, so daß sich die einzelnen Fraktionen nicht miteinander mischten. Am Boden (bottom) wurde mit der 62% Sucroslösung und dem PNS begonnen, dann folgte die 35% Sucroslösung etc. Nach 90 minütiger Zentrifugation bei 35.000rpm wurden dann vorsichtig von oben aus dem Gradienten in rotierender Spezialabnahmetechnik je zehn 1ml- Fraktionen abgenommen und in Eppendorf-Tubes überführt.

#### 2.2.14. TCA-Fällung

Diese Verfahren dient der Volumenreduktion der Proben. Zu dem jeweils 1 ml betragendem Inhalt der Eppendorf-Tubes des Gradienten wurden zuerst 150 µl gekühltes Triton 100 (10%) und dann jeweils 300 µl gekülte 3 M Trichloressigsäure (TCA 3M) pipettiert. Nach dem Vortexen der Proben wurden sie 10 Minuten auf Eis gestellt und dann 15 Minuten bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abgießendes Überstandes wurde zu dem Pellet je 1 ml eisgekühltes Aceton pipettiert. Es folgte erneute 10 minütige Zentrifugtion bei 14.000 rpm und 4°C und erneutes Verwerfen des Überstands. Nach Wiederholung dieses Aceton-Waschvorganges wurde, das neu gewonnene Pellet, das nun konzentriert den Proteinanteil der Proben darstellte, ca. 5 min auf dem Heizblock bei 50°C getrocknet. Zur Lösung des Proteinpellets wurden die geschlossenen Tubes nach Zugabe von je 100µl SDS(10%) für 30 min auf dem 37°C warmen Heizblock belassen.

#### 2.2.15. 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

$\mu\text{l}$  aufgefüllt. Es folgte die Zugabe von 1 ml Lowry-Lösung, die sich aus 3 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  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  $\mu\text{l}$  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.

### 2.2.16. Auftrennung von Proteinen durch 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 (Biosdesign Int.).

Gelelektrophorese:

Die Auftrennung von Proteinen per Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (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 zusammen. 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 abgegossen 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 60 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.

#### 2.2.17. Coomassiefärbung von Proteingelen

Proteingele wurden nach der Auftrennung gemäß Methodik im Maniatis 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.

### 2.2.18. 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 zuklappbare 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.

### 2.2.19. ECL-Immunodetection nach 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, 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.

### 2.2.20. Bestimmung der $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität

50  $\mu$ l der Proben werden mit 100  $\mu$ l Substratpufferlösung (10 mM para-Nitrophenyl-2-acetamido-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosid in 0,1 M Natriumcitrat pH 4,6, 0,04%  $\text{NaN}_3$ , 0,2% BSA) bei 37°C 30 bis 90 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 0,5-1,0 ml Stopplösung (0,4 M Glycin / NaOH pH 10,4) wird die Extinktion des freigesetzten p-Nitrophenols im Spektrometer bei 405 nm gemessen. Die Aktivität wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Aktivität [mU/ml]} = \frac{\Delta E_{405} * \text{Meßvolumen [ml]} * 1000}{\epsilon * \text{Enzymvolumen} * \text{Inkubationszeit [min]}}$$

Der molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) für p-Nitrophenol beträgt 18,5  $\text{cm}^3$  / Mol bei 405 nm.

### 2.2.21. Isolierung von humanen LDL

Die Isolierung und Präparation von humanen Low Density Lipoproteinen wurden nach der Methode von Havel et al (1955) durchgeführt. Nichthyperlipämischen Spendern wurden insgesamt 2000 ml Blut abgenommen. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l 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.

#### 2.2.22. Radioaktive Markierung von LDL mit $^3\text{H}$ -Cholesterol

Für diesen Schritt wurden 100  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Cholesterol eingedampft, welches eine Konzentration von 42 Ci/ mmol Radioaktivität von Amersham auf 8,125 $\mu\text{g}$  Chol./ml aufwies. Dies wurde nach Zugabe von 100 $\mu\text{l}$  2,5%ige BSA/DMEM-Lösung kurz gevortext. Nach der Zugabe von 1ml LDL (Konzentration ca. 5mg/ml) wurde das  $^3\text{H}$ -Cholesterol/LDL für einen Zeitraum, von 3 Stunden bei 37°C verwahrt und anschließend über eine PD10-Säule laufen gelassen. Nach Bestimmung der speziellen Aktivität konnte mit den  $^3\text{H}$ -Cholesterol/LDL-Experimenten begonnen werden.

#### 2.2.23. Herstellung von lipoproteindefizientem Serum

Für die Herstellung des lipoproteindefizienten Serums wurde zunächst FCS ( Dichte 1,006) bei 4°C mit KBr versetzt bis die Dichte ca. 1,24 betrug. Dies entsprach 0,3816 g KBr/ ml. Nach Kontrolle anhand der Dichtespindel wurde die Lösung in vier Ultrazentrifugen-Tubes (90 ml Falcons) überführt, die Falcons wurden in ihrem Gewicht genau aneinander angeglichen, versiegelt und 22 h bei 38.000 rpm und 4°C ultrazentrifugiert.

Nun wurden 15-20 ml der Top-Fraktion mit der Spritze abgesaugt, diese Fraktion enthielt einen Cholesterin-Gehalt von ca. 95 mg/dl. Ebenfalls wurden 10 ml der mittleren Fraktion abgesaugt. Das verbliebene Serum wurde unter Ausschluß des am Boden befindlichen Proteinpellets in je 5 Litern PBS vier mal im 12 Stunden Takt dialysiert. Nach der Proteinbestimmung (ca.:Gesamt-Protein 32 g / l, Gesamt-Cholesterin 4 mg / dl) wurde das Serum auf 25 mg/ml Gesamt-Cholesterin verdünnt und nach Sterilfiltration bei -20°C gelagert.

#### 2.2.24. Effluxbestimmung von $^3\text{H}$ -Chol/LDL

CHO-Wildtyp-Zellen und CHOanx6-klon-Zellen wurden nach oben beschriebener Methode zu jeweils 100.000 pro well auf six-well-Platten ausgesetzt und 24 Stunden zur Reduktion unspezifischer Bindungsstellen in in 10% lipoproteindefizientem Serum-Medium im Zellinkubator gehalten. Dann wurden 60  $\mu\text{g}$  radioaktiv markierte  $^3\text{H}$ -Cholesterol/LDL (50.000 cpm) pro well in das Zellmedium pipettiert und für einen Zeitraum von 24 Stunden konnten die Zellen diese Lipoproteine nun aufnehmen. Daraufhin wurde das Medium gegen normales Medium ausgetauscht, dem zusätzlich HDL (0,75 $\mu\text{g}$  / well) zugefügt wurde.

Die Effluxbestimmung fand nach einem Zeitraum von 3, 6, 8, 24 und 48 Stunden statt. Der radioaktive Efflux der Medien der einzelnen wells und die verbliebene Radioaktivität der in 0,1% NaOH lysierten Zellen wurde getrennt voneinander im  $\beta$ -Counter bestimmt und die Werte der einzelnen wells miteinander verglichen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung endosomaler Membranfraktionen in Annexin VI überexprimierenden Zellen

Für die folgenden Studien wurden CHO-Wildtyp-Zellen, die normalerweise nur eine geringe Menge an endogenem Annexin VI produzieren, mit der AnnexinVI-DNA transfiziert. In Westernblotting-Verfahren und Immunfluoreszenzen konnte daraufhin mit vier verschiedenen Antikörpern die Überexpression des Proteins in dem stabilen CHOanxVI-Klon im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen nachgewiesen werden. Alle vier Antikörper erkannten spezifisch gereinigtes Kälberleber-Annexin VI und endosomales Annexin VI in Rattenhepatozyten (Grewal et al, 2000).

Mit dieser stabilen Annexin 6 überexprimierenden Zelllinie wurde zur Bestimmung der Lokalisation von Annexin 6 eine subzelluläre Fraktionierung durch einen Sucrosegradienten nach Gorvel et al., 1991, vorgenommen. In dem Gradienten kann zwischen frühen und späten Endosomen und sogenannten schweren Plasmamembranen (u.a. wie Lysosomen, Mitochondrien und Golgi Apparat) unterschieden werden. Die einzelnen Fraktionen werden erzeugt, indem nach Zerstörung der Zellwände und Pelletierung der nicht verwertbaren Zellfragmente, der postnukleäre Überstand in einem Dichtegefälle unterschiedlich konzentrierter Sucroselösungen (62%, 35%, 25%) während einer 90 minütigen Ultrazentrifugation bei 35.000 rpm fraktioniert wird. Die Bestandteile verteilen sich im Gradienten ihrer Dichte entsprechend. Im unteren Teil des Gradienten sollten sich demnach die schweren Plasmamembranen und Membranbestandteile der Coated pits und des Golgi-Apparates nachweisen lassen, während die leichteren frühen und späten Endosomen im Zentrum des Gradienten zu erkennen sind.

##### 3.1.1. Nachweis von Annexin VI

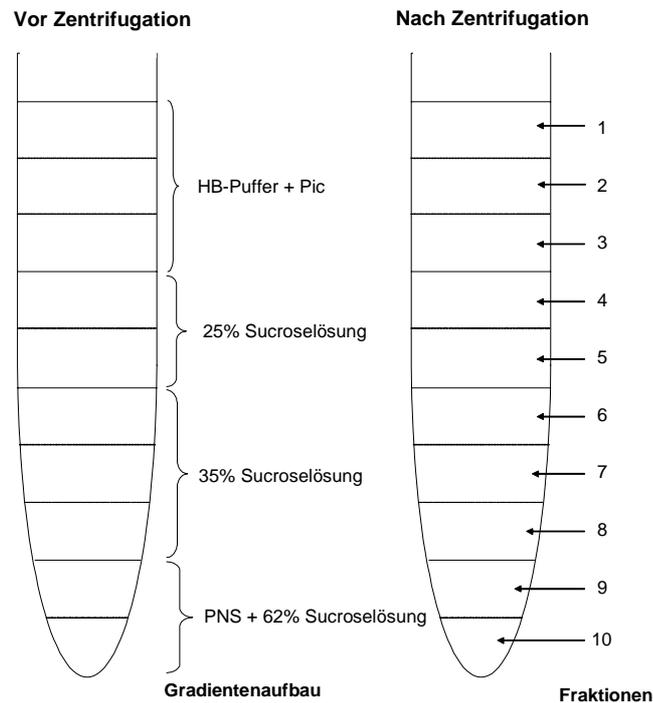
Im ersten Teil der Arbeit soll nun anhand dieses Verfahrens die Lokalisation von Annexin VI unter unterschiedlichen Bedingungen und somit in unterschiedlichen Zellstadien dargestellt werden.

### 3.1.1.1. Annexin VI im unbehandelten Gradienten

Zunächst wurde eine Endosomenpräparation nach oben genannter Methode aus Annexin VI überexprimierenden CHO-Zellen vorgenommen. Pro Sucrosegradient wurden  $4-6 \times 10^7$  Zellen benötigt. Die Zellen wurden zwei mal 5 Minuten lang mit sterilem PBS gewaschen und daraufhin in jeweils 20 ml kaltem HB-Puffer (250mM Sucrose, 3mM Imidazol, pH 7,4) mit PIC (Proteinasen-Inhibitoren-Cocktail) auf Eis von dem Zellkulturflaschenboden abgeschabt. Der zellbeinhaltende HB-Puffer wurde in zwei 50 ml Falcons gesammelt und nach 15 minütiger Zentrifugation bei 2200 rpm der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde in 2 ml HB-Puffer mit PIC gelöst und ca. 15 mal zur Zerstörung der Zellwände durch eine G23-Kanüle gezogen. Nach Kontrolle der einzelnen Zellpartikel in der Neugebauer Zählkammer folgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 3400 rpm. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand (Postnuclear Supernatant) wurde im nächsten Schritt in einen Sucrosegradienten eingefügt. Dieser Gradient bestand aus vier verschiedenen Phasen, die von unten nach oben in einem Beckmann 89mm Zentrifugenröhrchen in folgender Zusammenstellung mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig aufeinander getropft wurden:

- 1) 840µl PNS+1160µl 62% Sucroselösung (62% Sucrose, 3mM Imidazol)
- 2) 3ml 35% Sucroselösung (35% Sucrose, 3mM Imidazol)
- 3) 2ml 25% Sucroselösung (25% Sucrose, 3mM Imidazol)
- 4) 3 ml HB-Puffer+Pic

Nach 90 minütiger Ultrazentrifugation bei 35.000 rpm folgte die manuelle Abnahme der einzelnen Fraktionen (je 1 ml) des Dichtegradienten von oben (top) nach unten hin (bottom).



**Abbildung 5: Sucrosegradient vor und nach Ultrazentrifugation**

Durch eine TCA-Fällung wurde eine zehnfache Volumenreduktion der Proben zu je 100  $\mu\text{l}$  erzielt. Dabei wurde zu dem jeweils 1 ml betragendem Inhalt der Eppendorf-Tubes des Gradienten zuerst 150  $\mu\text{l}$  gekühltes Triton 100 (10%) und dann jeweils 300  $\mu\text{l}$  gekühlte 3 M Trichloressigsäure (TCA 3M) pipettiert. Nach dem Vortexen der Proben wurden sie 10 Minuten auf Eis gestellt und dann 15 Minuten bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abgießendes Überstandes wurde zu dem Pellet je 1 ml eisgekühltes Aceton pipettiert. Es folgte erneute 10 minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C und erneutes Verwerfen des Überstandes. Nach Wiederholung dieses Aceton-Waschvorganges wurde das neu gewonnene Pellet, das nun konzentriert den Proteinanteil der Proben darstellte, ca. 5 min auf dem Heizblock bei 50°C getrocknet. Zur Lösung des Proteinpellets wurden die geschlossenen Tubes nach Zugabe von je 100 $\mu\text{l}$  SDS (10%) für 30 min auf dem 37°C warmen Heizblock belassen.

Im nächsten Schritt wurde der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen mit der Methode nach Lowry bestimmt. Dazu wurde jeder 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<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0,15 N NaOH (A), 2 % Kaliumnatriumtartrat (B) und 1 % CuSO<sub>4</sub>x5H<sub>2</sub>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.

Um die Proben auf ein 10 prozentiges Acrylamid-SDS-Gel aufzutragen, wurden sie 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. Als Größenmarker wurde ein Rainbow Marker RPN 756 (Amersham) und zusätzlich noch ein Biotinylierter Protein Marker (Biodesign Int.) auf das Gel aufgetragen.

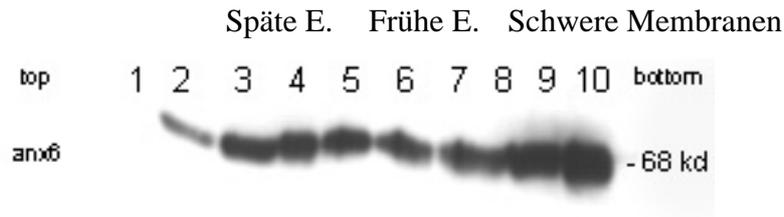
Die Auftrennung von Proteinen per Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach der Methode von Laemmli et al. (1970) durchgeführt. Dabei wurde ein diskontinuierliches Gelsystem verwendet, bestehend aus einem unteren Trenngel und einem oberen Sammelgel.

Zur Herstellung des 10 % Trenngels 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 zusammen. 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 abgegossen 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 60 mA durchgeführt und dauerte ca. 3-4 Stunden.

Nach dem Westernblotting des Gels, bei dem die Proteine des Gels innerhalb von 4 Stunden bei einer Stromstärke von 250 mA in einer Trans-blot Zelle mit Blottingpuffer auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen werden, wurde eine Immunodetection nach Whitehead mit dem primären anti-GSTanx6 Antikörper (1/500) und dem sekundären Antikörper GaR-Po (goat-anti-rabbit 1/1000) vorgenommen. Zuerst wurde die Nitrocellulose-Membran über 60 Minuten in eine Blockinglösung gelegt und dabei leicht geschüttelt. Die Blockinglösung setzte sich aus 0,1 % Tween, 10 % Milchpulver in PBS zusammen und minimierte die unspezifische Antikörperbindung. Danach wurde die Membran 90 Minuten lang bei Raumtemperatur mit dem primären anti-GSTanx6 Antikörper behandelt, der in 0,1 % Tween und 5 % BSA in PBS gelöst war. 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 Anti-IgG-Antikörper war ebenfalls mit der Blocking-Lösung verdünnt. Vor der eigentlichen Immunodetektion 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.

Die Röntgenfilm-Schwärzung zeigte folgendes Bild:



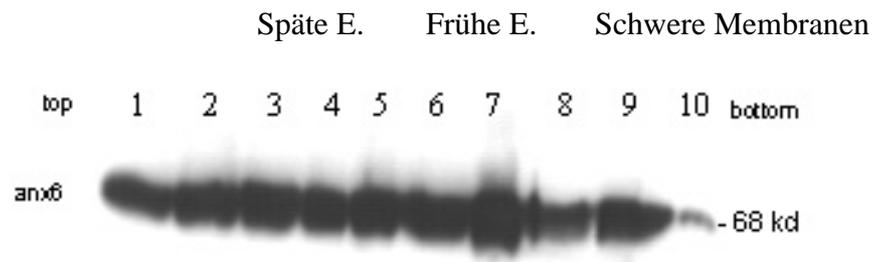
**Abbildung 6: Nachweis von Annexin VI im unbehandelten Gradienten nach subzellulärer Fraktionierung von CHO anx6-Klon-Zellen, nach SDS-Page, Westernblotting und ECL-Detektion mit einem primären anti-GSTanx6-Antikörper und einem sekundären Antikörper GaR-Po**

Das 68 kD große Protein war konsequent im gesamten Gradienten zu detektieren. Die größte Menge schien jedoch membrangebunden in den Bodenfraktionen des Gradienten vorzuliegen, die hauptsächlich die Plasmamembranen enthielten.

### 3.1.1.2. Annexin VI nach 120 min LDL-Inkubation im Dichtegradienten

Im nächsten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit sich die Lokalisation von Annexin VI ändert, wenn sich die Zellen größtenteils zum Untersuchungszeitpunkt in Aufnahmestadien befinden. Da Grewal et al. bereits eine Lokalisationsänderung von Annexin VI unter der Aufnahme von LDL beschrieben hatten, sollte dieses Phänomen hier reproduziert werden. Es wurde durch 120 minütige LDL-Inkubation der CHOanx6-klon-Zellen die Endozytose induziert und erneut die Lokalisation von Annexin VI im Dichtegradienten bestimmt. Pro Sucrosegradient wurden  $4-6 \times 10^7$  Zellen benötigt. Die Zellen wurden wie zuvor zwei mal je 5 Minuten mit sterilem PBS gewaschen und nach Füllen mit je 15 ml Inkubationsmedium (F12 mit 10 mM Hepes) fünf Minuten bei Raumtemperatur belassen. Dann wurde das Inkubationsmedium ausgetauscht gegen 15 ml Inkubationsmedium mit LDL und für 120 Minuten im Zellinkubator belassen. Darauf folgte erneutes kurzes zweimaliges Waschen mit PBS/BSA (PBS+0,5%BSA) auf Eis und schließlich ein Füllen der Flaschen mit je 20ml HB-Puffer+Pic (250mM Sucrose, 3mM Imidazol, pH 7,4). Auf Eis wurden die Zellen von der Oberfläche gekratzt und in zwei 50ml Falcons überführt. Auch hier erfolgte die Zentrifugation bei 2200 rpm und nach Abgießen des Überstandes die Suspensierung des Pellets in 2 ml HB-Puffer mit PIC. Nach Zerstörung der Zellwände durch die G23-Kanüle

folgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 3400 rpm und mit dem erhaltenen postnukleären Überstand wurde wie im zuvor beschriebenen Experiment ein Sucrosegradient erstellt. Nach manueller Gradientenabnahme wurden die je 1 ml-Proben durch die TCA-Fällung in ihrem Volumen auf ein Zehntel reduziert, der jeweilige Proteingehalt bestimmt und die einzelnen Fraktionen, in ihrem Proteininhalt angeglichen, auf ein 10 prozentiges Acrylamid-Gel aufgetragen. Nach Westernblotting und Immunodetektion konnte folgendes Ergebnis auf dem Röntgenfilm gezeigt werden:



**Abbildung 7: Nachweis von Annexin VI nach 120 min LDL-Inkubation nach subzellulärer Fraktionierung von CHO anx6-Klon-Zellen, nach SDS-Page, Westernblotting und ECL-Detektion mit einem primären anti-GSTanx6-Antikörper und einem sekundären Antikörper GaR-Po**

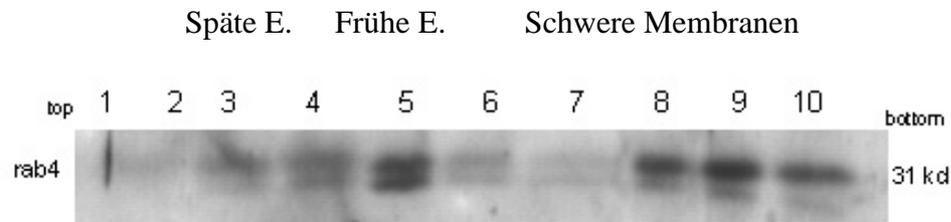
Hier erkannte man nun, induziert durch die LDL-Inkubation, eine Verschiebung der Lokalisation von Annexin 6 im Dichtegradienten. Zuvor kumulierte die größte Annexin VI-Menge an den schweren Membranen der Bodenfraktionen des Gradienten. Nun fand eine Umverteilung in die mittleren Fraktionen des Gradienten statt, in denen vor allem frühe Endosomen vorhanden sind.

Im nächsten Teil der Arbeit sollten nun anhand der Detektion endosomaler Markerproteine im Dichtegradienten die einzelnen Fraktionen untersucht und charakterisiert werden.

### 3.1.2. Nachweis von Rab 4

In unbehandelten CHOanx6-klon-Zellen sollte Rab 4 als Markerprotein früher Endosomen nach subzellulärer Fraktionierung im unbehandelten Sucrosegradienten durch Immunodetektion nachgewiesen werden. Wie in den vorigen Experimenten wurde aus je  $4-6 \times 10^7$  Zellen ein Sucrosegradient erstellt. Nach Ultrazentrifugation und manueller Abnahme

der einzelnen Fraktionen, Volumenreduktion durch die TCA-Fällung, Auftragen der einzelnen Proben auf ein 10 prozentiges Acrylamid-Gel, Westernblotting und Immunodetektion konnte man folgendes Bild auf dem Röntgenfilm erkennen:



**Abbildung 8: Nachweis von Rab 4 im unbehandelten Gradienten nach subzellulärer Fraktionierung von CHO an<sub>x</sub>6-Klon-Zellen, nach SDS-Page, Westernblotting und ECL-Detektion mit einem primären polyklonalen Kaninchen-AK gegen Rab 4 und einem sekundären Antikörper GaR-Po**

Als primärer Antikörper wurde hier ein polyklonaler Kaninchenantikörper gegen Rab 4 eingesetzt, der von dem sekundären Antikörper GaR-Po detektiert wurde.

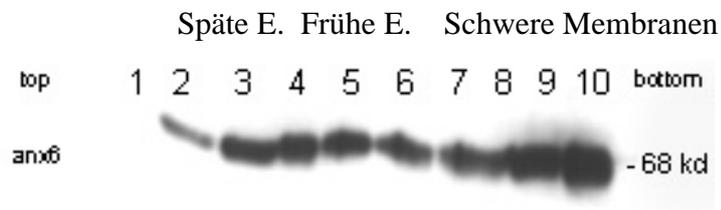
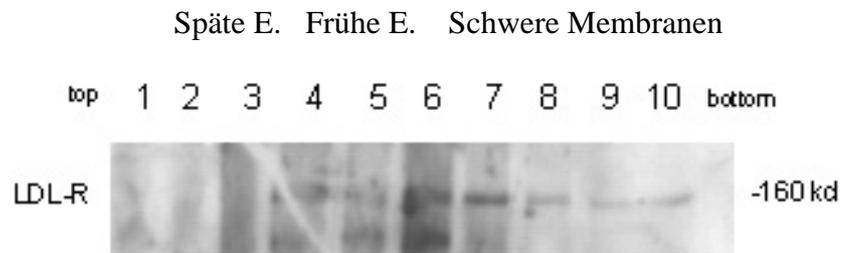
Hier waren zwei peaks zu erkennen, in denen das 31 kD große Rab 4 hauptsächlich vorhanden war. Einmal in den Bodenfraktionen der schweren Membranen (Fraktionen 8, 9. und 10) und zusätzlich in den mittleren Fraktionen des Gradienten (4, 5 und 6), die vermutlich die Lokalisation der frühen Endosomen darstellen.

### 3.1.3. Nachweis des LDL-Rezeptors

Nach der gleichen Methode des Sucrosegradienten sollte auch der LDL-Rezeptor, hauptsächlich vorkommend in den Coated Pits und in der Plasmamembran, nachgewiesen werden. Wieder wurde aus je  $4-6 \times 10^7$  Zellen durch Abschaben der Zellen, Zentrifugation, Zerstören der Zellwände und Verwendung des PNS nach erneuter Zentrifugation ein Sucrosegradient erstellt. Nach der Ultrazentrifugation wurden die einzelnen Fraktionen nach der Volumenreduktion auf ein SDS-Gel aufgetragen. Bei einer Größe des LDL-Rezeptors von 160 kD wurde dieses Mal ein fünfprozentiges Poly-Acrylamid-SDS-Gel benutzt, um den

Rezeptor nach Westernblotting und der Immunodetektion auf dem Röntgenbild detaillierter darzustellen.

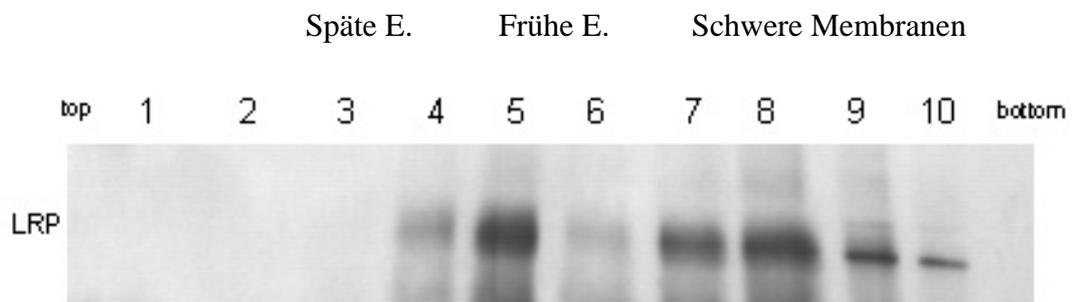
Man erkannte hier eine Verteilung in den Fraktionen 4-10. Dies zeigte, daß sich der LDL-Rezeptor sowohl in den Endosomen als auch auf der Plasmamembran befand. Somit zeigt der LDL-Rezeptor eine sehr ähnliche Verteilung im Sucrosegradient wie auch Annexin VI. Zum Vergleich soll hier nocheinmal der Annexin VI-Nachweis dargestellt werden:



**Abbildung 9: Nachweis des LDL-Rezeptors im unbehandelten Gradienten nach subzellulärer Fraktionierung von CHO anx6-Klon-Zellen, nach SDS-Page, Westernblotting und ECL-Detektion mit einem primären Kaninchenantikörper gegen den LDL-R und einem sekundären GaR-Po-AK (oben), Nachweis von Annexin VI im unbehandelten Gradienten nach subzellulärer Fraktionierung von CHO anx6-Klon-Zellen, nach SDS-Page, Westernblotting und ECL-Detektion mit einem primären anti-GSTanx6-Antikörper und einem sekundären Antikörper GaR-Po (unten)**

### 3.1.4. Nachweis von LRP

Auch LRP als membranständiger Lipoproteinrezeptor sollte im unbehandelten Dichtegradienten nachgewiesen werden. Nach Erstellung und Ultrazentrifugation des Sucrosegradienten aus  $4-6 \times 10^7$  Zellen wurden die einzelnen Fraktionen nach Reduktion ihres Volumens in ihrem Proteingehalt einander angeglichen und durch Hitze und Puffer reduziert auf ein 10 prozentiges Acrylamid-Gel aufgetragen. Als primärer Antikörper wurde hier nach Durchführung der Gelelektrophorese und des Westernblot-Verfahrens ein polyklonaler Kaninchenantikörper gegen LRP auf der Nitrozellulose inkubiert und mit einem GaR-Po sekundären Antikörper detektiert. Folgendes Ergebnis wurde erzielt:

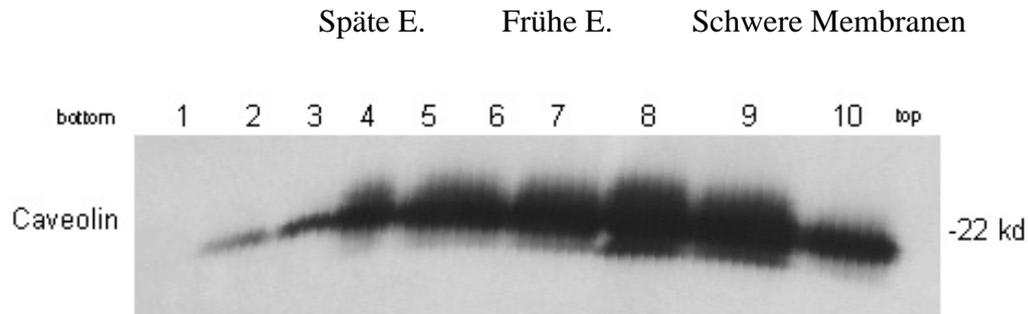


**Abbildung 10: Nachweis von LRP im unbehandelten Gradienten nach subzellulärer Fraktionierung von CHO anx6-Klon-Zellen, nach SDS-Page, Westernblotting und ECL-Detektion mit einem primären polyklonalen Kaninchenantikörper gegen LRP und einem sekundären Antikörper GaR-Po**

Hier erkannte man einen ausgeprägten peak am Boden des Gradienten, zwischen den schweren Membranen, in die das LRP hauptsächlich verankert ist. Aber zusätzlich war auch er in den frühen Endosomen (Fraktionen 4 und 5) zu detektieren.

### 3.1.5. Nachweis von Caveolin

Der Nachweis von Caveolin im unbehandelten Dichtegradienten, nach der bisher benutzten Methode, erzeugte folgendes Ergebnis:

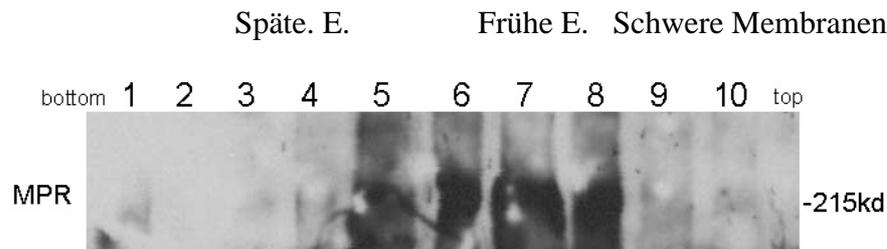


**Abbildung 11: Nachweis von Caveolin im unbehandelten Gradienten nach subzellulärer Fraktionierung von CHO anx6-Klon-Zellen, nach SDS-Page, Westernblotting und ECL-Detektion mit einem primären polyklonalen Kaninchenantikörper gegen Caveolin und einem sekundären Antikörper GaR-Po**

Caveolin, detektiert mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper, zeigte seine Lokalisation über die gesamte Zelle verteilt. Es war in jeder Fraktion des Dichtegradienten zu finden und lieferte ein sehr starkes Signal bei der Immunodetektion.

### 3.1.6. Nachweis des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors

Des weiteren sollte auch der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor als ein Markerprotein der späten Endosomen im Dichtegradienten dargestellt werden. Um dieses große Protein im Westernblot-Verfahren klar zu detektieren, wurden die Proben der einzelnen Gradientenfraktionen im Gegensatz zu den bisherigen Experimenten auf ein fünfprozentiges Acrylamid-SDS-Gel aufgetragen, so daß die Proteine im oberen Teil des Gels einer genaueren Auftrennung erlagen. Auch wurden die Proben der Fraktionen in diesem Experiment nicht durch Zugabe von Mercapto und zusätzlichem Erhitzen reduziert, da der Antikörper gegen den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor nur nicht reduzierte Proteine erkannte. Die Proben wurden direkt nach der Beschwerung mit Sample Buffer ohne Zugabe von Mercapto auf das Gel aufgetragen. Nach dem Westernblotting zeigte die Immunodetektion folgendes Bild:



**Abbildung 12: Nachweis des Mannose-6-P-Rezeptors im unbehandelten Gradienten nach subzellulärer Fraktionierung von CHO anx6-Klon-Zellen, nach SDS-Page, Westernblotting und ECL-Detektion**

Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor zeigt sich am stärksten in den Fraktionen 5-8 lokalisiert. Seine Lokalisation in den späten Endosomen scheint damit bestätigt zu sein.

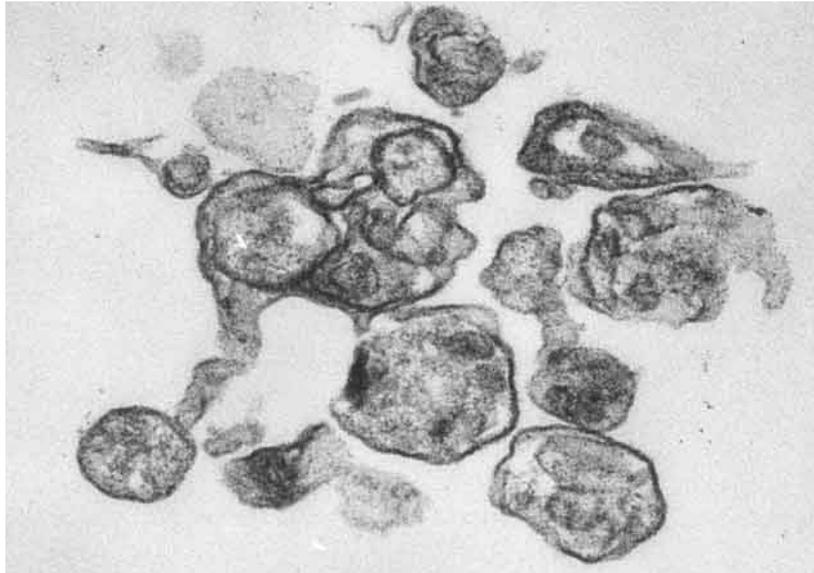
### 3.2. Vergleich zwischen CHO-Wildtyp-Zellen und CHOanx6 klon-Zellen

Nachdem nun im ersten Teil der Arbeit allein auf die Annexin VI überexprimierenden CHOanx 6-klon-Zellen eingegangen wurde, sollte im nächsten Teil der Arbeit ein Vergleich zwischen Wildtyp und Klon vorgenommen werden, der die Auswirkungen der Überexpression des Proteins verdeutlichen sollte.

#### 3.2.1. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Endosomen

Zunächst wurden von Carlos Enrich (Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona) zur Verfügung gestellte elektronen-mikroskopische Aufnahmen der einzelnen Fraktionen des Gradienten des CHOanx6klons betrachtet. Man erkennt auf diesen Bildern einmal frühe Endosomen und einmal das Bild der schweren Plasmamembranen. Zur Erstellung dieser Aufnahmen wurden Endosomen und schwere Membranen von CHO-Zellen in 2% PFA/2,5% Glutaraldehyd in PBS für 60 min bei Raumtemperatur fixiert. Dann wurden die fixierten Endosomen abgekratzt und in 2% PFA in PBS für 2 Tage bei 4°C postfixiert. Die Proben wurden gewaschen, mit 1% OsO<sub>4</sub> / 0,8% FeCNK (Sigma) in PBS behandelt, mit Aceton dehydriert und in Spurr resin (Sigma)

verwahrt. Ultradünne Schnitte wurden angefertigt und mit Uranylacetat und lead citrate behandelt. So konnten frühe Endosomen und schwere Membranen nach dieser Fixation und weiteren Vorbereitung unter dem Elektronenmikroskop analysiert werden.

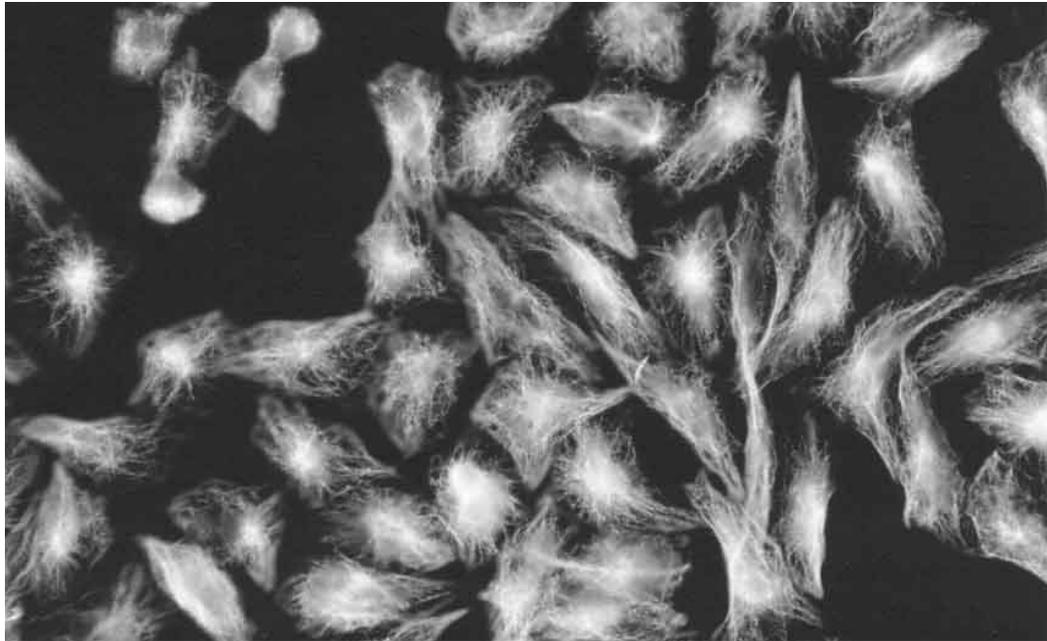


**Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Aufnahme von frühen Endosomen nach subzellulärer Fraktionierung von CHOanx6-klon Zellen, fixiert und präpariert wie beschrieben**

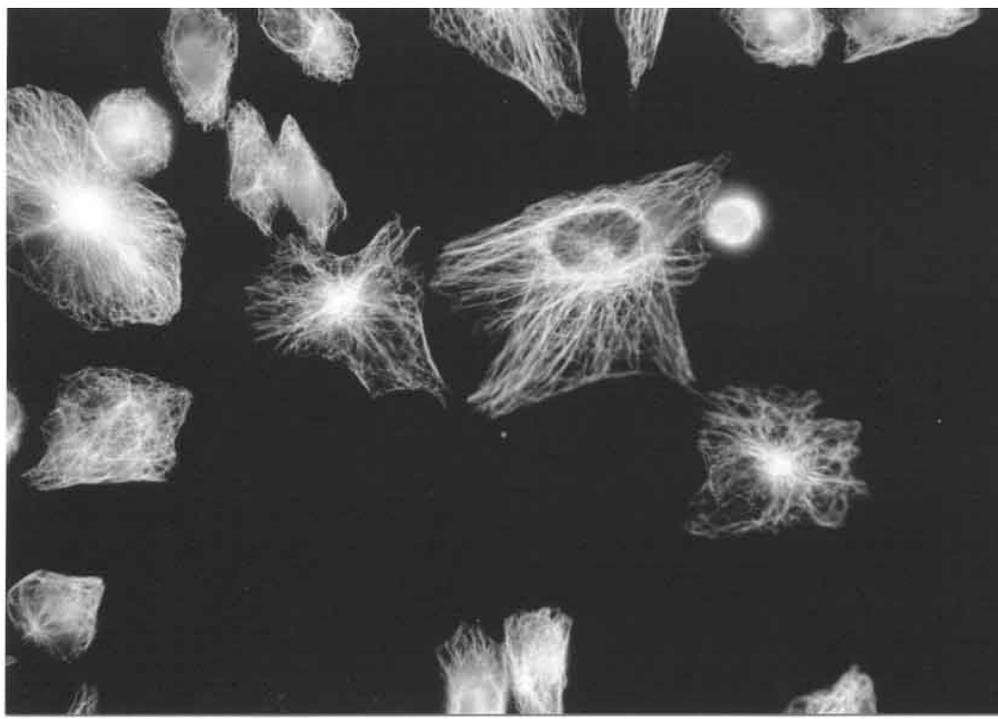


**Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Aufnahme von schweren Membranen nach subzellulärer Fraktionierung von CHOanx6-klon Zellen, fixiert und präpariert wie beschrieben**

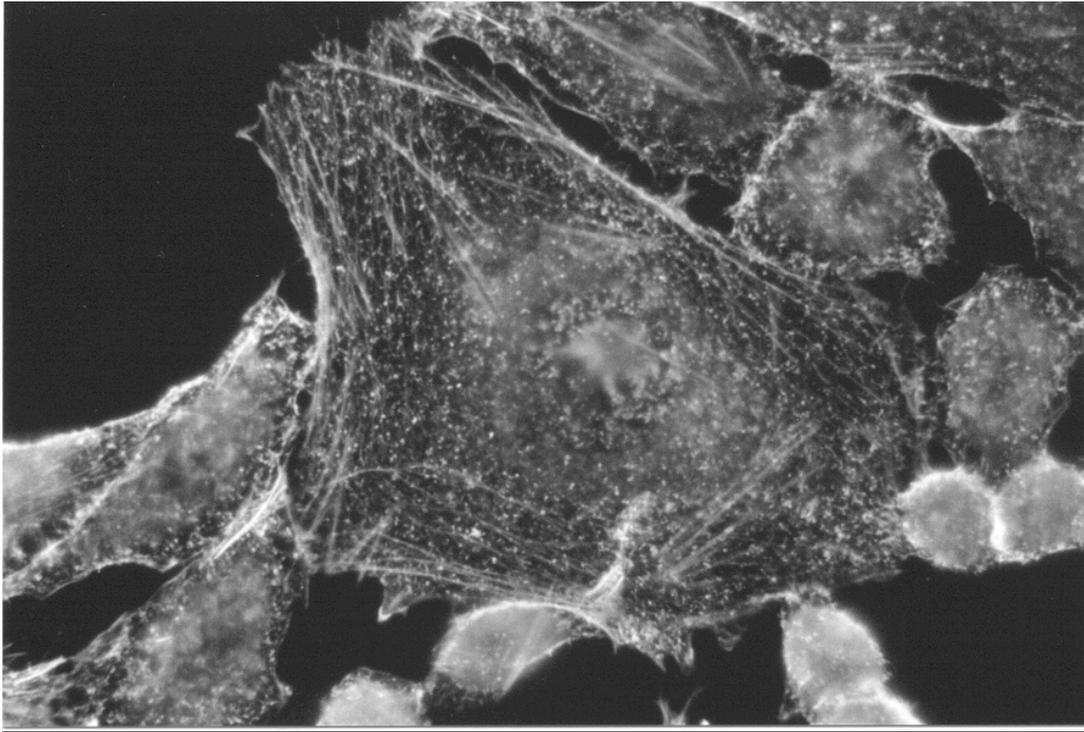
Im zweiten Teil wurden jeweils bestimmte Proteine in beiden Zellreihen, sowohl im CHOanx6-klon als auch im CHO-Wildtyp, mit Hilfe der Immunfluoreszenz betrachtet.



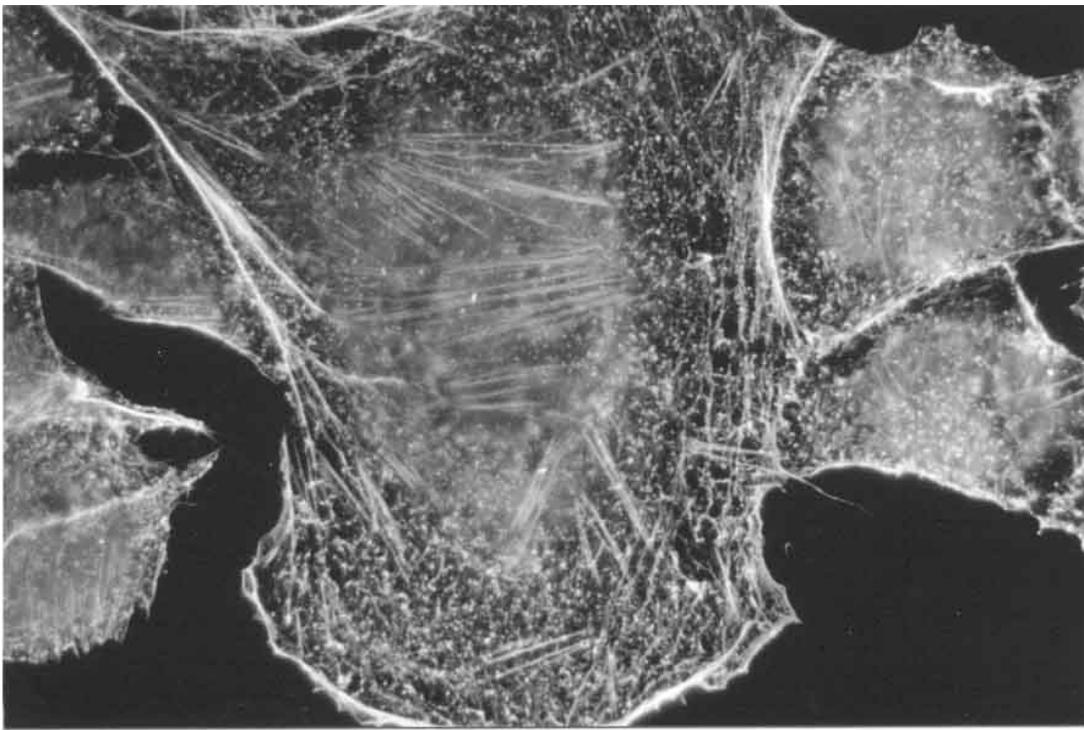
**Abbildung 15:  $\alpha$ -Tubulin im CHOanx6-klon, Immunfluoreszenz von Carlos Enrich (Departamento de Biologia Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona)**



**Abbildung 16:  $\alpha$ -Tubulin im CHO-Wildtyp, Immunfluoreszenz von Carlos Enrich (Departamento de Biologia Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona)**

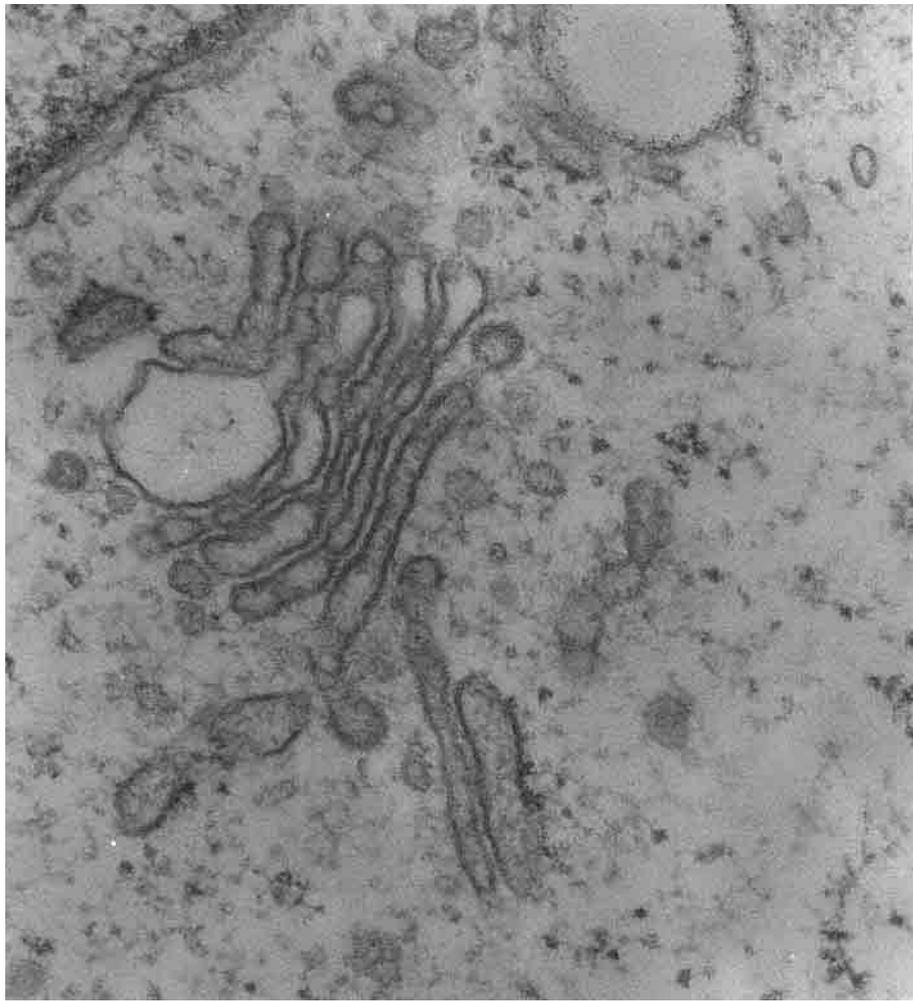


**Abbildung 17:  $\alpha$ -Aktin im CHOanx6-klon, Immunfluoreszenz von Carlos Enrich (Departamento de Biologia Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona)**

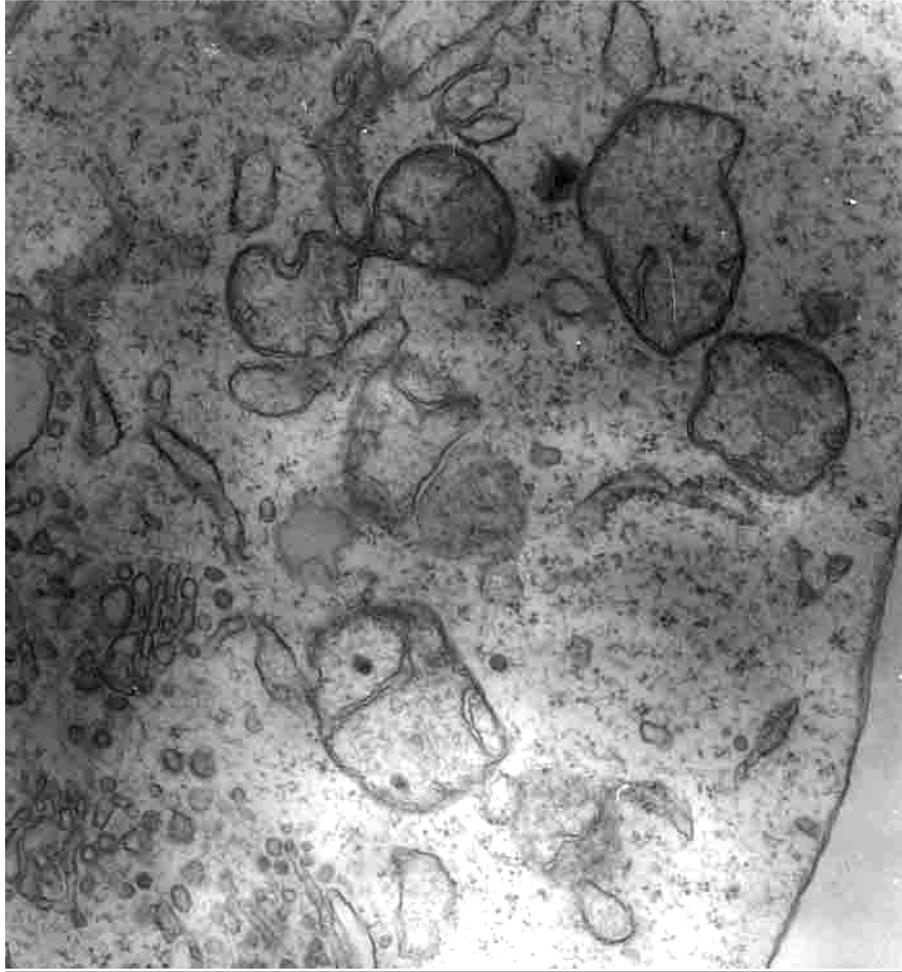


**Abbildung 18:  $\alpha$ -Aktin im CHO-Wildtyp, Immunfluoreszenz von Carlos Enrich (Departamento de Biologia Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona)**

Auf diesen elektronenmikroskopischen Bildern ist kein signifikanter Unterschied in der Lokalisation und Morphologie der Proteine  $\alpha$ -Tubulin und  $\alpha$ -Aktin in beiden Zellreihen zu erkennen. Beide stellen Proteine des Zytoskeletts dar. Auch der Aufbau des Zellinnenraumes scheint sich durch die Überexpression des Annexin VI-Proteins nicht verändert zu haben, wie man auf den folgenden Aufnahmen aus dem Zytoplasma beider Typen ersehen kann:



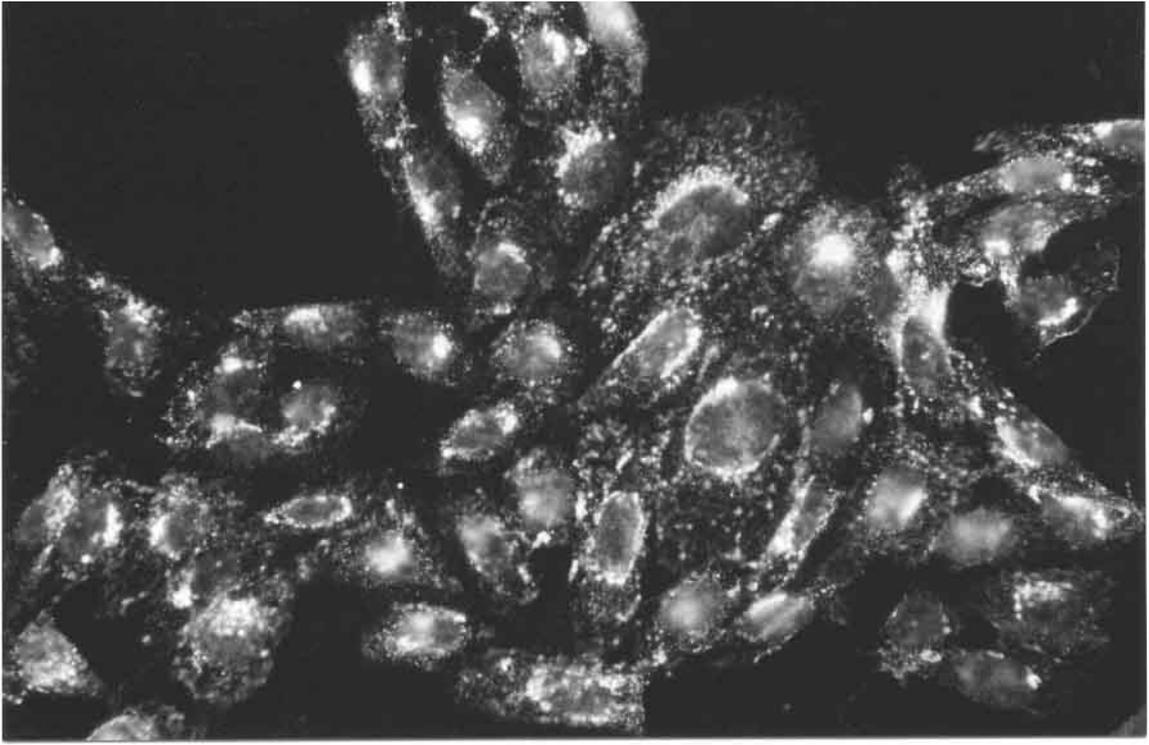
**Abbildung 19: Elektronenmikroskopischer Ausschnitt aus einer CHOanx6-klon Zelle angefertigt von Carlos Enrich (Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona)**



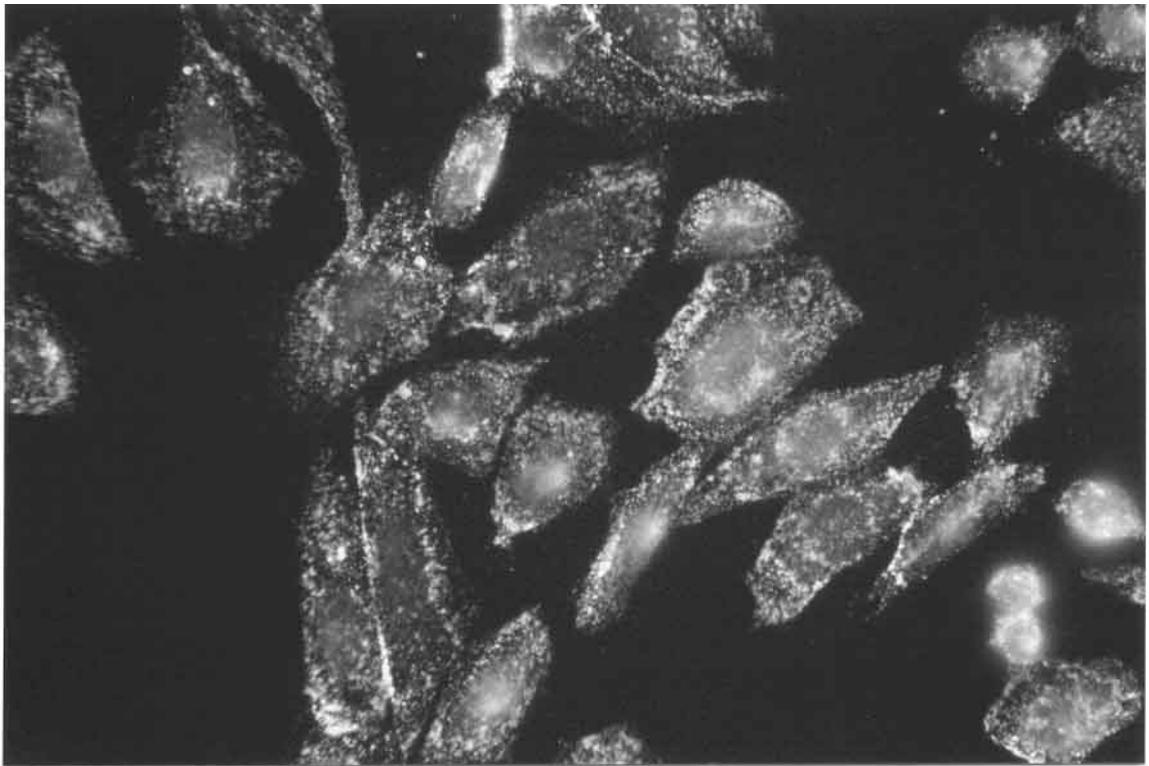
**Abbildung 20: Elektronenmikroskopischer Ausschnitt aus einer CHO-Wildtyp Zelle angefertigt von Carlos Enrich (Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona)**

Die Morphologie des Annexin VI- überexprimierenden Klons scheint nicht verändert.

Dennoch zeigte eine weitere Immunfluoreszenz, bei der das Protein  $\alpha$ -Caveolin in den beiden unterschiedlichen Zelltypen nachgewiesen wurde, ein auffälliges Ergebnis in Bezug auf die Lokalisation dieses Proteins innerhalb der einzelnen Zelle. Im CHOanx6-Klon scheint Caveolin hauptsächlich zellkernnah zu kumulieren, während es im CHO-Wildtyp eine relativ gleichmäßig verteilte Lokalisation im Zytoplasma aufweist:



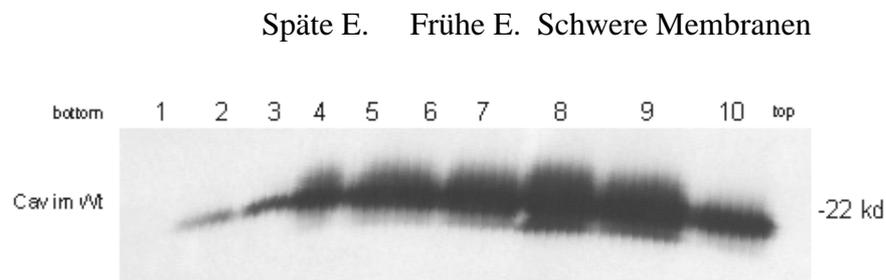
**Abbildung 21:  $\alpha$ -Caveolin im CHOanx6-klon, Immunfluoreszenz von Carlos Enrich (Departamento de Biologia Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona)**



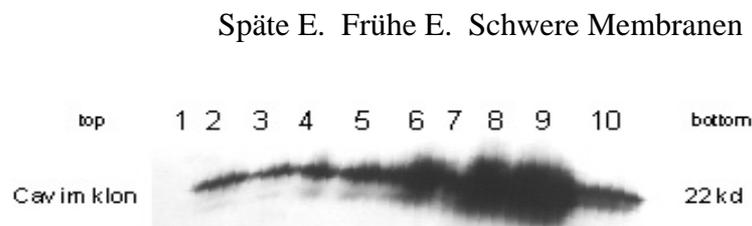
**Abbildung 22:  $\alpha$ -Caveolin im CHOanx6-klon, Immunfluoreszenz von Carlos Enrich (Departamento de Biologia Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona)**

### 3.2.2. Vergleich der Lokalisationen von LRP und Caveolin

Da auf den Fotos der einzige relevante Unterschied der beiden Zellreihen in der Lokalisation von Caveolin lag, sollte in folgenden Experimenten die Lokalisation dieses Proteins in beiden Zellreihen mittels des Sucrosegradienten näher untersucht werden. Dafür wurden von beiden Zelltypen aus je  $4-6 \times 10^7$  Zellen Sucrosegradienten erstellt. Nach der Ultrazentrifugation wurden die 10 einzelnen Fraktionen manuell in rotierender Spezialabnahmetechnik aus dem Zentrifugenröhrchen abgenommen und durch die TCA-Fällung in ihrem Volumen reduziert. Nach Bestimmung des Proteingehaltes und dessen Angleichung wurden sie auf ein 10 prozentiges Poly-Acrylamid-Gel aufgetragen und nach Gelelektrophorese und Westernblotting die Antikörper gegen LRP und Caveolin auf der Nitrozellulose inkubiert.

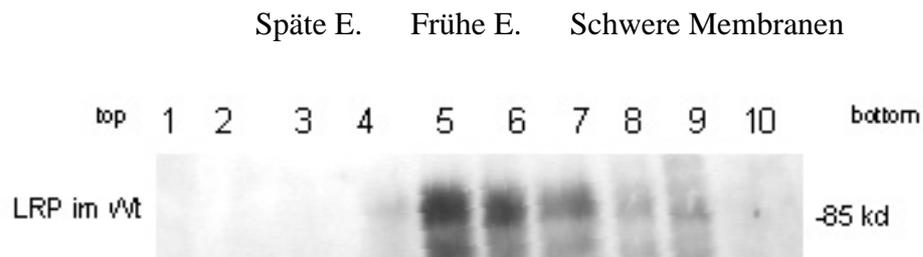


**Abbildung 23:** Nachweis von Caveolin im unbehandelten Gradienten nach subzellulärer Fraktionierung von CHO Wildtyp-Zellen, nach SDS-Page, Westernblotting und ECL-Detektion mit einem primären polyklonalen Kaninchenantikörper gegen Caveolin und einem sekundären Antikörper GaR-Po

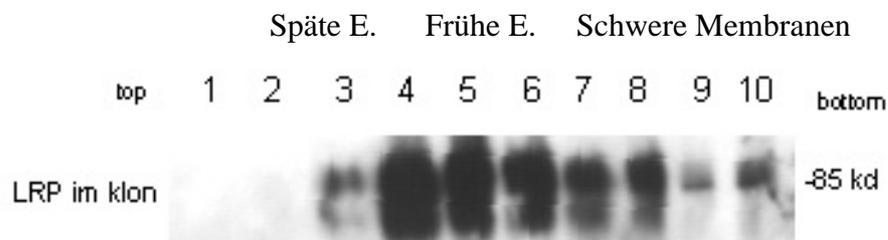


**Abbildung 24:** Nachweis von Caveolin im unbehandelten Gradienten nach subzellulärer Fraktionierung von CHO anx6-Klon-Zellen, nach SDS-Page, Westernblotting und ECL-Detektion mit einem primären polyklonalen Kaninchenantikörper gegen Caveolin und einem sekundären Antikörper GaR-Po

In beiden Zelltypen sah man eine durchgängige Verteilung von Caveolin im Sucrosegradienten. Es war kein prägnanter Unterschied zwischen beiden Caveolinlokalisationen festzustellen. Im nächsten Schritt sollte die Lokalisation des LRPs im Sucrosegradienten beider Zellreihen kontrolliert werden.



**Abbildung 25:** Nachweis von LRP im unbehandelten Gradienten nach subzellulärer Fraktionierung von CHO Wildtyp-Zellen, nach SDS-Page, Westernblotting und ECL-Detektion mit einem primären polyklonalen Kaninchenantikörper gegen LRP und einem sekundären Antikörper GaR-Po



**Abbildung 26:** Nachweis von LRP im unbehandelten Gradienten nach subzellulärer Fraktionierung von CHO anx6-Klon-Zellen, nach SDS-Page, Westernblotting und ECL-Detektion mit einem primären polyklonalen Kaninchenantikörper gegen LRP und einem sekundären Antikörper GaR-Po

Auch zwischen den Lokalisationen des LRP in beiden Zelltypen war kein aussagekräftiger Unterschied auf diesen Ergebnissen zu erkennen. Es schien, als ob die Annexin-Überexpression sich nicht demonstrativ in diesem Verfahren auswirkte. Dennoch war der Unterschied der Caveolin-Lokalisationen auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht zu ignorieren.

### 3.3. Etablierung eines Enzymassays zum Nachweis lysosomaler Proteine

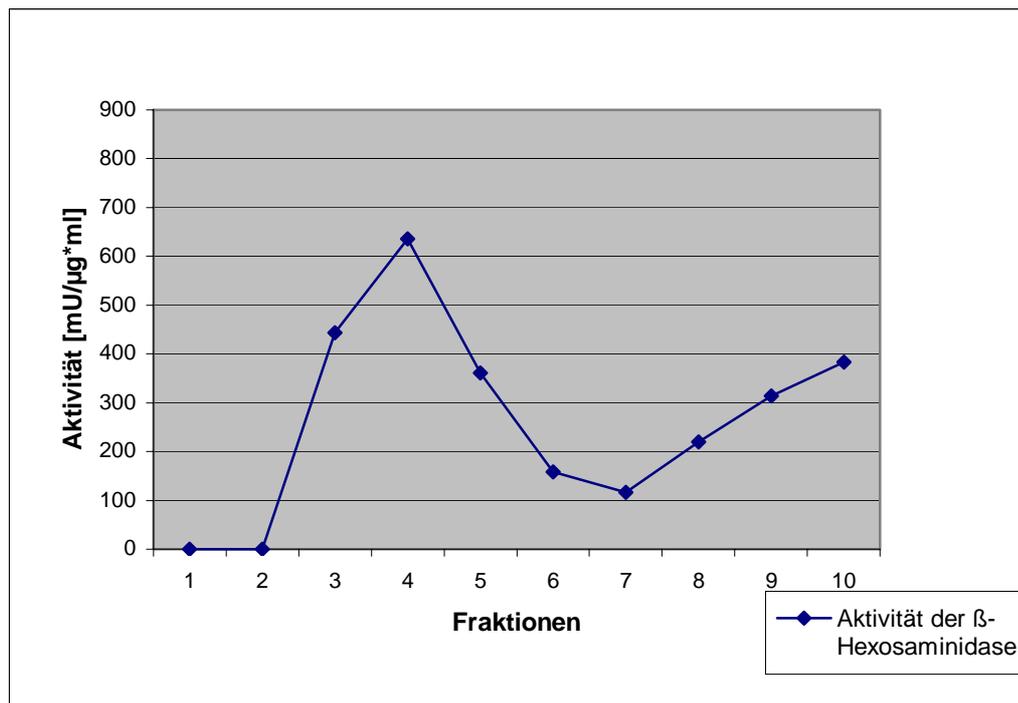
Um die Aussagekraft des Sucrosegradienten und seiner einzelnen Fraktionen zu verstärken, sollte im folgenden Teil der Arbeit ein Enzymassay angewandt werden, der die Aktivität der  $\beta$ -Hexosaminidase in jeder einzelnen Fraktion des Sucrosegradienten mißt. Die  $\beta$ -Hexosaminidase ist ein prälysosomales Enzym und sollte demnach eine besonders hohe Aktivität im Bereich der späten Endosomen, d.h. in den oberen Fraktionen (3-4), aufweisen. Es wurden  $4-6 \times 10^7$  CHOanx6-klon-Zellen nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS in HB-Puffer von dem Zellkulturflaschenboden gekratzt. Daraufhin wurde wie zuvor ein Sucrosegradient erstellt und ultrazentrifugiert. Um die Aktivität des Enzyms in den einzelnen Fraktionen zu bestimmen, wurden je 50  $\mu$ l der Proben des Dichtegradienten nach der TCA-Fällung mit je 100  $\mu$ l der im Methodenteil beschriebenen Substratlösung (10 mM para-Nitrophenyl-2-acetamido-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosid in 0,1 M Natriumcitrat pH 4,6, 0,04%  $\text{NaN}_3$ , 0,2% BSA) bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,5-1,0 ml der Stopplösung (0,4 M Glycin / NaOH pH 10,4) wurde die Extinktion des freigesetzten p-Nitrophenols bei 405 nm im Photometer gemessen. Die Aktivität wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Aktivität [mU/ml]} = \frac{\Delta E_{405} * \text{Meßvolumen [ml]} * 1000}{\epsilon * \text{Enzymvolumen} * \text{Inkubationszeit [min]}}$$

Der molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) für p-Nitrophenol beträgt  $18,5 \text{ cm}^3 / \text{Mol}$  bei 405 nm. Daraufhin wurde die jeweilig gemessene Aktivität auf den Proteingehalt der Probe umgerechnet, wozu vorher eine Proteinbestimmung nach Lowry stattfand.

#### 3.3.1. Charakterisierung der $\beta$ -Hexosaminidaseaktivität in den einzelnen Fraktionen des Dichtegradienten

Im folgenden ist die Aktivitätsbestimmung der  $\beta$ -Hexosaminidase in einem unbehandelten Gradienten des CHOanx 6-kлона dargestellt. Die Grafik zeigt ein charakteristisches Bild, was sich in mehreren Experimenten ähnlich darstellte:



**Abbildung 27:  $\beta$ -Hexosaminidaseaktivität in einem unbehandelten Sucrosegradienten aus  $4-6 \times 10^7$  CHO anx6 klon-Zellen**

Die Grafik zeigt die höchste Aktivität in den Fraktionen 3 bis 5 des Gradienten. Diese Fraktionen beinhalten die späten Endosomen und zeichnen sich durch die hohe Aktivität lysosomaler Enzyme aus.

### 3.3.2. Vergleich der $\beta$ -Hexosaminidaseaktivität in einem mit LDL inkubierten Gradienten

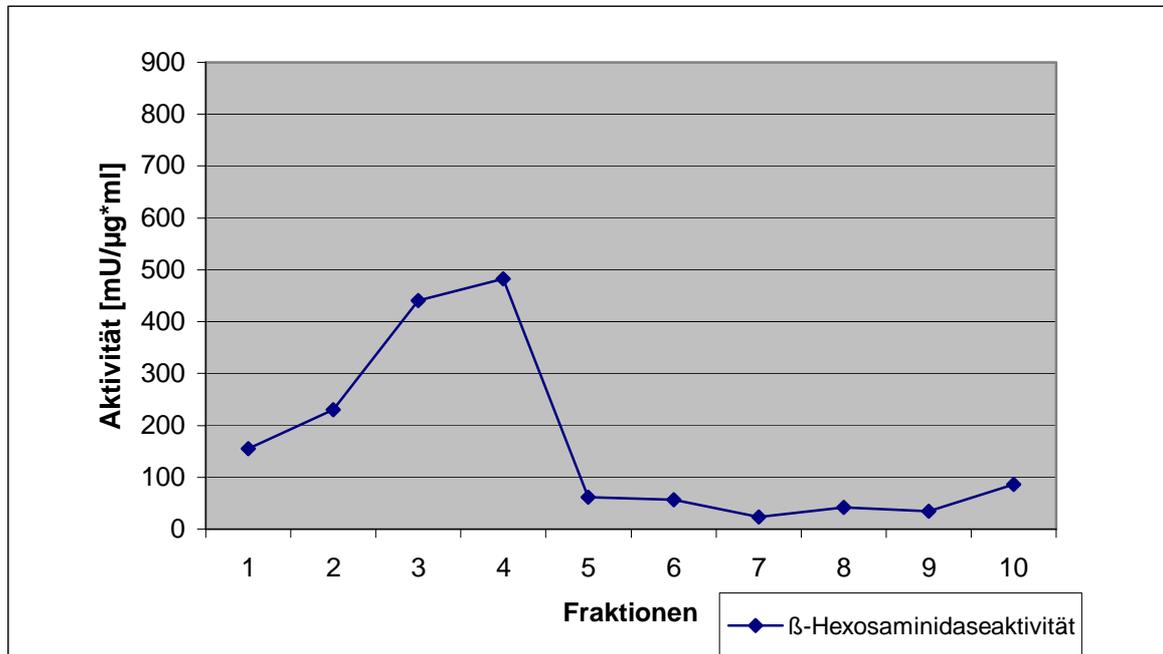


Abbildung 28:  $\beta$ -Hexosaminidaseaktivität eines LDL-behandelten Sucrosegradienten aus  $4-6 \times 10^7$  CHO anx6 klon Zellen

Die Aktivitätsverteilung ändert sich nicht, wenn die Zellen durch Inkubation mit LDL zur Endozytose induziert werden. Dies ist ein Beweis dafür, daß der Gradient seine strukturelle Aufteilung und seine Eigenschaften beibehält, während Annexin VI, wie in 3.1.1.2. gezeigt, seine Lokalisation unter diesen Bedingungen ändert.

### 3.4. Untersuchung der $Ca^{2+}$ -abhängigen Membranbindung von Annexin VI

Da bekannt ist, daß Annexin VI calciumabhängig Phospholipide endosomaler Membranen bindet, soll diese Eigenschaft im Sucrosegradienten bestätigt werden und eventuell Aufschluß darüber gewonnen werden, wohin sich Annexin VI im Gradienten verlagert, wenn dem Milieu der Zellen Calcium entzogen wird.

### 3.4.1. Vergleich der Lokalisation von Annexin VI in +/-EGTA behandelten Gradienten

Um dieses Phänomen zu untersuchen, wurden zwei parallel präparierte postnukleäre Überstände der CHOanx6-klon-Zellen jeweils 60 Minuten mit einer DMSO-Lösung inkubiert, die einmal den Calciumchelatorbildner EGTA enthielt. Anschließend wurde erneut die Lokalisation von Annexin VI im Sucrosegradienten bestimmt. Dabei entstand folgendes Ergebnis:



**Abbildung 29: Nachweis von Annexin VI im unbehandelten Gradienten nach subzellulärer Fraktionierung von CHO anx6-Klon-Zellen, nach SDS-Page, Westernblotting und ECL-Detektion mit einem primären anti-GSTanx6-Antikörper und einem sekundären Antikörper GaR-Po**

Annexin VI ist, wie zuvor bereits untersucht, im gesamten Gradienten nachzuweisen.



**Abbildung 30: Annexin VI im EGTA-behandelten Gradienten nach subzellulärer Fraktionierung von CHO anx6-Klon-Zellen, nach SDS-Page, Westernblotting und ECL-Detektion mit einem primären anti-GSTanx6-Antikörper und einem sekundären Antikörper GaR-Po**

Nach der Behandlung mit EGTA ist das Protein verstärkt nur noch in den Bodenfraktionen (8-10) des Gradienten nachzuweisen. Es hat eine Bewegung des Proteins stattgefunden. Von den zentralen Fraktionen des Gradienten scheint es sich zu den schweren Membranfraktionen verlagert zu haben. Zusätzlich scheint noch ein peak in der Fraktion 5 zu existieren, der hier leider von einer Luftblase überlagert ist.

### 3.5. Cholesterolefflux in CHO-Wildtyp-Zellen und CHOanx6-Zellen

Im letzten Teil der Arbeit soll noch einmal auf die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden CHO-Zellreihen (Anx6-klon und Wildtyp) eingegangen werden. Auf den elektronenmikroskopischen Bildern war eindeutig ein Unterschied der Caveolin-Lokalisationen in den Zellen nachzuweisen. Da Caveolin eine Rolle im Cholesterol-Stoffwechsel der Zellen spielt, soll dieser abschließend noch einmal in beiden Zellreihen untersucht und verglichen werden. Caveolin ist maßgeblich an der Ausschleusung des Cholesterols aus der Zelle beteiligt. Demnach soll genau dieser Vorgang besonders beachtet werden. Es wurden CHO-Wildtyp-Zellen und CHOanx6 Klon-Zellen auf 6 wells ausplattiert und zur Reduktion unspezifischer Bindungsstellen über 24 Stunden in lipoproteindefizientem Medium gehalten. Nach Austausch des Mediums und Zugabe von  $H^3$ -markiertem Cholesterol/LDL wurden die Zellen erneut 24h bei  $37^\circ C$  und 5%  $CO_2$  inkubiert. Dann folgte ein erneuter Austausch des Mediums und eine Zugabe von HDL für einen festgelegten Zeitraum. Nach Abnahme des Mediums und der separaten Überführung von Medium und lysierten Zellen in Scintillationsröhrchen, wurden die  $H^3$ -Counts bestimmt und miteinander verglichen. Auch hier sollen charakteristische, repräsentative Grafiken dargestellt werden, die bei allen Versuchen ähnlich ausfielen:

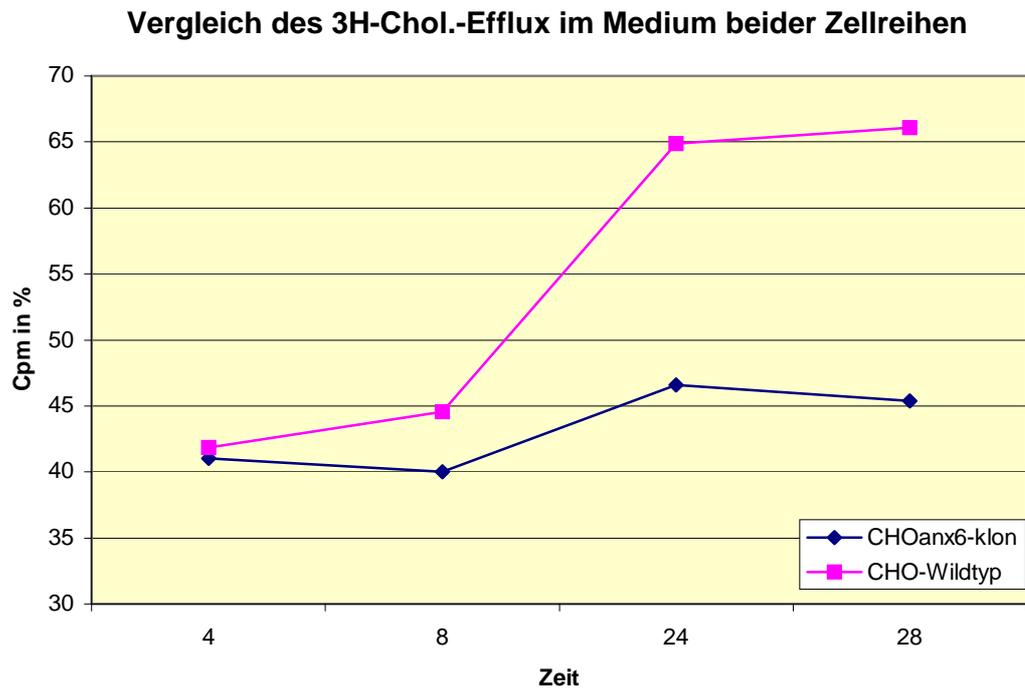


Abbildung 31: Vergleich des 3H-Cholesterol-Efflux im Medium

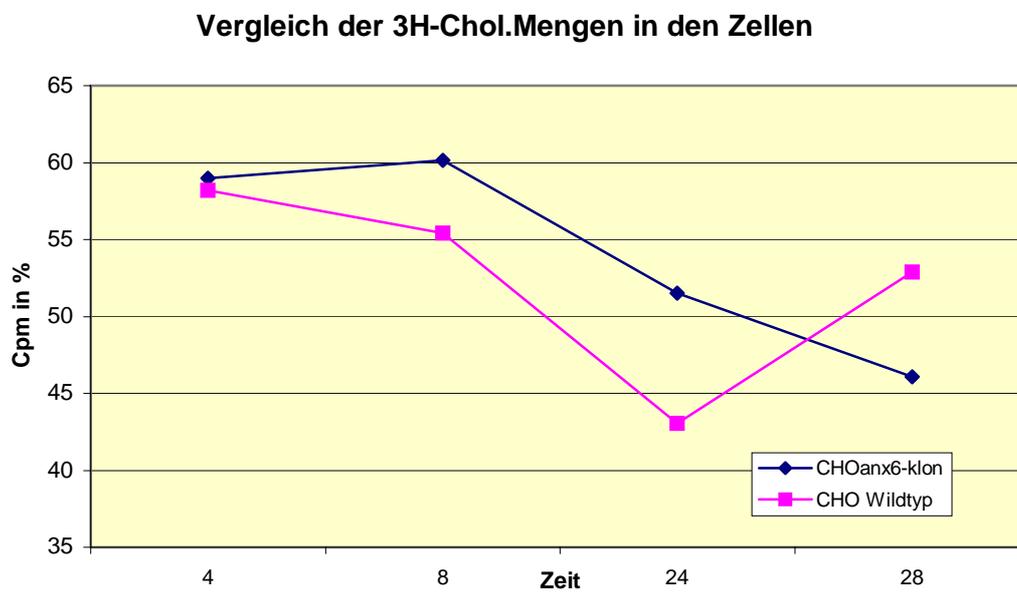


Abbildung 32: Vergleich der 3H-Cholesterolmengen in den Zellen

Anhand dieser Auswertungen ist zu sehen, daß die Ausschleusung im CHO-Wildtyp besser zu funktionieren scheint. Bei diesem Zelltyp ist ab einem Zeitpunkt von acht Stunden nach der Aufnahme eine deutlich höherer Cholesterinanteil im Medium nachzuweisen als im Klon. Auch in den Zellen sieht es so aus, als ob der Wildtyp zunächst schneller ausschleust, denn hier findet sich ein niedrigerer Anteil des Cholesterins in den Zellen. Aber nach einem Zeitraum von ca. 26 Stunden scheint der Klon ebenfalls stärker Cholesterol auszuschleusen. Seine Kurve der intrazellulären Cholesterolmenge überkreuzt sogar stark abfallend die des Wildtypes.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde die Rolle von Annexin VI in endozytotischen Stoffwechselwegen untersucht. Dazu wurde im ersten Teil der Arbeit vor allem mit einer transfizierten Zelllinie gearbeitet, die Annexin VI überexprimiert. Um diese Überexpressionseffekte besonders effektiv zu nutzen, wurden CHO-Zellen gewählt, eine Zellreihe, die nur geringfügig endogenes Annexin VI exprimiert. Diese Zellreihe wurde mit Ratten Annexin VI Plasmid-DNA transfiziert. Das überexprimierte Protein konnte in Western-Blotting-Verfahren und Immunfluoreszenzen mit vier verschiedenen Annexin VI-Antikörpern in dem stabilen CHOanxVI-Klon im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen nachgewiesen werden. Alle vier Antikörper erkennen spezifisch gereinigtes Kälberleber-Annexin VI (Grewal et al., 2000) und endosomales Annexin VI in Rattenhepatozyten (Ortega et al., 1998; Pons et al., 2000). Zum Einstieg in die Thematik soll auf die Lokalisation von Annexin VI innerhalb der Zelle eingegangen werden.

### *4.1. Charakterisierung der Lokalisation von Annexin VI im Dichtegradienten*

Die intrazelluläre Lokalisation von Annexin VI konnte bisher in der Literatur nicht auf bestimmte Zellkompartimente festgelegt werden. Sie wird kontrovers diskutiert, da sie in den unterschiedlichen Zelltypen voneinander abweicht. In einer Vielzahl von Zellen konnte man das Protein größtenteils in der Plasmamembran lokalisieren, wie beispielsweise in Lymphozyten (Owens and Crumpton, 1984) und Hepatozyten (Tagoe et al., 1994; Weinmann et al. 1994). Bei der Isolation endosomaler Fraktionen aus Ratten-Hepatozyten jedoch, waren im Bereich der Plasmamembranen nur geringe Mengen Annexin VI zu detektieren (Jäckle et al., 1994). Hier lag das 68 kD große Protein hauptsächlich im Bereich der Endosomen angereichert vor. Eine mögliche Erklärung für den Unterschied zu den Ergebnissen von Tagoe et al., 1994, könnte in diesem Fall sein, daß sich die frühen Endosomen hier bereits von der Plasmamembran gelöst haben. Eine weitere Ursache dieser Entdeckung könnte auch in dem Verfahren der Aufreinigung der Plasmamembranen liegen.

In Muskelzellen konnte Annexin VI 1991 sogar zusammen mit dem endoplasmatischen Retikulum (Hazarika et al., 1991) detektieren. All diese Ergebnisse sprechen für eine weitverbreitete intrazelluläre Lokalisation des Proteins.

Verschiedene Versuchsansätze zur Lokalisationsbestimmung von Annexin VI innerhalb der Zelle wurden bisher genutzt. So wurde der Ansatz der subzellulären Zellfraktionierung schon mehrmals eingesetzt, um eine Aussage über die genaue Lokalisation von Annexin VI in der Zelle treffen zu können. Desjardins et al. konnten 1994 mit dieser Methode durch die Fraktionierung von J774 Makrophagen das Protein in Phagosomen der Zellen nachweisen. 1994 erarbeiteten Jäckle et al. mittels der subzellulären Fraktionierung die Lokalisation von Annexin VI in endosomalen Membranen. Annexin VI scheint, all diesen Untersuchungen nach, auf einer Vielzahl von Zielmembranen vorhanden zu sein und von dort aus seine Funktionen in Bezug auf die Regulation verschiedener Interaktionsprozesse zu erfüllen.

Auch in dieser Arbeit wird die Methode der subzellulären Fraktionierung genutzt, um der Frage nach der Lokalisation von Annexin VI nachzugehen. Nach dem Verfahren von Gorvel et al., 1991, werden jeweils  $4-6 \times 10^7$  CHOanx6 Zellen aufgearbeitet, um einen Sucrosegradienten herzustellen. Der Sucrosegradient trennt frühe und späte endosomale Fraktionen von denen der Plasmamembranen und anderer Membranen. Zunächst erfolgt durch das mehrmalige Ziehen der Zelllösung durch eine feine Kanüle ein Aufbruch der Zellmembran der CHOanx6-Zellen. Die nicht zu untersuchenden Zellbruchstücke werden im nächsten Schritt während einer Zentrifugation bei 3400 rpm auf den Boden des Gefäßes befördert, so daß der postnukleäre Überstand, der alle wichtigen Fraktionen der Zellbestandteile (frühe und späte Endosomen, schwere Membranen) besitzt, getrennt von diesen Zelltrümmern in den Sucrosegradienten eingebracht werden kann. Durch die übereinander geschichteten verschieden konzentrierten Sucroselösungen entsteht während der Ultrazentrifugation ein Dichtegradient und ermöglicht eine Auftrennung der zellulären Bestandteile nach ihrer Dichte. Im Anschluß daran wurde durch die vorsichtige Abnahmetechnik der Gradient von oben nach unten in zehn einzelne Fraktionen unterteilt. Wie auf den elektronenmikroskopischen Bildern der einzelnen Fraktionen in Kapitel 3.2.1. deutlich wird, sind alle Bestandteile nach dieser Zentrifugation bei 35.000 rpm noch vollständig erhalten. Sowohl frühe Endosomen wie auch die Membranen sind klar und deutlich auf den Fotos zu erkennen. Sie sind demnach nicht durch das mehrmalige Ziehen durch die Kanüle beschädigt worden.

Die einzelnen Proben wurden nach der Ultrazentrifugation zur Volumenreduktion einer TCA-Fällung unterzogen. Dies ist notwendig, um möglichst große Proteinmassen auf das Gel auftragen zu können und später starke Signale bei der Immunodetektion zu erhalten. Nachdem

die Proteine dieser zehn Fraktionen durch ein Acrylamid-Gel ihrer Größe nach getrennt wurden, ist im folgenden Schritt nach dem Western-Blotting-Verfahren das Annexin VI Protein durch die Immunodetektion im Gradienten nachgewiesen worden. In Kapitel 3.1.1.1. zeigt das Ergebnis eine breite Verteilung des Proteins über den gesamten Gradienten. Die größte Menge jedoch läßt sich im Bereich der Bodenregion nachweisen. In dieser Region liegen hauptsächlich schwere Membranen wie beispielsweise Plasmamembranen vor.

Auch in der Literatur wird die Lokalisation von Annexin IV vor allem in der Plasmamembran beschrieben. So wird das Protein in polaren Epithelzellen stark exprimiert und wurde primär mit der Plasmamembran assoziiert vorgefunden, dabei aber jeweils in verschiedenen Membrandomänen. In Enterozyten und Epithelzellen der Lunge konzentrierte es sich an der basolateralen Plasmamembran, während es in renalen Epithelzellen an der apikalen und der basolateralen Plasmamembran und in den epithelialen Zellen des Uterus nur noch in der apikalen Membran zu finden war.

Auch das GTP-bindende Protein Dynamin, welches vorwiegend in Plasmamembranen und Clathrin Coated Pits zu finden ist, konnte durch Grewal et al., 2000, nach dem gleichen Verfahren bereits in der Bodenregion des Gradienten nachgewiesen werden. Dies geht konform mit der Aussage der Studie von Turpin et al., 1998, in der bereits eine Interaktion zwischen den Proteinen Annexin VI und Dynamin in bestimmten clathrin coated vesicles beschrieben wurde. Diese Interaktion konnte nur in den LCVs ( large coated vesicles) nachgewiesen werden, die als „endozytische, Transferrin-Rezeptor-positive“ Vesikel bezeichnet werden. Annexin VI könnte nach diesen Untersuchungen eine spezifische Protein-Lipid Interaktionsdomäne definieren, die eine wichtige Rolle für verschiedene Funktionen der clathrin coated vesicles darstellt und damit maßgeblich an der Endozytose beteiligt ist.

Die allgemeinen Eigenschaften der Annexine, insbesondere die calciumabhängige Bindung an saure Phospholipide, wurden stets präferentiell in zytosolischen Anteilen zellulärer Membranen gefunden, was auf eine Funktion dieser Proteine im Bereich der intrazellulären membranbezogenen Ereignisse schließen läßt. Die Annexine erfüllen diese Funktionen in erster Linie durch Organisation und Stabilisierung bestimmter Membrandomänen. Diese Membranorganisation wird primär gefordert bei Lipidregulationen, einschließlich des Metabolismus von lipid-enthaltenden Inositolphosphaten, Formation oder Modulation von Ionenkanälen und der Organisation von Elementen des Zytoskeletts. Daher läßt sich dieses erhaltene Ergebnis zur Lokalisation von Annexin VI innerhalb der CHOanx6-klon Zellen in

die bereits bestehende Literatur einreihen und stellt keinen Widerspruch zu bisher vorliegenden Daten dar.

Im Gegensatz zu diesem plasmamembrankonzentrierten Proteinpool allerdings, der auch hier in CHOanx6-klon-Zellen in 3.1.1.1 nachgewiesen wurde, fand man dagegen eine endosomale Anreicherung von Annexin IV in J774 Makrophagen und BHK-Zellen vor (Gerke and Moss, 1997). Auch diese endosomale Anreicherung kann durch das Ergebnis aus 3.1.1.1 bestätigt werden. Man vermutet die Lokalisation der frühen Endosomen in den Fraktionen 4-6 des Gradienten. Auch hier ist das Annexin VI-Protein eindeutig zu detektieren. Es scheint in diesen Fraktionen sogar ein zweiter peak vorhanden zu sein, da die Intensität gegenüber den Fraktionen 7 und 8 erhöht ist.

#### 4.1.1. Die Lokalisation des Annexin 6-Proteins im Vergleich zu Rab 4, dem LDL-Rezeptor, dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, LRP und Caveolin und im Dichtegradienten

Für exakte Aussagen über die Lokalisation von Annexin VI im Dichtegradienten und vor allem zur Charakterisierung der einzelnen Fraktionen des Gradienten sollten neben der Nutzung der Aussagekraft der elektronenmikroskopischen Bilder auch weitere Faktoren zugezogen werden. Dazu eignete sich die Lokalisationsbestimmung bestimmter Markerproteine. So wurden in den folgenden Experimenten wie zuvor bei der Lokalisationsbestimmung von Annexin VI innerhalb des Sucrosegradienten verfahren, jedoch wurden im letzten Schritt des Experimentes Antikörper gegen bestimmte Markerproteine auf der Nitrozellulose-Membran inkubiert. Begonnen wurde mit dem frühen Endosomen-Marker Rab 4. Die Bestimmung der Lokalisation der Rab-Proteine ist besonders sinnvoll, um bestimmte Populationen von Endosomen zu identifizieren, da besonders Rab-Proteine präferentiell assoziiert mit bestimmten Organell-Typen vorliegen. Während Rab 5 den initialen Schritt des Transportes internalisierten Materials zu den frühen Endosomen reguliert, ist Rab 4 an der Regulation des „recyclings“ dieses Kompartimentes beteiligt (McCaffrey et al., 2001). Nach der Herstellung und dem Westernblotting des Proteingels wurde zuerst ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Rab 4 eingesetzt, der daraufhin von einem sekundären GaR-Po detektiert wurde. Das Ergebnis zeigte zwei peaks, an denen Rab 4 besonders hoch konzentriert nachzuweisen war. Man konnte das 31 kD große Protein einmal

in der Bodenfraktion der schweren Membranen und zusätzlich in den Fraktionen der Mitte des Gradienten, die vermutlich die frühen Endosomen darstellen, detektieren. Da Rab 4 bekanntlich als ein Markerprotein früher Endosomen gilt, konnte die Annahme durch dieses Ergebnis bestätigt werden, daß es sich bei den Fraktionen 4 bis 6 um Fraktionen früher Endosomen handelt. Rab 4 ist impliziert in den Transport von frühen Endosomen zur Zelloberfläche. Ihm wird eine Funktion in der Regulation des Transportes von den sortierenden zu den rezyklierenden Endosomen zugeschrieben, insbesondere unterliegt ihm auch das „recycling“ des Transferrinrezeptors (McCaffrey et al., 2001). Der zweite peak im Bereich der schweren Plasmamembranen könnte darauf hinweisen, daß hier das Rab 4 detektiert wurde, das neben dem sortierenden Kompartiment auch im rezyklierenden Kompartiment vorhanden ist, und durch den engen lokalen Zusammenhang der Plasmamembran mit diesem rezyklierenden Zellkompartiment innerhalb des Sucrosegradienten in diesem Bereich noch nachgewiesen werden konnte.

Auch der LDL-Rezeptor wurde mit Hilfe dieser Methode im Sucrosegradienten detektiert. Bei einer Größe von 160 kD des Rezeptors wurde hier allerdings ein 5 %iges Acrylamid-Gel benutzt, um nach dem Westernblotting und der Immunodetektion ein detaillierteres Bild des Proteins zu erhalten. Den LDL-Rezeptor detektierte man in den Fraktionen 4-10, was für eine Verteilung sowohl in den frühen Endosomen als auch in der Plasmamembran spricht. In den späten Endosomen sollte der LDL-Rezeptor nicht mehr zu detektieren sein. Dieser wird nach der Dissoziation von seinem Liganden (LDL) im „Sortierenden Kompartiment“ mit Hilfe der „Rezyklierenden Endosomen“ zurück an die Zelloberfläche geschleust, um dort erneut LDL zu binden. Der dissoziierte Ligand (LDL) verbleibt in den „sortierenden Endosomen“ und wird daraufhin in späten Endosomen und Lysosomen degradiert (Mukherjee et al., 1997).

Auch das „LDL-receptor related protein“ (LRP) wurde in dieser Studie nach dem gleichen Verfahren im Sucrosegradienten nachgewiesen. Seine Lokalisation war maßgeblich in den Fraktionen 7-10 und 4 und 5 zu detektieren. Auch hier liegt das untersuchte Protein wie bereits der LDL-Rezeptor hauptsächlich in den Fraktionen der Plasmamembranen und der frühen Endosomen vor.

Der LDL-Rezeptor und das Protein LRP sind für die hochaffine Bindung und Aufnahme von zirkulierenden Lipoproteinen in die Zellen verschiedener Gewebe verantwortlich. Sie liegen

in den Coated Pits der Plasmamembran vor und folgen den internalisierten Molekülen auf ihrem Endozytoseweg in die frühen und rezyklierenden Endosomen.

LRP, das „LDL-receptor related protein“, ist 600 kD groß und besteht aus einer 515 kD und einer 85 kD großen Untereinheit. Dieser Plasmamembranrezeptor ist vor allem wegen seiner multifunktionalen Eigenschaft der Ligandenerkennung wichtig. LRP vermittelt die Bindung und die Endozytose mehrerer strukturell und funktionell unterschiedlicher Liganden, einschließlich der Chylomikronen-Remnants, Apolipoprotein E-reicher  $\beta$ -VLDL, aktivierten  $\alpha_2$ -Mikroglobulins und vieler anderer Moleküle. Ein 39 kD großes rezeptor-assoziiertes Protein (RAP) an seiner Seite zeigt eine modulierende Aktivität in Bezug auf die Ligandenbindung des Rezeptors.

Späte Endosomen werden häufig definiert als Organellen, denen Transferrin und andere Recycling Komponenten fehlen, aber die den Mannose-5-Phosphat-Rezeptor enthalten. Da der CI-MPR nie in die Lysosomen eintritt, kann diese Tatsache als Kriterium genutzt werden, zwischen späten Endosomen und Lysosomen zu unterscheiden. Der Nachweis des 215 kD großen, kationenunabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptors im Sucrosegradienten zeigte eine Verteilung in den Fraktionen 5 bis 8. Dies beweist die Lokalisation auch in den späten Endosomen. Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor wird hauptsächlich auf der Plasmamembran, in den frühen und späten Endosomen und im TGN gefunden. Lysosomale Enzyme, gebunden an den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, betreten direkt vom Trans Golgi Netzwerk kommend die späten Endosomen. Freie Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren werden nach dem Entlassen der lysosomalen Enzyme zum TGN rezykliert. Die Lysosomen, deren Enzyme durch das vorherrschende pH-Optimum hier ihre höchste Aktivität besitzen, degradieren die entlassenen Liganden und speichern das unverdauliche Material.

Als letztes Protein sollte Caveolin im Sucrosegradienten nachgewiesen werden. Das Protein, Caveolin, besitzt eine Größe von 21-24 kD und beinhaltet eine hydrophile  $\text{NH}_2$ - und eine  $\text{COOH}$ -terminale Domäne, die in das Zytosol hineinragen. Die zentrale Domäne von 33 hydrophoben Aminosäuren dagegen ist in einer Haarnadel-Konfiguration in der Lipidphase der Membran verankert. Der Hauptteil dieser Proteine ist in den Caveolae auf der Zelloberfläche und auf den Golgi-Membranen lokalisiert. Nach Pol et al., 1998, wurde auch eine Lokalisation von Caveolin in Endosomen nachgewiesen. Dies scheint auch die Verteilung des Proteins im Sucrosegradienten widerzuspiegeln. Das Protein ist in jeder Fraktion des Gradienten nachweisbar. Die unterschiedliche Intensität, die in Abbildung 11

zwischen den einzelnen Fraktionen zum Vorschein kommt, ist vermutlich korrelierend mit der jeweils enthaltenen Proteinmenge der Probe.

Die Struktur der Caveolae auf der Plasmamembran hängt vom Cholesterin ab. Caveoline wurden als Cholesterin-bindende Proteine entdeckt, die in Detergenzien-resistenten Membran-Remnants vorliegen, die generell als Abkömmlinge sphingolipid-cholesterin-haltiger Rafts interpretiert werden. Typische Raft-Marker wie Glycosylphosphatidylinositol Proteine und Glycosphingolipide wurden unter speziellen Bedingungen in Caveolae entdeckt. Dies und andere indirekte Beweise lassen vermuten, daß Caveolae spezielle Sphingolipid-Cholesterin-Rafts sind (van Meer, 2001). In der Golgi-Membran besitzt Caveolin-1 eine Rolle in Lipid- und Proteinsortierungsprozessen zur apikalen Plasmamembran hin. Zusätzlich hat die interessante Entdeckung zytosolischer Signalmoleküle in den Caveolae zu einer Vermutung geführt, nach der Caveolae Zelloberflächen-Domänen darstellen, in denen die Signale teilweise durch den physikalischen Zustand der Lipide reguliert werden.

#### 4.1.2. Diskussion der Aussagekraft des Dichtegradienten durch Einbeziehung der Werte der $\beta$ -Hexosaminidaseaktivität

Um die Aussagekraft des Sucrosegradienten weiterhin zu untersuchen und zu bestätigen, und auch die allgemeinen Veränderungen durch äußere Einflüsse wie bzw. LDL-Inkubation zu erfassen, sollte neben den elektronenmikroskopischen Bildern und dem Nachweis der Markerproteine ein Enzymassay etabliert werden, nach dem die Fraktionen des Gradienten charakterisiert werden können. Es wurde die Aktivität der  $\beta$ -Hexosaminidaseaktivität in jeder Probe direkt nach der Abnahme der Proben aus dem Ultrazentrifugen-Tube gemessen. Die  $\beta$ -Hexosaminidase stellt ein lysosomales Protein dar, das demnach die stärkste Aktivität in Lysosomenfraktionen aufweisen sollte. Lysosomale Enzyme, im Golgi Apparat synthetisiert, betreten, an den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor gebunden, direkt vom Trans Golgi Netzwerk kommend die späten Endosomen. Wie man aus der Grafik in Abbildung 27 in 3.3.1 ersehen kann, konnte im Verlauf dieser Studie ein Peak der Enzymaktivität in den Fraktionen 4 und 5 nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist ein weiterer eindeutiger Hinweis darauf, daß in den Fraktionen 4 und 5 die späten Endosomen und Lysosomen vorliegen. Auch nach der LDL-Inkubation ist (Abb. 28) die  $\beta$ -Hexosaminidaseaktivität in den gleichen Fraktionen nachzuweisen wie zuvor, was ein Zeichen für die Stabilität des Gradienten unter dieser Bedingung darstellt. Die Lysosomen stellen die letzte Station des Transportes der Moleküle

auf ihrem Degradationsweg dar. Sie beinhalten, bei einem pH-Wert von 5,0-5,5, endozytierte unverdauliche flüssige Phase-Marker wie Dextrane, aber ihnen fehlt der CI-MPR. Daher ergibt sich die Definition der Lysosomen als „CI-MPR-negative Kompartimente“, was sehr hilfreich bei der Abgrenzung gegenüber später Endosomen erscheint. Ein Großteil der Hydrolyse internalisierten Materials findet vermutlich in Organellen statt, die heute als späte Endosomen klassifiziert werden, noch vor einigen Jahren jedoch zu der Gruppe der Lysosomen gerechnet wurden. Der Transport des endosomalen Inhaltes zu den Lysosomen scheint durch die Fusion später Endosomen mit vorexistierenden Lysosomen zu funktionieren. Es wurde sogar von bidirektionalem Verkehr des löslichen Materials zwischen späten Endosomen und Lysosomen berichtet (Jahraus et al., 1994).

Nach neueren Ergebnissen werden auch Glycosphingolipide (GSLs) aus der Plasmamembran in den sauren Kompartimenten der Zellen degradiert. Sie erreichen die Lysosomen als membrangebundene Komponenten intraendosomaler und intralysosomaler Vesikel. Durch Faktoren wie Membranform, Membrandruck und Lipidkomposition sind solche intralysosomalen Vesikel mit einem Durchmesser von 50-100 nm leichter angreifbar für lysosomale Hydrolasen als wenn die GSLs in der Außenmembran verankert wären. Die Degradation dieser GSLs mit kurzen Oligosaccharid-Kopfgruppen und Ceramid erfordert zwei Proteine: eine wasserlösliche lysosomale Sphingolipid-Hydrolase und ein Sphingolipid-Aktivatorprotein., wobei das Aktivatorprotein die Interaktion der Hydrolase mit ihrem membrangebundenen Substrat vermitteln soll. Werth et al. veröffentlichten im Januar 2001 eine Studie, in der sie Degradation des membrangebundenen Gangliosids GM2 durch wasserlösliche  $\beta$ -Hexosaminidase A in Anwesenheit des GM2 Aktivatorproteins studierten. Ihre Ergebnisse zeigten, daß anionische Lipide wie die lysosomalen Komponenten Bis-(mono-acylglycero)phosphat oder Phosphatidylinositol die Degradation von GM2 durch die  $\beta$ -Hexosaminidase A bis zu 180-fach in Anwesenheit des GM2-Aktivatorproteins stimulierten. Bisher kennt man drei verschiedene Isoenzyme der humanen  $\beta$ -Hexosaminidase. Alle bestehen aus unterschiedlichen Kombinationen zweier nicht kovalent gebundener, strukturell verwandter Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$ . Das  $\beta$ -Homodimer wird  $\beta$ -Hexosaminidase B genannt, das  $\alpha$ -Homodimer ist die  $\beta$ -Hexosaminidase S, und das  $\alpha,\beta$ -Heterodimer stellt die sogenannte  $\beta$ -Hexosaminidase A dar.

#### 4.1.3. Veränderung der Lokalisation von Annexin 6 nach 120 min LDL-Inkubation

Aktuelle Studien sprechen von einem dynamischen Verhalten von Annexin VI im Membranverkehr (Grewal et al, 2000). Um diese Eigenschaft zu zeigen, wurden im nächsten Experiment CHOanx6-klon-Zellen mit zusätzlich eingebrachtem LDL in der üblichen Nährlösung für einen Zeitraum von 120 min inkubiert, bevor sie in HB-Puffer mit Pic von dem Zellkulturflaschenboden gelöst und nach der üblichen Vorgehensweise in den Sucrosegradienten eingefügt wurden. Dadurch sollten die Zellen künstlich durch ein Überangebot an Nährstoffen in ein Aufnahmestadium versetzt werden. Wie im vorhergehenden Experiment erhielt man nach Westernblotting des Proteingels und Immunodetektion mit Antikörpern gegen Annexin VI ein Ergebnis, welches die Lokalisation des Proteins unter diesen veränderten Bedingungen zeigte. Es war eindeutig eine Veränderung der Lokalisation aufzufinden. Das Annexin Protein verlagerte sich unter diesen Umständen von dem Bereich der schweren Membranen in den Fraktionen 9 und 10 hin zu den Fraktionen 7 und 8, dem Bereich der späten Endosomen. Bereits Grewal et al. beschrieben 2000 diesen Effekt. Sie führten dieses Experiment zusätzlich mit einer 5 min LDL-Inkubation durch und erreichten hiermit eine Verlagerung des Proteins hin zu den frühen Endosomen. Diese Ergebnisse ließen eindeutig eine Involvierung von Annexin VI in den Endozytoseablauf vermuten. Um diese Annahme zu festigen und näher zu untersuchen, induzierten Grewal et al. in CHOanx6-klon-Zellen durch  $^{125}$ I-LDL-Inkubation für 5 und 120 min die Endozytose. In Kontrollzell-Gruppen (0 min  $^{125}$ I-LDL) und auch nach 120 min LDL-Administration konnten die Proteine Rab 4 und Dynamamin stets in den gleichen Fraktionen des Gradienten identifiziert werden. Auch das beinahe identische Profil der  $\beta$ -Hexosaminidaseaktivität zu allen Zeitpunkten im Gradienten festigten die Stabilität und Reproduzierbarkeit dieser subzellulären Fraktionierung. Nach 5 min  $^{125}$ I-LDL-Inkubation wurde das internalisierte  $^{125}$ I-LDL hauptsächlich in den frühen Endosomen-Fraktionen des Gradienten gefunden. Später, 120 min nach der Administration des radioaktiv markierten LDL, akkumulierte  $^{125}$ I-LDL in den späten endosomalen Fraktionen. Dieses Ergebnis zeigte sich genau parallel zu der Veränderung der Lokalisation von Annexin VI im Sucrosegradienten nach 120 min LDL-Inkubation.

#### 4.2. Beschreibung der Lokalisationsänderung von Annexin VI nach Behandlung des Gradienten mit EGTA

Eine Veränderung der Lokalisation von Annexin VI im Sucrosegradienten war auch nach Calciumentzug zu erwarten, da Annexin VI bekanntlich calciumabhängig negativ geladene Phospholipide von Membranen bindet. Um dieses Phänomen zu untersuchen, wurde der postnukleäre Überstand der CHOanx6-klon-Zellen bei diesem Experiment 60 Minuten mit dem Calciumchelatorbildner EGTA inkubiert und schließlich die Lokalisation von Annexin VI im Sucrosegradienten bestimmt. Nach der Behandlung mit EGTA konnte das Protein im Gegensatz zu vorher, wo es verteilt über den gesamten Gradienten nachweisbar war, nun verstärkt nur noch in den Bodenfraktionen (8-10) des Gradienten nachgewiesen werden. Annexin VI scheint sich von den frühen Endosomen gelöst zu haben und sich in die Region der Plasmamembranen verlagert zu haben. Dies könnte bedeuten, daß nur die Bindung an Endosomen-Membranen calciumabhängig ist, während die Bindung an die Plasmamembran auch ohne Anwesenheit von Calcium ausgebildet wird. Die Membranbindung von Annexin VI ist vermutlich abhängig von der Zusammensetzung der Membran aus Phospholipiden und bestimmten Proteinen. Edwards und Crumpton (1991) stellten den Verdacht, daß die relative Bindungsaffinität der Annexine für unterschiedliche Phospholipide in Größe und Aufbau der jeweiligen Kopfgruppen erklärbar seien. Beispielsweise ist die Cholin-Struktur in Phosphatidylcholin groß und hydrophob im Vergleich zu der von Ethanolamin in Phosphatidylethanolamin oder auch der von Serin in Phosphatidylserin. Eventuell verhindert diese große Kopfgruppe eine nahe Assoziation der Phosphatgruppe mit dem Protein für eine calciumabhängige Bindung. Diese Erklärung gilt auch für die relativ seltene Bindungen der Annexine mit Phosphatidylinositol und Phosphatidyl-bisphosphonat. Aromatische Seitenketten, die durch die Calciumbindung expositioniert werden können, stabilisieren vermutlich die Assoziation von Protein und Phospholipid, wenn diese erst einmal eine Bindung eingegangen sind. Es müßte also der Aufbau der einzelnen Membranen (Plasmamembran und Endosomenmembranen) aus diesen Phospholipiden geprüft und miteinander verglichen werden, um aus diesen Erkenntnissen Schlüsse auf das unterschiedliche Verhalten von Annexin VI an den Membranen nach Calciumentzug ziehen zu können. Edwards und Crumpton diskutierten, daß die Assoziation einiger Annexine mit dem subkortikalen Membranskelett und ihre Kapazität, sowohl Fettsäuren als auch

Phospholipide zu binden, eine Rolle dieser Proteine als bestimmte „Membran-Anker“ für zytoskelettale Elemente vermuten läßt. Diese Art von Membranbindung und seine potentielle Rolle durch Änderungen des Phosphorylationsstatus und durch die Ca-Konzentration könnte eine wichtige Rolle in Prozessen wie Endo- und Exozytose spielen. In einer Studie von Turpin et al., 1998, wurde die Lokalisation von Annexin VI in den Clathrin coated pits untersucht. Man fand das Protein in den Membranen aller drei Vesikel-Populationen („small, medium, large coated vesicles“). Diese Membranbindung an die Vesikel erwies sich als calciumunabhängig, da sich das Annexin-Protein durch die Behandlung mit EGTA nicht lösen ließ, jedoch zeigt sich eine Abhängigkeit der Bindungsstärke von der Anreicherung negativ geladener Phospholipide in den Membrandomänen. Diese Erkenntnisse ließen sich erklären durch eine vermutlich nur vorübergehende calciumabhängige Bindung des Annexins an die Phospholipide der Membran. Die weitere Stabilisation der Bindung jedoch scheint calcium-unabhängig zu sein und durch Bindung an weitere Bestandteile der Membran fixiert zu werden. Auch Tagoe et al. sprachen 1994 von dieser Überlegung in Bezug auf die Bindung an Plasmamembranen in Rattenleberzellen.

Jäckle et al. konnten 1997 eine calciumabhängige Bindung an frühe Endosomen nachweisen, bei der sich Annexin VI durch die Behandlung mit EGTA vollständig von der Endosomenmembran löste. Dies wäre wiederum eine Bestätigung des Ergebnisses, daß im Sucrosegradienten sichtbar wurde.

#### *4.3. Diskussion und Erklärungsansätze zu dem unterschiedlichen $H^3$ -Cholesterol/LDL-Effluxverhalten von CHO-Wildtyp-Zellen und CHOanx6klon-Zellen*

Im zweiten Abschnitt der Arbeit erfolgte ein Vergleich zwischen der CHO-Wildtyp-Zellreihe und der CHOanx6-klon-Zellreihe. Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen beider Zelltypen wurden verschiedene Proteine von Carlos Enrich untersucht und miteinander verglichen. Auffällig erschien jedoch nur ein einziges Protein: Die Lokalisation von Caveolin war in den beiden Zellreihen unterschiedlich. Auf dieses Phänomen aufbauend wurde Caveolin in beiden Zelltypen im Sucrosegradient detektiert und die Ergebnisse miteinander verglichen (Abb. 23 und 24, 3.2.2). Allerdings ergab sich hieraus kein aussagekräftiger Unterschied zwischen beiden Zellreihen. Auch LRP wurde zum Vergleich in beiden Zelltypen nachgewiesen, aber auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Lokalisation.

Dieses Merkmal scheint sich demnach nicht bildgebend auf den Sucrosegradienten übertragen zu lassen. Da Caveolin maßgeblich an Cholesterin-Efflux-Prozessen beteiligt ist, wurde im folgenden Teil mit einer Vielzahl radioaktiver Efflux-Experimente versucht, einen Unterschied im Efflux-Verhalten der beiden Zelltypen auszumachen.

Zunächst wurden CHO-Wildtyp-Zellen und CHOanx6 Klon-Zellen zur Reduktion intrazellulären Cholesterins und unspezifischer Bindungsstellen über 24 Stunden in lipoproteindefizientem Medium gehalten. Nach Austausch des Mediums und Zugabe von  $H^3$ -markiertem Cholesterin/LDL für 24h folgte ein erneuter Austausch des Mediums und eine Zugabe von HDL für einen festgelegten Zeitraum. Im letzten Schritt wurde die Radioaktivität jeder Zellreihe jeweils in Medium und Zell-Lysat bestimmt und miteinander verglichen. Die Grafik in Abb. 31 in 3.5 zeigt, daß die Ausschleusung im CHO-Wildtyp besser zu funktionieren scheint. Bei diesem Zelltyp ist ab einem Zeitpunkt von acht Stunden nach der Aufnahme eine deutlich höherer Cholesterinanteil im Medium nachzuweisen als im Klon. Auch in den Zellen (Abb.32) sieht es so aus, als ob der Wildtyp zunächst schneller ausschleust, denn hier findet sich ein niedrigerer Anteil des Cholesterins in den Zellen. Aber nach einem Zeitraum von ca. 26 Stunden scheint der Klon ebenfalls stärker Cholesterin auszuschleusen. Seine Kurve der intrazellulären Cholesterinmenge überkreuzt sogar stark abfallend die des Wildtypes. Es scheint, als ob die Überexpression von Annexin VI in der Zelle die Ausschleusung von Cholesterin aus der Zelle zunächst für einen Zeitraum von ca. 24h hemmt. Um diesen Sachverhalt erklären zu können, soll im folgenden der Weg des  $3H$ -Chol./LDLs in den Zellen noch einmal nachvollzogen werden. Die Zellen nehmen das  $3H$ -Chol./LDL (das ApoB<sub>100</sub> als Lipoprotein beinhaltend) aus dem umliegenden Medium über den LDL-Rezeptor auf. Nach der Internalisierung des LDL-Moleküls wird durch die pH-Änderung im Vesikel die Dissoziation von Ligand und Rezeptor erzielt. Der Rezeptor gelangt zurück an die Oberfläche, das LDL-Molekül jedoch verbleibt im Lumen der sortierenden Endosomen und wird von dort aus weiterhin zur Degradation in späten Endosomen und Lysosomen transportiert. Inzwischen ist bekannt, daß mindestens zwei verschiedene Wege für die peripheren Zellen existieren, das überschüssige Cholesterin wieder auszuschleusen. Der erste sogenannte „reverse Transport“ des Cholesterins stellt einen passiven wäßrigen Diffusionsweg dar. Das intrazelluläre Cholesterin aus dem Plasma-membranpool assoziiert hierbei mit den HDL, die aus nichtveresterten Cholesterinmolekülen, ApoAI und Phospholipiden bestehen. Dieser Vorgang geschieht über einen einfachen

Konzentrationsgradienten zwischen Membran und Akzeptor (Johnson et al., 1986, Karlin et al., 1987). Das auf den HDL enthaltene ApoAI stellt hierbei einen Kofaktor für die Reaktion mit der LCAT (Lecithin-Cholesterin-Acetyltransferase) dar, durch die das freie Cholesterin aus den Zellen an die HDL gebunden wird. Der zweite Weg involviert den Transport von Cholesterin zu extrazellulären lipidfreien Apolipoprotein-Akzeptoren wie ApoA-I und Apolipoprotein E. Für beide Mechanismen existieren verschiedene Rezeptoren, der SR-BI und der ABCA1 (ATP-binding cassette transporter 1). In einer Studie von Ji et al., 1997, korrelierte die Cholesterol-Effluxrate SR-BI-transfizierter CHO-Zellen mit der Ausprägung der SR-BI-Levels in den Zellen. Es wäre aufgrund dieser Daten denkbar, daß auch in unseren beiden unterschiedlichen Zellreihen verschiedene Levels dieses Rezeptors vorliegen. Die Reaktion über SR-BI erwies sich in der Studie als unabhängig von einer speziellen Rezeptor-Liganden-Bindung, sondern ergab sich eher als ein Ergebnis einer Reorganisation von Membrancholesterol-Domänen, die die wäßrige Diffusion zu den HDL erleichtern. Eventuell beeinflußt die Überexpression von Annexin VI im CHO-klon negativ die Ausprägung des SR-BI-Rezeptors an der Zelloberfläche. Dadurch kann zunächst weniger Cholesterol an die HDL abgegeben werden. Dennoch bestünde weiterhin die Frage, aus welchem Grund der CHOanx6-klon nach einem Tag eine stärkere Aktivität der Cholesterolausschleusung zeigt. Smith et al. untersuchten 1996 den ABCA1. Sie stellten fest, daß die Behandlung von Maus-Makrophagen mit cAMP zu einer Stimulation des Cholesterol-Efflux zu ApoE und ApoAI hin steigerte. Polare Lipide, wie unverestertes Cholesterin und Phospholipide, werden zu den lipidarmen ApoAI Partikeln transferiert, aus denen dann HDL generieren. Diese nehmen weitere polare Lipide aus dem Stoffwechsel der ApoB-beinhaltenden Lipoproteine auf. Das freie Cholesterin in den HDL wird im Plasma verestert und eventuell an ApoB-beinhaltende Lipoproteine und andere Zellen abgegeben, was erneut lipidarme ApoAI-Partikel entstehen läßt. Allerdings ist ein genauer Zusammenhang zwischen dieser „Aktivierung“ lipidarmer ApoAI-Partikel und dem ABCA1 noch unklar (Young and Fielding, 1999). Eine Interaktion zwischen den beiden Rezeptoren wurde von Chen et al., 2000, untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß über die beiden Rezeptoren zwei voneinander getrennte, konkurrierende Routen des Cholesterol-Efflux zwischen HDL und Makrophagen gesteuert werden. Es wäre demnach ebenfalls eine Möglichkeit, daß die Ausprägung des ABCA1 durch die AnnexinVI-Überexpression gehemmt wird. Ein weiterer Ansatz zur Erklärung der Cholesterolausschleusung aus den Zellen bezieht die Synthese von sogenannten „Cholesterol-

reichen Membran-rafts“ ein. Hier liegen bestimmte Lipide (z.B. Glycosphingolipide) und Proteine (z.B. Caveolin, GPI verankerte Proteine, CD44) angereichert vor. Rafts sind in den Cholesterol-Efflux zu den HDL involviert, aber nach einer Studie von Mendez et al., 2000, interagieren sie nicht in den ABCA1-vermittelten Transport des Cholesterins zu den ApoAI hin. Sie werden im Endoplasmatischen Retikulum und Im Golgi Apparat gebildet und transportieren das überschüssige Cholesterol aus dem Zellinneren an die Oberfläche. Ihr Protein, das Caveolin, wurde wiederholt als cholesterinbindendes Protein in Caveolae und ähnlichen Raft-Abkömmlingen nachgewiesen. Murata et al. entdeckten 1995, daß Caveolin je ein Molekül Cholesterol bindet. Zusätzlich stellte sich seine Membranbindung in dieser Studie als cholesterinabhängig heraus. Da bereits auf den elektronenmikroskopischen Bildern ein Unterschied der beiden zu untersuchenden CHO-Zellreihen in der Lokalisation des Caveolins zu entdecken war, liegt die Vermutung nahe, daß sich der Unterschied im Ausschleusungsverhalten der beiden Zelltypen auf eine Veränderung dieser Zusammenhänge durch die Annexin VI-Überexpression zurückführen läßt. Eventuell bindet das Annexinmolekül an Caveolin und hemmt es dadurch an seiner Aktivität im Effluxprozess. All diese Vermutungen müssen jedoch weiterhin untersucht werden, um genauere Aussagen treffen zu können.

#### *4.4. Zusammenfassung*

In dieser Studie ist die Lokalisation von Annexin VI durch die Endosomenpräparation im Dichtegradienten gezeigt und im Vergleich zu anderen Proteinen betrachtet worden. Für die genaue Bestimmung der Zugehörigkeit der einzelnen Fraktionen zu bestimmten Zellkompartimenten wurde ein Enzymassay entwickelt, der die lysosmale  $\beta$ -Hexosaminidaseaktivität maß und so die Fraktion der späten Endosomen charakterisierte. Auch Veränderungen und Bewegungen des Annexinproteins durch verschiedene äußere Einflüsse (LDL-Inkubation, EGTA-Wirkung) wurden dargestellt. Auffällig war vor allem die Wanderung des Annexin VI-Proteins von den Plasmamembranen hin zu den Endosomen unter Induktion der Endozytose durch LDL-Inkubation der Zellen. Die Lokalisation von Annexin VI im unbehandelten Gradienten stimmte überwiegend mit der Lokalisation des LDL-Rezeptors überein. Beide waren vorwiegend in den Plasmamembranen und den Endosomen zu detektieren. Diese Tatsache und die zusätzliche Lokalisationsänderung von Annexin VI unterstützen die Vermutung einer gemeinsamen Funktion von Annexin VI und

dem LDL-Rezeptor in dem Prozess der Endozytose und der Degradation von LDL. Annexin VI, normalerweise weit in der Zelle verbreitet, wandert im Verlauf des Endozytose hin zu den LDL-beihaltenden Endosomen und besitzt dort vermutlich eine Funktion in der Regulation des Eintritts bestimmter Liganden in das Prälysosomale Kompartiment.

---

## LITERATURVERZEICHNIS

1. **Anderson R G W**, Brown M S and Goldstein J L (1977) Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* 10: 351-364
2. **Babiychuk E B**, Palstra R-J TS, Schaller J, Kämpfer U and Draeger A (1999) Annexin VI Participates in the Formation of a Reversible Membrane-Cytoskeleton Complex in Smooth Muscle Cells. *J. of Biol. Chem.*, Vol.274, No.49, 35191-35194
3. **Beisiegel U**, Weber W and Bengtsson-Olivecrona G (1991) Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 88, 8342-8346
4. **Beisiegel U** (1992) Apolipoproteins as Ligands for Lipoprotein Receptors. In: *Structure and Function of Apolipoproteins*, 269-294. Edited by Rosseneu, M., Boca Raton, USA, CRC Press
5. **Beisiegel U** (1995) Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 6, 117-122
6. **Brown M S** and Golstein J L (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-47
7. **Brown M S** and Goldstein J L (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-340
8. **Bucci C**, Parton R G, Mather I H, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B and Zerial M (1992) The small GTPase rab 5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70: 715-728
9. **Chen W J**, Goldstein J L and Brown M S (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalisation of the low density lipoprotein receptor. *J.Biol.Chem.* 265, 31116-31123
10. **Chen W**, Silver D L, Smith J D and Tall A R (2000) Scavenger receptor-BI (SR-BI) inhibits ATP binding cassette transporter 1 (ABC1)-mediated cholesterol efflux in macrophages. *JBC Papers in Press*, Published on July 14, 2000 as Manuscript M004552200

11. **Daro E**, Sluijs P D, Galli T and Mellman I (1996) Rab 4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9559-9564
12. **Davis C G**, Goldstein J L, Sudhof T C, Anderson R G W, Russell D W and Brown M S (1987) Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* 326: 760-765
13. **Desjardins M**, Celis J E, van Meer G, Dieplinger H, Jahraus A, Griffiths G and Huber G A (1994) Molecular characterization of phagosomes. *J. Biol. Chem.* 269, 32194-32200
14. **Dolphin P J** (1992) Lipolytic enzymes and the role of apolipoproteins in the regulation of their activity. In: *Structure and function of apolipoproteins*, 1. Ed., 296-362. Edited by Rosseneu, M., Boca Raton, CRC Press
15. **Donnelly S R** and Moss S E (1997) Annexins in the secretory pathway. *Cell. mol. life sci.* 53(1997) 533-538
16. **Dunn K W** and Maxfield F R (1992) Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *J. Cell Biol.* 117, 301-310
17. **Eisenberg S**, Sehayek E, Olivecrona T and Vlodavsky I (1992) Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *J. Clin. Invest.* 90, 2013-2021
18. **Fan H**, Josic D, Lim Y P and 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(2):741-51
19. **Futter C E**, Felder S, Schlessinger J, Ullrich A and Hopkins C R (1993) Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol.* 120, 77-83
20. **Gerke V** and Moss S E (1997) Annexins and membrane dynamics. *Biochim. et Biophysica Acta* 1357, 129-154
21. **Ghosh R N**, Gelmann D L and Maxfield F R (1994) Quantification of low density lipoprotein and transferrin endocytic sorting Hep2 cells using confocal microscopy. *J. Cell Sci.* 107, 80-89
22. **Gorvel J-P**, Chavrier P, Zerial M and Grueneberg J (1991) Rab 5 Controls Early Endosome Fusion in Vitro. *Cell* 64, 915-925
23. **Grewal T**, Heeren J, Mewawala D, Schnitgerhans T, Wendt D, Salomon G, Enrich C, Beisiegel U and Jäckle S (2000) Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in

- the trafficking of LDL to the prelysosomal compartment. *J. Biol. Chem.* Oct.2000, 275, 33806-13
24. **Hamosh M**, Klaevemann H L, Wolf R O and Scow R O (1975) Pharyngeal lipase and digestion of dietary triglyceride in man. *J. Clin. Invest.* 55, 908-913
  25. **Harder T** and Gerke V (1993) The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin II2p11(2) complex. *J. Cell. Biol.* 123(5), 1119-1132
  26. **Hazarika P**, Kaetzel M A, Sheldon A, Karin N J, Fleischer S, Nelson T E and Dedman J R (1991) Annexin VI is associated with calcium-sequestering organelles. *J. Cell. Biochem.* 46 (1), 78-85
  27. **Herbst J J**, Opresko L K, Walsh B J, Lauffenburger D A and Wiley H S (1994) Regulation of postendocytic trafficking of the epidermal growth factor receptor through endosomal retention. *J. Biol. Chem.* 269:12865- 12873
  28. **Herz J**, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H and Stanley K K (1988) Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J.* 7, 4119- 4127
  29. **Heuser J** (1980) Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J.Cell.Biol.*84, 560-583
  30. **Jäckle S**, Rinniger F, Beisiegel U, Block A, Tauscher W, Biermer M, Greten H and Windler E (1996) Annexins in endocytosis, *Z. Gastroenterology*, 1996, Jun., 34 Suppl.3:81-82
  31. **Jäckle S**, Beisiegel U, Rinniger F, Buck F, Grigoleit A, Block A, Groger I, Greten H and Windler E (1994) Annexin VI, a Marker Protein of Hepatocytic Endosomes. *J. Biol. Chem.* Vol.269, 1026-1032
  32. **Jahraus A**, Storrie B, Griffiths G and Desjardins M (1994) Evidence for retrograde traffic between terminal lysosomes and the prelysosomal /late endosome compartment. *J. Cell Sci.* 107: 145-157
  33. **Ji Y**, Jiang B, Wang N, Sun Y, Moya M L, Philipps M C, Rothblat G H, Swaney J B and Tall A R (1997) Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J.Biol. Cem.* 272 (34), 20982-20985
  34. **Johnson W J**, Bamberger M J, Latta R A, Rapp P E, Phillips M C and Rothblat G H (1986) The bi-directional flux of cholesterol between cells and lipoproteins. Effects of phospholipid depletion of high density lipoprotein. *J.Biol. Chem.* 261 (13), 5766-5776

35. **Johnstone S A**, Hubaishy I and Waisman D M (1992) Phosphorylation of Annexin II tetramer by protein kinase C inhibits aggregation of lipid vesicles by the protein. *J. Biol. Chem.* 267: 25976-25981
36. **Karlin J B**, Johnson W J, Benedict C R, Chacko G K, Phillips M C and Rothblat G H (1987) Cholesterol flux between cells and high density lipoprotein. Lack of relationship to specific binding of the lipoprotein to the cell surface. *J. Biol. Chem.* 262 (26), 12557-12564
37. **Kamal A**, Ying Y and Anderson RGW (1998) Annexin VI-mediated Loss of Spectrin during Coated Pit Budding Is Coupled to Delivery of LDL to Lysosomes. *J. Cell. Biol.* Vol.142, 937-947
38. **Kane J P** (1996) Structure and Function of the Plasma Lipoproteins and Their Receptors. In: *Atherosclerosis and Coronary Disease*, 89-103. Edited by Fuster, V., R. Ross, and E.J. Topol, Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers
39. **Khosravi-Far R**, Clark G J, Abe K, Cox A D, McLain T, Lutz R J, Sinensky M and Der C J (1992) Ras (CXXX) and Rab (CC/CXC) prenylation signal sequences are unique and functionally distinct. *J. Biol. Chem.* 267: 24363-24368
40. **Khosravi-Far R**, Lutz R J, Cox A D, Conroy L, Bourne J R, Sinensky M, Balch W E, Buss J R and Der C J (1991) Isoprenoid modification of rab proteins terminating in CC or CXC motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 62649-62699
41. **Kornfeld S** (1992) Structure and function of the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 307-330
42. **Kowal R C**, Herz J, Goldstein J L, Esser V and Brown M S (1989) Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apolipoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5810-5814
43. **Kunitake S T**, Mendel C M and Hennessy L K (1992) Interconversion between apolipoprotein A-I-containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities. *J. Lipid. Res.* 33, 1807-1816
44. **Lange Y**, Ye J, Rigney M and Steck T L (1999) Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. *J. Lipid. Res.* 40, 2264-2270
45. **Liemann S** and Huber R (1997) Three-dimensional structure of Annexins, *Cell. mol. life sci* 53 516-521
46. **Lin H C**, Südhof T C and Anderson R G W (1992) Annexin VI Is Required for Budding of Clathrin-Coated Pits. *Cell*, Vol.70, 283-291

47. **Löffler** G und Petrides P (1998) Biochemie und Pathobiochemie, 6., korr. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
48. **Mahley** R W, Ji Z S, Brecht W J, Miranda R D and He D (1994) Role of heparan sulfate proteoglycans and the LDL receptor-related protein in remnant lipoprotein metabolism. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 737, 39-52
49. **McCaffrey** M W, Bielli A, Cantalupo G, Mora S, Roberti V, Santillo M, Drummond F and Bucci C (2001) Rab4 affects both recycling and degradative endosomal trafficking. *FEBS Letters* 495: 21-30
50. **Mendez** A J, Lin G, Wade D P, Lawn R M and Oram J F (2000) Membrane Lipid domains distinct from cholesterol/ sphingomyelin-rich rafts are involved in the ABCA1-mediated Lipid Secretory Pathway, *JBC Papers in Press*. Published on Nov.9, 2000 Manuscript M007717200
51. **Miller** K W and Small D M (1987) Structure of triglyceride-rich lipoproteins: An analysis of core and surface phases. In: *Plasma Lipoproteins: New Comprehensive Biochemistry*, Edited by Gotto, A.M.J., Amsterdam, Elsevier Science
52. **Mukherjee** S, Ghosh R N and Maxfield F R (1997) Endocytosis, *Physiol Rev* 1997, 77, No.3, July 1997, 759-803
53. **Murata** M, Peränen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia T V and Simons K (1995) VIP21/Caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10339-10343
54. **Ohnishi** M, Tokuda M, Masaki T, Fujimara T, Tai Y, Itano T, Matsui H, Ishida T, Konishi R and Takahara J E A (1995) Involvement of Annexin I in glucose-induced insulin secretion in rat pancreatic islets. *Endocrinology* 136, 2421-2426
55. **Ortega** D, Pol A, Biermer M, Jäckle S and Enrich C (1998) Annexin VI defines an apical endocytic compartment in rat liver hepatocytes. *Journal of Cell Science* 111, 261-269
56. **Owens** R J and Crumpton M J (1984) Isolation and characterization of a novel 68,000-Mr Ca<sup>2+</sup>-binding protein of lymphocyte plasma membrane. *Biochem. J.* 219(1), 309-316
57. **Pol** A, Calvo M and Enrich C (1998) Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery. Differential distribution of activated Rat-1 and Mek in the endocytic compartment. *FEBS Lett.* 441(1): 34-38

- 
58. **Pons M**, Grewal T, Mewawala D, Jäckle S and Enrich C (Paper in press) Transport from the Annexin VI pre-lysosomal compartment and degradation of LDL in lysosomes is modulated by Annexin VI
  59. **Rainteau D**, Mansuelle P, Rochat H and Weinman S (1995) Characterization and ultrastructural localization of Annexin VI from mitochondria. *FEBS Lett.* 1995, 360(1):80-84
  60. **Robinson M S**, Watts C and Zerial M (1996) Membrane Dynamics in Endocytosis. *Cell* Vol.84, 13-21
  61. **Rothman J E** and Schmid S L (1986) Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. *Cell* 46, 5-9, 1986
  62. **Russell D W**, Browns M S and Goldstein J L (1989) Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins. *J. Biol. Chem.* 264, 21682-21688
  63. **Schmid S L** and Carter L L (1990) ATP is required for receptor-mediated endocytosis in intact cells. *J.Cell.Biol.*111 t-18, 1990
  64. **Simons K** and Zerial M (1993) Rab Proteins and the Road Maps for Intracellular Transport. *Neuron*, Vol.11, 789-799
  65. **Simons K** and Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572
  66. **Smith J D**, Myata M, Ginsberg M, Grigaux C, Shmookler E and Plump A S (1996) Cyclic ATP induces apolipoprotein E binding activity and promotes cholesterol efflux from a macrophage cell line to apolipoprotein acceptors. *J. Biol. Chem.* 271 (48), 30647-30655
  67. **Smythe E**, Smith P D, Jacob S M, Theobald J and Moss S E (1994) Endocytosis occurs independently of Annexin VI in human A 431 cells. *J. Cell Biol.* 124, 301-306
  68. **St Cair R W** and Beisiegel U (1997) What do all the apolipoprotein E receptors do? *Curr. Opin. Lipidol.* 8, 243-245
  69. **Tagoe C E**, Boustead C M, Higgins J and Walker J H (1994) Characterization and immunolocalization of rat liver annexin VI. *Biochim. Biophys. Acta* 1192(2): 272-280
  70. **Thurnhofer H**, Schnabel J, Betz M, Lipka G, Pidgeon C and Hauser H (1991) Cholesterin-transfer protein located in the intestinal brush-border membrane. Partial purification and characterisation. *Biochem. Biophys. Acta* 1064, 275-286
  71. **Tso P** and Balint J A (1986) Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics. *Am J. Physiol.* 250, t-26

- 
72. **Turpin** E, Russo-Marie F, Dubois T, de Paillerets C, Alfsen A and Bomsel M (1998) In adrenocortical tissue, annexins II and VI are attached to clathrin coated vesicles in a calcium-independent manner. *Biochim. Biophys. Acta* 1402, 115-130
73. **Tycko** B and Maxfield F R (1982) Rapid acidification of endocytic vesicles containing  $\alpha_2$ -macroglobulin. *Cell* 28: 643-651
74. **Watanabe** Y, Inaba T, Shimano H, Gotoda T, Yamamoto K, Mokuno H, Sato H, Yazaki Y and Yamada N (1994) Induction of LDL receptor-related protein during the differentiation of monocyte-macrophages. Possible involvement in the atherosclerotic process. *Arterioscler. Thromb.* 14, 1000-1006
75. **Weinman** J S, Feinberg J M, Rainteau D P, Gaspera B D and Weinman S J (1994) Annexins in rat enterocyte and hepatocyte: an immunogold electron-microscope study. *Cell Tissue Res.* 278(2): 389-397
76. **Wetterau** J R, Aggerbeck L P, Bouma M E, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, Schmitz J, Gay G, Rader D J and Gregg R E (1992) Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* 258, 999-1001
77. **Wolf** B B, Lopes M B, VandenBerg S R and Gonias S L (1992) Characterization and immunohistochemical localisation of alpha 2-macroglobulin receptor (low-density lipoprotein receptor-related protein) in human brain. *Am. J. Pathol.* 141, 37-42
78. **Young** S G and Fielding C J (1999) The ABCs of cholesterol efflux. *Nature genetics*, Vol.22
79. **Zerial** M and Stenmark H (1993), Rab GTPases in vesicular transport. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5: 613-620
80. **Zinser** E and Daum G (1995) Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 11:493-536

## Anhang

### Danksagung

Zunächst möchte ich Frau Prof. Dr. Beisiegel für die Vergabe des Themas und ihre Unterstützung bei der Durchführung dieser Dissertation danken.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Grewal und Herrn Walter Tauscher für die exzellente Betreuung und Anleitung.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Beisiegel für die herzliche Aufnahme und Hilfe bei Fragen.

Meinen Eltern und vor allem auch Philipp Goos danke ich für ihre Geduld und die moralische Unterstützung, ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

## **Lebenslauf**

### Persönliche Daten:

Miriam Julia Lotz

Geboren am 27.1.1977 in Salzgitter

Familienstand: ledig

Konfession: evangelisch

### Schulbildung:

1983-1987 Grundschule am Fredeberg, Salzgitter

1987-1989 Orientierungsstufe am Fredenberg, Salzgitter

1989-1996 Gymnasium am Fredenberg, Salzgitter

### Studium:

1996 Beginn des Medizinstudiums an der Universität Hamburg

1998 Ärztliche Vorprüfung

1999 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2002 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2002-2003 Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, am Kantonspital St. Gallen und am King's College in London

2003 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Dissertation:

Beginn im April 2000 im Endozytose-Labor von Frau Prof. Beisiegel, Medizinische Kern- und Poliklinik, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf

**Erklärung**

Ich versichere hiermit ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....