Aus der Abteilung für Molekulare Zellbiologie
des Instituts für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktorin: Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

Charakterisierung der Funktion von Annexin VI in Lipid Rafts

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

H e n r i k K u r t F o c k
aus Hamburg

Hamburg, 2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in:

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Cholesterintransport und Cholesterin-Efflux 1

1.1.1 Exogener und endogener Stoffwechselweg 1

1.1.1.1 Lipoproteine 1

1.1.1.1.1 Low Density Lipoproteine (LDL) 2

1.1.1.1.2 High Density Lipoproteine (HDL) 3

1.1.1.2 Stoffwechselwege der Lipide 4

1.1.1.2.1 Exogener Stoffwechselweg 4

1.1.1.2.2 Endogener Stoffwechselweg 4

1.1.2 Rezeptor-vermittelte Endozytose von Lipoproteinen 5

1.1.2.1 Clathrin-abhängige, Rezeptor-vermittelte Endozytose von LDL 5

1.1.2.2 Endosomaler Transport durch die Zellkompartimente 7

1.1.2.2.1 Frühes endosomales Kompartiment 8

1.1.2.2.2 Spätes endosomales Kompartiment 8

1.1.2.3 Regulation des endosomalen Membrantransportes 9

1.1.2.3.1 Rab-Proteine 10

1.1.2.3.2 NSF-, SNAP- und SNARE-Proteine 10

1.1.2.3.3 ARF-Proteine 11

1.1.3 Regulation des intrazellulären Cholesterinhaushaltes 11

1.1.4 Reverser Cholesterintransport und Cholesterin-Efflux 12

1.2 Cholesterinreiche Membrandomänen 14

1.2.1 Lipid Rafts 14

1.2.1.1 Struktur und intrazelluläre Lokalisation von Lipid Rafts 14

1.2.1.2 Lipid Rafts-asssoziierte Proteine 15

1.2.2 Aufbau und Struktur von Caveolae 16

1.2.3 Funktionen cholesterinreicher Membrandomänen 19

1.2.3.1 Signaltransduktion 19

1.2.3.2 Intrazellulärer Cholesterintransport und Cholesterin-Efflux 20

1.2.3.3 Weitere Funktionen 23

1.3 Annexine 23

1.3.1 Annexin-Protein-Familie 23

1.3.1.1 Molekulare Struktur der Annexine 24

1.3.1.2 Intrazelluläre Lokalisation und Gewebsverteilung von Annexinen 26

1.3.1.3 Eigenschaften und Funktionen der Annexine 27

1.3.1.3.1 Annexine und intrazellulärer Membrantransport 27

1.3.1.3.2 Annexine und cholesterinreiche Membrandomänen 28

1.3.2 Annexin VI 29

1.3.2.1 Molekulare Struktur von Annexin VI 29

1.3.2.2 Intrazelluläre Lokalisation und Gewebsverteilung von Annexin VI 31

1.3.2.3 Eigenschaften und Funktionen von Annexin VI 32

1.3.2.3.1 Annexin VI in Endo- und Exozytoseprozessen 32

1.3.2.3.2 Annexin VI und cholesterinreiche Membrandomänen 33

1.3.2.3.3 Interaktionen von Annexin VI mit Proteinen der Signaltransduktion in Caveolae 33

1.4 Ziel der Arbeit 35

2 Material und Methoden 36

2.1 Material 36

2.1.1 Zelllinien 36

2.1.1.1 CHO Wildtypzellen 36

2.1.1.2 CHO Annexin VI-Zellen 36

2.1.1.3 CHO Annexin II-Zellen 37

2.1.1.4 CHO Δ-1490-Zellen 37

2.1.2 Geräte 37

2.1.3 Chemikalien 38

2.1.3.1 Zellkultur 38

2.1.3.2 Proteinbestimmung 38

2.1.3.3 Cholesterinbestimmung 39

2.1.3.4 Western Blot 39

2.1.3.5 Radiochemikalien 39

2.1.3.6 Weitere Chemikalien 39

2.1.4 Proteinaseinhibitoren 40

2.1.5 Proteingrößenmarker 40

2.1.6 Verbrauchsmaterial 40

2.1.7 Antikörper 41

2.1.7.1 Primäre Antikörper 41

2.1.7.2 Sekundäre Antikörper 42

2.2 Methoden 42

2.2.1 Zellkultur 42

2.2.1.1 Zellkulturpflege 42

2.2.1.2 Ausplattieren von Zellen 43

2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen 43

2.2.2 Präparation von humanen Lipoproteinen 43

2.2.3 Präparation von Lipoprotein-depletiertem Serum (LPDS) 44

2.2.4 Proteinextraktion 44

2.2.5 Präparation und Isolierung von Lipid Rafts und Caveolae 45

2.2.5.1 Präparation und Isolierung von Triton X-100 unlöslichen Membranen durch Dichtgradientenzentrifugation 45

2.2.5.1.1 Präparation der Proteinextrakte 45

2.2.5.1.2 Isolierung Triton X-100 unlöslicher Membranen durch Dichtgradientenzentrifugation 46

2.2.5.2 Isolierung von Triton X-100 unlöslichen Membranen nach Brown und Rose 47

2.2.6 Fluorometrische Bestimmung von Cholesterin und Phospholipiden 47

2.2.7 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry 47

2.2.8 Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 48

2.2.9 Western Blot-Analyse und ECL-Immunodetektion 49

2.2.9.1 Western Blot-Analyse 49

2.2.9.2 ECL-Immunodetektion 50

2.2.10 Radioaktive Zellkulturexperimente 50

2.2.10.1 Radioaktive Markierung von LDL mit Tritium-Cholesterin 50

2.2.10.2 Efflux-Experimente mit ^{3}H-Cholesterin-LDL 51

2.2.10.3 Radioaktive Gradientenexperimente 51

3 Ergebnisse 53

3.1 Einfluss von Lipoproteinen auf die Expression von Annexinen und SR-BI 53

3.1.1 Annexin-, Caveolin- und SR-BI-Expression nach LDL-, HDL- und LPDS-Inkubation 53

3.1.1.1 Annexin VI- und Caveolin-Expression nach LDL-, HDL- und LPDS-Inkubation 53

3.1.1.2 SR-BI-Expression nach LDL-, HDL- und LPDS-Inkubation 58

3.1.2 SR-BI- und Caveolin-1-Expression in HDL-inkubierten Zellen 59

3.2 Etablierung der Lipid Rafts-/Caveolae-Präparation im Optiprep®-Gradienten 61

3.3 Calcium-induzierte Translokation von Annexinen in Lipid Rafts/Caveolae 63

3.3.1 Calcium-induzierte Translokation von Annexin VI in Lipid Rafts/Caveolae von CHO Anx VI-Zellen 63

3.3.2 Calcium-induzierte Translokation von Annexin VI in Lipid Rafts/Caveolae in CHO Anx II-Zellen 65

3.3.3 Einfluss von Calcium auf die intrazelluläre Verteilung von SR-BI 66

3.3.4 Expression von Annexin VI nach Calcium-Ionophor-Inkubation 67

3.4 Einfluss von HDL_3 auf die Lokalisation von Annexinen und Cholesterin in Lipid Rafts/Caveolae 71

3.4.1 Einfluss von HDL_3 auf die Lokalisation von Annexin VI, Annexin II und Caveolin 71

3.4.2 Einfluss von HDL_3 auf die Verteilung von Cholesterin in Lipid Rafts/ Caveolae 72

3.5 Einfluss von LDL auf die Cholesterinverteilung in Lipid Rafts/Caveolae 74

3.6 Cholesterinverteilung in Lipid Rafts/Caveolae nach HDL_3-induziertem Cholesterin-Efflux 76

3.7 Digitonin-abhängige Annexin-Verteilung in Triton X-100 unlöslichen Membranen 78

3.8 Triton X-100-Solubilisation 79

3.8.1 Nachweis von Annexin VI in Triton X-100 unlöslichen Membranen von CHO Anx VI- und CHO WT-Zellen 79

3.8.2 Einfluß von Calcium und Cholesterin auf die Lokalisation von $p120^{GAP}$, SR-BI und p21-Ras in CHO Anx VI-Zellen 82

3.8.3 Einfluß von Calcium auf die Annexin VI-Lokalisation in Triton X-100 unlöslichen Membranen 84

3.9 HDL_3-vermittelte ^{3}H-Cholesterin-Efflux-Experimente 86

3.9.1 Inhibitorischer Effekt von Annexin VI auf den HDL_3-vermittelten Cholesterin-Efflux 86

3.9.2 Einfluss einer EDTA-Inkubation auf den ^{3}H-Cholesterin-Efflux in CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen 88

3.9.3 HDL_3-induzierter ^{3}H-Cholesterin-Efflux in Lipid Rafts/Caveolae 89

4 Diskussion 91

4.1 Identifikation von Annexin VI in Lipid Rafts und Caveolae 91

4.2 Modell der calciuminduzierten Proteintranslokation von Annexin-Proteinen in Lipid Rafts und Caveolae 92

4.3 Einfluss von Cholesterin auf die Membranaffinität von Annexin VI in Lipid Rafts und Caveolae 96

4.4 Einfluß von Annexin VI auf den HDL-stimulierbaren Cholesterin-Efflux 97

4.5 Bedeutung von Lipid Rafts bzw. Caveolae im Rahmen des Cholesterin-Efflux 103

4.6 Ausblick 105

5 Zusammenfassung 106

6 Abkürzungen 107

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis 109

8 Literaturverzeichnis 111

9 Danksagung 125

10 Lebenslauf 126

11 Erklärung 127

1 Einleitung

1.1 Cholesterintransport und Cholesterin-Efflux

Lipide übernehmen vielfältige und unerlässliche Funktionen, ohne die Leben nicht möglich wäre. Sie bilden die Struktur sämtlicher zellulärer Membranen, spielen eine bedeutende Rolle als intrazelluläre Energieträger und sind Ausgangspunkt für die Biosynthese biologisch aktiver Moleküle. Dazu zählen fettlösliche Vitamine, verschiedene Gewebshormone sowie die sich vom Cholesterin ableitenden Steroidhormone. Cholesterin ist zudem essentieller Bestandteil tierischer Zellmembranen. Nahezu alle Gewebe tierischer Organismen sind zur Cholesterinsynthese befähigt (Kostner und März, 1995). Wird der Zelle genügend Cholesterin angeboten, so wird der Cholesterinbedarf bevorzugt durch Aufnahme von Cholesterin aus dem Blutstrom gedeckt und die zelleigene Cholesterinbiosynthese vermindert (Brown und Goldstein, 1986; Goldstein und Brown, 1990). Der Cholesterintransport im Plasma lässt sich in einen exogenen, einen endogenen und einen reversen Stoffwechselweg untergliedern. Lipide gelangen über den exogenen oder endogenen Stoffwechselweg zu den peripheren Geweben. Nach Internalisierung des Lipoprotein-assoziierten Cholesterins, z.B. über Rezeptor-vermittelte Endozytose von LDL, erfolgt der intrazelluläre Cholesterintransport durch die Zellkompartimente. Der Reverse Cholesterin Transport vermittelt den Transport von Cholesterin aus peripheren Geweben zurück zur Leber (Kostner und März, 1995).

1.1.1 Exogener und endogener Stoffwechselweg

1.1.1.1 Lipoproteine

Lipide besitzen hydrophobe Eigenschaften, die den Transport im wässrigen Blutplasma erschweren. Bis auf die mengenmäßig unbedeutende Fraktion der nicht veresterten Fettsäuren, die über das Serumalbumin im Blut transportiert werden, werden alle anderen Lipide des Plasmas in Form von Lipoproteinen, Komplexen aus spezifischen Transportproteinen und definierten Mischungen der einzelnen Lipide, transportiert. Dies ermöglicht die Versorgung der Gewebe mit Fettsäuren und Cholesterin (von Eckardstein et al., 2001). Lipoproteine sind sphärische Partikel, die sich aus variierenden Anteilen Proteinen, in diesem Falle Apolipoproteine genannt, und verschiedenen Lipiden zusammensetzen. Eine hydrophile Hülle aus Apolipoproteinen, Phospholipiden, polaren Fettsäuren und freiem Cholesterin umschließt einen aus hydrophoben, vor allem aus apolaren Triglyzeriden und Cholesterinestern gebildeten Kern. Neben einer strukturgebenden Funktion für Lipoprotein-Partikel übernehmen Apolipoproteine wichtige Funktionen als Liganden für spezifische Zelloberflächenrezeptoren oder als Aktivatoren und Co-Faktoren von Enzymen (Kostner und März, 1995; Gotto et al., 1986).
Die im Plasma vorkommenden Lipoproteine unterscheiden sich nach Größe, Dichte, Lipid- und Apolipoproteinzusammensetzung sowie elektrischer Ladung. Lipoproteine lassen sich aufgrund unterschiedlicher Dichten durch Ultrazentrifugation voneinander trennen (Havel et al., 1953; Gofman et al., 1954). Ausgehend von den bis zu 1200 nm großen, triglyzeridreichen Chylomikronen werden Lipoproteine nach zunehmender Dichte als VLDL (Very Low Density Lipoproteins), IDL (Interme-

diate Density Lipoproteins), LDL (Low Density Lipoproteins) und HDL (High Density Lipoproteins) eingeteilt. Zusätzlich ist eine weitere Subfraktionierung jeder einzelnen Hauptklasse in zahlreiche Unterklassen möglich (Kostner und März, 1995)

	Chylomikronen	**VLDL**	**IDL**	**LDL**	**HDL**
Durchmesser [nm]	75 – 1200	30 – 80	25- 35	18 – 25	5 –12
Dichte [g/ml]	0,93	0,93 – 1,006	1,006 – 1,019	1,019 - 1,063	1,063 – 1,21
Lipid-/ Proteinverhältnis	99 / 1	90 / 10	83 /17	78 / 22	50 / 50
Apolipoproteine	AI, AIV, CI-III, E, B_{48}	CI, CII, CIII, E, B_{100}	B_{100}, E, CI-III	B_{100}, (C,E)	AI, AII, AIV, CI-III, E
Elektrophorese	Startpunkt	Prä-ß	Slow prä-ß	ß	α

Tab. 1: Serumlipoproteineinteilung nach Ultrazentrifugation (modifiz. nach Gotto et al, 1986; Dargel, 1991; Kane, 1996)

Die meisten Literaturangaben beziehen sich auf Dichtefraktionen (vgl. Tab. 1). Es handelt sich dabei zuweilen um Mischungen einzelner Lipoproteinfamilien, die mit zusätzlichen Methoden weiter subfraktioniert werden können. Mit zunehmender Dichte nimmt der Triglyzeridgehalt in den Lipoproteinen ab, der Cholesteringehalt erreicht in der LDL-Fraktion einen maximalen Wert. Die Größe der Partikel nimmt mit zunehmender Dichte ab, der Proteingehalt zu.

Die Apolipoproteinanteile der Lipoproteine werden am Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, danach mit den entsprechenden Lipiden beladen und verlassen mit naszierenden Lipoproteinen die Zellen als metabolische Einheit. Im Blutstrom werden die Lipoproteine durch Enzyme und Lipid-Transferproteine modifiziert. Während der Zirkulation im Blutkreislauf kommt es zu einer Veränderung ihrer Dichte und elektrophoretischen Eigenschaften, bevor die Lipoproteine schließlich von Zellen wieder aufgenommen werden. Diese Prozesse können die physiko-chemischen Eigenschaften der Lipoproteine verändern (Kostner und März, 1995). Nachfolgend soll auf die in den Experimenten dieser Arbeit eingesetzten LDL- und HDL-Partikel näher eingegangen werden.

1.1.1.1.1 Low Density Lipoproteine (LDL)

LDL gehören zu der Fraktion von Lipoproteinen, die den höchsten Anteil an Cholesterin und Cholesterinestern aufweisen. Über LDL wird mehr als zwei Drittel des Cholesterins im Plasma transportiert (Kostner und März, 1995). LDL entstehen durch Delipidierung aus VLDL, können aber auch direkt von der Leber sezerniert werden (Gaw et al., 1995) und transportieren Cholesterin von der Leber zu den extrahepatischen Geweben. Jedes LDL-Partikel ist aus ca. 1500 Cholesterinestermolekülen aufgebaut, die von ca. 800 Phospholipid-, ca. 500 nicht veresterten Cholesterinmolekülen und $ApoB_{100}$, dem einzigen Apolipoprotein des LDL, umgeben werden (Deckelbaum et al., 1977; Elovson et al., 1985).

Die Cholesterinbiosynthese extrahepatischer Gewebe wird durch die Anwesenheit von Plasma-LDL reguliert. Fast sämtliche Gewebeformen können nach Bedarf Cholesterin synthetisieren, wobei extrahepatische Zellen jedoch in der Regel zunächst Cholesterin aus dem Plasma aufnehmen. Diese Pro-

zesse werden in den Zellen durch Transkriptionsfaktor-abhängige Proteinexpression reguliert (Brown und Goldstein, 1997).

1.1.1.1.2 High Density Lipoproteine (HDL)

Die Fraktion der HDL-Partikel im humanen Plasma repräsentiert eine heterogene Lipoprotein-Klasse. Gemeinsames Merkmal aller HDL-Subklassen sind ihre hohe Dichte (> 1,063 g/ml) und ihre geringe Größe (Ø 5 – 12 nm) im Vergleich mit anderen Lipoproteinen. Die Unterschiede im Lipidgehalt, der Apolipoproteinzusammensetzung und der Enzymausstattung führen zur Entstehung von HDL-Subpopulationen, die sich anhand von Gestalt, Dichte, Größe, elektrophoretischer Mobilität, Lipid- und Apolipoproteinzusammensetzung sowie antigenen Eigenschaften unterscheiden lassen (von Eckardstein et al., 1994). Die Klassifizierung von HDL-Partikeln in Dichteklassen aufgrund ihres Verhaltens in der Ultrazentrifiuge ergibt eine Einteilung mit den Subklassen HDL_1, HDL_2 ($1.063 < \rho < 1{,}125$ kg/l) und HDL_3 ($1{,}125 < \rho < 1{,}21$ kg/l) mit der größten Dichte. Mit Hilfe nichtdenaturierender Gradienten-Gel-Elektrophorese können HDL aufgrund ihrer Größe in verschiedene Untergruppen (α- und prä-$ß_1$ Mobilität) untergliedert werden. Die größte Untergruppe bildet α-HDL (entspricht HDL_2 und HDL_3), kleinere Untergruppen zeigen vorwiegend eine prä-ß-elektrophoretische Mobilität (entspricht HDL_1) (Barter und Rye, 1996; Kostner und März, 1995). Einige Autoren wählen eine Einteilung der HDL-Partikel nach ihrem spezifischen Apolipoproteingehalt (Barter und Reye, 1996).

HDL-Partikel können auf unterschiedlichen Wegen entstehen. Naszierende, d.h. neu synthetisierte, HDL sind scheibenförmige (diskoidale) Partikel, die sich in Perfusaten der isolierten Leber und in der mesenterialen Lymphe, jedoch nicht in der Blutzirkulation isolieren lassen. Neben der Leber und der Dünndarmmukosa werden HDL aber auch von Makrophagen synthetisiert (Kostner und März, 1995). Eine weitere Entstehungsmöglichkeit für potentielle Cholesterinakzeptoren ist die Interkonversion, d.h. die Umwandlung von HDL_2 in kleine, dichte HDL_3 (Kostner und März, 1995). Zudem können Prä-$ß_1$-HDL unter Vermittlung von CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein) und HTGL (Hepatic Triglyceride Lipase) aus α-HDL regeneriert werden (Francone et al., 1996).

HDL spielt eine entscheidende Rolle im Reversen Cholesterin Transport (RCT) (vgl. Kap. 1.1.4). Als Akzeptor für zellmembranständiges Cholesterin dient HDL dabei als wichtiges Bindeglied beim Transport von Cholesterin peripherer Zellen zur Leber. Der Gehalt an spezifischen Apolipoproteinen und Phospholipiden, die elektrophoretischen Wanderungseigenschaften und die Größe der HDL-Partikel beeinflussen in unterschiedlichem Ausmaß die Effizienz des durch HDL-Partikel vermittelten Cholesterin-Efflux, d.h. der Übertragung von Cholesterin auf HDL-Partikel (von Eckardstein et al., 2001).

1.1.1.2 Stoffwechselwege der Lipide

1.1.1.2.1 Exogener Stoffwechselweg

Den exogenen Stoffwechselweg beschreiten Lipide, die mit der Nahrung resorbiert werden. Dabei wird ein Großteil des resorbierten Cholesterins in nicht-veresterter Form von Darmepithelzellen aufgenommen. Cholesterinesterase aus dem Pankreas hydrolysiert zu diesem Zweck mit der Nahrung aufgenommene Cholesterinester. Triglyzeride werden nach Emulgation durch die Magen- und Pankreaslipase in Fettsäuren, Mono- und Diacylglyzeride degradiert. Die Spaltprodukte werden in Form von gemischten Mizellen emulgiert, die neben Gallensäuren auch Cholesterin, Phospholipide, Diglyzeride und dissoziierte Fettsäuren enthalten. Freies Cholesterin ist wasserunlöslich und nur mit gemischten Mizellen in Lösung zu halten. Nach der Dissoziation der Gallensäuren und der Absorption der Lipide durch die Jejunum-Mukosa (Tso und Balint, 1986) erfolgt die Reveresterung des Cholesterins unter Vermittlung der ACAT (Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase) im Enterozyten. Nach der Fusion von $ApoB_{48}$ mit triglyzeridreichen Lipidpartikeln vollzieht sich am Golgi-Apparat die Zusammensetzung mit ApoA-I, ApoA-IV, Phospholipiden und Cholesterinestern zu Chylomikronen (Powell et al., 1987, Davidson et al., 1995). Die Enterozyten entlassen die Chylomikronen in die Lymphbahnen, von wo aus sie, unter Umgehung der Leber, in den Blutkreislauf gelangen (Hussain, et al., 1996). Im Verlauf der Lipolyse und der Abgabe der Lipide an periphere Gewebe kommt es in den Chylomikronen zu Umbauprozessen mit einer Veränderung der Chylomikronen. Der Ergebnis dieser Umbauprozesse sind kleinere, sogenannte Chylomikronen-Remnants (CR), die relativ reich an Cholesterinestern und ApoE sind. Die CR werden danach über spezifische Rezeptoren in die Leber aufgenommen (Beisiegel et al., 1991; Beisiegel et al., 1994). Der größte Teil der CR wird dabei über die ApoE-vermittelte Internalisierung durch den LDL-Rezeptor in die Leber aufgenommen (Beisiegel et al., 1989; Beisiegel, 1995).

1.1.1.2.2 Endogener Stoffwechselweg

Endogener Stoffwechselweg bedeutet die körpereigene Synthese von Lipiden. In nahrungsfreien Intervallen kommt es in der Leber zur Bildung von VLDL (Very Low Densitity Lipoproteins). Auf diese Weise werden periphere Gewebe auch in nahrungsfreien Intervallen mit Cholesterin und Triglyzeriden versorgt. Am Endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten kommt es zur Komplexierung von $ApoB_{100}$ mit Lipiden (u.a. Cholesterinester und Triglyzeride) zu VLDL-Partikeln, die über die Disse'schen Räume in den Blutstrom sezerniert werden (Gibbons, 1990; Vance und Vance, 1990). Im Blutkreislauf nehmen VLDL weitere ApoE und ApoC aus HDL auf. Intravaskulär werden die Triglyzeride der VLDL durch die endothelständige Lipoproteinlipase zu IDL (Intermediate Density Lipoproteins) hydrolysiert (Griffin und Packard, 1994). IDL werden ApoE-vermittelt über den LDL-Rezeptor in die Leber aufgenommen (Havel und Hamilton, 1988) oder durch LPL (Lipoprotein Lipase) (Ginsberg, 1994) und die hepatische Lipase (Goldberg et al., 1982) weiter hydrolysiert. Die Umwandlung von IDL in LDL ist mit einer Verminderung der Triglyzeridkonzentration und dem vollständigen Verlust von ApoE und ApoC in LDL verbunden. LDL-Partikel können neben der Delipidierung aus VLDL auch direkt von der Leber synthetisiert werden. Im Normalzustand werden

dabei über 60% des Cholesterins im Plasma in Form von LDL transportiert. Der Abbau des LDL erfolgt zu etwa zwei Drittel über den LDL-Rezeptor in Form von Rezeptor-vermittelter Endozytose (vgl. Kap. 1.1.2). Die Leber leistet dabei den größten Beitrag zum Rezeptor-vermittelten Katabolismus der LDL-Partikel, der weitaus geringere Anteil wird in nicht-hepatischen (peripheren) Geweben abgebaut, um als Baustein von Membranen, der Steroidhormon- oder der Vitamin-D-Synthese zu dienen. Etwa ein Drittel der LDL-Partikel wird unabhängig vom LDL-Rezeptor abgebaut. Hinter diesem als „Scavenger pathway“ bezeichneten LDL-Katabolismus stehen unterschiedliche Mechanismen wie adsorptive Endozytose über niedrigaffine Rezeptoren, Pinozytose und LDL-Aufnahme über sogenannte „Scavenger Rezeptoren“ (v.a. in Makrophagen und Zellen des RHS, Retikulohistozytäres System) (Kostner und März, 1995). Im nachfolgenden wird der Mechanismus der Rezeptor-vermittelten Endozytose als der wichtigste Internalisierungsmechanismus von LDL erläutert.

1.1.2 Rezeptor-vermittelte Endozytose von Lipoproteinen

Eukaryotische Zellen besitzen verschiedene Möglichkeiten zur Internalisierung extrazellulärer Stoffe, um diese anschließend gezielt an spezifische Organellen im Zytoplasma weiterzuleiten. Dieser als Endozytose bezeichnete Prozeß umfaßt unterschiedliche Aufnahmemechanismen wie Phagozytose, Pinozytose, Clathrin-unabhängige Endozytose und Clathrin-abhängige, Rezeptor-vermittelte Endozytose (Mukherjee et al., 1997). Endozytotische Mechanismen sind die Grundlage bei der Aufnahme von Metaboliten, der Regulation der Expression von Zelloberflächenrezeptoren, der Erhaltung der Zellpolarität, der Antigen-Präsentation, der Cholesterinhomöostase und vielen grundlegenden physiologischen Vorgängen (Mukherjee et al., 1997). Im Folgenden soll auf den Hauptmechanismus zur Aufnahme von LDL-Partikeln aus dem Blutstrom, die LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose, eingegangen werden. Die Aufnahme von Low Density Lipoproteinen (LDL) ist eines der am besten verstandenen endozytotischen Systeme, das von den Nobelpreisträgern Goldstein und Brown detailliert beschrieben wurde (Goldstein et al., 1985; Brown und Goldstein, 1986).

1.1.2.1 Clathrin-abhängige, Rezeptor-vermittelte Endozytose von LDL

Ein Großteil tierischer Zellen nimmt Cholesterin durch den Aufnahmemechanismus der Rezeptor-vermittelten Endozytose auf (Anderson et al., 1977). Im Blutstrom wird Cholesterin zum größten Teil über LDL-Partikel transportiert (vgl. Kap. 1.1.1.1). Die Rezeptor-vermittelte Endozytose von Lipoproteinen findet im Bereich von spezialisierten Abschnitten der Plasmamembran, den „Clathrin-Coated Pits“ (Stachelsaumgrübchen), statt. Zahlreiche Liganden, darunter auch LDL, werden im Bereich dieser Invaginationen der Plasmamembran, nach Bindung an zelloberflächenständige Rezeptoren, internalisiert (Schwartz, 1995). LDL interagiert dabei unter Vermittlung des Apolipoproteins $ApoB_{100}$ mit der Ligandenbindungsdomäne des LDL-Rezeptors. Der LDL-Rezeptor hat damit nicht nur ein bedeutende Funktion im Rahmen der zellulären Cholesterinhomöostase, sondern auch im Rahmen der Regulation des Plasma-Cholesterinspiegels (Brown und Goldstein, 1986). Abbildung 1 zeigt den von Brown und Goldstein erarbeiteten Grundentwurf für diesen Mechanismus, der über die Jahre weiterentwickelt werden konnte.

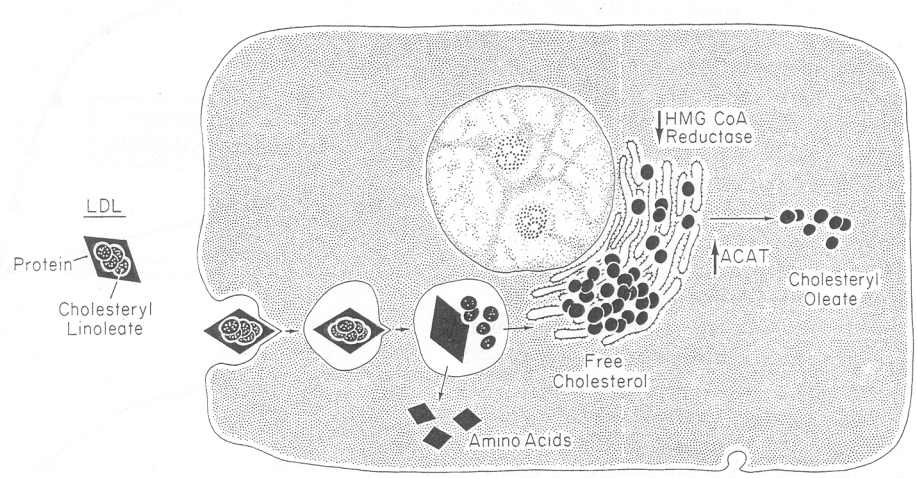


Abb. 1 : Grundentwurf der Rezeptor-vermittelten Endozytose von LDL nach Brown und Goldstein (Brown und Goldstein, 1976)

Die spontane oder durch Ligandenbindung ausgelöste Konzentration von Rezeptoren in diesem Plasmamembranabschnitt bildet den initialen Schritt dieses Aufnahmeprozesses. Einige Membranrezeptoren, u.a. auch der LDL-Rezeptor, liegen unabhängig von einer Ligandenbindung angereichert in diesen Membranbereichen vor und gewährleisten eine effiziente Aufnahme der Lipoproteine (Anderson et al., 1982; Anderson et al., 1977). Diese spezialisierten Membranbereiche machen in humanen Fibroblasten ca. 2% der Membranoberfläche aus (Anderson et al., 1976).

Die Bereiche der Coated Pits setzen sich aus einer hochorganisierten Matrix von Makromolekülen zusammen (Schröder und Ungewickell, 1991). Die beiden wichtigsten Komponenten dieser Matrix bilden das Clathrin und sogenannte Clathrin-assoziierte Adapterproteine (AP), insbesondere AP2, die durch einen noch nicht aufgedeckten molekularen Mechanismus auf der zytosolischen Seite der Invaginationen die Formation der Coated Pits übernehmen (Kirchhausen, 2000; Robinson, 1992). Nachfolgend kommt es zu einer fortschreitenden Einstülpung der Plasmamembran. Das sich auf diese Weise formierende Vesikel löst sich unter Vermittlung der GTPase Dynamin und mit Hilfe einer Reihe weiterer Proteine von der Plasmamembran. Dabei lagern sich Dynamin-Polymere an den Hals der nur noch über eine schmale Brücke mit der Plasmamembran verbundenen Vesikelknospe und führen auf diese Weise zur Abschnürung des Clathrin-umhüllten Vesikels von der Membran (Hinshaw, 2000).

Neben Dynamin ist für die endgültige Abschnürung der 100 – 150 nm Clathrin-umhüllten Vesikel ein Umbau des unterhalb der Plasmamembran gelegenen, netzartigen Spektrin-Aktin-Zytoskeletts erforderlich (Kamal et al., 1998). Dieser Umbau wird durch die Cystein-abhängige Protease Calpain I vermittelt, die eine lokale Auflösung des Zytoskeletts ermöglicht (Harris und Morrow, 1990). Auch Annexin VI ist neben weiteren Proteinen an der Abschnürung des sich formierenden Vesikels beteiligt, indem es in zytosolischen Plasmamembranbereichen mit ß-Spektrin interagiert. Durch Rekrutierung einer Calpain-ähnlichen Protease, die ß-Spektrin spaltet, wird dem Vesikel durch die lokale Auflösung des Zytoskeletts das Eintreten in das Zytosol ermöglicht (Kamal et al., 1998).

1.1.2.2 Endosomaler Transport durch die Zellkompartimente

Nach der Internalisierung extrazellulären Materials wird die Clathrinummantelung des Vesikels mit Hilfe eines ATP-abhängigen 70 kDa Proteins entfernt (Rothman und Schmid, 1986). Ab diesem Zeitpunkt bezeichnet man das Vesikel als endozytotisches Vesikel (Endosom), das für den Transport von Liganden/Rezeptorenkomplexen zu ihren intrazellulären Zielkompartimenten verantwortlich ist.
Endosomen bilden ein überaus komplexes und dynamisches System, das nicht nur durch intrazelluläre Prozessierung von Liganden, sondern auch durch den Austausch von Stoffen zwischen verschiedenen Zellkompartimenten untereinander und mit der Zellmembran gekennzeichnet ist. Es werden frühe und späte endosomale Kompartimente unterschieden, die sich anhand ihrer Morphologie, assoziierter Proteine, ihrer Funktion und ihres pH-Wertes unterscheiden lassen (vgl. Tab. 2). Der Nachweis bestimmter Liganden dient ebenfalls der Identifikation endosomaler Kompartimente. Frühe endosomale Kompartimente gliedern sich in Sortierende und Rezyklierende Endosomen. Endosomale Trägervesikel (ECV), Späte Endosomen und Lysosomen bilden die späten endosomalen Kompartimente (Mukherjee et al., 1997).

	Frühes endosomales Kompartiment		**Spätes endosomales Kompartiment**		
Kompartiment	Sortierende Endosomen	Recycling Endosomen	ECV (MVB)	Späte Endosomen	Lysosomen
Morphologie	tubulovesikulär	tubulär	sphärisch mit inneren Membranen	Komplex, inneren Membranen	tubulär oder wie Späte Endosomen
Verteilung	peripher	verstreut im Zytoplasma oder juxtanukleär	verstreut im Zytoplasma	perinukleär	perinukleär
PH	5,9 – 6,0	6,4 – 6,5	< 6,0	5,0 – 6,0	5,0 – 5,5
Rezeptoren u. Membranproteine	Transferrin-Rezeptor und andere Recycling Rezeptoren, Liganden, die für die Lysosomen bestimmt sind	Transferrin-Rezeptor und andere Recycling Rezeptoren	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, lysosomale Membranglykopro-teine und lysosomassoziierte Membranproteine	Lysosomale Membranglykoproteine und Lysosom-assoziierte Membranproteine
GTP-bindende Proteine	Rab4, Rab5, Rab11		Rab7, Rab9		

Tab. 2: Kennzeichen endosomaler Kompartimente (modifiziert nach Mukherjee et al., 1997)

Es lassen sich grundsätzlich drei Transportwege für Liganden, die rezeptorvermittelt internalisiert wurden, unterscheiden.
1. Degradation: 1.a) Frühe Endosomen fusionieren mit Sortierenden Endosomen. Die pH-Wert-Änderung führt zur Dissoziation von Ligand und Rezeptor. Der Rezeptor gelangt über Rezyklierende Endosomen zur Zelloberfläche zurück, während der Ligand in den Lysosomen seiner weiteren Verwendung unterliegt (z.B. LDL) (Mukherjee et al., 1997). 1.b) Gemeinsamer Abbau von Rezeptor und Ligand in den Lysosomen (z.B. EGF, Epidermaler Wachstumsfaktor) (Herbst et al., 1994).
2. Recycling: Ligand und Rezeptor bleiben assoziiert und werden über Rezyklierende Endosomen zurück an die Plasmamembranoberfläche transportiert (z.B. Transferrin) (Klausner et al., 1983).

3. Transzytose: Extrazelluläres Material nutzt die Rezeptor-vermittelte Endozytose zum Durchtritt durch eine polarisierte Zelle (z.B. IgA) (Song et al., 1995).

Für LDL und seinen Rezeptor soll exemplarisch der intrazelluläre, degradative Weg der Rezeptor-Ligandenkomplexe beschrieben werden, da dieser eine bedeutende Rolle im Rahmen der Cholesterinhomöostase besitzt.

1.1.2.2.1 Frühes endosomales Kompartiment

Alle internalisierten Moleküle erreichen zuerst frühe endosomale Zellkompartimente, um im Anschluß in Späte Endosomen zu gelangen. Nach der Internalisierung des LDL/LDL-Rezeptorkomplexes und Bildung Früher Endosomen fusionieren diese mit den sogenannten Sortierenden Endosomen. Der genaue Ablauf dieses Prozesses ist noch nicht vollständig verstanden. Beide Kompartimente weisen charakteristische Marker in Form von Rezeptoren und Proteinen auf, die eine Unterscheidung der einzelnen Kompartimente ermöglichen (vgl. Tab. 2). Die stetige Fusion von Frühen Endosomen mit den Sortierenden Endosomen führt zu einem kontinuierlichen Anstieg der LDL-Konzentration (Ghosh et al., 1994). Die peripher im Zytoplasma lokalisierten Sortierenden Endosomen besitzen einen sauren pH-Wert (pH 5,9 – 6,0), der durch ATP-abhängige Protonenpumpen aufrechterhalten wird (Linderman und Lauffenburger, 1988; Tycko und Maxfield, 1982). Der niedrige pH-Wert induziert eine Konformitätsänderung des LDL-Rezeptors, die zu einer Dissoziation von LDL und Rezeptor führt. Die LDL-Rezeptoren sammeln sich in tubulären Ausbuchtungen, die sich nachfolgend von den Sortierenden Endosomen ablösen und sogenannte Rezyklierende Endosomen bilden (Maxfield und Yamashiro, 1991). Mit Hilfe der Rezyklierenden Endosomen wird der LDL-Rezeptor zur Zelloberfläche transferiert, um dort den Zyklus aus Ligandenbindung, Internalisierung und Weg durch die endosomalen Kompartimente mehrfach zu durchlaufen (Goldstein et al., 1985).

1.1.2.2.2 Spätes endosomales Kompartiment

Kennzeichen Später Endosomen ist das Fehlen von Komponenten, die rezykliert werden sollen. Späte Endosomen sind an der Degradierung internalisierter Liganden beteiligt. Während die LDL-Rezeptoren zurück zur Zelloberfläche gelangen (vgl. Kap. 1.1.2.2.1), verbleibt das LDL in den Sortierenden Endosomen, die sich in mehreren Zwischenschritten (Reifungsmodell) zu den Späten Endosomen entwickeln (Dunn und Maxfield, 1992). Der Reifungsprozess beginnt mit der Abschnürung von Vesikeln aus dem Verband der Sortierenden Endosomen (Gruenberg und Maxfield, 1995), die entsprechend ihrer Funktion als endosomale Trägervesikel bezeichnet werden (ECV) (Gruenberg et al., 1989). Aufgrund ihrer zwiebelschalenartigen Membraninvaginationen (van Deurs et al., 1993b) werden sie auch als multivesikuläre Körperchen (MVB) bezeichnet (Hopkins, 1983; Dunn et al., 1986). Die ECV wandern entlang von Mikrotubuli durch Vermittlung des CLIP 170-Proteins (Cytoplasmic linker protein) in Richtung Zellzentrum (Gruenberg et al., 1989) und reifen auf diesem Weg zu Späten Endosomen (Pierre et al., 1992). Bei diesem Reifungsprozeß kommt es zu einer Änderung der Membranprotein-Komposition und zu einer weiteren pH-Wert-Erniedrigung des inneren Milieus (Aniento et al., 1996).

Die Fusion der Späten Endosomen mit vorhandenen Lysosomen, leitet die finale Degradation des LDL ein. Lysosomen weisen einen pH-Wert von 5,0 – 5,5 auf und sind vorwiegend perinukleär lokalisiert. Der niedrige pH-Wert bildet ein Milieuoptimum für die lysosomalen Enzyme. Der Apolipoproteinanteil des LDL wird durch Enzyme in freie Aminosäuren abgebaut, für Cholesterinester erfolgt eine Hydrolysierung durch die lysosomale saure Lipase. Spezifische Transportmechanismen sorgen für den Abtransport der Abbauprodukte und des freien Cholesterins in das Zytoplasma (Lange und Steck, 1996; Tabas, 1995). Zwischen Späten Endosomen und Lysosomen herrscht ein dynamischer Materialverkehr, der nicht nur unidirektional in Richtung Lysosomen führt, sondern auch einen retrograden Stoffaustausch zwischen den Kompartimenten ermöglicht. Neben der Degradierung extrazellulären Materials sind die Lysosomen auch für die Speicherung unverdaulicher Substanzen verantwortlich (Jahraus et al., 1994).

1.1.2.3 Regulation des endosomalen Membrantransportes

Die Rezeptor-vermittelte Endozytose und der endosomale Membrantransport werden durch diverse zytosolische, integrale oder membranassoziierte Proteine kontrolliert, die zudem als Marker endosomaler Kompartimente dienen (Mukherjee et al., 1997). Im Rahmen der Internalisierung von Rezeptor-Ligandenkomplexen interagieren verschiedene regulatorische Proteine mit den zytoplasmatischen Anteilen von Rezeptoren, dem Clathrin-Grundgerüstes und dem AP2-Komplex (vgl. Kap. 1.1.2.1) (Kirchhausen, 2000; Kirchhausen 1999; Hinsaw 2000). In diesem Zusammenhang übernehmen Amphiphysin und Syndapine eine entscheidende Funktion bei der Rekrutierung von Dynamin an Clathrin Coated Pits sowie bei der Interaktion endozytotischer Vesikel mit dem Aktin-Zytoskelett (Wigge und McMahon, 1998). Des Weiteren werden Eps15 und Epsin als essentielle Komponenten der Clathrin-vermittelten Endozytose beschrieben (Benmerah et al., 1998; Chen et al., 1998).

Der nachfolgende endosomale Membrantransport durch die Zellkompartimente wird durch eine Reihe weiterer Proteine beeinflusst (Sorkin, 2000; Gruenberg, 2001). Dieser Prozess der Vesikel-Ausbildung mit dem nachfolgenden Transport zu einem Zielorganell läßt sich prinzipiell in vier Abschnitte (I – IV) untergliedern (Zerial und McBride, 2001). Zunächst erfolgt die Ausbildung eines Vesikels oder eines tubulären Intermediats (I), das im Anschluß in Richtung eines Zielkompartiments transportiert wird (II, “Targeting”). Danach kommt es zur Anlagerung (“Docking”) der vesikulären Membran mit einer Zielmembran (III). Dies ist die Voraussetzung für die anschließende Fusion der beiden Membranabschnitte (IV). In diesem Zusammenhang übernehmen vor allem die Mitglieder der Rab-Proteinfamilie eine wichtige Funktion, da diese das spezifische “Targeting” endozytotischer Vesikel in Richtung Zielkompartiment vermitteln (Zerial und McBride, 2001). Die anschließende Fusion der Membranen übernehmen membranspezifische SNARE-Proteine (Chen und Scheller, 2001). Die Rolle von Mitgliedern der Annexin-Proteinfamilie innerhalb der endozytotischen Membranverkehrs wird in Kapitel 1.3 erläutert.

1.1.2.3.1 Rab-Proteine

Rab-Proteine stellen ein große Familie niedermolekularer GTPasen (20 – 30 kDa) mit vielfältigen Aufgaben im Membranverkehr dar. Fast sämtliche Schritte im intrazellulären Membrantransport finden unter Vermittlung von Rab-Proteinen statt (Zerial und Stenmark, 1993). Eine zentrale Funktion übernehmen Rab-Proteine beim „Targeting“ sowie beim „Docking“ von Vesikeln (siehe 1.1.2.3) (Pfeffer, 1994; Zerial et al. 2001, Chavrier und Goud, 1999). Aktive Rab-GTP Proteine benötigen während des “Targetings” weitere Faktoren (Effektormoleküle), die die Signale der Rab GTP-asen weiterleiten können (Zerial und McBride, 2001). Für zahlreiche Rap-Proteine konnte eine Interaktion mit diesen Effektoren, die essentiell an der Regulation des endosomalen Transports beteiligt sind, nachgewiesen werden (Stenmark et al., 1995).

Die Rab-Proteine sind hochspezifisch in unterschiedlichen subzellulären Fragmenten lokalisiert, wodurch die Identifikation intrazellulärer Kompartimente erleichtert wird (vgl. Tab. 2). Im Rahmen des Frühen endosomalen Transportweges sind dies Rab5, Rab4 und Rab11 (Van der Sluijs et al., 1992; Daro et al., 1996; Ullrich et al., 1996), während Rab7 entscheidend an der Regulation des lysosomalen Transportweges beteiligt ist (Feng et al., 1995) und Rab9 im Späten endosomalen Kompartiment vermittelt (Riederer et al., 1994; Lombardi et al.,1993). Eine zentrale Rolle im endosomalen Membrantransport übernimmt Rab5, indem es maßgeblich am zielgerichteten Membrantransport von der Zellmembran zu den Frühen Endosomen sowie an der homotypischen Fusion Früher Endosomen beteiligt ist (Gorvel et al., 1991; Bucci et al., 1992, Stenmark et al., 1994). Rab5 scheint darüber hinaus an der Regulation des Vesikel-“Budding”, d.h. Vesikelbildung an der Plasmamembran (Gorvel et al., 1991; Stenmark et al., 1994) und bei der Anlagerung und Mobilität von Frühen Endosomen entlang von Mikrotubuli (Nielsen et al., 1999) beteiligt zu sein.

1.1.2.3.2 NSF-, SNAP- und SNARE-Proteine

Im Gegensatz zu den Rab-Proteinen, die das „Targeting“ und das „Docking“ der Vesikel übernehmen, wird die Fusion der Transportvesikel mit der Zielmembran im Rahmen des endosomalen Membrantransports durch spezielle zytosolische Proteinkomplexe reguliert (Chen und Scheller, 2001). Sogenannte NSF-Proteine (N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein) und hiermit assoziierte Proteine, die sogenannten SNAPs (soluble NSF attachment protein) sind danach Teil einer generellen Fusionsmaschinerie (Wilson et al., 1992). SNAP-Rezeptoren (SNARE) gewährleisten die Spezifität des Fusionsprozesses der Membranen. Die Transportvesikel tragen spezifische v-SNAREs, die mit spezifischen t-SNAREs der Zielmembran interagieren können (Söllner et al., 1993). Unter Bildung eines stabilen SNARE-Komplexes werden Transportvesikelmembran und Zielmembran in enge räumliche Beziehung gesetzt. Dies ist der entscheidende Schritt für die Andockung, sodass es nachfolgend zur Fusion von Vesikel und Zielmembran kommt (Poirier, 1998). Das Rab-abhängige “Dokking” und “Targeting” von endosomalen Vesikeln gewährleistet somit zusammen mit der SNARE-vermittelten Membranfusion einen spezifischen Membrantransport innerhalb der Zelle (Zerial und McBride, 2001; Chen und Scheller, 2001).

1.1.2.3.3 ARF-Proteine

Für den intrazellulären Membranverkehr sind zwei Gruppen umhüllter Vesikel von wesentlicher Bedeutung. Zum einen Clathrin-Coats und sogenannte COP-umhüllte (Coat Protein) Vesikel. Clathrin-umhüllte Vesikel mit ihren Adapterproteinen sind in den Prozeß der Endozytose an der Zellmembran einbezogen (vgl. Kap. 1.1.2.1). Für diese Vesikel wird zudem eine Beteiligung an Exozytose-Prozessen am Trans-Golgi-Netzwerk beschrieben (Kirchhausen, 2000). COP-umhüllte Vesikel vermitteln den Transport zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Trans-Golgi-Netzwerk, aber auch innerhalb des Golgi-Apparates (Kreis und Pepperkok, 1994; Schekman und Orci, 1996). Die Bildung von Transportvesikeln durch Clathrin- bzw. COP-Hüllen wird durch ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARF) gesteuert. Zur Gruppe der ARF gehören sechs GTP-Bindungsproteine, wobei ARF1 das bislang am besten charakterisierte Gruppenmitglied darstellt. ARF1 ist am Golgi-Apparat lokalisiert und ist dort direkt an der Bildung der COP-Hüllen beteiligt (Spang et al., 1998, Ktistakis et al., 1996). Eine wichtige regulatorische Aufgabe besitzen ARF auch bei der Bildung von Clathrinhüllen, indem sie an der Rekrutierung der Adapter-Proteine (AP) beteiligt sind. ARF1 rekrutiert AP1 und AP3 an der Membran des Trans-Golgi-Netzwerks (Rothman, 1996; Ooi et al., 1998).

1.1.3 Regulation des intrazellulären Cholesterinhaushaltes

Die Schritte der intrazellulären Cholesterinbiosynthese sind mit Ausnahme der ersten Reaktionen im Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zellen lokalisiert. Das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) dient als Akzeptor für das neusynthetisierte Cholesterin, das aus dem ER zum TGN gelangt (Fielding und Fielding, 1997). Exogenes Cholesterin stammt aus endozytierten Lipoproteinen (vgl. Kap. 1.1.2) und gelangt über Endosomen, Lysosomen und Caveolae in das TGN (Fielding und Fielding, 1997). Die Erhöhung der Konzentration an freiem Cholesterin führt zur Aktivierung zellulärer Kontrollwege (Brown und Goldstein, 1997), die über verschiedene Mechanismen zu einer Hemmung der Neusynthese von LDL-Rezeptoren (Brown und Goldstein, 1975), zu einer Aktivitätshemmung der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), zu einem beschleunigten Abbau bereits vorhandener HMG-CoA-Reduktase als Schlüsselenzym der endogenen Cholesterinsynthese (Luskey et al., 1983; Gil et al., 1985) und über eine Aktivitätserhöhung der Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) zur Speicherung von überschüssigem Cholesterin als Cholesterinester (Goldstein et al., 1974) führen. Die durch ACAT gebildeten Cholesterinester werden von den Zellen in Form von Lipidvakuolen im Zytoplasma gespeichert und können bei Bedarf durch die neutrale Cholesterinesterhydrolase (NCEH) über den cAMP-abhängigen Proteinkinase-A-Weg wieder hydrolysiert werden (Bernard et al., 1991). Das durch NCEH freigesetzte Cholesterin wird zur Zellmembran transferiert und kann von dort aus erneut zum ER zwecks Reveresterung durch ACAT transportiert werden.

Dieser Zyklus aus Cholesterin- und Cholesterinesterbildung kann durch Anwesenheit von extrazellulären Cholesterinakzeptoren wie z.B. HDL oder durch Bildung neusynthetisierter Lipoproteine unterbrochen werden. Vom TGN ausgehend gelangen dabei Cholesterin und Phospholipide entweder in

Form von caveolinhaltigen Lipid Rafts oder als neusynthetisierte Vesikel zurück zur Zelloberfläche (Liscum und Munn, 1999; Simons und Ikonen, 1997). Dieser intrazelluläre Cholesterintransport über intrazelluläre Lipid Rafts in cholesterinreiche Mikrolipiddomänen der Zellmembran, unterstreicht einen ausgeprägten Membrantransport zwischen Lipid Rafts und Caveolae sowie dem endozytotischen Kompartiment und ist als exozytotischer Membranverkehr die Voraussetzung für den Efflux von intrazellulärem Cholesterin auf extrazelluläre Akzeptoren (Fielding und Fielding, 1997; von Eckardstein et al., 2001).

1.1.4 Reverser Cholesterintransport und Cholesterin-Efflux

Annähernd 9 mg Cholesterin pro kg Körpergewicht werden täglich in peripheren Geweben synthetisiert und müssen für einen effektiven Katabolismus über die Blutbahn zur Leber transportiert werden, da periphere Zellen eine unzureichende Ausstattung mit Enzymen zum Abbau des Sterangerüstes aufweisen (Dietschy et al., 1993). Die Leber ist das einzige Organ des menschlichen Körpers, das Cholesterin entweder direkt oder nach Umbau zu Gallensäuren ausscheiden kann. Dieser Weg des Cholesterins aus extrahepatischen Geweben zurück zur Leber wird als Reverser Cholesterintransport (RCT) bezeichnet (Fielding und Fielding, 2000). Die Übertragung von Cholesterin nichthepatischer Zellen auf Transportmoleküle, wie z.B. lipidarme HDL-Partikel oder lipidfreie Apolipoproteine, wird als Cholesterin-Efflux bezeichnet und ist der initiale Schritte beim Reversen Cholesterin-Transport (von Eckardstein et al., 2001; Barter und Rye, 1996). Lipidarme HDL-Partikel bzw. lipidfreie Apolipoproteine spielen dabei eine besondere Rolle, da sie in der Lage sind, unverestertes Cholesterin oder Phospholipide aus hepatischen oder nicht hepatischen Zellen aufzunehmen (Oram und Yokohama, 1997). Verschiedene Varianten für den Mechanismus des Cholesterin-Efflux werden diskutiert. Grundsätzlich lassen sich aktive und spezifische sowie unspezifische und passive Cholesterin-Efflux-Mechanismen unterscheiden (von Eckardstein, 1995; Oram und Yokoyama, 1997; Rothblat et al., 1999).

Der über ABCA1-Transporter (ATP-binding cassette transporter A type 1) vermittelte aktive, Energie- und Apolipoprotein-abhängige Cholesterin-Efflux wird als ein entscheidender Schritt im Rahmen des Reversen Cholesterintransportes gesehen (von Eckardstein et al., 2001). Dieser Efflux-Mechanismus ist charakteristisch für bestimmte Zelltypen wie z.B. humane Fibroblasten, glatte Muskelzellen der Aorta oder Makrophagen (von Eckardstein, 1996; Rothblat et al., 1999; Francis et al., 1999; Ramaley et al., 1997). In bestimmten Zelltypen kann dieser Efflux-Mechanismus dagegen nicht nachgewiesen werden, dazu zählen z.B. humane Erythrozyten oder Fibroblasten von Patienten mit der Tangier-Erkrankung (Ramaley et al., 1997; Francis et al., 1995; von Eckardstein et al., 2001). Durch die Untersuchung von Tangier-Patienten, die eine gestörte Funktion des ABCA1-Transporters aufweisen, konnte für den ABCA1-Transporter eine zusätzliche Funktion im intrazellulären Cholesterintransport aufgedeckt werden. Bei diesen Patienten kommt es neben einem gestörten Cholesterin-Efflux über den ABCA1-Transporter zusätzlich zu hyperplastischen Strukturen des Golgi-Apparates inmitten von lipidbeladenen Tangier-Makrophagen (Orso et al., 2000). Damit kann auf eine Beteiligung des ABCA1-Transporters beim intrazellulären Cholesterintransport zwischen

lipidreichen Zellorganellen (Lysosomen und TGN) und der Plasmamembran geschlossen werden. Ein Nachweis des ABCA1-Transporters in cholesterinreichen Membrandomänen ist nicht erbracht (Mendez et al. 2001).

Der über dem ABCA1-Transporter vermittelte Lipid-Efflux ist unidirektional, besitzt eine Sättigungsgrenze, erfolgt bedeutend schneller als passive Efflux-Mechanismen (siehe unten) und führt zu einer effizienten Reduktion der zytosolischen Konzentration an Cholesterinestern (Oram und Yokohama, 1997; von Eckardstein, 1996; Rothblat et al., 1999). Vermutlich gelangen mit Hilfe des ABCA1 Transporters Cholesterin und Phospholipide von intrazellulären Kompartimenten in äußere Abschnitte der Plasmamembran (Hamon et al., 2000), um im Anschluß auf lipidfreie Apolipoproteine oder lipidarme HDL-Partikel übertragen zu werden (Wang et al., 2000). Dabei scheint ein Phospholipid-Efflux dem Cholesterin-Efflux vorauszugehen. So ist vermutlich die Bildung von Phospholipid/ApoA1-Komplexen durch Vermittlung des ABCA1-Transporters die Voraussetzung für den Cholesterin-Efflux aus Teilen der Zellmembran (Rothblat et al., 1999). Das Cholesterin wird durch den ABCA1-Tansporter nicht direkt gebunden, jedoch regulieren die Phospholipid/Apo-A1-Komplexe den Cholesterin-Efflux (Wang et al., 2001). Die Bedeutung des ABCA1-Transporters wird auch dadurch unterstrichen, dass dessen Expression und der Lipid-Efflux positiv mit der Höhe der intrazellulären Cholesterinkonzentration korreliert sind (Langmann et al., 1999). Ebenso kommt es zu einer Abnahme des HDL-vermittelten Cholesterin-Efflux bei Inhibition des ABCA1-Transporters, oder umgekehrt zu einem zunehmenden Cholesterin-Efflux bei einer Überexpression von ABCA1 (Lawn et al., 1999; Hamon et al., 2000).

Neben diesem schnellen und energieabhängigen Cholesterin-Efflux-Mechanismus kann Cholesterin über einen weiteren Mechanismus die Zelle verlassen. Dabei kommt es vermutlich nach der Bindung von HDL-Partikeln an den Scavenger-Rezeptor-B1 (SR-BI) zu einer passiven Diffusion von nicht verestertem membranständigen Cholesterin auf HDL-Partikel (Ji et al., 1997). SR-BI ist ein in Lipid Rafts/Caveolae nachgewiesenes 57 kDa Protein (Acton et al., 1996; Babitt et al. 1997). Caveolin und SR-BI werden in verschiedenen Zellen in Abhängigkeit von der Cholesterinkonzentration exprimiert (Fielding und Fielding, 1997; Fielding und Fielding, 2000; Frank et al., 2001). Die Bindung von HDL an SR-BI ermöglicht einen im Vergleich zum ABCA1-Transporter langsamen, bidirektionalen Cholesterinaustausch entlang eines Konzentrationsgefälles zwischen HDL-Partikel und cholesterinreichen Domänen (Caveolae) der Plasmamembran. Auf diese Weise kommt es zu einer permanenten Reorganisation der Lipidkomposition innerhalb von Caveolae (de la Llera-Moya et al., 1999). Die Veresterung des übertragenen Cholesterins verhindert die Rückdiffusion des HDL-Cholesterins und fördert damit den Cholesterin-Efflux (Czarnecka und Yokohama, 1995).

Einige Arbeiten beschreiben einen als Retroendozytose bezeichneten Prozess. Für Makrophagen, Hepatozyten und Fibroblasten konnte dabei die Internalisierung von lipidarmen HDL-Partikeln und lipidfreien Apolipoproteinen in „Clathrin-Coated“ Endosomen gezeigt werden, die anschließend nach intrazellulärer Lipidaufnahme als lipidreiche Apolipoproteine resezerniert werden (Heeren et al., 1999, Takahashi und Smith, 1999). Die Lipide der HDL-Partikel können über direkte und indirekte Mechanismen die Blutbahn verlassen (Acton et al., 1996). In der Leber kann Cholesterin weiter für

Stoffwechselprozesse genutzt, oder in mehreren Schritten in Gallensäuren umgewandelt und durch Sekretion der produzierten Gallensäuren in das Duodenum ausgeschieden werden.

1.2 Cholesterinreiche Membrandomänen

1.2.1 Lipid Rafts

Die Plasmamembran wurde bisher als eine aus Lipiden aufgebaute Zellstruktur betrachtet, in der die assoziierten Membranproteine relativ ungeordnet und gleichmäßig verteilt sind. Eine grundlegend neue Interpretation liefert das durch Simons formulierte Modell der Lipid Rafts (Simons und Ikonen, 1997). Das Modell beschreibt die Plasmamembran als eine Zellstruktur, in der die in der Membran befindlichen Lipide asymmetrisch eingelagert sind. Danach wird die Existenz lateraler Lipidzusammenlagerungen („Lipid Rafts“) beschrieben, in denen vor allem Glykosphingolipide und Cholesterin eingelagert sind. Durch molekulare Interaktion der in der Membran eingelagerten Lipide kommt es zur Formierung dieser Lipid Rafts, die als bewegliche Plattformen fungieren, an denen spezifische Proteine konzentriert werden können (Simons und Ikonen, 1997). Die Beschreibung lateraler Lipidzusammenlagerungen als „Lipid Rafts“ bezieht sich auf ihre potentielle Funktion in der Zelle. Als eine Art Floß (engl. Raft) übernehmen sie in der Plasmamembran Aufgaben, z.B. beim Transport von Membranbestandteilen wie Cholesterin, und sind damit Bindeglied im Rahmen des intrazellulären Cholesterinhaushaltes und Cholesterinmembranverkehrs (Babiychuk und Draeger, 2000). Zudem fungieren sie als Plattform bei der Etablierung spezifischer Proteinkomplexe zur Weitergabe von Signalen im Rahmen der intrazellulären Signaltransduktion, indem beispielsweise Proteine selektiv aufgenommen und wieder abgegeben werden können (Simons und Ikonen, 1997). Das Modell der Lipid Rafts wurde lange Zeit kontrovers diskutiert, vor allem weil sich der definitive Nachweis von Lipid Rafts in lebenden Zellen sehr schwierig gestaltet. Durch den Einsatz verbesserter Methoden konnten diese Zweifel mittlerweile beseitigt werden (Simons und Toomre, 2000).

1.2.1.1 Struktur und intrazelluläre Lokalisation von Lipid Rafts

Die Größe von Lipid Rafts beträgt ca. 50 nm im Durchmesser. Damit sind diese Zellstrukturen lichtmikroskopisch nicht mehr abgrenzbar. Dies ist ein Grund für den schwierigen Nachweis von Lipid Rafts *in vivo* (Simons und Toomre, 2000). Der Membranaufbau im Bereich von Lipid Rafts ist asymmetrisch. Die Formierung dieser sphingolipid- und cholesterinreichen Lipidmikrodomänen wird nach dem Modell von Simons (Simons und Ikonen, 1997; Harder und Simons, 1997) durch Lipid-Lipid Interaktionen ermöglicht, wobei vermutlich benachbarte Glykosphingolipide durch schwache Wechselwirkungen ihrer Carbohydrat-Kopfbereiche in Kontakt treten. Die Kopfgruppe dieser Sphingolipide ragt auf der extraplasmatischen Seite aus der Plasmamembran heraus. Die Lücken zwischen den assoziierten Sphingolipiden werden durch Cholesterinmoleküle aufgefüllt, die als Platzhalter fungieren. Die Sphingolipidkopfgruppen sind mit gesättigten Hydrocarbonketten verbunden, die in der Membran verankert sind. Diese dicht gedrängten Sphingolipid-Cholesterin-Ansammlungen befinden sich auf der extraplasmatischen Seite der Plasmamembran. In der zwischen

extraplasmatischer und zytoplasmatischer Seite gelegenen inneren Membranregion sind ungesättigte Phosphatidylcholinmoleküle eingelagert. Der genaue Aufbau dieser Region ist aber noch nicht verstanden. Die auf der extraplasmatischen Seite befindlichen Glykosphingolipide tragen lange Fettsäureketten, die über eine Amidbindung mit der Sphingosinbasis verbunden sind. Die Glykosphingolipide können vermutlich auf diese Weise mit der zytoplasmatischen Seite der Doppelmembran in Wechselwirkung treten. Cholesterin übernimmt wie auf der extraplasmatischen Seite auch auf der zytoplasmatischen Seite die Funktion eines Platzhalters und füllt den Raum zwischen den ineinandergreifenden Fettsäureketten aus. An der zytoplasmatischen Membranseite der Lipid Rafts-Region befinden sich vor allem Glycerolipide (z.B. Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin). Über die genaue Aufgabe der auf der zytoplasmatischen Seite befindlichen Phospholipide ist noch wenig bekannt. Es wird vermutet, dass auch diese Fettsäurereste tragen, die die Struktur der Lipidmikrodomänen optimieren. Spezifische Lipide können in Lipid Rafts ein- und wieder heraustreten, so dass der Aufbau der Membrandomäne kontinuierlichen Änderungen unterworfen ist. (Simons und Ikonen, 1997). Die geschilderten Molekül-Interaktionen sind per se schwach und transient. Lipid Rafts sind aus diesem Grunde dynamische Strukturen, in denen Cholesterin eine bedeutende Rolle zu spielen scheint (Harder und Simons, 1997).

Die Verteilung von Lipid Rafts auf der Zelloberfläche ist abhängig von jeweiligen Zelltyp. In polarisierten Epithelzellen und Neuronen akkumulieren Lipid Rafts in apikalen und axonalen Membranbereichen. Basolaterale und somatodendritische Membranbereiche enthalten auch Lipid Rafts, aber in wesentlich kleinerer Anzahl (Simons und Ikonen, 1997). Im Gegensatz dazu verteilen sich Lipid Rafts in Lymphozyten und Fibroblasten ohne offensichtliche Polarität gleichmäßig über die gesamte Zelloberfläche (Simons und Toomre, 2000).

Lipid Rafts werden vor allem an der Plasmamembran nachgewiesen. Belegt sind jedoch auch Funktionen in biosynthetischen und endozytotischen Prozessen (Simons und Toomre, 2000). Es handelt sich nicht um ein statisches System, sondern um einen dynamischen Prozeß, der ständigen Veränderungen unterliegt. Nach bisherigen Studien wird davon ausgegangen, dass Lipid Rafts im Golgi-Apparat zusammengestellt werden, danach in die verschiedenen zellulären Kompartimente, vor allem zur Plasmamembran gelangen, um danach als sphingomyelin- und cholesterinarme Vesikel zurück zum Endoplasmatischen Retikulum zu gelangen (Brown und London, 1998; van Meer, 1989). Dabei spielen spezifische Proteine in den Lipid Rafts in vielen Zellen eine wichtige Rolle für den gerichteten Verkehr von Lipid Rafts zur Zelloberfläche (Simons und Ikonen, 1997; Keller und Simons, 1997). Lipid Rafts der Frühen Endosomen gelangen zum Recycling entweder direkt zur Plasmamembran oder indirekt über recyclierende Endosomen in den Golgi-Apparat (Puri et al., 1999)

1.2.1.2 Lipid Rafts-asssoziierte Proteine

Aufgrund ihrer Eigenschaft, Proteine selektiv aufzunehmen und wieder abzugeben, werden Lipid Rafts unterschiedliche Aufgaben zugeschrieben. Die Proteinanzahl in einer Lipid Rafts-Domäne hängt von der Dichte des Einbaus in die Membran ab und schwankt im allgemeinen zwischen 10 – 30 Proteinen pro Lipid Rafts-Region. Dabei können verschiedene Proteine, aber auch Ansammlungen von bis zu 15 Molekülen des gleichen Proteins in derselben Domäne nachgewiesen werden. Da-

mit ist eine Rafts-Domäne lediglich in der Lage, einen kleinen Teil aller in Lipid Rafts bisher nachgewiesenen Proteine aufzunehmen (Simons und Toomre, 2000).

Für eine Vielzahl von Proteinen ist ihre Assoziation mit Lipid Rafts beschrieben worden. Zu ihnen gehören z.B. GPI-verankerte Proteine (Glykosylphosphatidylinositol), die auf der extraplasmatischen Seite der Doppelmembran mit ihren GPI-Ankern, im Regelfall zwei gesättigte Fettsäureketten, mit Lipid Rafts verbunden sind (Brown and Rose, 1992). Andere Proteine assoziieren mit ihrer transmembranen Domäne mit der Doppelmembran. Zu diesen transmembranen Proteinen zählen z.B. Influenza Virus Proteine Neuraminidase und Hämagglutinin, die mit Lipid Rafts in der Virus Membran assoziieren (Skibbens et al., 1989). Weiterhin zählen Tyrosinkinasen der Src-Familie zu den Lipid Rafts-assoziierten Proteinen. Diese binden auf der zytoplasmatischen Seite über ihre Acyl-Enden im Bereich der Lipidmikrodomänen (Casey, 1995). Auch die α-Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen (Resh, 1999) oder palmitoylierte Proteine (Rietveld et al., 1999) werden in den Mikromembrandomänen beschrieben. In cholesterinreichen Membrandomänen ist zudem das cholesterinbindende Protein Caveolin nachweisbar. Caveoline beeinflussen das dynamische Zusammenspiel in Membranen durch Formierung spezieller Domänen, sogenannte Caveolae, in intrazellulären Membranen und Plasmamembranen (Harder und Simons, 1997; Simons und Ikonen, 1997). Trotz der nachgewiesenen Proteininteraktionen bleibt es aber weiterhin unklar, welche Proteine tatsächlich *in vivo* mit Lipid Rafts bzw. Caveolae in Beziehung stehen.

1.2.2 Aufbau und Struktur von Caveolae

Caveolae wurden erstmals in den 50er Jahren von Palade (Palade, 1953) und Yamada (Yamada, 1955) beschrieben. Die Struktur von Caveolae ist bisher wenig erforscht, da es sich einerseits um dynamische und andererseits um sehr kleine Zellstrukturen handelt. Bisher stand die Beschreibung der morphologischen Erscheinungsform und die Benennung von Molekülen, die mit Caveolae assoziiert sind, im Vordergrund des Interesses. Weniger ist über die potentielle Funktion dieser Strukturen bekannt. Caveolae formieren sich vermutlich aus Lipid Rafts durch Polymerisation von Caveolinen, palmitoylierten integralen Membranproteinen mit der Fähigkeit zur Cholesterinbindung (vgl. Abb. 2) (Parton, 1996; Smart et al., 1999). Obwohl vieles darauf hindeutet, ist weiterhin ungeklärt, ob Caveolae und caveolinfreie Lipid Rafts in einer und derselben Zelle koexistieren. So könnte das Protein Caveolin bereits existierende Lipid Rafts in Caveolae umgestalten. Die sehr ähnliche Komposition aus Lipiden und Proteinen von Lipid Rafts und Caveolae unterstützt diese Vermutung, es mangelt aber noch an einem Beweis für diese Annahme. Caveolae würden somit eine spezialisierte Form von Lipid Rafts darstellen (Fielding und Fielding, 2000). Vor diesem Hintergrund erscheint eine Abgrenzung von Lipid Rafts und Caveolae schwierig. Für die vorliegende Arbeit wird eine auf morphologischen Unterscheidungsmerkmalen aufbauende Definition gewählt. Danach sind Caveolae cholesterinreiche, clathrinfreie, omegaförmige Plasmamembraninvaginationen mit einem Durchmesser von 50 – 70 nm (Brown und London, 1998; Simons und Ikonen, 1997; von Deurs et al., 1993). Die Namensgebung (lat. cavum: der Hohlraum) berücksichtigt die bereits bei Erstbeschreibung aufgefallenen Membraneinstülpungen. Bei dieser Definition muß berücksichtigt werden, dass es sich bei Caveolae

um dynamische Strukturen handelt, deren morphologisches Erscheinungsbild durch noch nicht genau bekannte Faktoren beeinflusst werden kann. Zu berücksichtigen ist weiterhin, dass einige experimentelle Bedingungen zu morphologischen Veränderungen an Caveolae führen können und einen Nachweis erschweren (Brown und London, 1998).

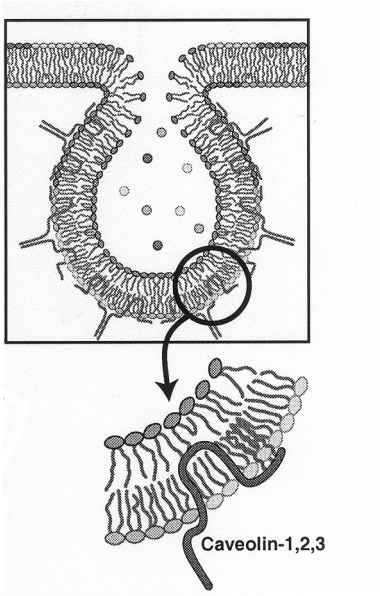


Abb. 2 : Modell des strukturellen Aufbaus von Caveolae (modifiziert nach Parton, 2001)

Caveolae besitzen wie Lipid Rafts eine charakteristische Lipid- und Proteinzusammensetzung (vgl. Tab. 3). Das 22 kDa Protein Caveolin hat hierbei eine herausgehobene Stellung. Heteropolymere von Caveolinen übernehmen vermutlich eine wichtige Funktion bei der strukturellen Formierung von Caveolae (Rothberg et al., 1992). So verhindert die Inaktivierung von Caveolinen in Caveolin-„Knockout“ Mäusen die Ausbildung von Caveolae und führt zu funktionellen Beeinträchtigungen in diesen Tieren (Park et al., 2002). Bisher konnten Caveolin-Familienmitglieder in vielen Zelltypen nachgewiesen werden, dazu zählen z.B. Adipozyten, Fibroblasten, Muskelzellen oder Endothelzellen. Nur sehr geringe Konzentrationen fanden sich in Hepatozyten. In nicht adhärenten Monozyten und Lymphozyten scheinen Caveolae vollständig zu fehlen (Fielding und Fielding, 2000). Man unterscheidet wenigstens vier Caveolin-Genprodukte, Caveolin-1α, -1β, -2 und –3 (Tang et al., 1996). Die Lokalisation der Mitglieder der Caveolin-Familie ist abhängig vom Gewebetyp. Für Caveolin-1α, -1β und -2 erfolgte ein Nachweis in fast allen bisher untersuchten Geweben (Scherer et al., 1997). Im Gegensatz dazu wird Caveolin-3 vorherrschend in Muskelzellen exprimiert (Tang et al., 1996).

Kennzeichnendes Merkmal aller Mitglieder der Caveolin-Proteinfamilie ist eine hochkonservierte hydrophobe Domäne aus 33 Aminosäuren. Sie dient der Verankerung des Proteins in der Membran. Das amino- und das C-terminale Ende liegen intrazellulär frei im Zytoplasma (Glenney et al., 1992). Caveolinmoleküle haben die Fähigkeit zur Oligomerisation. Die im Zytoplasma als Monomer vorliegenden Caveoline bilden dabei Aggregate aus 16 – 18 Caveolin-Proteinen (Monier et al., 1996). Das Caveolin-Molekül besitzt eine saure, 23 Aminosäuren lange, hydrophobe Domäne mit palmitoylierten Cysteinresten am C-terminalen Ende. Die Palmitoylierung ermöglicht die Bindung von Cholesterin und die Formierung des Caveolin-Chaperon-Transportkomplexes. Dieser Komplex setzt sich aus

HSP56, Cyclophilin 40, Cyclophilin A und Cholesterin zusammen und dient vermutlich dem Transport von neusynthetisiertem Cholesterin von ER durch das Zytoplasma zu den Caveolae (Uittenbogaard und Smart, 2000). Die Fähigkeit zur Bindung von Cholesterin erklärt die Assoziation von Caveolin mit Caveolae und post-Golgi-Transportvesikeln (Murata et al., 1995). Neben Caveolinen können in Caveolae weitere Proteine wie z.B. Dynamin nachgewiesen werden. Die GTPase Dynamin vermittelt wahrscheinlich die Internalisierung von Caveolae-Vesikeln an der Plasmamembran. (Henley et al., 1998; Conrad et al., 1995). Auf die besondere Bedeutung von Annexinen in diesen Membrandomänen wird in Kapitel 1.3 eingegangen.

Caveolae lassen sich neben charakteristischen Struktur-Proteinen anhand ihrer besonderen Lipidzusammensetzung beschreiben (vgl. Tab. 3). Caveolae sind reich an freiem Cholesterin, Sphingomyelin und einer Reihe weiterer Lipide wie Ganglioside, Ceramide, Diacylglycerol oder Phosphatidylinositoldiphosphat. Bisher ist es nicht vollständig geklärt, ob Caveolae-Fraktionen dieser Lipide direkt in Signaltransduktionsprozesse involviert sind, oder ob Caveolae ein Reservoir für präformierte bioaktive Lipide sind, die sich bei Bedarf in anderen Zelloberflächenmikrodomänen sammeln (Fielding und Fielding, 2000). Tabelle 3 zeigt auszugsweise charakteristische Lipidkomponenten, spezifische Rezeptoren, strukturgebende Proteine, Transportproteine und Proteine der Signaltransduktionskette, die in Caveolae nachweisbar sind (Anderson, 1998).

In der Literatur erfolgt aufgrund der problematischen inhaltlichen Abgrenzung keine klare Trennung der Begriffe Lipid Rafts und Caveolae. Daher werden im Folgenden diese Kennzeichnungen unter dem Begriff cholesterinreiche Membrandomänen gemeinsam behandelt. Diese lassen sich zusammengefaßt durch folgende Eigenschaften beschreiben. Dazu zählen (1) die Unlöslichkeit in Triton X-100 bei 4°C und Ausbildung glykolipidhaltiger Komplexe in diesem Detergenz („detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membrane domains“, „DIG“ oder „detergent-resistant membranes“ „DRM“) (Parton and Simons, 1995; Brown und London, 1998), (2) die Anreicherung mit Cholesterin, Glykosphingolipiden und einer Zahl weiterer Lipide (vgl. Tab. 3) (Anderson, 1998; Simons und Ikonen, 1997), (3) die Anreicherung im Bereich niedriger Dichte bei Zentrifugation im Optiprep®-Gradienten (Brown and Rose, 1992; Simons und Toomre, 2000), (4) die Anreicherung mit einer Gruppe spezifischer lipidverankerter Membranproteine (Simon und Ikonen, 1997; Simons und Toomre, 2000).

Molekülklasse	**Name des Moleküls**	**Referenz**
Lipide	Ganglioside	Smart et al., 1995
	Sphingomyelin	Brown und Rose, 1992
	Ceramide	Brown und Rose, 1992
	Cholesterin	Smart et al., 1996
	Diacylglycerol (DAG)	Liu und Anderson, 1995
Membranrezeptoren	Platelet-derived growth factor (PDGF)	Liu et al., 1996
	Insulin	Goldberg et al., 1987
	Epidermal growth factor (EGF)	Smart et al., 1995

	SR-BI	Babitt et al. 1997
Moleküle d. Signaltransduktion	PKC_{α}	Lisanti et al., 1994
	Adenylatcyklase	Wagner et al., 1972
	Raf1	Anderson, 1998
	Calmodulin	Anderson 1998
	Phosphoinositide	Hope und Pike, 1996
Strukturgebende Moleküle	Caveolin	Rothberg et al., 1992
	Annexin II	Lisanti et al., 1994
Transport-Moleküle	IP_3 Rezeptor; H^+ ATPase; Ca^{2+} ATPase	Anderson, 1998

Tab. 3: Spezifische Lipid- und Proteinzusammensetzung in Caveolae (modifiziert nach Anderson, 1998)

1.2.3 Funktionen cholesterinreicher Membrandomänen

1.2.3.1 Signaltransduktion

Die genaue biologische Aufgabe von Lipid Rafts und Caveolae ist weiterhin Gegenstand zahlreicher Forschungsbemühungen. Aus bisherigen Arbeiten lässt sich als eine der Hauptaufgaben von Lipid Rafts bzw. Caveolae die Funktion als Plattform für Rezeptoren und Proteinkomplexe von Signaltransduktions-Kaskaden ableiten (Harder und Simons, 1997; Brown und London, 1998). Durch die laterale Organisationsstruktur von Zellmembranen können spezifische lipidverankerte Membranproteine und Rezeptoren der Signaltransduktion in den Mikrodomänen konzentriert werden. Die Rezeptoren können so mit Liganden und Effektoren auf beiden Seiten der Membran durch komplexe Protein-Protein Wechselwirkungen interagieren. Lipid Rafts bzw. Caveolae an der Zelloberfläche enthalten unterschiedliche Proteinkomplexe (vgl. Kap. 1.2.1.2) entsprechend ihrer jeweiligen Funktion im Signaltransduktionsweg. Die Bindungen der Interaktionspartner werden auf diese Weise beschleunigt und störende Interaktionen zwischen den verschiedenen Signaltransduktions-Wegen verhindert (Simons und Ikonen, 1997). So ist der Komplex aus Rezeptoren und Liganden geschützt vor nicht Rafts-assoziierten Enzymen, wie z.B. Membran-Phosphatasen, die den Signalübertragungsprozeß beeinflussen könnten (Simons und Toomre, 2000). Die Assoziation von Proteinen der Signaltransduktion mit Lipid Rafts/Caveolae-Regionen der Zellmembran kann durch andere Proteine moduliert werden. Lipid Rafts bzw. Caveolae sind in der Lage, ihre Proteinzusammensetzung, ihre Größe und Lipidkomposition durch den Einfluß extra- und intrazellulärer Stimuli zu verändern (Nykjaer et al., 1994; Simons und Ikonen, 1997).

Zu den in Lipid Rafts bzw. Caveolae nachgewiesenen Signalmolekülen mit einer Schlüsselstellung innerhalb von Signaltransduktionsprozessen gehören GPI-verankerte Proteine, die je nach Zelltyp verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren (Parton und Simons, 1995; Anderson, 1993). Eine Reihe von signaltransduzierenden Proteinen ist in der Lage mit Caveolin, dem strukturgebenden Protein der Caveolae, zu interagieren. Hierzu zählt neben anderen Proteinen auch die GTPase p21-Ras, die eine Schlüsselstellung in Signalprozessen des ERK-MAP Kinaseweges einnimmt (Song et al., 1996; Couet et al., 1997; Anderson, 1998). Zu diesen Mitgliedern des MAP Kinase Weges gehören neben p21-Ras auch Fyn oder s-SRC. Weiterhin assoziieren Zelloberflächenrezeptoren wie EGF

(epidermal growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), Trimerische G Proteine und die Proteinkinasen A und C mit Lipid Rafts bzw. Caveolae (Anderson, 1998; Smart et al., 1999; Li et al., 1995; Song et al., 1996). Außerdem sind Lipide mit signaltransduzierenden Funktionen in Lipid Rafts bzw. Caveolae nachgewiesen worden. Zu ihnen zählen Phosphoinositide wie z.B. Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (Hope und Pike, 1996) und Sphingomyelin (Linardic und Hannun, 1994). Zur Zeit besteht keine Einigkeit in die Frage, welche der aufgezählten Proteine *in vivo* tatsächlich mit Caveolae assoziiert sind. Es bleibt unklar, ob Caveolae direkt in Signaltransduktionsprozesse involviert sind, oder ein Reservoir für präformierte bioaktive Moleküle bilden, die bei Bedarf bereitgestellt oder aktiviert werden können (Fielding und Fielding, 2000). Diese Interpretation wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass eine Überexpression von Caveolin die Signaltransduktion über den MAP-Kinase und PK-A-Signalweg inhibiert (Li et al., 1996; Raziani et al., 1999). Dieser Eindruck wird auch durch die Beobachtung bekräftigt, dass es bei einem Verlust von Caveolae durch Entzug von Cholesterin zu einer erhöhten Ras- und Src-vermittelten Signaltransduktion von der Zelloberfläche zum Zellkern in diesen Zellen kommt (Furuchi und Anderson, 1998). Neuere Arbeiten interpretieren Caveolae durch die Konzentration einer hohen Anzahl von spezifischen Molekülen verschiedener Signaltansduktionsprozesse in diesem zellulären Segment in der Form, dass Caveolae als ein möglicher Standort für signalintegrative Prozesse zu sehen sind. Damit könnte Caveolae eine Schlüsselfunktion bei der Modulation von Signalprozessen und beim Austausch von Signalen verschiedener Informationswege zukommen, z.B. im Sinne einer stimulatorischen und inhibitorischen Beeinflussung (Anderson, 1998).

1.2.3.2 Intrazellulärer Cholesterintransport und Cholesterin-Efflux

Cholesterinreiche Caveolae als spezialisierte Form von Lipid Rafts stellen ein wichtiges Bindeglied im Lipidverkehr der Zelle dar und übernehmen neben ihrer Rolle in der zellulären Signaltransduktion vermutlich eine bedeutende Funktion im Rahmen der Regulation des intrazellulären Cholesterinhaushaltes (Anderson, 1998). Es besteht eine enge Beziehung zwischen dem Cholesteringehalt der Zelle, der Konzentration von Caveolae an der Zelloberfläche und der Expression von Caveolin in der Zelle (Fielding et al., 1997). Die enge Verknüpfung mit dem Cholesterinmetabolismus in der Zelle lässt sich durch die folgenden Beobachtungen stützen. Caveolin ist (vgl. Kap. 1.2.2) ein cholesterinbindendes Protein (Murata et al., 1995). Die Transfektion von Caveolin-1 cDNA in Lymphozyten, die nativ keine Caveolae besitzen, führt zu einer vierfachen Erhöhung der Cholesterinkonzentration in caveolaeähnlichen Domänen und zur Formierung von caveolaeähnlichen Invaginationen (Smart et al., 1996; Fra et al., 1995). Im Vergleich dazu zeigen Zellen, die nur geringe Mengen an Caveolin-1 exprimieren, eine verringerte Transportkapazität für Cholesterin, im Gegensatz zu Zellen mit einem hohen Expressionsniveau für Caveolin-1, einer entsprechend größeren Zahl an Caveolae und einer höheren Transportkapazität für Cholesterin, wie z.B. Adipozyten (Anderson, 1998). Bei einer Vielzahl von Zellen führen erhöhte Cholesterinkonzentrationen zu einem verstärkten Expressionsniveau von Caveolin und zu einer erhöhten Anzahl von Caveolae (Fielding et al., 1997; Zhu et al., 1999).

Im Umkehrschluß führen verringerte Cholesterinkonzentrationen zu einer verminderten Zahl von Caveolae und einem verringerten Expressionsniveau für Caveolin (Fielding und Fielding, 2000).
Cholesterin ist in den zellulären Kompartimenten nicht gleichmäßig verteilt. So bindet die Plasmamembran von Säugetieren mit 60 – 90% den größten Anteil von nicht-verestertem, freiem Cholesterin in der Zelle (von Eckardstein et al., 2000). Ein Großteil davon (ca. 95%) befindet sich auf der zytoplasmatischen Seite der Doppelmembran (Liscum und Munn, 1999; Fielding und Fielding, 1997). Plasmamembranabschnitte mit clathrinhaltigen Membran-Invaginationen und Lipoproteinrezeptoren (vgl. Kap. 1.1.2) enthalten vergleichsweise weniger Cholesterin und Sphingolipide als Caveolae-assoziierte Bereiche, die sich durch einen hohen Gehalt an Cholesterin und Sphingolipiden auszeichnen (Simons und Ikonen, 1997). Andere intrazelluläre Kompartimente besitzen eine im Vergleich dazu nur geringe Konzentration an nicht verestertem, freien Cholesterin, mit Ausnahme jener Abschnitte, die auch mit der Plasmamembran kommunizieren wie z.B. Endosomen, Lysosomen und das Trans-Golgi Netzwerk (TGN) (Fielding und Fielding, 1997).
Das cholesterinbindende Markerprotein Caveolin-1 (Murata et al., 1995) fungiert zwischen diesen intrazellulären Kompartimenten vermutlich als Teil eines intrazellulären Lipidtransportsystems (Smart et al., 1994). Das TGN dient dabei als Akzeptor für neu-synthetisiertes Cholesterin aus dem ER und von exogenem Cholesterin (z.B. aus LDL, vgl. Kap. 1.1.2), das über Endosomen, Lysosomen und Caveolae in das TGN gelangt. Von TGN ausgehend können Cholesterin und Phospholipide nun entweder in Form von Triton X-100 unlöslichen caveolinhaltigen Lipid Rafts oder als Triton X-100-lösliche sekretorische Vesikel im Rahmen eines exozytotischen Membranverkehrs zur Plasmamembran transportiert werden (Fielding und Fielding, 1997; Liscum und Munn, 1999). Caveolin wandert dabei vermutlich zwischen intrazellulären Kompartimenten wie TGN und Plasmamembran hin und her (Simons und Toomre, 2000). Caveolae würden somit eine Durchgangsstation darstellen im Ausschleusungsprozess für neusynthetisiertes Cholesterin (Smart et al., 1996) und für Cholesterin, das aus Low Density Lipoproteinen (LDL) abgegeben wurde (Fielding und Fielding, 1996).
Eine interessante Verbindung besteht zwischen Caveolin, Caveolae, intrazellulärem Cholesterin-Transport und der Niemann-Pick-Erkrankung. Bei Patienten, die unter der Niemann-Pick-Erkrankung Typ C (NPC) leiden, ist der intrazelluläre Transport von unveresterten Cholesterin aus dem Zellinnern in Richtung Plasmamembran gestört bzw. verzögert (Neufeld et al., 1996, Garver et al. 1997). Cholesterin akkumuliert bei Patienten mit dieser autosomal-rezessiv vererbten Sphingomyelinose im späten endosomalen Kompartiment ("NPC-Kompartiment") (Schmitz und Orsó, 2001; Neufeld et al., 1999). Das bei diesen Patienten defekte NPC1 Protein (Niemann-Pick disease C Protein 1) dient vermutlich als Regulator im Rahmen des Transportes von Cholesterin zur Plasmamembran. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass sich in Zellen von NPC-Patienten erhöhte Caveolin-Expressionsraten nachweisen lassen (Garver et al., 1997). Möglicherweise hat das NPC1-Protein damit eine regulatorische Funktion für die Caveolin-Expression (Garver et al., 1997). Also scheinen caveolinhaltige, cholesterinreiche Membranen eine besondere Bedeutung bei diesem Defekt im intrazellulären Cholesterinverkehr bei der Niemann-Pick-Erkankung zu besitzen. Bisher ist nicht geklärt, ob die erhöhte Caveolin-Expression einen Kompensationsmechanismus für den verzögerten post-lysosomalen Cholesterin-Transport via NPC-Kompartiment darstellt oder ob beide Proteine,

NPC1 und Caveolin, gemeinsam im gleichen Kompartiment zu finden sind (Garver et al., 1997). Verschiedene Konzepte werden für das NPC1 Protein diskutiert. NPC1 könnte als direkter endolysosomaler Transporter für Cholesterin fungieren, indem es am Transport von Cholesterin vom NPC-Kompartiment zum TGN beteiligt ist. Weiterhin könnte es als Docking/Fusions-Protein fungieren, indem es beim „Docking“ und der Fusion von Cholesterin-beladenen Vesikeln mit Recycling-Endosomen vermittelt, mit dem sich anschließenden Transport von Cholesterin zum TGN. NPC1 könnte auch als eine „Pumpe“ fungieren, die Cholesterin und andere Lipide von Endosomen/Lysosomen zum TGN befördert (Schmitz uns Orsó, 2001). Auf diese Weise käme dem NPC1-Protein eine wichtige Funktion beim Transport von Cholesterin aus intrazellulären Kompartimenten zur Plasmamembran zu.

Die intrazellulären Transportwege für Cholesterin von Späten endosomalen/lysosomalen Kompartimenten über intrazelluläre Lipid Rafts in Caveolae der Plasmamembran deuten zudem auf einen ausgeprägten Membranverkehr zwischen cholesterinreichen Membrandomänen und dem endozytotischen Kompartiment hin. Einige Arbeiten unterstreichen diese Auffassung durch die Identifikation von Proteinen des Frühen endosomalen Kompartiments, z.B. Rab-, SNAP- und SNARE-Proteine, in Caveolae von Hepatozyten (Pol et al., 2000; Pol et al., 1999). In Caveolae können Internalisierungsmechanismen und die Ausbildung von endosomalen Vesikeln beobachtet werden (Anderson, 1993; Kartenbeck, 1989). Der Nachweis von Annexin-Proteinen (z.B. Annexin VI und Annexin II) in Caveolae (Orito et al., 2001; Oliferenko et al., 1999) deutet möglicherweise auf eine regulatorische Aufgabe dieser Proteine bei der Interaktion endozytotischer Transportvesikel aus Caveolae mit endozytotischem Kompartiment hin (Pol et al., 2000; Pol et al., 2000b). Dabei dürfte jedoch nicht die Internalisierung von Liganden im Vordergrund zu stehen. Vielmehr scheint dieser Prozeß dem dynamischen Membranverkehr zwischen Caveolae, internen Lipid Rafts sowie dem endozytotischen System zu dienen (Conrad et al., 1995). Gestützt wird diese Annahme durch den Nachweis von Caveolin und Caveolae-assoziierten Proteinen (z.B. p21-Ras, $p120^{GAP}$ oder Raf-1) in endosomalen Kompartimenten (Pol et al., 2000; Pol et al., 2000b).

Die Bedeutung der Funktion von Caveolae im Lipidverkehr und im Cholesterin-Efflux der Zelle unterstreicht auch die Lokalisation des Scavenger-Rezeptors-B1 (SR-BI) in Caveolae (Babitt et al., 1997). SR-BI vermittelt zum einen die selektive Aufnahme von Cholesterin aus High Density Lipoproteinen (HDL) in die Zelle, zum anderen vermutlich den Efflux des zellulären Cholesterins aus der Zelle (vgl. Kap. 1.1.4; Krieger, 1999). Die Funktion des ABCA1-Transporters im Cholesterin-Efflux und im intrazellulären Cholesterintransport wurde bereits in Kapitel 1.1.4 beschrieben. Bisher konnte jedoch noch kein Nachweis des ABCA1-Transporters in Lipid Rafts bzw. Caveolae und dessen Beteiligung am Cholesterin-Efflux beschrieben werden (Mendez et al., 2001). Auf die mögliche regulatorische Funktion von Annexinen in cholesterinreichen Membrandomänen wird in Kapitel 1.3 eingegangen.

1.2.3.3 Weitere Funktionen

Eine wesentliche Aufgabe kommt Caveolae auch bei der Internalisierung von Molekülen zu. Unabhängig von der Rezeptor-vermittelten, Clathrin-abhängigen Endozytose werden zwei Mechanismen unterschieden. Transzellulärer Transport und Potozytose. Potozytose bezeichnet einen Prozeß, bei dem extrazelluläre Moleküle in Caveolae konzentriert werden, um im Anschluß daran internalisiert und nachfolgend an das Zytoplasma oder Endoplasmatische Retikulum entlassen zu werden (Kartenbeck et al., 1989; Anderson, 1993). Dieser Mechanismus wird durch die Proteinkinase Cα (PKC) reguliert und ist durch Histamin sowie durch den Entzug von Cholesterin hemmbar (Rothberg et al., 1990). Internalisierte Moleküle sind u.a. Cholesterin (Anderson, 1998), virale Pathogene (Anderson et al., 1996), Choleratoxin (Parton, 1994) und 5-Methyltetrahydrofolat (Anderson et al., 1992). Transzellulärer Transport wird vor allem für Endothelzellen beschrieben. In Caveolae formieren sich bei diesem Prozeß Vesikel, die Molelüle wie z.B. Insulin und Albumin durch die Zelle transportieren (Schnitzer et al., 1994; Simionescu et al., 1973).

1.3 Annexine

1.3.1 Annexin-Protein-Familie

Die Annexin-Protein-Familie umfasst mehr als 10 Angehörige, die in zahlreichen Organismen untersucht wurden. Dazu zählen Vertebraten, Insekten, Nematoden und Pflanzen. (Gerke und Moos, 1997; Morgan und Fernandez, 1997). Die gut erforschten gemeinsamen Struktureigenschaften haben zur Identifizierung der umfangreichen Annexin-Familie geführt, deren Vertreter mit römischen Ziffern unterschieden werden. Annexine stellen, gebunden an intrazelluläre Membranen, aber auch frei im Zytoplasma befindlich, einen Anteil von über 1% des Gesamtzellproteins, abhängig vom jeweiligen Zelltyp. Im Gegensatz zu den gut bekannten Struktureigenschaften der Annexine gibt es unterschiedliche Erkenntnisse über die Funktion und Lokalisation der einzelnen Gruppenmitglieder (Gerke und Moss, 1997).

Mitglieder der Annexin-Proteinfamilie sind an der Regulation der Rezeptor-vermittelten Endozytose und des endosomalen Membrantransportes beteiligt (Gerke und Moss, 1997; Crompton et al., 1988). Annexin II und VI besitzen zudem vermutlich eine stabilisierende Funktion bei der Interaktion von cholesterinreichen Membrandomänen mit Teilen des Zytoskeletts (Babiychuk et al., 1999; Babiychuk und Draeger, 2000). Neuere Arbeiten identifizieren insbesondere Annexin VI in Caveolae und intrazellulären Lipid Rafts (Babiychuk und Draeger, 2000). Neben diesen Funktionen im intrazellulären Membranverkehr und der Membranorganisation wird ebenfalls eine Beteiligung von Annexinen an Prozessen der Signaltransduktion, Ionenkanalregulation, Blutkoagulation, Zellwachstum und -differenzierung, der DNA-Replikation, Entzündungshemmung und der Interaktion zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix beschrieben. Die Beteiligung an diesen sehr unterschiedlichen physiologischen Prozessen mit teilweise überlappenden Aktivitäten von einzelnen Mitgliedern der Annexin-Familie erschwert deren Zuordnung zu einer eindeutigen Funktion und ihre Identifikation *in vivo*. (Gerke und Moss, 1997; Moss, 1995; Raynal und Pollard, 1994; Mollenhauer, 1997). Die geschil-

derten Beobachtungen deuten darauf hin, dass Annexine in Abhängigkeit vom Zelltyp und physiologischen Bedingungen unterschiedliche Lokalisationen und Funktionen in der Zelle aufweisen können.

1.3.1.1 Molekulare Struktur der Annexine

Annexine lassen sich durch zwei Merkmale charakterisieren. Zum einen bestehen Annexine aus einem hochkonservierten Annexinkern („Core"-Domänen), zum anderen aus einem kürzeren, variablen N-Terminus. Der Annexinkern ist das gemeinsame Strukturmerkmal aller Annexine (vgl. Abb. 3). Dieser besteht aus vier sich wiederholenden, hintereinander geschalteten, homologen Segmenten („Core"-Domänen, Annexin-Wiederholungen) einer hochkonservierten Aminosäuresequenz mit jeweils 70-80 Aminosäuren (Glenney und Tack, 1985; Smith and Moss, 1994a). Beim Annexin VI liegen die vier auch als Annexin-Wiederholungen bezeichneten "Core"-Domänen doppelt vor (Crompton et al., 1988). Diese formieren sich zu einer kompakten, leicht gewölbten Scheibe und bilden dabei vier unterschiedliche Kerndomänen aus. Durch die Interaktion der hydrophoben Seitenketten der Annexin-Kerndomänen 1 und 4 sowie 2 und 3 wird im Zentrum dieser Formation eine hydrophile Pore gebildet (Huber et al., 1992; Liemann und Huber, 1997). Jede Annexin „Core"-Domäne setzt sich aus 5 α-Helices (A-E) zusammen. Die Helices werden durch kurze Schleifen („loops") miteinander verbunden. Zwischen den Helices A und B bzw. D und E in den „loops" jeder Kerndomäne befinden sich die potentiellen Calcium-Bindungsstellen der jeweiligen Domäne. Diese Calcium-Bindungsstellen ermöglichen den Mitgliedern der Annexin-Proteinfamilie über einen Brükkenmechanismus die calciumabhängige Bindung an vornehmlich negativ geladene Phospholipide zytosolischer Plasmamembranen (Liemann und Huber, 1997; Huber et al., 1992; Crompton et al., 1988; Swairjo and Seaton, 1994). Annexin-Proteine translozieren somit vom Zytosol an intrazelluläre Membranen in Abhängigkeit von der intrazellulären Calcium-Konzentration (Lecat et al., 2000). Die calciumabhängige Bindung an vorzugsweise negativ-geladene Phospholipide ist das zweite gemeinsame Merkmal der Mitglieder der Annexin-Proteinfamilie. Zu den Membranphospholipiden, die als Bindungspartner von Annexinen dienen, gehören z.B. Phosphatidsäure, Phosphatidylserin oder Phosphatidylinositol (Raynal und Pollard, 1994). Die Anzahl und Lokalisation der Calcium-Bindungsstellen sind trotz der sehr ähnlichen strukturellen Eigenschaften der Annexine unter den Mitgliedern der Annexin-Proteinfamilie zum Teil variabel (Gerke et al., 1997).

Innerhalb der Annexin-Familie gibt es relativ große Unterschiede in Bezug auf die Calcium-Konzentrationen, die für die Phospholipidbindung notwendig sind, als auch hinsichtlich der Potenz, mit der sie zelluläre Membranen aggregieren. Annexin I und II benötigen Calcium-Konzentrationen in submikromolarer oder geringer mikromolarer Höhe zur halbmaximalen Membranbindung, dagegen sind z.B. für Annexin V Calcium-Konzentrationen von 10 bis über 100 Mikromol für eine halbmaximale Bindung an Membranoberflächen erforderlich (Raynal und Pollard, 1994). Die calciumabhängige Phospholipidbindung und die intrazelluläre Lokalisation von Mitgliedern der Annexin-Proteinfamilie variiert auch zwischen einzelnen Zelltypen sowie innerhalb einer Zelle (Gerke und Moss, 1997). Neben der calciumabhängigen Form der Bindung an Membranphospholipide werden für Annexin I und II (Futter et al., 1993; Jost et al., 1997; Harder et al., 1997), Annexin VI (Turpin

et al., 1998) sowie für Annexin XIIIb (Fiedler et al., 1995) calciumunabhängige Membraninteraktionen beschrieben.

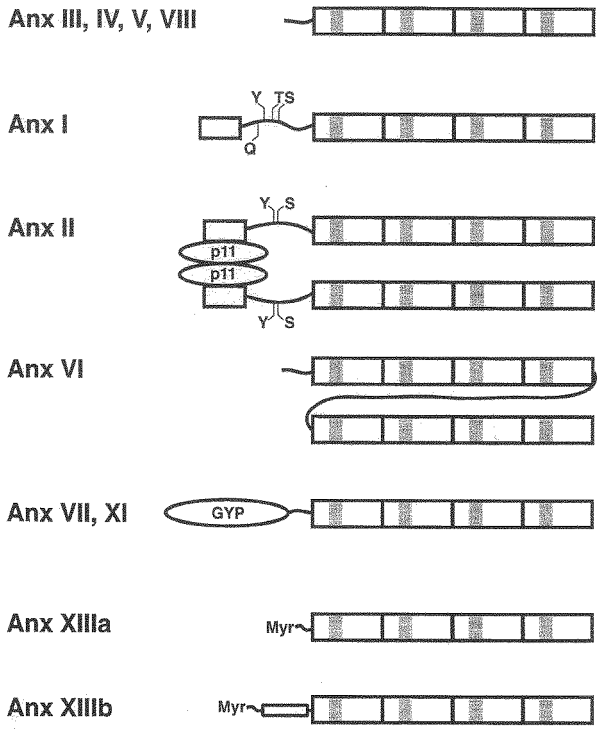


Abb. 3 : Struktur der Annexine (Gerke und Moss, 1997)

Im Gegensatz zu den Annexin-„Core"-Domänen, die die strukturellen und biochemischen Eigenschaften der Annexine definieren, weisen die einzelnen Mitglieder der Annexin-Familie eine hohe Variabilität im Bereich der N-terminalen Domänen hinsichtlich ihrer Länge und Aminosäuresequenz auf. Die Aminosäuresequenz verfügt in diesem Bereich über ein Länge zwischen 11 bis 19 Aminosäuren, kann aber auch über 100 Aminosäuren (Annexin VII und XI) erreichen. Dieser Molekülbereich, der den Annexin-„Core"-Domänen vorausgeht, vermittelt wahrscheinlich durch posttranslationale Modifikation die funktionelle Spezifität der einzelnen Annexine (Raynal und Pollard, 1994; Gerke und Moss, 1997; Südhof et al., 1988).

Eine Aufgabe dieser Regionen besteht möglicherweise in der intramolekularen Beeinflussung des Annexin-Kerns durch die N-terminalen Domänen, als Steuerungsgröße für die Regulation des Calcium- und Phospholipidbindungsverhaltens der Annexine (Powell und Glenney, 1987; Ando et al., 1989). Zudem sind die N-terminalen Molekülregionen anscheinend für die spezifische Interaktion einzelner Annexine mit bestimmten Proteinen verantwortlich (Gerke und Moss, 1997). Das Annexin II-Molekül ist ein gutes Beispiel für die Interaktion dieser Region mit anderen Proteinen. Das Annexin II-p11-Heterotetramer besteht aus einem Komplex zweier Moleküle des S100-Proteins p11 mit zwei Annexin II-Molekülen (vgl. Abb. 3). Durch den Zusammenschluß mit dem p11-Dimer werden zwei Annexine zum Annexin II-Molekül verbunden, mit einer veränderten Membranaffinität und veränderten subzellulären Lokalisation von Annexin II im Vergleich zum monomeren Annexin II-

Molekül (Rety et al., 1999; Thiel et al., 1992; Gerke und Moss, 1997; Powell und Glenney, 1987). Dieser Molekülzusammenschluß wird durch hydrophobe Reste stabilisiert, die sich für Annexin II im N-Terminus und für p11 am C-Terminus befinden (Gerke und Moss, 1997). Für Annexin I (Tokumitsu et al., 1996), Annexin VI (Garbuglia et al., 1998) und Annexin XI (Seemann et al., 1996) ist ebenfalls die Bindung der N-terminalen Region an dimerische Proteine aus der S-100 Familie beschrieben worden.

Weiterhin stellen die N-terminalen Domänen der Annexine potentielle Phosphorylierungsstellen für verschiedene signaltransduzierende Proteinkinasen dar, damit könnte ebenfalls das Bindungsvermögen der Annexine für Phospholipide verändert werden (Raynal et al., 1994). Bei Annexin I führt die Phosphorylierung des N-terminalen Serin (Wang und Creutz, 1994) oder Tyrosin (De et al., 1986) zu einer veränderten Calciumbindungs- und Vesikelaggregationseigen-schaft (Schlaepfer und Haigler, 1987). Bei Annexin II bedingt die Phosporylierung der N-terminalen Domäne eine reduzierte Affinität für Phospholipide (Brambilla et al., 1991). Die Phosphorylierung von Annexin II durch die Proteinkinase C inhibiert die Aggregation von Lipidvesikeln (Johnstone et al., 1992). Zudem sind Annexin I und II als Substrate von PDGF- (platelet-derived growth factor) und EGF- (epidermal growth factor) beschrieben worden (Futter et al., 1993; Rothut, 1997; Johnstone et al., 1993). Ferner ist die Interaktion von Annexinen mit Proteinen des Zytoskeletts anerkannt (Gerke und Moss, 1997). So können Annexin I, II und VI an Aktinfilamente binden (Glenney et al., 1987; Gerke und Weber, 1984; Hayashi et al., 1989), Annexin II und VI binden *in vitro* an Spektrin des submembranösen Zytoskeletts (Watanabe et al., 1994; Gerke und Weber, 1984). Die Identifikation von Bindungspartnern liefert wichtige Hinweise über mögliche Funktionen der Annexine (vgl. Kap. 1.3.1.3). Insbesondere die Interaktion von Annexinen mit zytoskelett-assoziierten Proteinen ist von erheblicher Bedeutung für das Verständnis der Funktion der Annexine bei der Regulation des Membranverkehrs.

1.3.1.2 Intrazelluläre Lokalisation und Gewebsverteilung von Annexinen

Annexine werden in fast allen Zelltypen angetroffen, wobei es aber zu einem gewebsspezifischen Expressionsmuster bei jedem Zelltyp kommt. Während einige Annexine (Annexine I, II und VI) ubiquitär exprimiert werden, finden sich andere Familienmitglieder wie z.B. Annexin VIII und XIII nur in sehr wenigen Zelltypen (Gerke und Moss, 1997). Das Expressionsniveau der Annexine korreliert oftmals mit dem Differenzierungsgrad der Zelle, z.B. erfolgt eine differenzierungsabhängige Erhöhung der Annexin VI-Expression während der Entwickung von T- und B-Lymphozyten (Clark et al., 1991). Allerdings hängt das Expressionsniveau nicht nur vom Differenzierungsgrad der Zelle ab, sondern auch von ihrem Aktivitätszustand wie z.B. vom jeweiligen Stadium der Wachstumsphase, in der sich die Zelle befindet (Schlaepfer und Haigler, 1990).

Zudem beeinflussen mögliche Isoformen, Konformitätsänderungen und Inkubationsbedingungen die exakte Beschreibung der intrazellulären Lokalisation. Im Gegensatz zu Kompartiment-spezifischen Rab- oder SNARE-Proteinen (vgl. Kap. 1.1.2.3) können Annexine in verschiedenen Zellkompartimenten nachgewiesen werden (Gerke und Moss, 1997). Dazu zählen Plasmamembranen (Annexin I – III, Annexin V – VII), endosomale Membranen (Annexin I, II, VI), aber auch weitere in Tabelle 4

aufgeführte membranassoziierte Zellregionen (Gerke und Moss, 1997). Bereits die intrazelluläre Lokalisation von Annexinen deutet auf deren mögliche Funktion im intrazellulären Membrantransport hin.

Annexintyp	**Lokalisation**	**Referenz**
Annexin I	Plasmamembran Frühes und Spätes endosomales Kompartiment	Seemann et al. 1996 Futter et al., 1993
Annexin II	Plasmamembran Frühe Endosomen Caveolae sekretorische Vesikel Phagosomen	Emans et al.,1993 (FE) Harder et al., 1997 (FE) Harder und Gerke 1993 (PM) Nakata et al. 1990 (PM) Senda et al. 1994 (SV) Desjardins et al. 1994 (Phag)
Annexin III	Plasmamembran, Membranen intrazellulärer Granula/Phagosamen	Le-Cabec und Maridonneau-Parini, 1994
Annexin IV	Basolaterale und / oder apikale Membranen polarisierter Epithelzellen	Massey et al., 1991 Mayran et al. 1996 Massey-Harroche et al., 1995 Kojima et al. 1994
Annexin V	Plasmamembran Endoplasmatisches Retikulum	Spreca et al. 1992 Giambanco et al. 1993
Annexin VII	Plasmamembran Membranen intrazellulärer Granula	Kuijpers et al. 1992 Selbert et al. 1995
Annexin XI	Nukleus	Mizutani et al. 1992 Mizutani et al. 1995
Annexin XIII	Apikaler Bürstensaum von Enterozyten Basolaterale Membranen	Wice und Gordon, 1992
Annexine VIII, IX und X	Noch keine exakte Zuordnung	-

Tab. 4: Intrazelluläre Lokalisation der Annexine (modifiziert aus: Gerke und Moss, 1997)

1.3.1.3 Eigenschaften und Funktionen der Annexine

Annexine stellen eine Proteingruppe mit sehr unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften und Funktionen in der Zelle dar. Die Vielfalt der potentiellen Funktionen von Annexinen spiegelt sich auch in der verwirrenden Zahl von Bezeichnungen für die einzelnen Proteinfamilienmitglieder bei ihrer Entdeckung wieder (z.B. Lipocortine, Chromobindins, Calcimidine, Anchorine oder antikoagulatorische Proteine). Die verwirrende Nomenklatur ist mittlerweile durch Einführung der universellen Bezeichnung „Annexine“ vereinfacht worden (Crompton et al., 1988; Gerke und Moss, 1997).

1.3.1.3.1 Annexine und intrazellulärer Membrantransport

Die calciumabhängige Bindung an vorzugsweise negativ geladene Membranphospholipide (vgl. Kap. 1.3.1.1) gehört zu der zentralen biochemischen Eigenschaft der Annexine. Negativ geladene, saure Phospholipide sind integrale Bestandteile aller biologischen Membranen und befinden sich vor allem auf der zytoplasmatischen Seite von Membranen. Die calciumabhängige Bindung von Mitgliedern

der Annexin-Familie an Phospholipide weist auf ihre mögliche Funktion im Rahmen des intrazellulären Membranverkehrs hin (Creutz, 1992). Für Annexin II und Annexin VI sind zwei Lipidbindungsstellen im Molekül nachgewiesen worden. Diese ermöglichen den direkten Kontakt zwischen zwei benachbarten Membranoberflächen (Gerke und Moss, 1997). Insbesondere Annexin II dient durch Brückenbildung zweier Annexin II Moleküle über ein dimeres p11-Molekül (vgl. Kap. 1.3.1.1) als entscheidendes Element bei der Interaktion und Fusion von intrazellulären Membranen im Rahmen von Exo- und Endozytoseprozessen (Creutz, 1992; Zaks et al., 1990; Emans et al., 1993).

Neben Annexin VII (Creutz, 1992) und Annexin XIII (Fiedler et al., 1995) werden vor allem Annexin I und II für den primären Membrankontakt und die Fusion exozytotischer Vesikel verantwortlich gemacht. Annexin I bindet an Membranen sekretorischer Granula und fördert calciumabhängig ihre Aggregation (Creutz et al., 1987). Annexin I ist darüberhinaus an der Steuerung der Glucose-induzierten Insulinsekretion und der Translokation insulinhaltiger Granula beteiligt (Ohnishi et al., 1995). Annexin II ist Mediator der exozytotischen Sekretion von Granula in Zellen des Nebennierenmarks (Donnelly und Moss, 1997).

Neben dieser exozytotischen Funktion von Annexinen belegen zahlreiche Arbeiten die bedeutende Rolle von Annexinen im Rahmen des endozytotischen Membranverkehrs. Annexin I wurde in multivesikulären Körperchen im Späten endosomalen Kompartiment nachgewiesen und vermittelt deren Formation (Haigler et al., 1987; Futter et al., 1993). In BHK-Zellen (Baby Hamster Kidney) assoziiert Annexin I mit Membranen Früher Endosomen (Seemann et al., 1996). Annexin II und sein Ligand p11 assoziieren mit Frühen Endosomen (Harder und Gerke, 1993) und sind an deren Fusion beteiligt (Emans et al., 1993; Mayorga et al., 1994). Die intrazelluläre Lokalisation der Frühen Endosomen ist dabei von der hochaffinen Bindung mit dem Annexin II-p11-Komplex abhängig (Harder und Gerke, 1993).

Uittenbogaard und Mitarbeiter haben gezeigt, dass Cholesterin mit Caveolin, Cyclophilin A, Cyclophilin 40 und HSP56 einen zytosolischen Caveolin-Chaperone Komplex ("Heat-shock Protein-Caveolin Chaperone Complex") bildet, über den neu synthetisiertes Cholesterin vom ER durch das Zytoplasma in Richtung Caveolae (Uittenbogaard et al., 1997; Uittenbogaard und Smart, 2000) transportiert wird, um von dort durch anschließenden Efflux auf extrazelluläre Akzeptoren übertragen zu werden oder in der Plasmamembran zu verbleiben. Auf der anderen Seite wird Cholesterin aus Caveolae in Richtung intrazellulärer Membranen über einen Caveolin-Annexin II Lipid-Protein-Komplex transportiert (Uittenbogaard et al., 2002). Eine in diesem Zusammenhang vorstellbare Interaktion von Annexin VI mit Caveolin konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Allerdings sind verschiedene Varianten einer Einflußnahme von Annexin VI auf den intrazellulären Cholesterintransport und Cholesterin-Efflux vorstellbar (vgl. Kap. 1.3.2 ff.).

1.3.1.3.2 Annexine und cholesterinreiche Membrandomänen

Neben ihrer Funktion bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose und im endosomalen Membrantransport wird eine weitere wichtige Funktion der Annexine in der Organisation und Stabilisierung von Membrandomänen (Lipid Rafts bzw. Caveolae) gesehen. Danach könnte die calciumabhängige Bin-

dung an negativ geladene Phospholipide eine Beeinflussung der Membrankomposition und die Stabilisierung von Membrandomänen zur Folge haben (Junker und Creutz, 1993; Gerke und Moss, 1997; Harder et al., 1997). Einige Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Organisation in Membrandomänen bedeutsam für die Anlagerung an das Zytoskelett, für die Lipidsegregation und den Transport von Vesikeln in verschiedenste Kompartimente der Zelle zu sein scheint. Über das Zusammenspiel von Teilen des submembranösen Zytoskeletts mit Membrandomänen besteht bisher keine klare Vorstellung. So könnten einige Annexine der Verankerung von Membrandomänen mit dem kortikalen Zytoskelett dienen und eine besondere Rolle bei der Etablierung von Lipidsegregationen (z.B. Lipid Rafts / Caveolae) spielen (Gerke und Moss, 1997). Als Beispiel sei der Annexin II-p11-Komplex angeführt, der das Aktin-Zytoskelett mit cholesterinreichen Membrandomänen (Lipid Rafts) verbindet (Babiychuk et al., 1999).

Verschiedene Annexine werden mit cholesterinreichen Membranabschnitten in Verbindung gebracht. Für Annexin II, V und VI wird eine calciumabhängige Translokation in cholesterinreiche Membranbereiche von glatten Muskelzellen beschrieben (Babiychuk und Draeger, 2000). Für Annexin XIII konnte kürzlich ebenfalls eine Assoziation mit Lipid Rafts dargestellt werden (Lecat et al., 2000). Annexin II unterstützt vermutlich calciumabhängig die Zusammenlagerung von Lipid Rafts. Neben Caveolinen haben Annexin II und VI scheinbar eine stabilisierende Funktion bei der Interaktion von cholesterinreichen Membrandomänen, Lipid Rafts bzw. Caveolae, mit Teilen des Zytoskeletts (Babiychuk et al., 1999; Babiychuk und Draeger, 2000; Harder et al., 1997). Neuere Arbeiten identifizieren insbesondere Annexin VI in Caveolae und intrazellulären Lipid Rafts (Lecat et al., 2000; Orito et al., 2001; Babiychuk und Draeger, 2000; Babiychuk et al., 2000; Schnitzer et al., 1995). Trotz zahlreicher Forschungsanstrengungen ist die Rolle von Annexinen bei der Aggregation von Membranen und ihre Funktion in cholesterinreichen Membranen nicht vollständig geklärt. Auf die Funktion von Annexin VI in cholesterinreichen Membranen wird nun gesondert in Kapitel 1.3.2 eingegangen.

1.3.2 Annexin VI

Die multifunktionelle Rolle von Annexinen bei der Regulation des Membranverkehrs bestätigt sich auch bei der Betrachtung des Annexin VI-Proteins. Annexin VI wurde erstmals 1984 aus einer Plasmamembranpräparation menschlicher Lymphozyten isoliert (Owens und Crumpton, 1984; Owens et al., 1984). Das neuentdeckte Protein wurde zunächst unter verschiedenen Bezeichnungen wie z.B. Calelectrin, Calcimedin, Calpactin oder Calphobindin geführt, die sich auf die calciumbindende Aktivität und die möglichen Funktionen in der Zelle bezogen. Seit 1988 ist deren Zugehörigkeit zur Annexinfamilie anerkannt und es wird einheitlich die Bezeichnung Annexin VI verwendet (Crompton et al., 1988; Südhof et al., 1988)

1.3.2.1 Molekulare Struktur von Annexin VI

Das strukturelle Kennzeichen aller Annexine sind vier hochkonservierte, C-terminale 70 – 80 Aminosäuren umfassende Kerndomänen („Core“-Domänen, Annexin-Wiederholungen) (vgl. Kap. 1.3.1.1). Im Falle von Annexin VI besteht der Proteinkern aus zwei fast identischen Hälften mit je-

weils vier „Core“-Domänen und entsprechend achtfacher Annexin-Wiederholung (vgl. Abb. 4). Dies erklärt auch die Höhe des Molekulargewichtes, das mit ca. 68 kDa ungefähr doppelt so hoch liegt wie das der übrigen Annexine. Eine kurze, nicht konservierte N-terminale Sequenz von 24 Aminosäuren geht der ersten Annexin-Wiederholung voraus. (Südhof et al., 1988; Crompton et al., 1988; Benz et al. 1996). Aufgrund der auffallenden Sequenzhomologie der beiden Annexinkerne wird vermutet, dass Annexin VI durch Genduplikation aus einem Vorläuferprotein mit vier Annexin-Wiederholungen hervorgegangen ist (Crompton et al., 1988; Smith und Moss, 1994 a und b).

Die kristalline und membrangebundene Struktur des humanen Annexin VI-Moleküls zeigt zwei voneinander getrennte Molekülhälften, bestehend aus der charakteristischen Tetrade-Domäne von Annexin I mit vier Annexin-Domänen, die entsprechend der Grundstruktur aller Annexine aus fünf α-Helices (A – E) aufgebaut sind (vgl. Abb. 4). Die fünf Helices ordnen sich im Raum in Form einer rechtshändigen Superhelix an und werden durch kurze Schleifen miteinander verbunden. An der leicht konvexen Seite der Annexinkerne befinden sich an der Schleife A/B und D/E die potentiellen Calcium-Bindungsorte. Über diese wird vermutlich die calciumabhängige Bindung an Membranphospholipide ermöglicht (Avila-Sakar et al., 1998; Driessen et al., 1992). In der Literatur werden unterschiedliche Bindungsaffinitäten von Annexin VI zu einzelnen Phospholipiden beschrieben. Eine ausgeprägte Affinität besteht für negativ geladene Phospholipide wie Phospatidylinositol, Phosphatidylserin und Cardiolipin (Edwards und Booth, 1987). Der Bedarf an freiem intrazellulärem Calcium geht zurück, wenn prozentual der Gehalt an Phosphatidylsäure oder Phosphatidylethanolamin in der Membran erhöht ist (Lu et al., 1994). Jedoch überschreiten die experimentell eingesetzen Calcium-Konzentrationen teilweise bei weitem die Menge an freiem Calcium in den „Calcium-Pools“ in ruhenden Zellen. Dies deutet darauf hin, dass zusätzliche Mechanismen bei der Membranassoziation von Bedeutung sein müssen. Außerdem sind für Annexin VI calciumunabhängige Membranassoziationen beschrieben worden (Turpin et al., 1999) und ein Teil des Annexin VI liegt auch nicht membrangebunden im Zytosol vor (Gerke und Moss, 1997).

Die zwei Molekülhälften von Annexin VI sind über eine Verbindungshelix von 49 Aminosäuren verbunden (vgl. Abb. 4) und stehen im kristallinen Zustand senkrecht zueinander. Im membrangebundenen Zustand sind sie mit den Calcium-Bindungsstellen koplanar zur Membranebene ausgerichtet. Diese Rotation um 90° verlangt eine große Flexibilität der α-Helix-Verbindungsachse. Diese Flexibilität spielt bei der Interaktion mit fusionierenden Membranen eine wichtige Rolle. Aufgrund seiner molekularen Struktur ist das Annexin VI-Molekül in der Lage, calciumabhängige Kontakte über zwei Membranen hinweg zu vermitteln (Liemann und Huber, 1997; Zaks und Creutz, 1991; Benz et al., 1996).

In der Protein-Gelelektrophorese entsteht oftmals bei ca. 68 kDa eine charakteristische Doppelbande. Vermutlich repräsentiert diese zwei Isoformen des Annexin VI-Moleküls. Für Annexin VI werden zwei Splicing-Varianten beschrieben, wobei sich die cDNA durch eine Insertion eines 18 Nukleotide langen Teilstücks unterscheiden, das für 6 Aminosäuren am Beginn der siebten Annexin-Wiederholungsdomäne kodiert. Im Gegensatz zu Splicing-Varianten anderer Annexine, die ausschließlich die N-terminale variable Region betreffen, sind bei dieser Form der gruppenspezifische Teil der Annexin-Kerndomänen betroffen (Crompton et al., 1988; Moss et al., 1988). Durch die ge-

ringen biochemischen Unterschiede (Moss et al., 1990) nehmen die beiden Isoformen wahrscheinlich unterschiedliche Aufgaben innerhalb der Zelle wahr (Fleet et al., 1999).

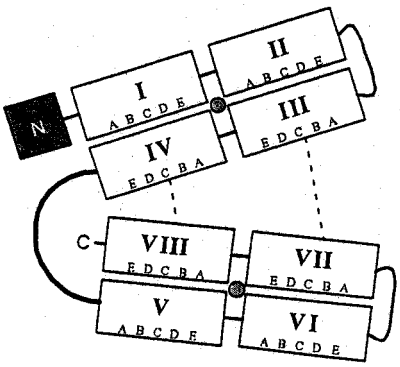


Abb. 4 : Schematische Darstellung des Annexin VI-Moleküls
Das Annexin VI Molekül besteht aus 8 Kerndomänen mit jeweils 70 – 80 Aminosäuren. Jede Domäne setzt sich aus je fünf α-Helices (A – E) zusammen. Zwischen den Domänen I/IV, II/III, V/VIII und VI/VII sorgen hydrophobe Wechelwirkungen für eine enge Interaktion der Segmente. Durch Interaktionen der Domänen III und IV der ersten Hälfte mit den Domänen VII und VIII der zweiten Hälfte wird die räumliche Struktur des Moleküls stabilisiert. Durch die 49 Aminosäuren lange Verbindungshelix zwischen Domäne IV und V können beide Molekülhälften um bis zu 90° zueinander rotieren. Ein aus 24 Aminosäuren bestehender aminoterminaler Anteil geht der ersten Kerndomäne voraus (modifiziert nach Liemann und Huber, 1997).

1.3.2.2 Intrazelluläre Lokalisation und Gewebsverteilung von Annexin VI

Annexin VI ist bisher in sehr vielen Zelltypen nachgewiesen worden. Der Nachweis gelang u.a. an Epithelzellen (Silva et al., 1986; Clark et al., 1991), Muskelzellen (Hazarika et al., 1991), Fibroblasten (Pons et al., 2000), Hepatozyten (Weinman et al., 1994; Tagoe et al., 1994), Lymphozyten (Owens et al., 1984; Clark et al.,1991) und Makrophagen (Desjardins et al., 1994). Lediglich in der Plattenepithelkarzinomzelllinie A 431 (Smythe et al., 1994) und in Erythrozyten von Säugetieren (Clark et al., 1991) konnte Annexin VI nicht nachgewiesen werden.

Entsprechend seiner multifunktionalen Rolle in der Zelle wird die intrazelluläre Lokalisation von Annexin VI kontrovers beschrieben (Gerke und Moss, 1997). In Abhängigkeit vom Zelltyp findet sich Annexin VI in zahlreichen zellulären Kompartimenten, z.B. auffallend häufig assoziiert mit Plasmamembranen (Owens et al., 1984; Tagoe et al., 1994; Bandorowicz et al., 1992) oder mit Teilen des endosomalen Kompartiments (Grewal et al., 2000; Jäckle et al., 1994; Ortega et al., 1998; Pons et al., 2000). Dies wird belegt durch den Nachweis von Annexin VI in Rattenleber-Endosomen (Jäckle et al., 1994), apikalen Endosomen von WIF-B-Zellen (Pons et al., 2000) und Ratten-Hepatozyten (Ortega et al., 1998) sowie durch die Kolokalisation mit dem späten endosomalen Marker lgp120 in Rattennierenzellen (Pons et al., 2000). Weitere zelluläre Kompartimente, in denen Annexin VI nachgewiesen wurde, sind das sarkoplasmatische Retikulum von quergestreiften Muskelzellen (Hazarika et al., 1991), Mitochondrien von Hepatozyten (Rainteau et al., 1995) und Phagosomen einer Makrophagenzelllinie (Desjardins et al., 1994). Weitere Arbeiten identifizieren Annexin VI in cholesterinreichen Membrandomänen (Caveolae und Lipid Rafts) (Lecat et al., 2000; Orito et al., 2001: Babiychuk und Draeger, 2000; Babiychuk et al., 2000; Schnitzer et al., 1995).

1.3.2.3 Eigenschaften und Funktionen von Annexin VI

1.3.2.3.1 Annexin VI in Endo- und Exozytoseprozessen

Aufgrund der biochemischen Eigenschaften von Annexin VI besteht in den letzten Jahren ein Forschungsschwerpunkt in der Identifikation der regulatorischen Funktion von Annexin VI im Rahmen von Endo- und Exozytoseprozessen. Dabei deuten ältere Arbeiten auf einen inhibitorischen Effekt von Annexin VI bei Aggregation und Fusion sekretorischer Vesikel hin (Blackwood und Ernst, 1990). Neuere Arbeiten diskutieren einen stimulierenden Effekt des Proteins in Endozytoseprozessen. Annexin VI läßt sich sowohl in frühen als auch in späten endosomalen Kompartimenten nachweisen (Jäckle et al., 1994; Ortega et al., 1998; Pons et al., 2000). So konnte Annexin VI in drei verschiedenen endosomalen Fraktionen hepatischer Endosomen (Kompartiment der Dissoziation von Rezeptoren und Liganden [CURL]), Rezeptor-rezyklierendem Kompartiment [RRC] und prälysosomalem Kompartiment [MVB]) nachgewiesen werden (Jäckle et al., 1994). Für die LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose konnte ein mögliches Modell für die Funktion von Annexin VI im Rahmen des endozytotischen Membranverkehrs oder in Sortierungsprozessen endosomaler Membranstrukturen entwickelt werden. In einem *in vitro*-Ansatz ist Annexin VI neben Calcium, ATP und weiteren zytosolischen Komponenten für die Ablösung von Clathrin umhüllten Vesikeln (Clathrin coated pits) aus isolierten Plasmamembranen identifiziert werden. Dabei besteht eine positive Korrelation der Ablösungs-Aktivität mit der zytosolischen Annexin VI-Konzentration (Lin et al., 1992).

Die Umbildung des Zytoskeletts scheint Voraussetzung für die endozytotische Aufnahme zu sein (Aunis und Bader, 1988). Bindungsstudien identifizieren Teile des Zytoskeletts oder damit assoziierter Proteine als Interaktionsparter von Annexin VI, wobei die Interaktionen vermutlich über die in Länge und Aminosäuresequenz variable N-terminale Region von AnnexinVI vermittelt werden (Gerke und Moss, 1997). In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Annexin VI an die aminoterminale 28 kDa-Domäne von ß-Spektrin (Watanabe et al., 1994), das sich gemeinsam mit Aktin an der inneren Plasmamembranseite befindet (Bennett, 1990), die Formation von Clathrin-umhüllten Vesikeln fördert (Kamal et al., 1998). Das an Spektrin gebundene Annexin VI reguliert über die Aktivierung einer Calpain-I-ähnlichen Protease die Umbildung des Zytoskeletts. Calpain I spaltet membrangebundenes Spektrin und leitet auf diese Weise mit der Abschnürung von „Clathrin-Coated-Pits“ die initialen Schritte der LDL-Rezeptor-vermittelten Endozytose ein. In Annexin VI-überexprimierenden Zellen konnte eine Stimulation der LDL-Aufnahme (und auch der Transferrin-Aufnahme) gezeigt werden (Grewal et al., 2000).

Diese Schritte sind durch Zusatz von Calpain Protease-Inhibitor ALLN (N-Acetyl-Leucyl-Leucyl-Norleucinal) zu unterbinden. Nach Zusatz von ALLN sind die Zellen aber bereits nach kurzer Zeit durch einen Annexin VI-unabhängigen Mechanismus wieder zur LDL-Endozytose befähigt. Neben morphologischen Veränderungen der Endosomen weisen ALLN-behandelte Zellen auch eine veränderte Lokalisation der von Annexin VI unabhängig entstandenen Endosomen auf. Es kommt zu einer Anreicherung von LDL in perinukleären Vesikeln und zu einem deutlichen Rückgang der LDL-Degradation. (Pons et al., 2001; Kamal et al., 1998). Die Ursache dieser Phänomene könnte in der gestörten Interaktion von Annexin VI oder Spektrin (Holleran et al., 1996) mit Teilen des Zytoske-

letts bzw. den damit assoziierten Proteinen begründet sein. Ebenfalls führt die Mikroinjektion einer dominant-negativen Annexin VI-Mutante zu einer Akkumulation von LDL in morphologisch veränderten Endosomen und zu einem Rückgang der LDL-Degradation (Pons et al., 2001). Diese Ergebnisse weisen für Annexin VI, neben seiner Funktion im frühen endosomalen Kompartiment, auf eine potentielle Steuerungsfunktion innerhalb der lysosomalen Prozessierung von LDL und damit im späten bzw. prälysosomalen Kompartiment hin (Kamal et al., 1998, Pons et al., 2001).

1.3.2.3.2 Annexin VI und cholesterinreiche Membrandomänen

Neben der Rolle von Annexin VI in der Rezeptor-vermittelten Endozytose deuten verschiedene Arbeiten auf eine zusätzliche Lokalisation und regulatorische Funktion in cholesterinreichen, Triton X unlöslichen Membrandomänen, sogenannten Lipid Rafts und Caveolae, hin (vgl. Kap. 1.2). Dabei kann auch für Annexin VI die bereits für Annexin II beschriebene Assoziation mit cholesterinreichen Membrandomänen bestätigt werden (Babiychuk und Draeger, 2000; Harder et al., 1997). Annexin VI wurde in Caveolin-angereicherten Fraktionen von Hepatozyten und endothelialen Zellen beschrieben (Pol et al., 1999; Schnitzer et al., 1995). Die Translokation von Annexin VI in cholesterinreiche Membrandomänen erfolgt dabei vermutlich calciumabhängig (Babiychuk und Draeger, 2000). Gleichzeitig beschreiben jüngste Veröffentlichungen zusätzlich eine cholesterininduzierbare und calciumabhängige Membranbindung von Annexin VI (Ayala-Sanmartin, 2001). Die Beschreibung von Annexin VI in cholesterinreichen Membrandomänen weist auf eine mögliche Funktion von Annexin VI bei der Etablierung spezifischer Membrandomänen und im Membrantransport zwischen Caveolae, intrazellulären Lipid Rafts und endosomalen Kompartimenten hin (Babiychuk und Draeger, 2000).

1.3.2.3.3 Interaktionen von Annexin VI mit Proteinen der Signaltransduktion in Caveolae

Annexin VI besitzt aufgrund seiner Interaktion mit Proteinen, die wichtige Funktionen im Rahmen der zellulären Signaltransduktion übernehmen, möglicherweise eine regulatorische Bedeutung im Rahmen von signaltransduzieren Prozessen in Caveolae. Dafür spricht zunächst die Identifikation von Annexin VI in Caveolae (Schnitzer et al., 1995). Obwohl Annexin VI scheinbar nicht wie andere Moleküle direkt mit Caveolin interagiert, könnte eine indirekte Interaktion über Proteine wie H-Ras (Song et al., 1996), Raf-1 (Pons et al., 2001b), PKC α (Orito et al., 1994; Schmitz-Pfeiffer et al., 1998), Fyn (Chow et al., 2000) oder Dynamin (Henley et al., 1998) erfolgen.

Ein wichtiger Hinweis für die Interaktion von Annexin VI mit Proteinen der Signaltransduktion in Caveolae ergibt sich zum Beispiel daraus, dass Annexin VI mit der C2 Domäne von $p120^{GAP}$ interagieren kann (Chow und Gawler, 1999), als Teil eines Proteinkomplexes, der ebenfalls die Src-Tyrosinkinase Fyn und die fokale Adhäsionskinase Pyk2 enthält (Chow et al., 2000; Davis et al., 1996). $P120^{GAP}$ ist ein GTP-ase aktivierendes Protein (GAP), dass die GTP-Bindung des in Caveolae lokalisierten p21-Ras reguliert und dessen GTP-ase Aktivität um ein Vielfaches steigert. P21-Ras-Proteine sind an entscheidender Stelle an Zellproliferations- und Differenzierungsprozessen beteiligt (Crespo and Leon, 2000) und vermitteln die Weiterleitung von Signalen zwischen Rezeptor-

Tyrosinkinasen, Src-verwandten intrazellulären Tyrosinkinasen, membranassoziierten G-Proteinen und „downstream“ Effektoren wie z.B. Raf-1 und Phosphatidyl-3-Kinase (Marais und Marshall, 1996). Die biologische Aktivität von p21-Ras-Proteinen ist abhängig von der Assoziation und Bereitstellung von GTP in der Zelle. $P120^{GAP}$ zählt zu einer Gruppe von Proteinen (GTPase aktivierende Proteine), die die GTP-Bindung von p21-Ras regulieren (Chow und Gawler, 1999).

Die Funktion von Annexin VI in Rahmen von membranassoziierten Signalproteinkomplexen in cholesterin- und caveolinhaltigen Mikrolipiddomänen ergibt sich aus der für p21-Ras beschriebenen direkten Interaktion mit Caveolin in Caveolae (Song et al., 1996). Dabei führen steigende Cholesterinkonzentrationen, z.B. über eine Lipoproteininkubation, zu einer erhöhten Bindungsaffinität von p21-Ras an Caveolin (Zhu et al., 2000). Über die Assoziation von Annexin VI und $p120^{GAP}$ könnten damit indirekt cholesterinabhängige Interaktionen von p21-Ras mit Caveolin an der Plasmamembran moduliert werden (Pons et al., 2001b).

1.4 Ziel der Arbeit

Trotz grosser Forschungsanstrengungen sind die exakten physiologischen und biochemischen Funktionen von Annexinen noch nicht vollständig aufgeklärt. In bisherigen Arbeiten wurde für Annexin VI vor allem die Rolle bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose sowie bei der Regulation des endosomalen Membranverkehrs untersucht.

In der vorliegenden Arbeit sollte im ersten Teil der Arbeit die Lokalisation von Annexin VI in cholesterin- und sphingolipidreichen Membrandomänen, den Lipid Rafts und Caveolae, untersucht werden. Die Etablierung von Methoden zur Isolierung von Lipid Rafts und Caveolae diente als Voraussetzung, um darauf aufbauend die Assoziation von Annexin VI mit cholesterinreichen Membrandomänen zu untersuchen. Vergleichende Protein- und Lipidanalysen mit etablierten Markerproteinen (Caveolin) und Lipiden (Cholesterin) der Lipid Rafts/Caveolae sollten genutzt werden, um einen möglichen Einfluss von Annexin VI auf die Struktur von cholesterinreichen Membrandomänen zu identifizieren.

Im zweiten Teil der Arbeit war zu überprüfen, ob Annexin VI einen regulatorischen Einfluß auf den HDL-vermittelten (High Density Lipoprotein) Cholesterin-Efflux besitzt. Für diese Experimente wurden CHO Wildtypzellen (Chinese Hamster Ovary) im Vergleich mit Annexin VI überexprimierenden CHO Zellen eingesetzt. Diese Zellen wurden mit ^{3}H-Cholesterin inkubiert, um anschliessend den HDL-stimulierbaren Cholesterin-Efflux zu erfassen und den möglichen Einfluß des Annexin VI zu demonstrieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Im experimentellen System kamen folgende eukaryotische Zelllinien zum Einsatz:

CHO Wildtyp

CHO Annexin II

CHO Annexin VI

CHO Δ-1490

Alle in der vorliegenden Arbeit eingesetzten CHO Zelllinien (Chinese Hamster Ovary) wurden mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Dr. T. Grewal (Hamburg) zur Verfügung gestellt. Im einzelnen zeichneten sich diese Zelllinien durch folgende Besonderheiten aus.

2.1.1.1 CHO Wildtypzellen

Bei den als „Wildtyp" bezeichneten CHO Zellen (Chinese Hamster Ovary-Zellen) handelt es sich um kommerziell erworbene, untransfizierte CHO Zellen (American Type Culture Collection, ATCC). Chinese Hamster Ovary wurden dafür aus dem Ovar des Chinesischen Hamsters präpariert und kultiviert. Bei den im Zellkulturexperiment eingesetzten CHO Zellen handelt es sich um Fibroblasten ähnliche Zellen, die sich durch eine gute Kultivierbarkeit trotz Transfektion auszeichnen. Diese Zelllinie besitzt eine nur geringe endogene Annexin VI-Produktion. Sie bietet sich deshalb besonders für den experimentellen Vergleich mit Annexin VI- und Annexin II-überexprimierenden CHO Zellen an (Grewal et al., 2000; Pons et al., 2001; Pons et al., 2001b; Moringa et al., 2001).

2.1.1.2 CHO Annexin VI-Zellen

Die Überexpression von Proteinen ist ein etabliertes Verfahren bei der Identifikation der Funktion von Proteinen. Zur Charakterisierung der Funktion von Annexin VI in Lipid Rafts wurden CHO Zellen eingesetzt, die eine stabile Überexpression von Annexin VI der Ratte aufwiesen (im Folgenden Anx VI-Zellen). Dies bedeutet, dass die Expressionsvektoren für das Protein in das Genom der Zellen integriert wurden und somit mit dem übrigen Genom vererbt und weitergegeben werden. Die Klonierung der Annexin VI-Expressionsvektoren erfolgte durch Dr. T. Grewal (Grewal et al., 2000; Pons et al., 2001b). Die CHO Anx VI-Zelllinie wurde mit Ratten-Annexin VI Plasmid-DNA transfiziert. Zu diesem Zweck wurde die cDNA für Ratten-Annexin VI aus einer DNA-Bibliothek (Uni-Zap® XR, Stratagene) isoliert mit einer weitgehenden Homologie zum humanen Annexin VI (Morgan et al., 1997). Diese konnte nach mehreren Subklonierungen in den kommerziell erhältlichen Expressionsvektor pcDNA 3.1 (Invitrogen) inseriert werden. Der Expressionsvektor enthielt zusätzlich Resistenzgene für das Antibiotikum Geneticin G-418 Sulfat. Weiterhin wurde dem Annexin VI-Gen ein CMV-Promotor vorgeschaltet, um das Expressionsniveau von Annexin VI zu erhöhen. Die Transfektion der CHO-Wildtypzellen mit dem Expressionsvektor erfolgte mit FUGENE® 6-

Transfektionsreagenz (Roche Molecular Biochemicals) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die in den Expressionvektoren enthaltenen Resistenzgene für Geneticin G 418 Sulfat erlaubten die Selektionierung von stabil transfizierten Zellen in Antibiotika-haltigem Zellkulturmedium (1 mg/ml), die die transfizierte DNA fest in ihr chromosomales Erbgut integriert hatten. Die CHO Anx VI-Zelllinie zeichnet sich analog zu den CHO Wildtypzellen durch geringe Mengen an endogenem Annexin VI aus. Dies erleichtert das Studium spezifischer Überexpressioneffekte des Proteins im Vergleich mit nicht transfizierten CHO Wildtypzellen. Durch Western Blot-Analyse und Immunfluoreszenz konnte eine um das Mehrfache gesteigerte Expression von Annexin VI in transfizierten Anx VI-Zellen nachgewiesen werden (Grewal et al., 2000; Pons et al., 2001b).

2.1.1.3 CHO Annexin II-Zellen

Als Vergleichszelllinie sind zusätzlich CHO Zellen eingesetzt worden, die eine stabile Überexpression von Annexin II aufwiesen (im Folgenden Anx II-Zellen). Die Klonierung der Annexin II-Expressionsvektoren wurde durch Dr. T. Grewal (Hamburg) vorgenommen. Die Transfektion der CHO Zellen erfolgte mit Hilfe des Expressionsvektors pCMV5-EX-AII, der für humanes Annexin II kodiert und freundlicherweise von Prof. V. Gerke (Münster) zur Verfügung gestellt wurde. Der Expressionsvektor enthielt zusätzlich Resistenzgene für das Antibiotikum Geneticin G-418 Sulfat.

2.1.1.4 CHO Δ-1490-Zellen

Weiterhin kam eine Zelllinie zum Einsatz, die die Annexin VI Deletionsmutante (Δ-1490) überexprimiert. Die Klonierung der Deletionsmutante erfolgte ebenfalls durch Dr. T. Grewal (Hamburg). Bei der Interpretation der Ergebnisse muß von einer unklaren Expression der Mutante ausgegangen werden. Auch diese Zelllinie enthielt Resistenzgene für das Antibiotikum Geneticin G-418 Sulfat.

2.1.2 Geräte

Folgende Laborgeräte standen für die Versuche zur Verfügung:

Accu-Jet Pipettierhilfe	Merck
Autoradiographiekammer mit Verstärkerfolien	Rego
Bioclav	Schütt
Einschweißgerät	TEW
End-über-End-Schüttler Reax 2	Heidolph
Feinwaage U 4100S	Sartorius Universal
Fluorocounter	Packard
Gelelektrophoresekammer (6 x 8 cm)	Biometra
Geleletrophoresekammer (10 x 13 cm)	Höfer
Heizblock Thermostad 5320	Eppendorf
Inkubator mit Schüttelvorrichtung B6420	Heraeus Instruments
Kühlzentrifuge Universal 16R	Hettich
Liquid Scintillatior Aquasafe Plus 500	Zinsser Analytic
Magnetrührer mit Heizung Ikamag RH	Janke & Kunkel

Messzylinder 100 – 2000 ml	Hirschmann
Mikroskop Diavert	Leitz
pH-Meter omega 50	Beckmann
Photometer Lambda 20	Perkin Elmer
Pipetten (Glas), 1 – 25 ml	Brand
Pipettierhilfe Accujet	Brand
Pipettierhilfen blau	Gilson
Powersupply Frigostat	Desaga
Präzisionspipetten	Eppendorf
Rotoren für Ultrazentrifuge: SW 60 Rotor ,Kontron TST 55,5	Kontron
Schüttler Certomat TC-2	B-Braun Biotech
ß-Counter 1600 TR	Packard
Trans-Blot-Zelle	Bio-Rad
Ultrazentrifuge L5 50	Beckman
Ultrazentrifuge TL-100	Beckman
Vortexer Ika-Vibor-Fix VF2	Janke & Kunkel
Wasserbad	GFL
Wasserbad	GFL
Zählkammer	Neubauer
Zellinkubator IR 1500	Flow Laboratories
Zellkultur-Mikroskop	Leitz
Zellkultur-Werkbank	Baker
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus Instruments
Zentrifuge Universal 16 R	Hettich
Zentrifuge Varifuge RF	Heraeus Christ

2.1.3 Chemikalien

In den Experimenten kamen die unten angeführten Chemikalien zum Einsatz. Falls keine andere Angabe erfolgt, waren die Chemikalien von höchstem Reinheitsgrad.

2.1.3.1 Zellkultur

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco-Brl
Geneticin G-418 Sulfat	Gibco-Brl
L-Glutamin 200mM (100x)	Gibco-Brl
Nutrient Mixture F 12 (HAM)	Gibco-Brl
Penicillin / Streptomycin	Gibco-Brl
Phosphate Buffered Saline (PBS) – Dulbecco's	Gibco-Brl
Trypsin-EDTA	Gibco-Brl

2.1.3.2 Proteinbestimmung

Albuminstandard (2mg/ml)	Pierce
Folin–Ciocalteus Phenolreagenz (Lowry-Reagenz)	Merck

Kaliumnatriumtartrat (Lowry B)	Merck
Kupfersulfatlösung 1% ($CuSO_4$) (Lowry C)	Merck
Natriumcarbonat (Na_2CO_3) (Lowry A)	Merck
Natriumtartat	Sigma

2.1.3.3 Cholesterinbestimmung

Das für die Cholesterinbestimmung eingesetzte Amplex Red Cholesterin Kit (A-12216) stammte von der Firma Molecular Probes. Als Standard und Positivkontrolle diente Precipath (Boehringer).

2.1.3.4 Western Blot

Aceton	Merck
Acrylamid – Bisacrylamid (30% / 0,8%)	Boehringer Mannheim
Ammoniumpersulfat (AP)	Bio-Rad
Borsäure krist.	Merck
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Merck
ECL-Chemoluminiszenz-Kit	Amersham Pham. Biot.
Glycerol	Sigma
Glycin	Sigma
Isopropanol (2-Propanol)	Merck
Methanol (CH_3OH)	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Non-Fat Dry Milk (Milchpulver)	Bio-Rad
Poinceau-S Lösung (0,2% in 3% Trichloressigsäure [TCE])	Serva
ß-Mercaptoethanol	Sigma
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma
Triton X-100 1%	Sigma
Tween 20	Merck

2.1.3.5 Radiochemikalien

^{3}H-Cholesterin	Amersham Pharm. Biotech
(1-α,2-α(n)-^{3}H-Cholesterin; 48 Ci / mMol; 8,125 Chol./ml)	

2.1.3.6 Weitere Chemikalien

Antifect	Schülke & Mayr
Benzamidine	Sigma
Calcium Ionophor A23187	Sigma
Calciumchlorid (CaCl2)	Merck
Digitonin	Fluka Chemie
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na2HPO4x2H2O)	Merck

Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DMEM	Gibco-Brl
Ethanol	Merck
Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA)	Sigma
Ethylenglykol-bis-N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA)	Sigma
Kaliumbromid (KBr)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat) (KH_2PO_4)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker
Natronlauge (NaOH)	Merck
Optiprep	Nycomed-Pharma
Salzsäure (HCl)	Merck
Trichloressigsäure (TCE)	Merck

2.1.4 Proteinaseinhibitoren

Im Proteaseninhibitorcocktail (PIC) wurden folgende Antiproteasen eingesetzt:

Antipain	Calbiochem
Chymostatin	Calbiochem
Leupeptin	Calbiochem
Pepstatin A	Calbiochem

2.1.5 Proteingrößenmarker

Als Proteingrößenmarker dienten:

Biotinylierter Proteinmarker	Cell Signalling
Rainbow coloured protein weight markers RPN 756	Amersham Pharm. Biotech

2.1.6 Verbrauchsmaterial

Als Verbrauchsmaterial für die Versuche dieser Arbeit kamen folgende Materialien zum Einsatz:

Cryoröhrchen (1,8 ml)	Nunc
Deckgläser (20 x 20 mm)	Superior
Einmalspritzen (1 ml, 10 ml, 20 ml)	Braun
Gel-Blotting-Papier GB 002	Schleicher & Schüll
Gewebekulturschalen (Ø 10 cm und Ø 14,5 cm)	Nunc
Injektionskanülen Sterican 27 G	Braun
Microliter Syringes Pipette	Hamilton
Objektträger 76 x 26 x 1 mm	Marienfeld
Parafilm	American National Can
Pasteurpipetten Glas 230 mm	Brand
PD 10 Columns G-24M	Amersham Pharm. Biotech
Pipetten (Glas)	Brand
Pipetten (Kunststoff, steril, 5-25 ml)	Becton Dickinson
Pipettenspitzen	Greiner Labortechnik

Protan Nitrozellulose Transfer Membran	Schleicher & Schüll
PS halb-mikro Küvetten (10 x 10 x 45 mm)	Greiner Labortechnik
Reagenzgefäß (15 ml, 50 ml)	Falcon
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Greiner
Röntgenfilm Biomax MR (18x24 cm)	Kodak
Sterilfilter (0,45 µm)	Nunc
Szintillationsflasche (27,0 x 60,0 mm)	Greiner
Zellkulturflasche (225 ml)	Nunc / Falcon
Zellkulturplatten, sechsloch („6-well“)	Costar / Nunc
Zellkulturplatten, zwölfloch („12-well“)	Costar / Nunc
Zellschaber	Costar
Zentrifugenröhrchen Ultra-Clear (2 und 5 ml)	Beckmann

2.1.7 Antikörper

Expression und intrazelluläre Lokalisation von Proteinen wurden mit der Western Blot-Analyse studiert. Die eingesetzten primären und sekundären Antikörper wiesen folgende Eigenschaften und Verdünnungen auf.

2.1.7.1 Primäre Antikörper

Antikörper	**Hersteller**	**Ursprung**	**Antigen**	**Herkunft**	**Verdünnung**
Anx VI (AB 3718)	Abimed, Darmstadt	Schaf	Spez. N-Terminus von Ratten-Annexin VI	Polykl.	1/100
Anx VI (ICO 908)	Ortega et.al, 1998	Kaninchen	Endos. u. membrangeb. Ratten-Annexin VI	Polykl.	1/250
Anx VI	ICN	Maus	Anx VI	Monokl.	1/500
Anx VI	Biodesign Intern.	Kaninchen	Anx VI	Polykl.	1/1000
Anx II (H 28.2)	Gerke (Münster)	Maus	Annexin II: p36 Protein vom Schwein	Monokl.	1/1000
Anx II (HH 7)	Gerke (Münster)	Maus	Anx II	Monokl.	1/1000
Caveolin	Tansduction Lab.	Kaninchen	Caveolin	Polykl.	1/5000
Caveolin-1	Tansduction Lab.	Maus	Caveolin I	Monokl.	1/1000
Dynamin	Tansduction Lab.	Maus	Dynamin I	Monokl	1/1000
$P120^{GAP}$	Upstate Biotech.	Maus	RasGAP	Monokl.	1/1000
P21-Ras	Oncogene	Maus	P21-Ras	Monokl.	1/100
SR-BI	Rinninger (Hamburg)	Kaninchen	SR-BI	Polykl.	1/2000

2.1.7.2 Sekundäre Antikörper

Zur Immunodetektion der verschiedenen Proteine in der Western Blot-Analyse kamen folgende sekundäre Antikörper zum Einsatz:

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Ziege-anti-Kaninchen F(ab´)$_2$-Fragmente HRP-konjugiert (GARPO=Goat-Anti-Rabbit)	Jackson Immuno Research	1 : 1000
Ziege-anti-Maus F(ab´)$_2$-Fragmente HRP-konjugiert (GAMPO-Goat-anti-mouse)	Jackson Immuno Research	1 : 5000
Hase-anti-Schaf F(ab´)$_2$-Fragmente HRP-konjugiert (RASPO=Rabbit-anti-sheep)	Jackson Immuno Research	1 : 1000

Als Antikörper gegen biotinylierten Protein-Marker wurde eingesetzt:

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Anti-Biotin-Antikörper HRP-konjugiert	Cell Signalling	1 : 1000

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zellkulturpflege

Für die vorliegende Arbeit wurden adhärente CHO-Zellen in 25 cm^2 Zellkulturflaschen kultiviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 15 ml Nährmedium bei einer Temperatur von 37°C, einem Luft-CO_2-Gehalt von 5% bei gesättigter Luftfeuchtigkeit. Zur Aufrechterhaltung dieser Bedingungen wurden die Zellkulturen in einem Zellinkubator (Flow Laboratories) gehalten. Das Nährmedium der Zellen hatte folgende Zusammensetzung: 15 ml F-12 (HAM) Nutrient Mixture, 10% fötales Kälberserum (FCS), 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin. Zusätzlich war das Zellnährmedium bei stabil transfizierten Zellen mit dem Antibiotikum Geneticin G-418 Sulfat (1 mg/ml) versetzt, um durch die ebenfalls transfizierte Resistenz gegen dieses Antibiotikum den Selektionsdruck gegenüber nicht transfizierten Zellklonen zu erhalten.

In einem Abstand von 3-4 Tagen wurden die adhärenten Zellen passagiert, da die Zellen nach dieser Zeit durch Vermehrung und Wachstum 70 – 80% konfluent waren und das eingesetzte Nährmedium verbraucht hatten. Unter dem Schutz einer sterilen Werkbank (Baker) wurde das Nährmedium der Zellen abgesaugt. Danach wurden die Zellen ca. für eine Minute in 10 ml PBS (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 8,1 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2HPO_4; pH 7,4) gewaschen. Nach Entfernung des PBS wurden 5 ml Trypsin-EDTA für ca. zwei Minuten auf die Zellen gegeben. Die so gestartete Proteolyse und Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche wurde mit 5 ml bzw. 10 ml frischen Nährmedium unterbrochen. Die auf diese Weise suspendierten Zellen wurden im Verhältnis 1/5 bis 1/8 passagiert, d.h. in neue Zellkulturflaschen überführt und mit neuem Nährmedium versehen.

2.2.1.2 Ausplattieren von Zellen

Nachdem die durch Trypsin-EDTA gestartete Proteolyse mit Nährmedium abgebrochen wurde, erfolgte die Ermittlung der Zellzahl pro ml Zellsuspension durch Überführung von 1-2 Tropfen Zellsuspension in eine Zählkammer (Neubauer). Entsprechend der in der Zählkammer ermittelten Zellzahl wurden je nach Versuchsaufbau unterschiedliche Zellmengen auf 6-well- und 12-well Mehrfachkulturschalen, bzw. Ø 10 cm oder Ø 14,5 cm Zellkulturschalen überführt. Die in die Mehrfachzellkulturschalen überführte Zellsuspension wurde danach auf ein Volumen von 2 ml (6-well-Mehrfachkulturschalen), bzw. 1 ml (12-well-Mehrfachkulturschalen), bei Ø 10 cm Zellkulturschalen auf ein Volumen von 10 ml, bzw. 20 ml (Ø 14,5 cm Zellkulturschale) mit Nährmedium ergänzt.

2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren: CHO-Zellen wurde wie in Kapitel 2.2.1.1 mit Trypsin-EDTA versetzt und in 5 – 10 ml Vollmedium resuspendiert. Danach wurden die suspendierten Zellen in 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 1800 U/min für fünf Minuten in einer Eppendorf 5810 R Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das am Boden des Zentrifugenröhrchens zurückbleibende „Zellpellet“ danach in 1 ml Gefrierlösung (3 Teile Nutrient Mixture F–12 (HAM), 1 Teil FCS, 1 Teil DMSO) tropfenweise resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen nach der Überführung in ein 1,8 ml Cryoröhrchen für zwei Stunden auf 4°C gekühlt, um danach bei -80°C tiefgefroren zu werden. Durch die Überführung der bei -80°C tiefgefrorenen Zellen in flüssigen Stickstoff nach 24 – 48 Stunden konnten optimale Lagerungsbedingungen erzielt werden.

Auftauen: Die Rekultivierung der tiefgekühlten Zellen erfolgte durch Erwärmung der Zellen über zwei Minuten bei 37°C und unmittelbare Zugabe von frischem Nährmedium. Anschließend wurde die Zellsuspension für drei Minuten bei 1800 U/min zentrifugiert (Eppendorf 5810 R), der Überstand verworfen und das entstandene Pellet erneut in frischem Nährmedium resuspendiert. Zur Kultivierung der Zellen wurden diese anschließend in eine 25 cm^2 Zellkulturflasche überführt.

2.2.2 Präparation von humanen Lipoproteinen

Die Präparation humaner Lipoproteine erfolgte nach der Methode von Havel (Havel et al., 1953). Für die Präparation von LDL (Low Density Lipoproteine) und HDL (High Density Lipoproteine) wurden zunächst 2000 ml Blut gesunder, normolipämischer Spender mit 500 µl Benzamidine versetzt und über 45 Minuten bei Raumtemperatur in einem Glasröhrchen zur Gerinnung ruhen gelassen. Nachfolgend wurden die Glasröhrchen für 30 Minuten bei 13.000 U/min (Heraeus-Christ-Laborzentrifuge) zentrifugiert, so dass das Serum abgenommen werden konnte. 1000 ml Serum wurden im Anschluß mit 5 ml einer 4%-igen EDTA-Lösung (pH 7,4) versetzt, um die Aktivität calciumabhängiger Proteasen zu unterbinden. Ergänzt wurden weiterhin 5 ml einer 2%-igen Gentamycin-Sulfat-Lösung und einer 4%-igen Natriumazid-Lösung (pH 7,4), um Keimfreiheit während der Präparation zu gewährleisten. Durch die Zugabe von 27,75 g Kaliumbromid pro 1000 ml Serum wurde die Eigendichte des Serums von 1,006 g/ml auf 1,025 g/ml erhöht. Die Präparation vollzog sich bei 4°C im Kaliumbromid-Gradienten. Dafür wurden die Proben in Quick-seal-Röhrchen überführt und

über 20 Stunden bei 38000 U/min und 4°C ultrazentrifugiert (60 Ti-Rotor). Nach diesem ersten Ultrazentrifugationsschritt wurden die Zentrifugationsröhrchen auf Eis gelagert und die im Überstand befindlichen VLDL- und IDL-Lipoproteine mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Die in der Bodenfraktion befindlichen LDL- und HDL-Lipoproteine wurden gesammelt und erneut volumenbestimmt. Durch erneutes Überschichten mit Kaliumbromid-Lösung (36,932 g KBr auf 1000 ml Serum) wurde die Dichte der Lipoproteine von 1.025 g/ml auf 1,050 g/ml erhöht. Die zweite Zentrifugation bei 38000 U/min und 4°C über 20 Stunden trennte HDL vom LDL-reichen Überstand. Der LDL-reiche Überstand und die HDL-reiche Bodenfraktion wurden abgenommen, gegen PBS dialysiert und bei 4°C gelagert. Vor den Experimenten wurden entsprechende Mengen LDL und HDL mit Hilfe einer PD-10-Säule von Kaliumbromid befreit. Das eingesetzte LDL wies im Durchschnitt eine Konzentration von ca. 8 - 15 µg/ml auf. HDL (Dichte 1,125 – 1,21 g/ml) wurde in den Experimenten mit einer durchschnittlichen Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt.

2.2.3 Präparation von Lipoprotein-depletiertem Serum (LPDS)

LPDS (Lipoprotein-depletiertes Serum) wurde anstelle von FCS (Fötales Kälberserum) im Nährmedium eingesetzt, um unspezifische Bindungen und den Stoffwechselverkehr von Lipoproteinpartikeln zu verringern. Für die Präparation von LPDS wurde Fötales Kälberserum mit einer Dichte von 1,006 bei 4°C mit Kaliumbromid (KBr) versetzt, bis sich eine Dichte von ca. 1,24 g/ml einstellte (0,3816 g KBr pro Milliliter FCS). Das Gemisch wurde in Quick-Seal-Röhrchen überführt und über 22 Stunden bei 38000 U/min und 4°C zentrifugiert. Die obere Fraktion (lipoproteinreich) wurde verworfen. Von der untere Hälfte wurde lipoproteinarmes Serum abgenommen und in einem Becherglas gesammelt. Ein Dialyseschlauch wurde 2-fach mit Aqua dest. gespült und dessen innere Glycerinbeschichtung ausgestrichen. Der Dialyseschlauch wurde mit dem bearbeiteten FCS befüllt und verschlossen. Die Lösung wurde viermal in 5 l PBS bei 4°C auf einem Rührer dialysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (Lowry et al., 1951) wurde die Gesamt-Proteinkonzentration mit 0,15 M NaCl auf 0,25 mg/ml eingestellt. Der Ansatz wurde steril filtriert, in sterile Falcon-Reagenzgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

2.2.4 Proteinextraktion

Für die Extraktion von Proteinen aus CHO-Zellen wurden zunächst 1–2 x 10^5 Zellen/ml entsprechend der in Kapitel 2.2.1.1 beschriebenen Methode auf 6-Loch-Zellkulturschalen („6-well“) ausplattiert. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Zellen variierenden Versuchsbedingungen ausgesetzt. Dafür ist zunächst das alte Nährmedium entfernt und ein Waschschritt mit PBS ausgeführt worden. Die CHO-Zellen konnten jetzt entsprechend den Versuchsbedingungen mit Reagenzien versetztem Nährmedium für weitere 24 h inkubiert werden. Danach hatten die Zellen eine fast hundertprozentige Konfluenz. Das Zellmedium wurde verworfen und die Zellen einem PBS-Waschschritt unterzogen, um abgestorbene Zellen und zurückgebliebenes Versuchsmedium zu entfernen. Die Zellen wurden nun in 2 ml kaltem PBS „auf Eis“ (zum Schutz der Zellproteine) mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturschalen gelöst und in Eppendorf-Reagenzgefäße über-

führt. Dieses Zell-PBS-Gemisch wurde für 3 min bei 13.000 U/min zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R), anschließend der Überstand abgesaugt und das zurückgebliebene „Zellpellet“ in 200 µl Solubilitätspuffer (50mM Tris, 2 mM $CaCl_2$, 80 mM NaCl, 1% Triton X-100 und 1/1000 Proteinaseinhibitorcocktail [PIC: 1mM Pepstatin A, 10mM Chymostatin, 10mM Leupeptin, 10mM Antipain]) resuspendiert. Der Solubilitätspuffer lysiert die Zellen, um die Proteine zur weiteren Analyse freizusetzen. PIC ist ein Gemisch aus Antiproteasen, das die Wirkung der durch die Lyse der Zellen freigesetzten intrazellulären Proteinasen möglichst gering halten sollte. Nach Lagerung über 30 min bei Raumtemperatur erfolgte die Zentrifugation über 3 min bei 13000 U/min. Der proteinreiche Überstand wurde abgenommen und in Eppendorf-Reagenzgefäße überführt.

2.2.5 Präparation und Isolierung von Lipid Rafts und Caveolae

2.2.5.1 Präparation und Isolierung von Triton X-100 unlöslichen Membranen durch Dichtgradientenzentrifugation

2.2.5.1.1 Präparation der Proteinextrakte

Um die Triton X-100 unlöslichen Membranen zu isolieren, wurden zunächst CHO-Zellen entsprechend der in Kapitel 2.2.1.1 beschriebenen Methode in 25 cm^2 Zellkulturflaschen kultiviert. War die Zellzahl ausreichend, konnten die Zellen für sich anschließende Versuche auf Zellkulturschalen (Ø 10 cm oder Ø 14,5 cm) mit einer Verdünnung von 1 x 10^5 Zellen/ml ausplattiert werden. Nach einer Vermehrungszeit von 24 – 48 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Zellen variierenden Versuchsbedingungen ausgesetzt. Dafür wurde zunächst das alte Nährmedium verworfen und ein Waschschritt mit PBS ausgeführt. Nachfolgend wurden die Zellen mit humanem LDL, HDL, ^{3}H-Chol-LDL oder mit anderen Versuchsreagenzien inkubiert. Nach der Inkubation hatten die CHO Zellen eine fast 100%-ige Konfluenz, entsprechend ca. 1 - 2 x 10^7 Zellen. Das Versuchsmedium wurde verworfen und die Zellen einem PBS-Waschschritt unterzogen, um abgestorbene Zellen und restliches Versuchsmedium zu entfernen. Die nachfolgend beschriebenen Schritte erfolgten unter ständiger Kühlung zum Schutze der Zellproteine. In ca. 5 ml (Ø 10 cm Zellkulturschalen) bzw. 10 ml (Ø 14,5 cm Zellkulturschalen) PBS-Lösung wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Mehrfachkulturflaschen bei 4°C gelöst und in der PBS-Lösung in ein 15 ml bzw. 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zentrifugationsröhrchen wurden anschließend fünf Minuten bei 1800 U/min (Eppendorfzentrifuge 5810 R) zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes konnte das verbleibende Zellpellet in 400 µl Raftpräp-Lösung (10 mM Tris HCl [pH 7,5], 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 [1%], 1mM Dithiothreitol [DTT]) solubilisiert werden (Lecat et al., 2000). Nachdem dieser Zellextrakt über 30 min bei 4°C im Kühlraum geschwenkt wurde, konnte das Material für die weiteren Arbeitsschritte verwendet oder bei minus 20°C tiefgefroren werden.

2.2.5.1.2 Isolierung Triton X-100 unlöslicher Membranen durch Dichtgradientenzentrifugation

Die Isolierung von Triton X-100 unlöslichen Membranen erfolgte mit Hilfe der Methode von Lecat und Lafont (Lecat et al., 2000; Lafont et al., 1998). Hierzu wurden 400 µl von dem in Kap. 2.2.5.1.1 gewonnenen Zelllysat in 600 µl Optiprep® (Nycomed Pharma) gelöst. Das durch Optiprep® auf 40% eingestellte Zellysat wurde anschließend unter ständiger Kühlung in ein Ultrazentrifugationsröhrchen (5 ml) überführt. Nachfolgend wurde mit 1,2 ml 30% Optiprep®, 1,2 ml 25% Optiprep® und 0,8 ml 5% Optiprep® überschichtet. Als Verdünnung diente Lysispuffer (10 mM Tris HCl [pH 7,4], 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM Dithiothreitol [DTT]). Dabei war streng darauf zu achten, dass keine Vermischung der Flüssigkeitsphasen erfolgte und sich klare Trennschichten zwischen den einzelnen Phasen ausbildeten. Danach wurden die Ultrazentrifugationsröhrchen (5ml) in den SW 60 Rotor einer Ultrazentrifuge (Beckman L5 50) überführt und über vier Stunden bei 50000 U/min und 4°C zentrifugiert. Für einen „Mini"-Gradienten sind alle Volumina um die Hälfte zu reduzieren.

Nach dem Zentrifugieren waren die Proteine im Ultrazentrifugationsröhrchen entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Nun wurden sukzessive 9 - 10 Fraktionen von 500 µl („Mini"-Gradient 200 µl), von oben beginnend, aus dem Ultrazentrifugationsröhrchen entnommen und jeweils in ein Eppendorfgefäß (1,5 ml) überführt. In der Trennschicht zwischen der 5% und der 25% Optiprep-Lösung konzentrierten sich Lipid Rafts. Dieser Bereich zeichnete sich durch eine Anreicherung von Cholesterin, Phospholipiden und Caveolin aus. In der Western Blot-Analyse dienten Aliquots der Fraktionen, nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen (vgl. Kap. 2.2.7) und Auftragung vergleichbarer Proteinmengen, dem Nachweis der verschiedenen Rezeptoren und Proteine. In Aliquots der Fraktionen wurde zudem der Cholesteringehalt ermittelt (vgl. Kap. 2.2.6).

Die Ergebnisse der Lipid Rafts/Caveolae Präparation im Optiprep®-Gradienten sind stets vor dem Hintergrund möglicher präparationsbedingter Schwierigkeiten zu interpretieren, so kann z.B. die Konzentration an Caveolin-1 in den Präparationen Schwankungen unterliegen und dadurch die Ergebnisse beeinflussen. Zudem können die bei der Präparation eingesetzten Substanzen (z.B. Triton X-100) die molekulare Zusammensetzung der Caveolae beeinflussen, wodurch der Vergleich von Ergebnissen verschiedener Arbeiten erschwert werden kann (Anderson, 1998). Ein weiteres Problem dieser Extraktionsmethode ist, dass die subzelluläre Lokalisation der extrahierten DIGs nicht nachweisbar ist. Dieser Nachteil kann dadurch ausgeglichen werden, dass eine Isolation spezifischer Zellorganellen vor der Detergenzextraktion vorgenommen wird und sich auf dieses Weise der Ursprung der extrahierten Membranen belegen lässt (Simons und Ikonen, 1997). Potentielle Fehlerquellen liegen auch in folgenden Bereichen. Rafts-assoziierte Proteine können mit dem Zytoskelett verbunden sein. Sie werden somit nach Extraktion mit Triton X-100 in der Dichtegradientenzentrifugation nicht „floatieren". Eine weitere Fehlerquelle liegt in der möglicherweise zu schwachen Assoziation der Proteine mit Lipid Rafts bzw. Caveolae, so dass das Protein mit dem Detergenz abgelöst und später nicht mehr nachgewiesen werden kann (Simons und Toomre, 2000).

2.2.5.2 Isolierung von Triton X-100 unlöslichen Membranen nach Brown und Rose

Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung von cholesterinreichen Membranen (Lipid Rafts/Caveolae) ist die Methode nach Brown und Rose (Brown and Rose, 1992). Bei diesem Verfahren wurden zunächst ca. 5 x 10^6 CHO-Zellen mit ca. 10 ml kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde das PBS verworfen und die Zellen in ca. 5 ml MES-Puffer (25 mM MES pH 6,5, 0,15 M NaCl, 1% Triton X-100, 1/1000 PIC) abgekratzt und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nun in einen vorgekühlten Douncer überführt und nach zehnmaligem „Douncen" anschließend über ca. 20 min auf Eis inkubiert. Durch das nachfolgende Zentrifugieren bei 14.000 g über 20 min und 4°C wurden die Triton X-100 unlöslichen von den Triton X-100 löslichen Fraktionen getrennt. Der Überstand (Triton X-100 lösliche Fraktion) wurde in Eppendorf-Probengefäße überführt. Das Pellet wurde in 0,5 ml Hepes Puffer (25 mM Hepes pH 7,4, 0,15 M NaCl, 1% Triton X-100, 1% PIC) bei Raumtemperatur über ca. 30 min erneut inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension nochmals über 30 min bei 57°C im Heizblock inkubiert, um das Pellet vollständig zu lösen. Für die Western Blot-Analyse wurde nun die Proteinkonzentration der gewonnenen Fraktionen bestimmt, um vergleichbare Mengen an Triton X-100 löslichen und unlöslichen (caveolinhaltigen) Fraktionen auf das Elektrophoresegel auftragen zu können und die Fraktionen auf die Anwesenheit bestimmter Proteine zu untersuchen.

2.2.6 Fluorometrische Bestimmung von Cholesterin und Phospholipiden

Die Cholesterinkonzentration in Lipid Rafts/Caveolae und in Membranfraktionen wurde mit dem Amplex Red Cholesterin Kit (A-12216) bestimmt (Molecular Probes). Zur fluorometrischen Cholesterinbestimmung wurden zunächst 25 µl Probe mit 25 µl Reaktionspuffer (0,1 M Kaliumphosphat, 0,05 M NaCl, 0,1% Triton X-100; pH 7,4) in einer Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend wurden 50 µl eines Reaktionsgemisches aus Horseradish-Peroxidase (HRP) (1/100), Cholesterin-Oxidase (1/500), Cholesterin-Esterase (1/1000) und Amplex Red (1/67) in Reaktionpuffer über 30 min bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Phospholipidkonzentration erfolgte mit Hilfe des enzymatischen Bestimmungskits der Firma Boehringer Mannheim. Die Proben (10 – 50 µl) wurden mit 50 µl Reaktionsgemisch (Phospholipase D [1/40], Cholin-Oxidase [1/40] und Amplex Red [1/67] in 0,1 M Tris, 2,5 mM $CaCl_2$; pH 7,4) über 30 min bei 37°C inkubiert. Als Standard und Positivkontrolle der Cholesterin- und Phospholipidbestimmungen diente Precinorm und Precipath (Boehringer). Nach der Inkubation wurden die Proben mit Hilfe eines Fluorometers (Packard) bei 530 / 570 nm gemessen.

2.2.7 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Proteinbestimmungen dienten nach den Zellkulturexperimenten der Korrektur der gemessenen Radioaktivität auf counts per minute (cpm) pro mg Zellprotein, um so die gemessenen Werte bei unterschiedlicher Zellproteinmenge pro Ansatz vergleichen zu können. Ferner mussten vor der Probenbeschickung der Gele in der Western Blot-Analyse die Proteinkonzentrationen der Proben angeglichen werden, um aussagefähige Ergebnisse zu erhalten. Die Konzentrationsbestimmung der eingesetzten Proteine erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951). Bei dieser Methode wurde der zu untersuchenden Probe ein Aliquot zwischen 5 und 50 µl entnommen, entsprechend der aus Erfah-

rungswerten abzuschätzenden Proteinkonzentration. Die Probe wurde auf ein Volumen von 400 µl mit Aqua bidest aufgefüllt und mit 1 ml Lowry-Lösung (Lösung A [3% Na_2CO_3 in 0,15 N NaOH], Lösung B [2% Kaliumnatriumtartrat] und Lösung C [1% $CuSO_4$ x $5H_2O$] im Verhältnis 65 : 1 : 1) versetzt. Im Anschluß wurden die Proben auf einem Handrüttler (Vortex) gut durchmischt und über zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um danach mit 125 µl Folin-Reagenz (Mischungsverhältnis Folinlösung und Aqua bidest 1:1) versetzt zu werden. Nach anschließender Durchmischung erfolgte die Inkubation der behandelten Proben über 30 Minuten bei 37°C. Zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration bei 750 nm (Lambda 20 Photometer) wurden die Proben in Photometerküvetten überführt. Die zusätzliche photometrische Konzentrationsbestimmung von standardisiertem Rinderalbumin (2 mg/ml) diente der Erstellung einer Eichgerade und ermöglichte die Umrechnung der photometrisch ermittelten Extinktion der Proben auf Proteinkonzentrationen in µg/µl.

2.2.8 Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) diente der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht, die im Rahmen der Zellkulturarbeiten gewonnen wurden. Für die Gelelektrophorese wurden die aufzutrennenden Zellproteine aus der Isolierung von Lipid Rafts (vgl. Kap. 2.2.5) oder aus der Proteinextraktion (vgl. Kap. 2.2.4) nach Angleichung der eingesetzten Proteinmengen auf 5 – 100 µg (vgl. Kap. 2.2.7) in einem Eppendorf-Probengefäß (1,5 ml) mit Aqua bidest. auf ein gleiches Gesamtvolumen von 100-130 µl ergänzt. Anschließend wurde das Probenmaterial mit fünffach konzentriertem Probenpuffer (0,1 M Tris HCl [pH 6,8], 2% Natriumdodecylsulfat [SDS], 20% Glycerol, 1% 2-Mercaptoethanol und 0,1% Bromphenolblau) versetzt, um die Proben zu reduzieren und zu beschweren. Eine zehnminütige Erhitzung bei 95°C in einem Heizblock führte zur Denaturierung der Proteine in der Probe. Bevor die Proben auf das Elektrophoresegel aufgetragen werden konnten, wurden diese auf 4°C gekühlt und anschließend kurz abzentrifugiert. Als Größenmarker wurden zusätzlich ein Rainbow Marker (Amersham Pharmacia) und biotinylierter Protein Marker (Biolaps) auf das Elektrophoresegel aufgetragen.

Die anschließende Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mit 12,5%-Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Zur Anwendung kommt dabei ein diskontinuierliches Gelsystem, bestehend aus einem unteren Trenn- und einem oberen Sammelgel, um eine möglichst hohe Auflösung der Proteinbanden zu erzielen. Der Ansatz eines 12,5%-igen Trenngels für ein großes Gelelektrophoresesystem (10 x 13 cm, Höfer) beinhaltete 12,5 ml 30%-Acrylamid-0,8%-N,N-Bisacrylamid, 7,5 ml 1,5 Tris HCl (pH 8,8), 11.8 ml Aqua bidest., 0,6 ml 10%-ig Natriumdodecylsulfat (SDS) und 0,2 ml 10%-ig Ammonium Persulfat (AP). Zur Beschleunigung der Polymerisation wurden diesem Ansatz 10 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) hinzugegeben. Nach dem Zusammenbau des Elektrophoresesystems wurde dieser Ansatz zwischen die beiden Glasplatten des Systems gegeben und mit ca. 1 cm Isobutanol überschichtet, um die sauerstoffbedingte Inhibition der Polymerisation zu unterbinden und andererseits eine geglättete Gel-Oberfläche zu erzielen. Nach vollständiger Polymerisation der Trenngels konnte das Isobutanol verworfen und die Oberfläche des Trenngels

mehrmals mit Aqua bidest. gespült werden. Für das große Gelsystem wurde ein Volumen von 20 ml eines 3,5%-igen Sammelgels (2,4 ml 30%-Acrylamid-0,8%-N,N-Bisacrylamid, 5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 12,1 ml Aqua bidest., 0,2 ml 10%-ig Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,3 ml 10%-ig Ammonium Persulfat (AP) und 10 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) benötigt. Der Ansatz wurde auf das bereits polymerisierte Trenngel gegeben. Ein in das Sammelgel eingesetzter Kamm diente der Bildung von Kammern, in die später die Proben einpipettiert werden konnten. Der Kamm konnte nach Polymerisation des Sammelgels wieder entfernt und die entstandenen Probenkammern mehrmals mit Laufpuffer gespült werden. Der Laufpuffer (0,25 M Tris, 0,2 M Glycin und 1% Natriumdodecylsulfat [pH 8,8]) diente dabei als Elektrodenlösung. Die bereits vorbereiteten und zu trennenden Proben konnten nun in die Kammern überführt und mit Laufpuffer überschichtet werden. Nach dem Verschluß des Gelsystems, Verbindung mit der Stromquelle und dem Einschalten des Kühlsystems, startete die Proteinauftrennung zunächst mit einer Stromstärke von 10 mA (10 x 13 cm Gel) pro Gelplatte. Nach Beendigung der Sammelperiode, mit dem Erreichen des Trenngels, konnte die Probenauftrennung bei 30 mA pro Gelplatte über 4 - 5 Stunden (10 x 13 cm Gel) fortgesetzt werden. Für das kleinere Gelelektrophoressystem (Biometra, 6 x 8 cm) wurde ca. die Hälfte der oben angegebenen Volumina für das Trenn- und Sammelgel benötigt. Die Stromstärke für die Sammelgelperiode betrug dabei 5 mA über ca. 1 Stunde und 10 mA über ca. 2 Stunden pro Gelplatte während der Trennperiode.

2.2.9 Western Blot-Analyse und ECL-Immunodetektion

2.2.9.1 Western Blot-Analyse

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben folgte die Western Blot-Analyse nach dem Verfahren von Towbin (Towbin et al.,1979). Durch das Anlegen einer Spannung werden beim Western Blot die aufgetrennten Proteine aus dem Elektrophoresegel auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Das Proteingel wurde dazu in einer mit Blottingpuffer (3% Borsäure und 20% Methanol [pH 9,0]) befüllten Wanne auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran Nitrozellulosefilter) überführt. Proteingel und Nitrozellulose-Membran (Schleicher & Schüll) wurden nachfolgend in der Wanne auf beiden Seiten mit je zwei Blatt Blottingpapier und je einem Polster umgeben und in eine verschließbare Transferplastik eingelegt. Die Migration der aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulose-Membran vollzog sich in einer mit Blottingpuffer gefüllten Trans-blot-cell-Kammer (Bio-Rad), in die die Transferplastik im Anschluß an den oben beschriebenen Arbeitsschritt eingesetzt wurde. Der Transfer der Proteine in der Blotting-Kammer auf die Nitrozellulose-Membran erfolgte über mindestens 5 Stunden bei einer Stromstärke von 220 - 250 mA. Nach der Entnahme der Nitrozellulose-Membran aus der Blotting-Kammer wurde die Membran zur Überprüfung des Proteintransfers über zehn Minuten mit Ponceau-S-Lösung gefärbt. Mehrfaches waschen in Aqua bidest. führte zur Entfernung unspezifischer Anfärbungen der Nitrozellulose-Membran.

2.2.9.2 ECL-Immunodetektion

Die sich der Western Blot-Analyse anschließende ECL-Immunodetektion zum Nachweis spezifischer Antigene erfolgte nach der Methode von Whitehead (Whitehead et al., 1979). Die Nitrozellulose-Membran wurde entsprechend der geplanten Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern in Streifen geschnitten und beschriftet. Danach wurden die mit Ponceau-S-Lösung angefärbten Proteinbanden der Nitrozellulose-Membran über 5 – 10 Minuten mit PBS entfärbt, im Anschluß die Membran für 60 Minuten in einer Blocklösung (0,1% Tween, 10% Milchpulver in PBS) unter leichtem Schütteln inkubiert, um überschüssige Proteinbindestellen der Membran zu satuieren und später unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren. Danach erfolgte die Detektion der Proteine durch Inkubation der Nitrozellulose-Membran mit den in Kapitel 2.1.7.1 aufgeführten primären Antikörpern über 90 Minuten. Die primären Antikörper waren in 0,1% Tween und 5% BSA in PBS gelöst. Die Konzentration der primären Antikörper basierte auf Erfahrungswerten. Nach der Inkubation folgte ein dreimaliges Waschen der Membran über jeweils 10 Minuten in 0,1% Tween in PBS. Für den Nachweis der Antigen-Antikörper-Bindung sorgte eine weitere 45-minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur. Dieser kovalent an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gebundene Anti-IgG-Antikörper wurde in Blocking-Lösung verdünnt. Die eingesetzten Konzentrationen von Erst- und Zweit-Antikörpern sind in Kap. 2.1.7 tabellarisch aufgeführt. Die folgenden drei jeweils fünfminütigen Waschschritte in PBS 0,3% Tween, PBS 0,1% Tween und PBS ohne weitere Zusätze dienten dazu, unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers mit der Nitrozellulose-Membran abzuwaschen. Die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern erlaubte dann die Detektion der Protein-Erst-Antikörper-Zweit-Antikörper-Komplexe mit einem ECL-Chemolumineszenz-Kit (Amersham). Bei dieser Reaktion wurde Luminol von der an den 2. Antikörper gebundenen Meerrettich-Peroxidase oxidiert. Die resultierende maximale Lichtemission lag im Wellenlängenbereich von 428 nm und führte durch Einbringung der Nitrozellulose-Membran nach gestarteter ECL-Reaktion in eine Filmkassette zu einer quantifizierbaren Schwärzung des auf die Membran gelegten Röntgenfilms (Biomax, Kodak). Das Maximum der substrat- und zeitabhängigen Chemolumineszenzreaktion wurde nach 5 – 20 Minuten erreicht.

2.2.10 Radioaktive Zellkulturexperimente

2.2.10.1 Radioaktive Markierung von LDL mit Tritium-Cholesterin

Für die radioaktive Markierung von LDL mit ^{3}H-Cholesterin (Tritium-Cholesterin) wurden 100 µl handelsübliches ^{3}H-Cholesterin (1-α,2-α(n)-^{3}H-Cholesterin, 8,125 µg Cholesterin/ml; 42 Ci/mMol, Amersham) eingedampft. Im Anschluß wurden zu diesem Ansatz 100 µl 2,5% BSA in F-12-Medium pipettiert und gemischt. Dieser Ansatz wurde mit 1 ml LDL (ca. 5 mg/ml) versetzt und das Gemisch über mindestens drei Stunden bei 37°C inkubiert. Vor dem Einsatz des mit Tritium-Cholesterin markierten LDL mußte dieses von KBr und vorhandener freier Radioaktivität befreit werden. Dazu wurden 2 ml radioaktiv markiertes LDL vor dem Versuch über eine PD 10 Säule (Amersham) dialysiert und die spezifische Aktivität des „gelabelten“ LDL bestimmt.

2.2.10.2 Efflux-Experimente mit ^{3}H-Cholesterin-LDL

Die CHO Zellen wurden in 12-well Zellkulturschalen mit ca. 1 x 10^5 Zellen/well ausplattiert und 24 h im Standardmedium inkubiert (vgl. Kap. 2.2.1). Nach 24 h wurden die Zellen in PBS gewaschen und einer Vorinkubation in LPDS-Nährmedium (vgl. Kap. 2.2.3) bei 37°C über verschiedene Zeiträume unterzogen. Die Vorinkubation mit LPDS führt durch den Mangel an Cholesterin kompensatorisch zu einer vermehrten Expression des LDL-Rezeptors (Goldstein et al., 1985). Wegen der erhöhten Zahl an LDL-Rezeptoren auf der Zellmembranoberfäche der LPDS vorinkubierten Zellen wird die Aufnahme von LDL bei der folgenden Inkubation mit ^{3}H-Chol-LDL erhöht.
Die Zellen wurden anschließend mit ^{3}H-Cholesterin markierten Low Density Lipoproteinen (^{3}H-Cholesterin-LDL, 50 µg/ml) inkubiert. Um die Aufnahme des mit ^{3}H-Cholesterin markierten LDL zu erleichtern, wurde jedes „Well" zusätzlich mit unmarkiertem LDL und LPDS-Nährmedium ergänzt. Die Internalisierung des ^{3}H-Cholesterins erfolgte über unterschiedlich lange Inkubationszeiten (ca. 24 Stunden) bei 37°C. Am nächsten Tag wurde das Medium mit der nicht aufgenommenen Radioaktivität entfernt und die Zellen mit 1 ml PBS pro Well über ca. 1 min gewaschen, um oberflächengebundenes ^{3}H-Chol-LDL abzulösen. Der ^{3}H-Cholesterin-Efflux aus den Zellen wurde anschließend mit High Density Lipoprotein (HDL_3) induziert als Akzeptor für internalisiertes ^{3}H-Cholesterin. Dazu wurden die Zellen mit 1 ml einer mit HDL_3 angereicherten LPDS-Lösung (100 µg/ml HDL_3) inkubiert. Nach unterschiedlicher Inkubationsdauer wurde das Nährmedium zur Bestimmung des in das Medium abgegebenen ^{3}H-Cholesterins in Zählröhrchen überführt. Zur Bestimmung des ^{3}H-Cholesterins, das in den Zellen verblieben war, wurden die Zellen nachfolgend mit 1 ml 0,1 N NaOH pro Well über 30 min vom Boden der Mehrfachzellkulturschalen gelöst und ebenfalls in Zählröhrchen überführt. Nach Zugabe von 7 ml Szintillationslösung (Zinsser Analytic) erfolgte die Bestimmung der Radioaktivität über eine Minute (Packard). Aliquots von 100 µl dienten zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben (Lowry et al., 1951), um die ermittelten Werte entsprechend der Zellproteinkonzentration zu korrigieren.

2.2.10.3 Radioaktive Gradientenexperimente

Die Präparation von Lipid Rafts mit Dichtgradientenzentrifugation wurde bereits in Kap. 2.2.5.1 beschrieben. Bei der Dichtegradientenzentrifugation mit radioaktiv markiertem Tritum-Cholesterin wurden die Zellen entsprechend der in Kap. 2.2.5.1.1 beschriebenen Methode kultiviert. Nach 24 h wurde das Nährmedium verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Nährmedium versehen. Anschließend wurde das Nährmedium zusätzlich mit ^{3}H-Cholesterin beladenem LDL (50 µg/ml) versetzt. Nach 24 h bei 37°C wurde das Medium mit nicht aufgenommener Radioaktivität entfernt und die Zellen mit 20 ml PBS pro Zellkulturflasche über ca. 1 min gewaschen. Der ^{3}H-Cholesterin-Efflux aus den Zellen wurde anschließend mit High Density Lipoprotein (HDL_3) induziert. HDL_3 (30 µg/ml) wurde gelöst in F-12 (HAM) Nutrient Mixture, 10% LPDS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin eingesetzt. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurde das Medium abpipettiert und die Zellen einem PBS-Waschritt unterzogen. Anschließend wurden die Zellen in PBS (10 ml) mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturschale abgekratzt. Die in PBS gelö-

sten Zellen wurden nun in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und 5 min bei 1500 – 2000 U/min (4°C) abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 400 µl Raftpräp-Lösung (vgl. Kap. 2.2.5.1) solubilisiert und über 30 min bei 4°C im Kühlraum geschwenkt (Lecat et al., 2000). Das auf diese Weise gewonnene Material wurde entsprechend der in Kapitel 2.2.5.1.2 dargestellten Methode einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Jeweils 200 µl der Proben wurden in Messbecher überführt und auf die in den Zellen vorhandene Radioaktivität untersucht (Packard). Aliquots der Fraktionen dienten der Bestimmung der Proteinkonzentration (vgl. Kap. 2.2.7).

3 Ergebnisse

Die Funktion von Annexin VI in Lipid Rafts/Caveolae wurde in der vorliegenden Arbeit auf mehreren Ebenen untersucht. Im ersten Teil der Arbeit stand die Etablierung von Methoden zur Isolierung von Lipid Rafts/Caveolae im Vordergrund. Zwei Methoden haben sich dabei als zuverlässig und reproduzierbar erwiesen. Vergleichende Protein- und Lipidanalysen mit etablierten Marker-Proteinen (Caveolin) und -Lipiden (Cholesterin) von Lipid Rafts bzw. Caveolae wurden herangezogen, um die Rolle und Lokalisation von Annexin VI in Lipid Rafts/Caveolae zu charakterisieren. Besonderes Interesse galt dem Einfluss von Calcium und Cholesterin auf die Assoziation bzw. Membranbindung von Annexin VI mit Lipid Rafts/Caveolae-Membrandomänen. Im zweiten Teil der Arbeit stand die potentielle Rolle von Annexin VI beim HDL-vermittelten Cholesterin-Efflux im Mittelpunkt des Interesses. Zu diesem Zweck wurden verschiedene CHO-Zellreihen mit ^{3}H-Cholesterin-LDL beladen und variierenden Bedingungen zum Studium der Effekte ausgesetzt.

3.1 Einfluss von Lipoproteinen auf die Expression von Annexinen und SR-BI

In einführenden Experimenten sollte der Einfluss von Lipoproteinen auf die Expression von Annexin VI, Annexin II, SR-BI oder Caveolin untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden CHO WT-, CHO Anx VI- und CHO Anx II-Zellen mit HDL, LDL oder LPDS beladen, um nach Proteinextraktion und Western Blot-Analyse Rückschlüsse auf die Genexpression nach Lipoproteinbeladung zu ziehen.

3.1.1 Annexin-, Caveolin- und SR-BI-Expression nach LDL-, HDL- und LPDS-Inkubation

In diesen Experimenten sollte die Annexin VI-, Annexin II-, Caveolin- und SR-BI-Expression nach Inkubation mit unterschiedlichen Nährmedien untersucht werden. Die Proteinextraktion mit der unten dargestellten Methode erlaubt keine Unterscheidung von Lipid Rafts/Caveolae-Fraktionen und anderen Membranbereichen. Diese Extraktionsmethode diente vielmehr dazu, zunächst einen Überblick über die generellen Verschiebungen im Expressionsniveau für die untersuchten Proteine nach Inkubation mit HDL-, LDL- oder LPDS-angereicherten Zellkulturmedien zu gewinnen. Zur gezielten Untersuchung der Lipid Rafts/Caveolae-Fraktionen nach LDL- oder HDL-Inkubationen siehe Kapitel 3.4 ff.

3.1.1.1 Annexin VI- und Caveolin-Expression nach LDL-, HDL- und LPDS-Inkubation

Für dieses Experiment wurden die Versuchszellen in LDL-, HDL-, LPDS- und FCS-angereicherten Zellkulturmedien vorinkubiert, um im Anschluß daran die Proteinexpression nach Lipidbeladung bzw. Lipidentzug zu untersuchen. Für die Versuche wurden 1 x 10^5 CHO Anx VI-, Anx II- und WT-Zellen nach der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Methode auf 12-well Zellkulturschalen kultiviert und mit verschiedenen Nährmedien über 16 und 24 Stunden inkubiert. Jeweils eine Vergleichs-Zellreihe wurde in FCS-(Fetal Calf Serum)-haltigem Standard-Nährmedium kultiviert. Die drei weiteren Ver-

suchs-Zellreihen enthielten im Austausch zum FCS-haltigen Nährmedium ein mit 10%-LPDS (lipoproteindefizientes Serum, vgl. Kap. 2.2.3) angereichtertes Nährmedium. Zusätzlich wurde bei einer Versuchszellreihe das 10%-LPDS-angereicherte Nährmedium mit LDL (50 µg/ml), bei einer weiteren Zellreihe mit HDL (50 µg/ml) angereichert. Die Vorinkubation in LPDS-angereichertem Nährmedium führte in den Zellen aufgrund von Mangel an Cholesterin kompensatorisch zu einer vermehrten Expression des LDL-Rezeptors. Diese Anpassungsreaktion der Zelle wird über die „sterol-responsive-elements (SRE's) vermittelt (Goldstein et al., 1985). Durch die erhöhte Zahl an LDL-Rezeptoren auf der Zellmembranoberfäche der mit LPDS „vor"-inkubierten Zellen wird die Aufnahme von LDL erhöht.

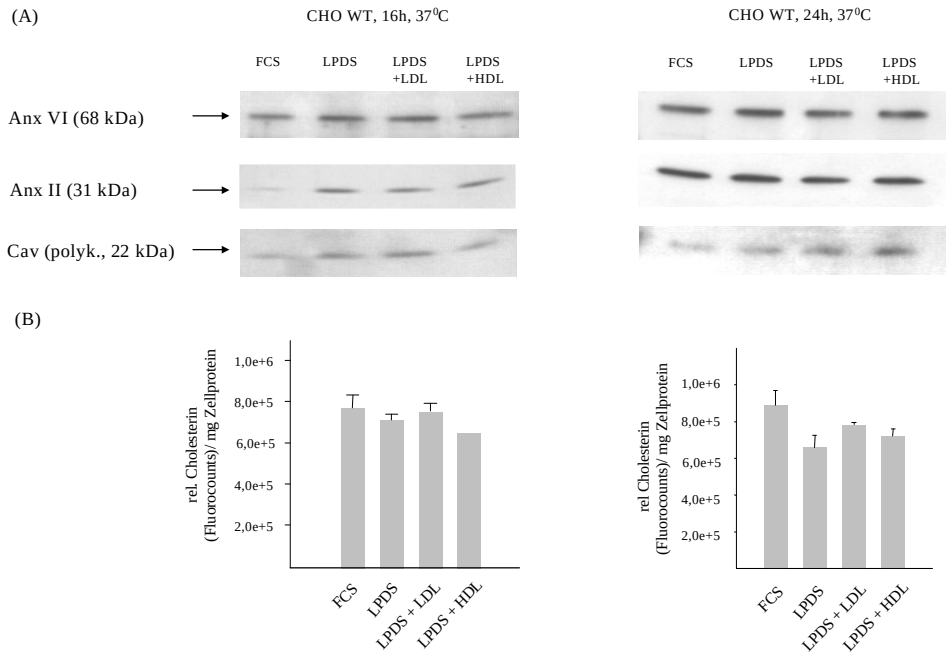


Abb. 5 **:** Proteinexpression und Cholesterinkonzentration in CHO WT-Zellen nach Lipidbeladung
(A) 1 x 10^5 CHO WT-Zellen pro ml wurden auf 12-well Zellkulturschalen ausplattiert und in vier verschiedenen Nährmedien über 16 oder 24 Stunden kultiviert: (1.) FCS-haltiges Nährmedium [F-12 (HAM) Nutrient Mixture, 10% fötales Kälberserum (FCS), 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin], (2.) 10% LPDS angereichertes Nährmedium [LPDS-Nährmedium: F-12 (HAM) Nutrient Mixture, 10% LPDS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin], (3.) mit 50 µg LDL pro ml angereichertes LPDS-Nährmedium und (4.) mit 50 µg HDL pro ml angereichertes LPDS-Nährmedium. Nach 16 bzw. 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Zellen entsprechend der im Kapitel 2.2.4 beschriebenen Methode aufgearbeitet. Jeweils 20 µg Protein aus dem Überstand mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot-Methode analysiert und über ein ECL-System detektiert (vgl. Kap. 2.2.8 und 2.2.9). Dem biotinylierten Proteingrößenmarker entsprechend sind Molekulargewichtsmarkierungen (kDa) angegeben. Die Antiköperinkubation erfolgte mit anti-Annexin VI, anti-Annexin II und anti-Caveolin-(polykl.)-Antikörpern.
(B) Cholesterinkonzentration in den Proteinextrakten: Aliquots von 25 µl von CHO WT-Zellen dienten der fluorometrischen Bestimmung des Gesamtcholesterins (s. Kap. 2.2.6; Amplex Red Cholesterol Assay Kit).

Abbildung 5 zeigt für CHO WT-Zellen, dass sich nach einer 16-stündigen Inkubation der Zellen mit FCS-, LPDS-, LPDS+LDL- und LPDS+HDL-angereicherten Zellkulturmedien keine Verschiebungen in der Expression von Annexin VI nachweisen ließen. Die 24-stündige Inkubation der CHO WT-Zellen mit den verschiedenen Nährmedien zeigte ebenfalls keine inkubationsbedingten Veränderungen in der Annexin VI-Proteinexpression. Die Proteinbanden von Annexin II zeigten für eine Inkubation der CHO WT-Zellen in FCS-haltigem Zellkulturmedium nach 16 Stunden ein schwächeres Si-

gnal im Vergleich zu einer Inkubation der Zellen mit den drei übrigen Nährmedien. Nach 24 Stunden waren jedoch keine auf die Inkubationen mit verschiedenen Nährmedien zurückzuführenden Verschiebungen in der Annexin II-Expression nachweisbar. Die Protein-Expression für Caveolin schien bei einer Inkubation der Zellen in FCS-angereichertem Nährmedium schwächer ausgeprägt im Vergleich mit LPDS-, LPDS+LDL- und LPDS+HDL-inkubierten CHO WT-Zellen. Die geringere Proteinexpression für Caveolin ließ sich ebenso nach einer 24-stündigen FCS-Inkubation der CHO WT-Zellen zeigen.

Die zusätzlich durchgeführte Bestimmung der Cholesterinkonzentration in den CHO WT-Zellen (vgl. Abb. 5 B) ergab für die in FCS-haltigem Medium kultivierten Zellen einen zeitabhängigen Anstieg der Cholesterinmesswerte. So stieg die Cholesterinkonzentration in den Zellen nach 24-stündiger Inkubation in FCS-haltigem Medium im Vergleich zur 16-stündigen Inkubation deutlich an. Im Vergleich dazu wiesen in LPDS-Nährmedium kultivierte CHO WT-Zellen niedrigere Cholesterin-Messwerte auf. Dies gilt insbesondere für eine 24-stündige Inkubation der Zellen in diesem Medium. Die Inkubation der CHO WT-Zellen mit LPDS+LDL-angereichertem Zellkulturmedium (50 µg/ml LDL) zeigte nach 16 Stunden vergleichbar hohe Cholesterinkonzentrationen wie die im FCS-haltigem „Standard"-Zellkulturmedium inkubierten Zellen. Nach 24 Stunden waren die Messwerte im Vergleich mit in FCS-Zellkulturmedium inkubierten Zellen dagegen geringgradig erniedrigt. Im Vergleich zu den Zellen, die lediglich in LPDS-angereichertem Zellkulturmedium kultiviert wurden (sowohl für die 16- als auch die 24-stündige Inkubation), zeigten sich bei den mit LPDS+LDL inkubierten Zellen höhere Cholesterin-Messwerte. Allerdings bleiben die Messwerthöhen hinter den in FCS-haltigem Medium kultivierten Zellen zurück. Die Kultivierung der Zellen in LPDS+HDL-angereichertem Medium führte sowohl nach 16- als auch nach 24-stündiger Inkubation zu geringeren Cholesterinmesswerten als bei den in FCS- oder in LPDS+LDL angereichertem Zellkulturmedium kultivierten Zellen.

Abbildung 6 zeigt Ergebnisse, die mit dem gleichen Versuchsaufbau und den gleichen Inkubationsbedingungen wie aus dem vorhergehenden Experiment für CHO Anx II-Zellen erzielt wurden. Hierbei war weder nach 16- noch nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Lipoproteinen oder LPDS-Medium ein inkubationsbedingter Einfluss auf die Expression von Annexin VI, Annexin II und Caveolin festzustellen. Die Auswertung der Cholesterin-konzentrationen der in unterschiedlichen Zellkulturmedien kultivierten CHO Anx II-Zellen (vgl. Abb. 6 B) zeigte dagegen inkubationsbedingte Veränderungen. Die in FCS-haltigem „Standard"-Zellkulturmedium kultivierten CHO Anx II-Zellen wiesen zu jedem Zeitpunkt die höchsten Cholesterin-Messwerte auf. Im Vergleich dazu ergaben sowohl LPDS-, LPDS+LDL als auch LPDS+HDL-inkubierte CHO Anx II-Zellen deutlich geringere Cholesterin-Messwerte.

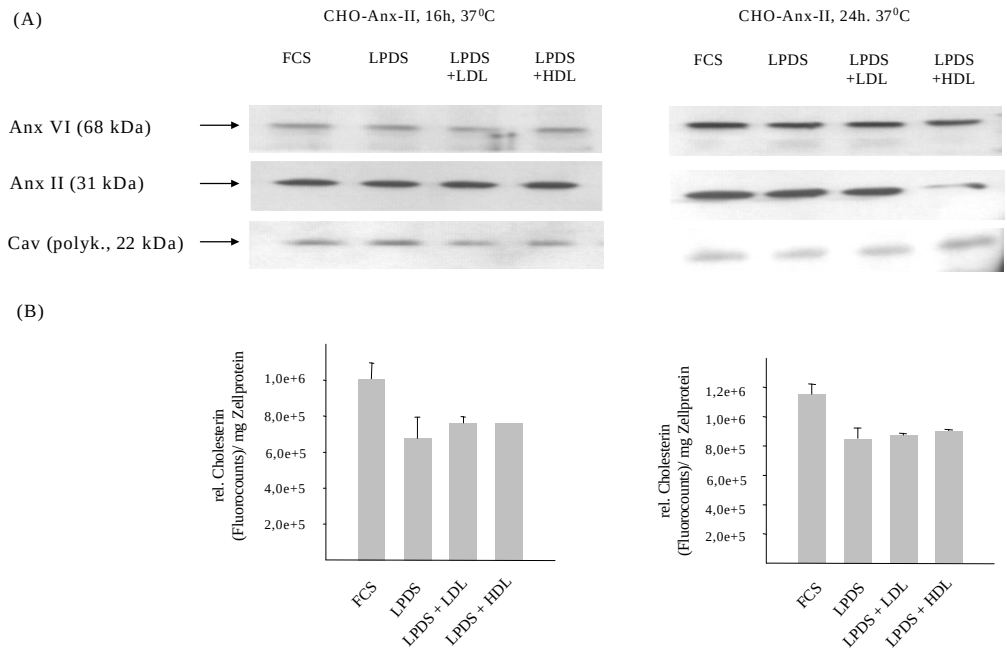


Abb. 6 **:** Proteinexpression und Cholesterinkonzentration in CHO Anx II-Zellen nach Lipidbeladung
(A) 1 x 10^5 CHO Anx II-Zellen pro ml wurden wie im Experiment der Abbildung 5 kultiviert, inkubiert und aufgearbeitet.
(B) Cholesterinkonzentration: Aliquots von 25 µl pro Fraktion von CHO Anx II dienten der fluorometrischen Bestimmung des Gesamtcholesterins (vgl. Kap. 2.2.6).

Auch unter gleichen Versuchsbedingungen kultivierte und inkubierte CHO Anx VI-Zellen (vgl. Abb 7 A) zeigten nach 16 Stunden ebenfalls keine von der Inkubation mit Lipoproteinen beeinflusste Veränderung in der Proteinexpression für Annexin VI, Annexin II oder Caveolin (hier keine Messwerte für eine 24-stündige Inkubation).

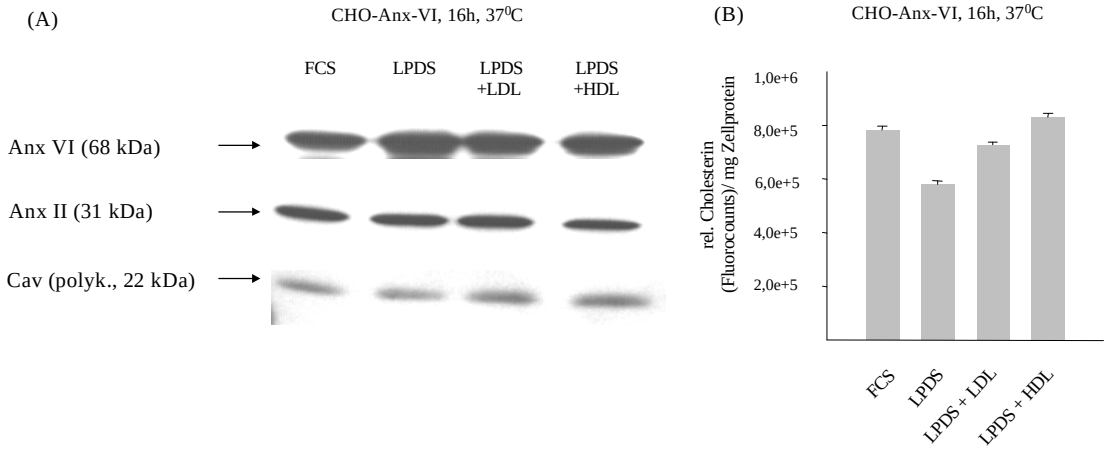


Abb. 7 **:** Proteinexpression und Cholesterinkonzentration in CHO Anx VI-Zellen nach Lipidbeladung
(A) 1 x 10^5 CHO Anx II-Zellen pro ml wurden wie im Experiment der Abbildung 5 kultiviert, inkubiert und aufgearbeitet. Es wurden Werte lediglich für eine 16 stündige Inkubation ermittelt.
(B) Cholesterinkonzentration: Vorgehen wie in Abb. 5 und 6, hier für CHO Anx VI-Zellen.

Wie im Falle der CHO WT- und CHO Anx II-Zellen zeigten sich jedoch auch bei den CHO Anx VI-Zellen inkubationsbedingte Veränderungen in den Cholesterin-Messwerten (vgl. Abb. 7B). Im Einklang mit den beiden anderen Versuchszellreihen ergaben sich für CHO Anx VI-Zellen, die im

LPDS-Zellkulturmedium kultiviert worden waren, die niedrigsten Cholesterin-Messwerte. Auffällig war insbesondere, dass die höchsten Cholesterin-Messwerte für LPDS+HDL-inkubierte CHO Anx VI-Zellen ermittelt werden konnten. Bei CHO WT- und CHO Anx II-Zellen ergaben sich unter Inkubationsbedingungen mit LPDS+HDL, im Vergleich mit in FCS-haltigem Zellkulturmedium kultivierten Zellen, niedrigere Cholesterin-Messwerte (vgl. Abb. 5 u. 6).

Die schwächeren Proteinbanden für Anx II- und Caveolin-Proteine, insbesondere bei 16-stündiger Inkubation in FCS-haltigem Nährmedium von CHO WT-Zellen (vgl. Abb. 5A), sind vermutlich nicht als Effekt der Inkubation mit dem Nährmedium zu interpretieren, sondern lassen sich durch das Aufbringen einer zu geringen Proteinmenge auf das Elektrophoresegel deuten. In den Zellklonen (CHO Anx VI- und CHO Anx II-Zellen) erklären sich die starken Signale für Annexin VI (CHO Anx VI-Zellen) und Annexin II (CHO Anx II-Zellen) aufgrund erhöhter Expression dieser Proteine in den jeweiligen Zelllinien.

Um die Interpretation der Messergebnisse zu erleichtern, wurden die Werte der Cholesterinbestimmungen nochmals in Abb. 8 für die einzelnen Zellreihen gegenübergestellt (für CHO Anx VI-Zellen sind keine 24 Stunden Werte gezeigt).

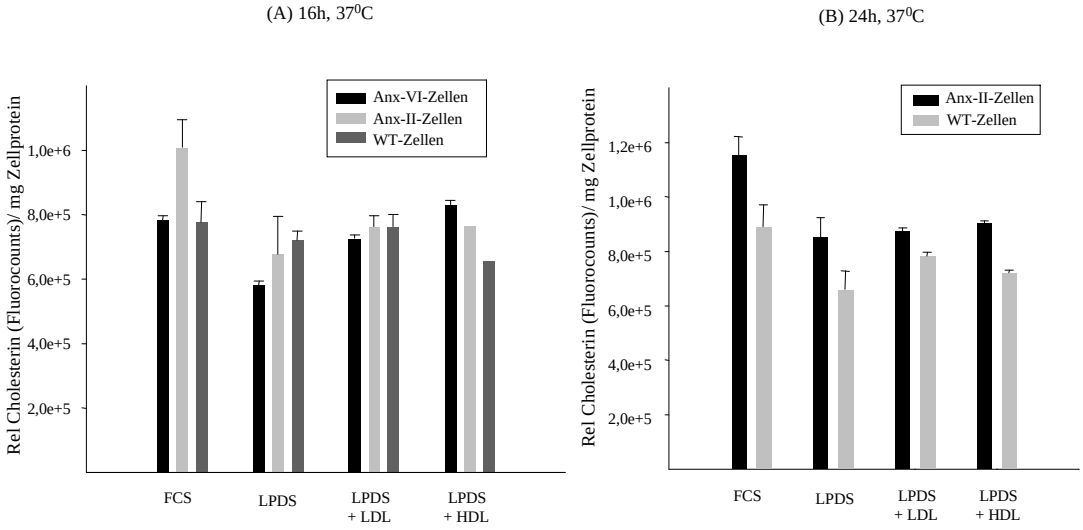


Abb. 8 **:** Vergleichende Darstellung der Cholesterinkonzentrationen der Experimente der Abb. 5 bis 7

Diese Darstellung veranschaulicht für die Versuchszelllinien die von der Inkubation mit Lipoproteinen abhängigen Cholesterin-Messwerte. Abbildung 8 zeigt, dass HDL-inkubierte CHO Anx VI-Zellen höhere Cholesterin-Werte aufwiesen als vergleichsweise HDL-inkubierte CHO WT- und CHO Anx II-Zellen (16 h). Zudem ist bei allen Zelllinien der Einfluß einer LPDS-Inkubation auf die Zellen erkennbar. Dieser äußert sich in einem deutlichen Rückgang der Cholesterin-Meßwerte (für die 16- und 24-stündige Inkubation) im Vergleich mit den in FCS-haltigem Zellkulturmedium kultivierten Zellen.

Zusammenfassend ergibt sich, dass bei den Inkubationen mit LPDS und Lipoproteinen (LDL und HDL) keine bedeutenden Veränderungen im Expressionsniveau der untersuchten Proteine in der Western Blot-Analyse resultieren. Die Vermutung, dass es mit einer LPDS+HDL- oder LPDS-LDL-

Inkubation zu einer inkubationsbedingten Veränderung der Expression der betrachteten Proteine kommt, ließ sich im Experiment nicht bestätigen.

Zur differenzierten Analyse der Auswirkung einer HDL- oder LDL-Präinkubation der Versuchszellen auf die Verteilung der untersuchten Proteine, sind nach Etablierung der Methode zur Lipid Rafts/Caveolae-Präparation verschiedene Experimente durchgeführt worden im Hinblick auf eine direkte Beobachtung einer Veränderung der Proteinverteilung in cholesterinreichen Membrandomänen (Lipid Rafts bzw. Caveolae) (siehe Kap. 3.4 ff).

3.1.1.2 SR-BI-Expression nach LDL-, HDL- und LPDS-Inkubation

Die im Kapitel 3.1.1.1 beschriebenen Proteinextrakte dienten im Folgenden der Analyse der SR-BI-Expression. Die Proben wurden auf ein 12%-iges SDS-Page aufgebracht, einer Western Blot-Analyse und ECL-Detektion unterzogen (vgl. Abb. 9; vgl. Kap. 2.2.8 u. 2.2.9).

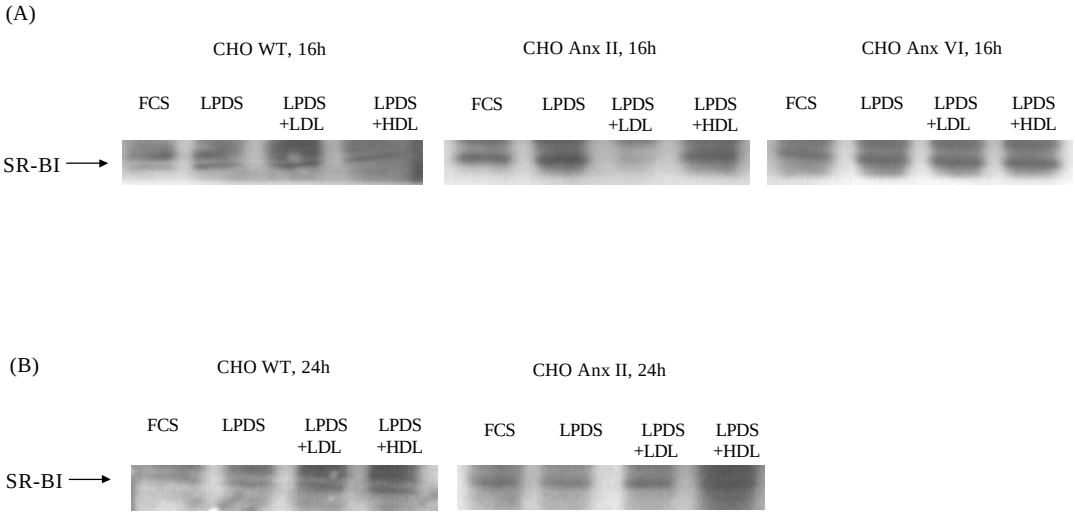


Abb. 9 **:** Charakterisierung der SR-BI-Expression nach LDL-, HDL- und LPDS-Beladung
Die Proteinextrakte des Kapitels 3.1.1.1 wurden in reduziertem Zustand auf ein 12% Polyacrylamidgel aufgetragen, mit Hilfe der Western Blot-Methode analysiert und mit einem ECL-System detektiert. Dem biotinylierten Proteingrößenmarker entsprechend sind Molekulargewichtsmarkierungen (kDa) angegeben. Die Antiköperinkubation der Nitrozellulose-Membran erfolgte mit anti-SR-BI-Antikörpern.

Die Analyse von CHO WT-, CHO Annexin II- und CHO Annexin VI-Zellen ergibt dabei keine signifikanten Veränderungen im Expressionsniveau für SR-BI nach einer 16-stündigen Inkubation mit FCS-, LPDS-, LPDS+LDL- oder LPDS+HDL-angereicherten Zellkulturmedien (vgl. Abb. 9). Das abgeschwächte Signal bei CHO Anx II–Zellen nach LDL-Beladung erklärt sich aus dem Auftrag einer geringeren Proteinkonzentration. Die SR-BI-Antikörper-Inkubation der Proben läßt nach 24-stündiger Inkubation ebenfalls keine von der Inkubation abhängigen Veränderungen der SR-BI-Expression in den Zellen erkennen. Zusammenfassend ergab sich kein Hinweis auf eine Veränderung im Expressonsniveau von SR-BI in den verschiedenen Zelllinien nach Inkubation mit LPDS-, LPDS+LDL- oder LPDS+HDL-angereichertem Zellkulturmedium (vgl. Abb. 9).

3.1.2 SR-BI- und Caveolin-1-Expression in HDL-inkubierten Zellen

In diesem Experiment erfolgte eine Inkubation der Versuchszellen bei variablen HDL-Konzentrationen, um die Proteinexpression nach einer HDL-Beladung besser beurteilen zu können. Für die Versuche wurden 4 x 10^5 CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen entsprechend der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Methode kultiviert und unterschiedlich hohen Konzentrationen an HDL ausgesetzt. Zusätzlich kultivierte und HDL-inkubierte CHO Anx II- wurden zum Vergleich herangezogen. Abb. 10 zeigt einen repräsentativen Western Blot dieser Experimente.

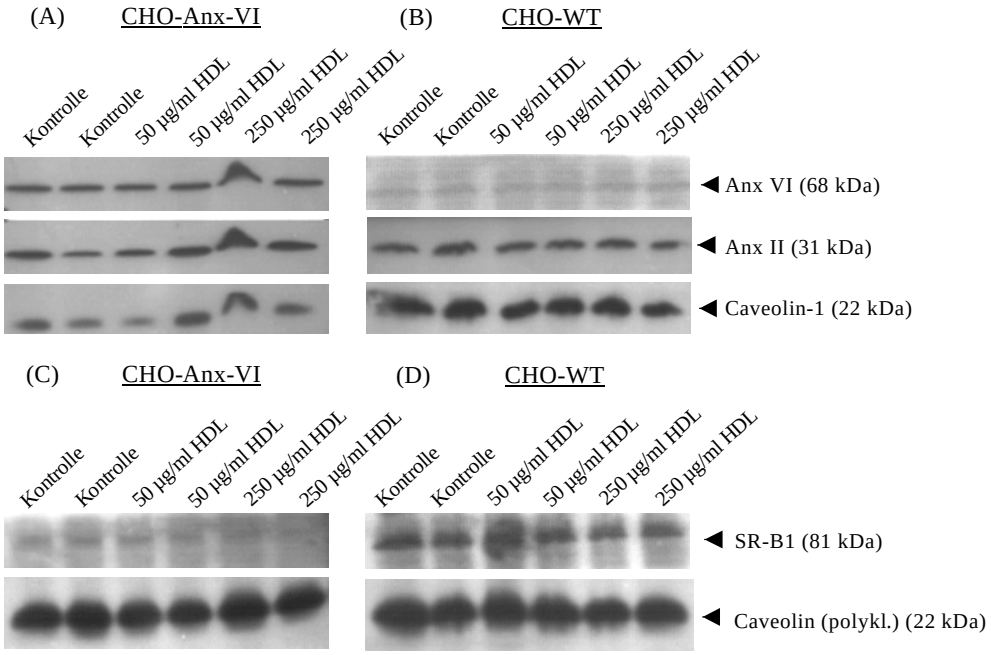


Abb. 10 : Annexin VI-, Annexin II-, Caveolin- und SR-BI-Expression in CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen nach HDL-Inkubation
4 x 10^5 CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen wurden für 24 Stunden nach der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Methode kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium verworfen und die Zellen in 10%-LPDS Nährmedium (vgl. Kap. 2.2.3) mit unterschiedlichen HDL-Konzentrationen inkubiert. (1.) 10% LPDS Zellkulturmedium, (2.) mit 50 µg HDL pro ml angereichertes 10%-LPDS-Zellkulturmedium und (3.) mit 250 µg HDL pro ml angereichertes 10%-LPDS-Zellkulturmedium. Nach 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 im Inkubator wurden die Zellen nach der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Methode aufgearbeitet. Jeweils 20 µg Protein auf ein 12% Polyacrylamidgel aufgetragen, mit Hilfe der Western Blot-Methode analysiert und über ein ECL-System detektiert. Dem biotinylierten Proteingrößenmarker entsprechend sind Molekulargewichtsmarkierungen (kDa) angegeben. Die Antiköperinkubation der Nitrozellulose-Membran erfolgte mit anti-Annexin VI, anti-Annexin II, anti-Caveolin-1, anti-Caveolin-(polykl.)- und anti-SR-BI-Antikörpern.

Die Protein-Expression von Annexin VI, Annexin II, Gesamt-Caveolin, Caveolin-1 und SR-BI zeigte in CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen keine Abhängigkeit von der Inkubation mit variierenden HDL-Konzentrationen (vgl. Abb. 10; siehe unbehandelte Kontrollzellen, mit 50 µg/ml HDL und mit 250 µg/ml HDL inkubierte Zellen). Die Detektion mit dem Annexin VI-Antikörper ergab unter allen Inkubationsbedingungen in CHO WT-Zellen deutlich schwächere Signale als in CHO Anx VI-Zellen. Als Ursache ist vermutlich die Überexpression von Annexin VI in CHO Anx VI-Zellen anzunehmen. Im Gegensatz dazu war die Signalstärke für Annexin II und Gesamt-Caveolin in beiden Zelllinien vergleichbar ausgeprägt. Die Expression von SR-BI zeigte geringe Differenzen zwischen

CHO Anx VI- und CHO WT-Zellen. Die SR-BI-Bande in CHO Anx VI-Zellen erschien weniger signalstark als in CHO WT-Zellen.

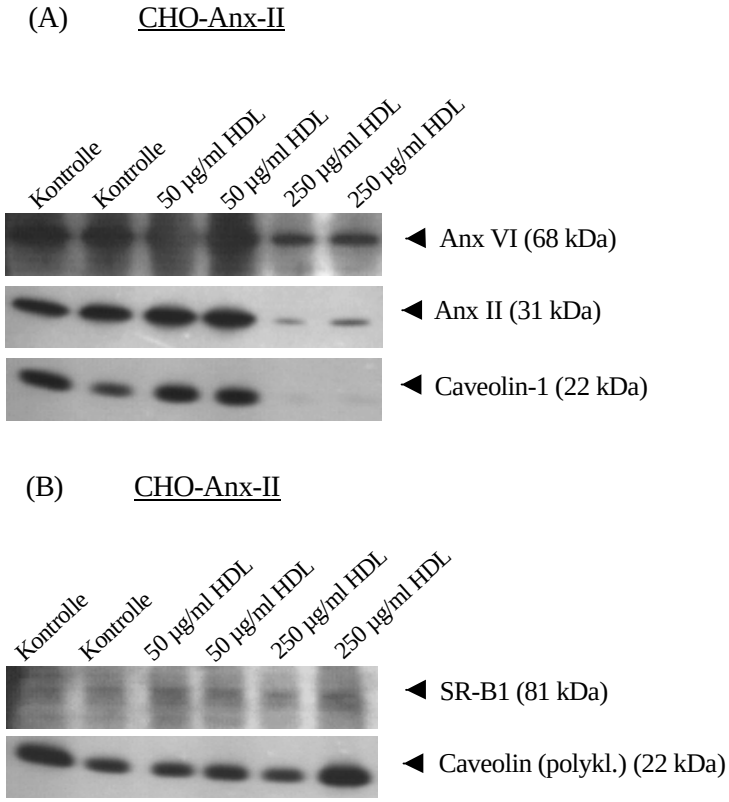


Abb. 11 : Annexin VI-, Annexin II-, Caveolin- und SR-BI-Expression in CHO Anx II-Zellen nach HDL-Inkubation
Gleiches experimentelles Vorgehen wie bei den in Abb.10 gezeigten Exponaten, hier CHO Anx II-Zellen.

In einer zweiten Western Blot-Analyse mit CHO Anx II-Zellen, die unter den gleichen Inkubationsbedingungen wie die Zellen in Abb. 10 kultviert wurden, zeigten sich ebenfalls keine Veränderungen in der Expression der betrachteten Proteine nach einer HDL-Inkubation (vgl. Abb. 11 A u. B). Bei CHO Anx II-Zellen ergaben sich für die mit 250 µg/ml HDL inkubierten Versuchszellen vergleichsweise schwächere Proteinbanden sowohl für Annexin VI, Annexin II als auch Caveolin-1. Da die Signale bei allen drei Antikörper-Inkubationen abgeschwächt sind, wurde hier vermutlich eine zu geringe Proteinmenge auf das Elektrophorese-Gel aufgetragen. Auch die Proteinbanden für Gesamt-Caveolin und SR-BI (vgl. Abb. 11 (B)) zeigten keine Abhängigkeit von einer HDL-Inkubation.
Zusammenfassend scheint eine HDL-Inkubation das Expressionsmuster in den Zellen weder für Annexin VI, Annexin II, Caveolin noch für SR-BI zu beeinflussen. So konnte in keiner der Zelllinien eine signifikante Veränderung im Expressionsmuster der Proteine nach HDL-Inkubation nachgewiesen werden. Unterschiede in der Signalstärke ergaben sich vermutlich durch Auftrag unterschiedlicher Proteinmengen auf das Elektrophorese-Gel. Allerdings zeigen die Ergebnisse eine erhöhte Expression für Annexin VI in CHO Anx VI-Zellen im Vergleich mit CHO WT-Zellen (vgl. Abb. 10 A und B). Zudem deutet die Proteinbande für SR-BI in Annexin VI überexprimierenden CHO Anx VI-

Zellen im Vergleich mit CHO WT-Zellen auf eine geringere Expression des Proteins in dieser Zellmutante hin (vgl. Abb. 10 C und D).

3.2 Etablierung der Lipid Rafts-/Caveolae-Präparation im Optiprep®-Gradienten

Das zur Familie hochkonservierter calciumabhängiger, phospholipidbindender Proteine gehörende Annexin VI übernimmt, wie bereits in Kapitel 1.3 einleitend dargestellt, vermutlich eine wesentliche Rolle in cholesterinreichen Membrandomänen (Lipid Rafts bzw. Caveolae). Zur Kenntnis der regulatorischen Funktion von Annexin VI in Lipid Rafts/Caveolae wurden zunächst verschiedene Methoden der Isolation von Triton X-100 unlöslichen Membranen aus CHO Zellen etabliert, um im Anschluß Annexin VI in Lipid Rafts bzw. Caveolae mit Hilfe von SDS-PAGE, Western Blot-Analyse und ECL-Immunodetektion nachweisen zu können. Bisher war in der Arbeitsgruppe Grewal keine Standardmethode zur Isolation von cholesterinreichen Membrandomänen (Lipid Rafts bzw. Caveolae) eingeführt. Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Untersuchung zwei Methoden zur Präparation von Lipid Rafts/ Caveolae etabliert, um Ergebisse unabhängig voneinander bestätigen zu können. Es handelt sich dabei um die Lipid Rafts/Caveolae-Präparation im diskontinuierlichen Optiprep®-Gradienten (Lecat et al., 2000; vgl. Kap. 3.2.1) und um die Triton X-100-Solubilisation von Lipid Rafts/Caveolae (Brown and Rose, 1992), auf die in Kapitel 3.8 näher eingegangen wird.

Die charakteristischen biochemischen Eigenschaften von Lipid Rafts/Caveolae (vgl. Kap. 1.2) ermöglichen die Identifizierung dieser zellulären Strukturen. Insbesondere die Unlöslichkeit in Triton X-100 bei 4°C und die Ausbildung glykolipidhaltiger Komplexe in diesem Detergenz erlauben den Nachweis und die Unterscheidung von Triton X-100 löslichen Proteinen und weiteren zytoskelettalen Zellkomponenten (Lafont et al., 1998). Aufgrund des hohen Lipidgehaltes bilden Lipid Rafts bzw. Caveolae, DIG-(detergent-insoluble glycolipid-enriched complexes)-Komplexe in Triton X-100 aus und reichern sich bei der Zentrifugation im Optiprep®-Gradienten im Bereich niedriger Dichte an (Lecat et al., 2000). Im Gegensatz dazu lassen sich zytoskelettassoziierte und Triton X-100-lösliche Proteine am Boden des Gradienten nachweisen. Der Nachweis von Proteinen, die mit Lipid Rafts/Caveolae assoziiert sind, ermöglicht die Unterscheidung von Lipid Rafts bzw. Caveolae von anderen DIG-Komplexen (Simons und Ikonen, 1997). Als Markerprotein für die Isolation von Caveolae dient Caveolin (vgl. Kap. 1.2).

Zur Etablierung der Methode der Präparation von Lipid Rafts/Caveolae im diskontinuierlichen Optiprep®-Gradienten (Lafont et al., 1998) wurden CHO Anx VI-Zellen nach dem in Kapitel 2.2.5.1 beschriebenen Verfahren auf Ø 15 cm Zellkulturschalen kultiviert und anschließend aufgearbeitet. Abbildung 12 A zeigt einen repräsentativen Western Blot einer Lipid Rafts-/ Caveolae-Präparation nach Ultrazentrifugation des Gradienten, Fraktionierung, Western Blot-Analyse und ECL-Immunodetektion für CHO Anx VI-Zellen. Die parallel durchgeführte Bestimmung der Cholesterin-Verteilung in den Fraktionen des Gradienten ist in Abbildung 12 B für CHO Anx VI-Zellen dargestellt.

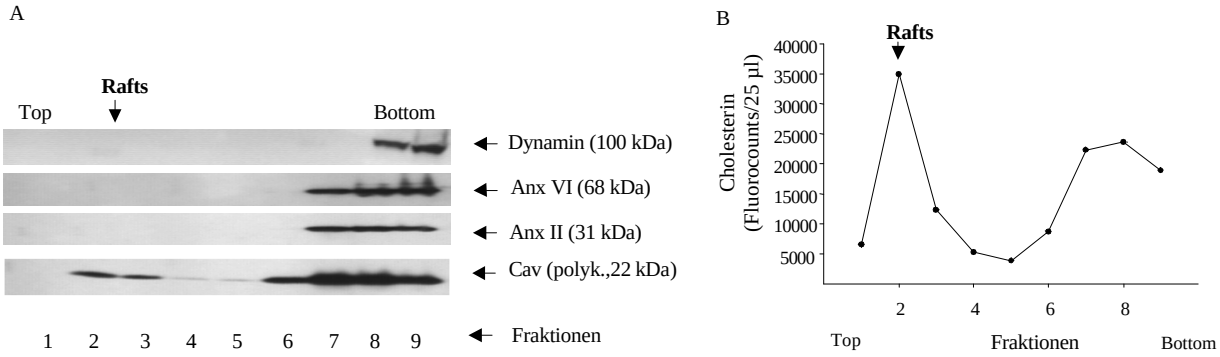


Abb. 12 **:** Lipid Rafts/Caveolae-Präparation von CHO Anx VI-Zellen
(A) 1 x 10^6 CHO Anx VI-Zellen wurden auf Ø 15cm Petrischalen ausplattiert und nach 48 Stunden in PBS vom Boden der Petrischalen gelöst. Anschließend nach der in Kapitel 2.2.5.1 beschriebenen Methode aufgearbeitet und in einem diskontinuierlichen Optiprep®-Gradienten durch Ultrazentrifugation aufgetrennt (Lecat et al., 2000). Jeweils 100 µl pro Zellfraktion wurden in reduziertem Zustand auf ein 12% Polyacrylamidgel aufgetragen, mit Hilfe der Western Blot-Methode analysiert und über ein ECL-System detektiert. Dem biotinylierten Proteingrößenmarker entsprechend sind Molekulargewichtsmarkierungen (kDa) angegeben. Die Antiköperinkubation erfolgte mit anti-Annexin VI-, anti-Annexin II-, anti-Caveolin- und anti-Dynamin-Antikörpern. Die Erst- und Zweitantikörper wurden empirsch verdünnt angesetzt.
(B) Anreicherung von Cholesterin in Lipid Rafts/Caveolae von CHO Anx VI-Zellen.
Aliqouts (25 µl) jeder Fraktion von CHO Anx VI-Zellen dienten der fluorometrische Bestimmung des Gesamtcholesterins (vgl. Kap. 2.2.6). Die relative Position der Fraktionen innerhalb des Gradienten [Top (oben, Fraktion 1) bis Bottom (unten, Fraktion 9)] und die Position der Lipid Rafts bzw. Caveolae („Rafts“) sind angegeben. Die Position der Lipid Rafts/Caveolae liegt im Bereich der Fraktionen 2 und 3.

Nach der Präparation konnten cholesterinreiche Membranen (Lipid Rafts bzw. Caveolae), die eine Subpopulation zellulärer Caveolin-positiver Membranen darstellen, im Bereich der Fraktionen 2 und 3 nachgewiesen werden (Pfeilmarkierung in den Abb. 12 A u. B). Diese Membranfraktionen zeichnen sich durch eine erhöhte Konzentration des Caveolin-Proteins (vgl. Abb. 12 A), eine erhöhte Cholesterin-Konzentration (vgl. Abb. 12 B) und durch eine erhöhte Phospholipid-Konzentration (nicht gezeigt) aus. In den Fraktionen 4 – 5 sind dagegen nur sehr schwache Caveolin-Signale erkennbar. Diese Fraktionen des Gradienten sind gekennzeichnet durch eine geringere Cholesterin-Konzentration als im Bereich von Lipid Rafts/Caveolae. Eine starke Anreicherung mit Caveolin (vgl. Abb. 12 A) und Cholesterin (vgl. Abb. 12 B) ließ sich zudem in den Fraktionen 6 – 9 am Boden des Gradienten feststellen. Annexin VI konnte ausschließlich am Boden des Gradienten, d.h. im Bereich der Triton X-100 löslichen Membranabschnitte (nachfolgend: „schwere Membranen“) bestimmt werden. Im Bereich von Lipid Rafts/Caveolae zeigte sich keine Anreicherung von Annexin VI, gleiches gilt für Annexin II und das Plasmamembran-assoziierte Dynamin-Protein (Henley et al., 1998), die beide ebenfalls ausschließlich am Boden des Gradienten nachzuweisen waren. In den proteinreichen Fraktionen 6 – 9 am Boden des Gradienten befinden sich außer Triton X-100 löslichen Proteinen auch zytoskelettassoziierte Strukturen. Dazu zählen Proteine aus intrazellulären Organellen wie z.B. Plasmamembran oder Golgi-Apparat (Lecat et al., 2000). Vergleichbare Ergebnisse liessen sich sowohl für CHO WT-Zellen als auch für CHO Anx II-Zellen (nicht gezeigt) erzielen.

3.3 Calcium-induzierte Translokation von Annexinen in Lipid Rafts/Caveolae

Die Charakterisierung von Lipid Rafts/Caveolae im Optiprep®-Gradienten führte zur Identifikation der calciumabhängigen Assoziation von Annexin VI mit cholesterinreichen Membrandomänen. Dafür wurden 1 x 10^6 CHO Anx VI- und CHO Anx II-Zellen entsprechend dem Vorexperiment (vgl. Kap. 3.2) ausplattiert und während der anschließenden Präparation variierenden Calcium-Konzentrationen ausgesetzt. Jeweils 100 µl jeder Fraktion wurden über 12% SDS-PAGE aufgetrennt, mit Hilfe der Western Blot-Methode analysiert und über das ECL-System detektiert. Abbildung 13 zeigt einen repräsentativen Western Blot dieser Experimente für CHO Anx VI-Zellen.

3.3.1 Calcium-induzierte Translokation von Annexin VI in Lipid Rafts/Caveolae von CHO Anx VI-Zellen

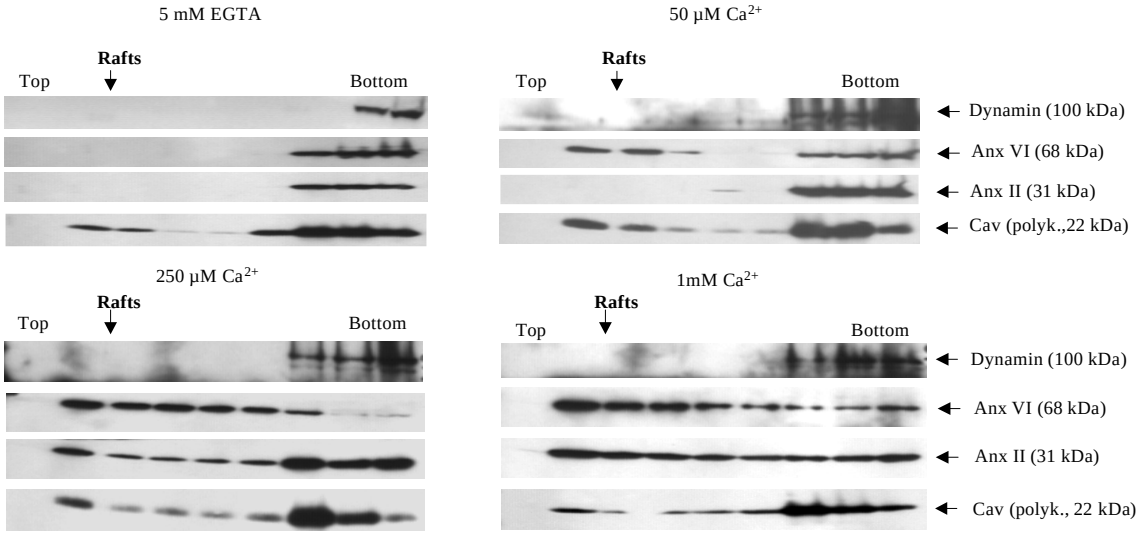


Abb. 13 : Calciumabhängige Verteilung von Annexinen in Lipid Rafts/Caveolae von CHO Anx VI-Zellen
1 x 10^6 CHO Anx VI-Zellen wurden entsprechend der Kapitel 2.2.5.1.1 beschriebenen Methode ausplattiert und während der anschließenden Präparation variierenden Bedingungen (5 mM EGTA – 1 mM Ca^{2+}) ausgesetzt. 100 µl Aliquots jeder Fraktion wurden auf einem 12% SDS-Page aufgetrennt, mit Hilfe der Western Blot-Methode analysiert und über das ECL-System detektiert. Die relative Position der Fraktionen im Optiprep-Gradienten [Top (oben, Fraktion 1) bis Bottom (unten, Fraktion 9)], die Position der Lipid Rafts/Caveolae („Rafts“) und die detektierten Proteine sind angegeben. Dieses Experiment erfolgte in Zusammenarbeit mit D. Mewawala, Hamburg.

Der Entzug von Calcium durch Inkubation von CHO Anx VI-Zellen mit 5 mM EGTA (Ethylenglykol-bis-N,N,N`,N`-tetraacetat) während der Präparation ergab keine Veränderung der Verteilung von Caveolin, Annexin VI, Annexin II und Dynamin im Optiprep®-Gradienten, verglichen mit nicht inkubierten CHO Anx VI-Zellen (vgl. Abb. 13). Mit Ausnahme von Caveolin waren alle Proteine lediglich am Boden des Gradienten nachweisbar. Caveolin konnte dagegen sowohl in den Fraktionen 6 – 9 in hoher Konzentration als auch im Bereich von Lipid Rafts/Caveolae (Fraktionen 2 – 3) festgestellt werden. Bei einer Konzentration von 50 µM Calcium war bereits ein Teil des Annexin VI-Proteinpools aus CHO Anx VI-Zellen in cholesterinreichen Lipid Rafts/Caveolae bestimmbar. Am Boden des Gradienten waren entsprechend geringere Mengen von Annexin VI-Proteinen zu detektieren. Im Gegensatz dazu translozieren bei dieser Calcium-Konzentration noch keine Proteine aus dem

Annexin II-Proteinpool in cholesterinreiche Membranregionen. Annexin II-Proteine waren lediglich am Boden des Gradienten in den Fraktionen 7 – 9 nachzuweisen. Ab einer Konzentration von 250 µM Calcium ließ sich für über 50% der Annexin VI-Proteine eine calciumabhängige Assoziation mit cholesterinreichen Lipid Rafts/Caveolae-Fraktionen zeigen. Die Translokation von Annexin VI-Proteinen in Lipid Rafts/Caveolae Membranregionen war auch durch eine Erhöhung der Calcium-Konzentration auf 1 mM Ca^{2+} nur noch unwesentlich zu erhöhen. Die calciumabhängige Assoziation mit Lipid Rafts/Caveolae ist bei einer Konzentration von 250 µM Calcium auch für Annexin II-Proteine nachweisbar. Jedoch war lediglich ein Teil der Annexin II-Proteine in cholesterinreichen Membranregionen zu finden. Der größte Anteil des Annexin II-Proteinpools zeigte sich am Boden des Gradienten. Erst bei einer Konzentration von 1 mM Calcium schien die calciumabhängige Assoziation von Annexin II mit Lipid Rafts/Caveolae vergleichbar stark ausgeprägt. Caveolin diente in den Versuchen als negative Kontrolle und konnte unter keinen Inkubationsbedingungen in seiner Verteilung im Gradienten durch die Calcium-Inkubationen beeinflusst werden. Ebenso ergab sich für Dynamin keine Calciumabhängigkeit im Optiprep®-Gradienten. Das Protein ließ sich unter allen Inkubationsbedingungen ausschließlich am Boden des Gradienten nachweisen. Neben der Western Blot-Analyse erfolgte parallel die Bestimmung der Cholesterin- und Phospholipidkonzentration in den Fraktionen des oben beschriebenen Optiprep-Gradienten (vgl. Abb. 14.).

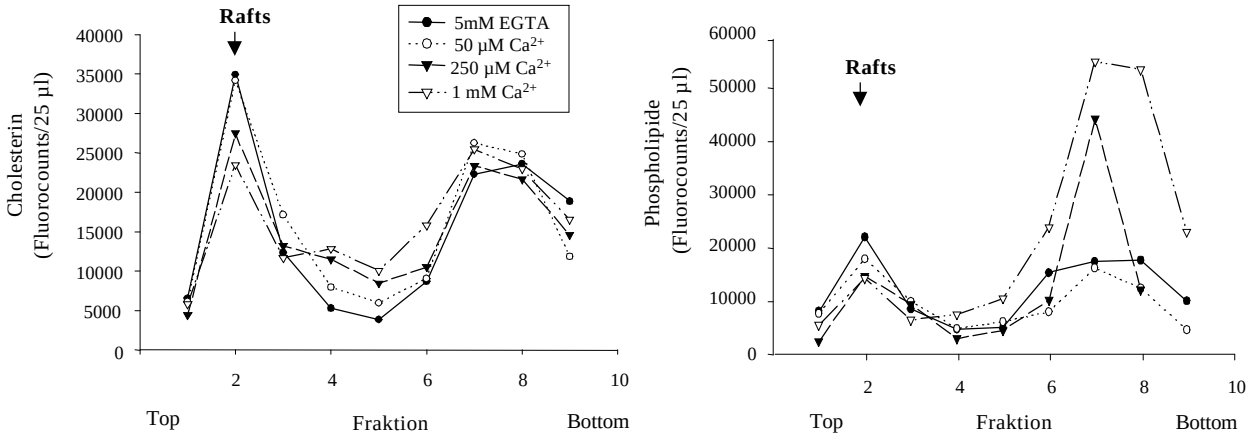


Abb. 14 : Cholesterin- und Phospholipid-Verteilung in CHO Anx VI-Zellen nach Calcium-Inkubation
Die fluorometrische Bestimmung des Gesamtcholesterins und des Phospatidylcholins erfolgte mit Aliquots von 25 µl jeder Fraktion der Proben aus Abb. 13 (vgl. Kap. 2.2.6). Gesamtcholesterin- und Phospholipidverteilung sowie die relative Position der Fraktionen innerhalb des Gradienten [Top (oben, Fraktion 1) bis Bottom (unten, Fraktion 9)] und die Position der Lipid Rafts bzw. Caveolae („Rafts“) sind angegeben.

Ein Vergleich der Cholesterinkonzentration in den Fraktionen des oben beschriebenen Optiprep®-Gradienten von CHO Anx VI-Zellen zeigte eine Calciumabhängigkeit der Cholesterinverteilung in Lipid Rafts/Caveolae-Fraktionen (vgl. Abb. 14). Mit steigender Konzentration an Calcium kam es in den Fraktionen von Lipid Rafts/Caveolae zu einer Abnahme der Cholesterinkonzentration. In den bodennahen Fraktionen sieben bis zehn des Gradienten hatten erhöhte Calcium-Konzentrationen lediglich geringe Auswirkungen auf die Cholesterinkonzentration. In den Fraktionen vier und fünf des Gradienten, in denen sich bisher nicht identifizierte intrazelluläre Strukturen wiederfinden, kam es

wie im Bereich von Lipid Rafts/Caveolae mit zunehmender Calcium-Konzentration zu einem Anstieg der Cholesterin-Konzentration.

Mit wachsender Calcium-Konzentration zeigten sich ebenfalls inkubationsbedingte Veränderungen in der Konzentration von Phospholipiden in den Fraktionen des oben beschriebenen Gradienten (vgl. Abb. 14). Dabei scheint eine Erhöhung der Calcium-Konzentration mit einer Verringerung der Konzentration an Phospholipiden in Lipid Rafts/Caveolae einherzugehen. In den bodennahen Bereichen des Gradienten führte eine Calcium-Inkubation (Ausnahme: 50 µM Ca^{2+}-Inkubation) zu einem deutlichen Anstieg der Phospholipid-Konzentration.

3.3.2 Calcium-induzierte Translokation von Annexin VI in Lipid Rafts/Caveolae in CHO Anx II-Zellen

In einer zweiten Versuchsreihe wurden CHO Anx II-Zellen unter gleichen Bedingungen wie CHO Anx VI-Zellen des vorhergehenden Experiments (vgl. Kap. 3.3.1) kultiviert und während der anschließenden Präparation ebenfalls variierenden Calcium-Konzentrationen ausgesetzt. Abbildung 15 zeigt einen repräsentativen Western Blot dieser Experimente.

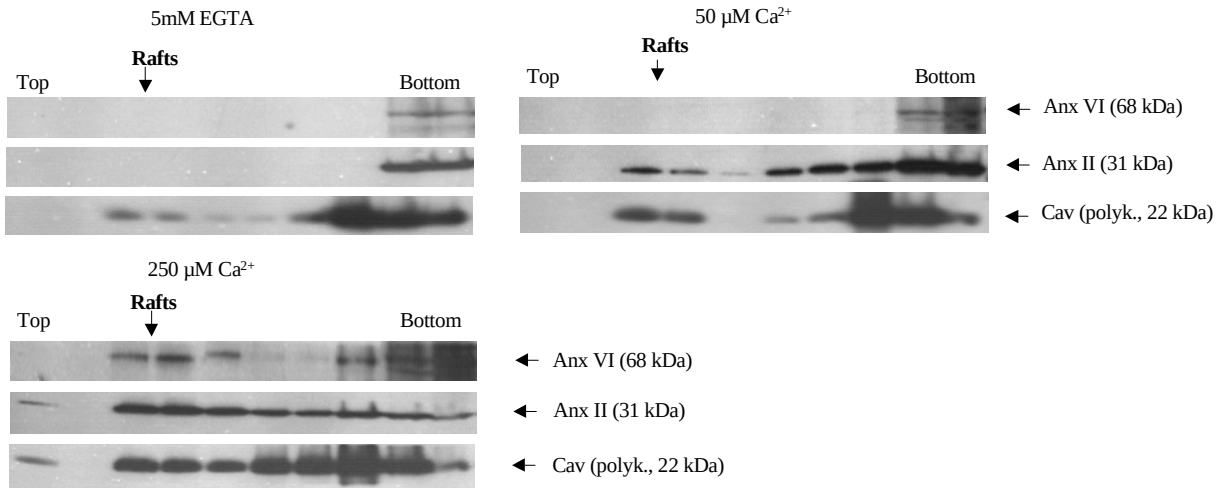


Abb. 15 : Calciumabhängige Verteilung von Annexinen in Lipid Rafts/Caveolae von CHO Anx II-Zellen
1 x 10^6 CHO Anx VI-Zellen wurden entsprechend der Kapitel 2.2.5.1 beschriebenen Methode ausplattiert und während der anschließenden Präparation variierenden Bedingungen (5 mM EGTA – 250 µM Ca^{2+}) ausgesetzt. 100 µl Aliquots jeder Fraktion wurden auf einem 12% SDS-Page aufgetrennt, mit Hilfe der Western Blot-Methode analysiert und über das ECL-System detektiert. Die relative Position der Fraktionen im Optiprep-Gradienten [Top (oben, Fraktion 1) bis Bottom (unten, Fraktion 9)], die Position der Lipid Rafts/Caveolae („Rafts“) und die detektierten Proteine sind angegeben.

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der Western Blot-Analyse von CHO Anx II-Zellen. Die CHO Anx II-Zellen, die während der Präparation mit 5 mM EGTA inkubiert wurden, ergaben gegenüber gleich inkubierten CHO Anx VI-Zellen des vorherigen Experiments (vgl. Abb. 13) keine inkubationsbedingten Veränderungen in der Proteinverteilung von Annexin VI, Annexin II und Caveolin. Annexin VI und Annexin II waren in hoher Konzentration in den bodennahen Fraktionen, Caveolin sowohl im Bereich der Lipid Rafts/Caveolae als auch in den Fraktionen sechs bis neun nachzuweisen. Bei einer Inkubation mit 50 µM Ca^{2+} waren im Gegensatz zu CHO Anx VI-Zellen (vgl. Abb.

13) noch keine Annexin VI-Proteine im Bereich der Lipid Rafts/Caveolae bestimmbar. Annexin VI war unter diesen Inkubationsbedingungen ausschließlich am Boden des Gradienten zu finden. Im Gegensatz dazu konnte für einen Teil des Annexin II-Proteinpools aus CHO Anx II-Zellen die calciumabhängige Translokation in cholesterinreiche Lipid Rafts/Caveolae-Membranregionen bereits bei dieser niedrigen Calcium-Konzentration (50 µM) gezeigt werden. Der größte Teil des „Annexin II-Proteinpools" ließ sich jedoch in den Fraktionen 6 – 9 am Boden des Optiprep®-Gradienten nachweisen. Für die Verteilung von Caveolin zeigten sich bei dieser Calcium-Konzentration keine Veränderungen gegenüber EGTA-inkubierten CHO Anx II-Zellen.

Bei einer Konzentration von 250 µM Ca^{2+} translozierten auch Proteine aus dem Annexin VI-Proteinpool in Lipid Rafts/Caveolae-Fraktionen, jedoch in geringerem Ausmaß als Annexin II-Proteine, die bei dieser Calcium-Konzentration zum größten Teil in Lipid Rafts/Caveolae Membranregionen nachweisbar waren. In den Bodenfraktionen des Gradienten war unter diesen Bedingungen nur noch ein geringer Teil von Annexin II-Proteinen zu detektieren. Im Gegensatz dazu war der größte Teil der Annexin VI-Proteine bei einer Inkubation mit 250 µM Calcium in den Bodenfraktionen des Gradienten nachzuweisen. Das als Kontrolle detektierte Caveolin blieb durch die Calcium-Inkubationen in seiner Verteilung im Gradienten unbeeinflusst. Vergleichbare Western Blots ergaben sich ebenfalls mit CHO WT-Zellen (nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte für beide Zellreihen (CHO Anx VI-Zellen, siehe Abb. 13 und CHO Anx II-Zellen, siehe Abb. 15) gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Calcium-Konzentration zu einer deutlichen Umgestaltung der Proteinverteilung innerhalb des Gradienten führt. Annexin VI und Annexin II translozieren calciumabhängig in cholesterinreiche Membrandomänen (Lipid Rafts/Caveolae). Als Kontrolle bestimmte Caveolin-Proteine wiesen keine Calciumabhängigkeit auf. Gleichzeitig führt die Calcium-Inkubation zu einer veränderten Cholesterin- und Phospholipidkomposition in Lipid Rafts/Caveolae-Membranregionen (gezeigt in Abb. 14 für CHO Anx VI-Zellen).

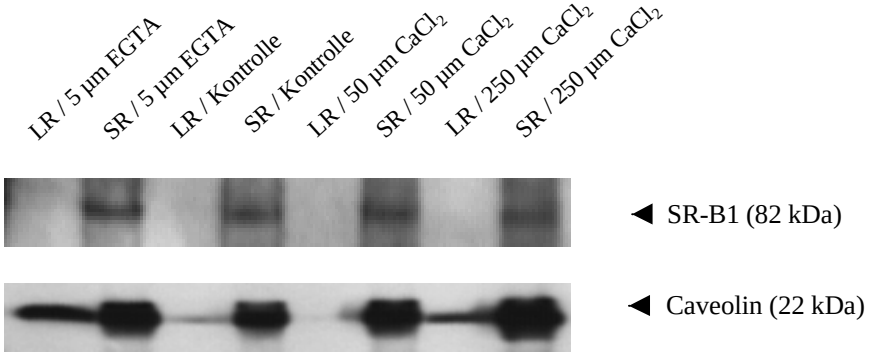
3.3.3 Einfluss von Calcium auf die intrazelluläre Verteilung von SR-BI

Mit Aliquots der Fraktionen von CHO Anx II-Zellen aus dem vorhergehenden Experiment (vgl. Kap. 3.3.2) wurde die Verteilung von SR-BI (Scavenger-Rezeptor-B1) in den Zellen analysiert. SR-BI ist, wie in Kapitel 1.2 erläutert, ein vermutlich in Caveolae lokalisierter Rezeptor (Babitt et al., 1997), der zum einen die selektive Aufnahme von Cholesterin aus High Density Lipoproteinen (HDL) in die Zelle, auf der anderen Seite wahrscheinlich den Efflux von zellulärem Cholesterin aus der Zelle vermittelt (Krieger, 1999). Bei der in Kapitel 3.2 etablierten Methode zur Lipid Rafts/Caveolae-Präparation im Optiprep®-Gradienten wird lediglich eine Subpopulation Caveolin-positiver Membranen angereichert. Grundlage für das folgende Experiment war die Frage, ob SR-BI in diesen mit Detergenz extrahierten Lipid Rafts-/Caveolae-Fraktionen nachzuweisen ist, oder ob es sich bei den extrahierten cholesterinreichen Lipid Rafts/Caveolae um Subpopulationen von Caveolae handelt, die kein SR-BI enthalten.

Für das Experiment wurden Aliquots der Fraktionen 1 bis 5 von CHO Anx II-Zellen des vorherigen Experiments (vgl. Kap. 3.3.2), in denen Lipid Rafts/Caveolae nachzuweisen waren, und Aliquots der

Fraktionen 6 bis 10 der gleichen Zelllinie mit den restlichen zellulären Membranbestandteilen (z.B. Plasmamembranen) „gepoolt“, d.h. zusammen untersucht. Die simultane Analyse mehrerer Fraktionen diente dazu, möglicherweise vorhandene schwache SR-BI-Signale in Lipid Rafts/Caveolae-Fraktionen besser detektieren zu können. Bei der Analyse von SR-BI zeigten sich lediglich in den „gepoolten“ Fraktionen 6 - 9 (in Abb. 16 „SR“) der CHO Anx II-Zellen Proteinbanden für SR-BI. Diese waren bei allen Inkubationen (5 µM EGTA, 50 µM Ca^{2+}, 250 µM Ca^{2+} und Standard-Zellkulturmedium) von CHO Anx II-Zellen gleich stark ausgeprägt und wiesen keine inkubationsbedingten Verschiebungen auf. In den „gepoolten“ Fraktionen 1 bis 5 (in Abb. 16 „LR“), d.h. im Bereich Lipid Rafts/Caveolae, konnte SR-BI nicht nachgewiesen werden.

Die Detektion von Caveolin zeigte für alle Inkubationen starke Signale in den Bodenfraktionen des Gradienten (Fraktionen 6 - 9). In den „gepoolten“ Lipid Rafts-/Caveolae-Fraktionen (Fraktionen 1 – 5) zeigte Caveolin ein starkes Signal nach einer EGTA-Inkubation der CHO Anx II-Zellen. Im Vergleich dazu ließ sich bei nicht-inkubierten CHO Anx II-Kontrollzellen lediglich ein sehr schwaches Caveolin-Signal finden. Mit 50 µM Ca^{2+} inkubierte CHO Anx II-Zellen ergaben lediglich ein sehr schwaches Signal für Caveolin, mit 250 µM Ca^{2+} dagegen ein deutlich stärkeres.



LR=Lipid Rafts/Caveolae (gepoolte Fraktionen 1 - 5)
SR= “Schwere Menbranen” (gepoolte Fraktionen 6 - 9)

Abb. 16 : Einfluss von Calcium auf die intrazelluläre SR-BI-Verteilung in CHO Anx II-Zellen
Aliquots der Fraktionen 1 bis 5 und der Fraktionen 6 bis 9 von CHO Anx II-Zellen der Lipid Rafts/Caveolae-Präparation aus Kapitel 3.3.2 wurden „gepoolt“ und zusammen auf SR-BI und Caveolin detektiert. In den „gepoolten“ Fraktionen 1 – 5 befinden sich Lipid Rafts/Caveolae, in den „gepoolten“ Fraktionen 6 – 9 die „schweren Membranen“ (restliche zelluläre Membranbestandteile z.B. Plasmamembranen oder Golgi-Apparat). 100 µl jeder Probe wurden über ein 12%-SDS-Page aufgetrennt und die Verteilung von SR-BI und Caveolin mit Hilfe der Western Blot-Analyse und ECL-Immunodetektion ermittelt (vgl. Kap. 2.2.8 und 2.2.9).

3.3.4 Expression von Annexin VI nach Calcium-Ionophor-Inkubation

In den bisherigen Lipid Rafts/Caveolae-Präparationen wurde den Versuchszellen extern Calcium angeboten, indem während der Präparation eine Inkubation mit 50 µM – 1 mM Ca^{2+} erfolgte (vgl. Kap. 3.3.1 u. 3.3.2), um die Auswirkungen auf die Proteinverteilung zu studieren. Nach Aktivierung intrazellulärer Calcium-Speicher durch Anreicheruung des Zellkulturmediums mit 10 µM Calcium-Ionophor (A 23187, Sigma) sollten in den folgenden Experimenten Veränderungen in der Verteilung von Anenxin VI und Annexin II in Abhängigkeit von der intrazellulären Calcium-Konzentration un-

tersucht werden. 1 x 10^7 CHO WT-, CHO Anx VI- und CHO Anx II-Zellen wurden auf Ø 15 cm Zellkulturschalen ausplattiert. Für einen Teil der Zellen erfolgte nach 24 Stunden eine 30-minütige Inkubation mit 10 µM Calcium-Ionophor (A 23187, Sigma), Kontrollzellen erhielten keine Zusätze zum Zellkulturmedium. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen nach der in Kapitel 2.2.5.1.2 beschriebenen Methode einer Lipid Rafts-Präparation unterzogen. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proben über 12%-SDS-PAGE und die Analyse der Proteinverteilung mittels Western Blot und ECL-System.

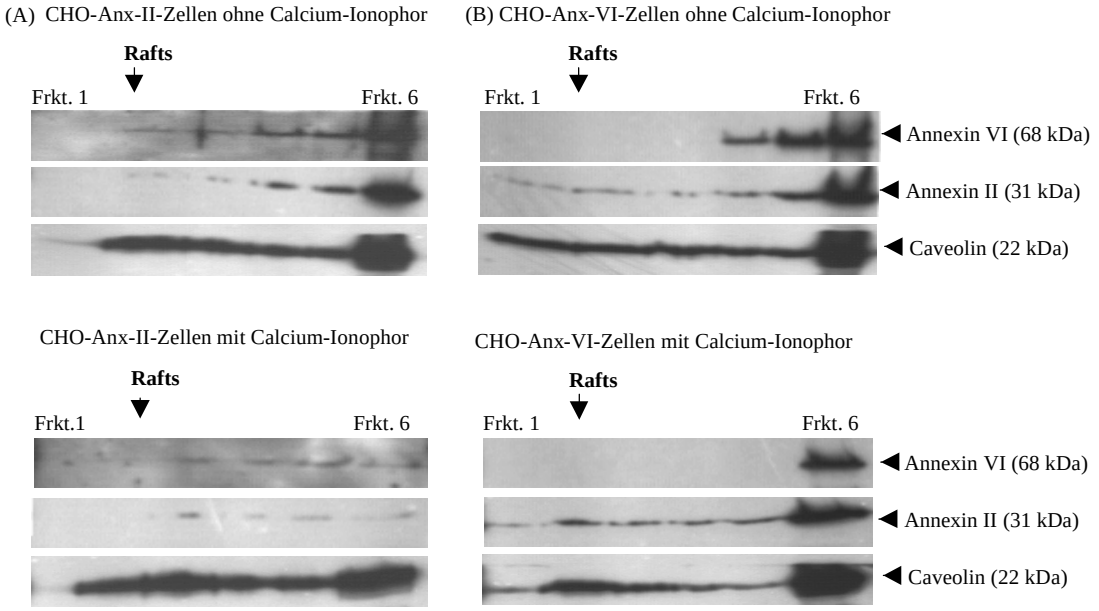


Abb. 17 : Annexin VI- und II-Verteilung in CHO Anx II- und CHO Anx VI-Zellen nach Inkubation mit Calcium-Ionophor
1 x 10^7 CHO Anx II- und CHO Anx VI-Zellen wurden nach der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Methode für 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Zellkulturmedium versehen oder ein Teil der Zellen zusätzlich mit 10 µM Calcium-Ionophor (A 23187, Sigma) für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Aufarbeitung der Zellen und Ultrazentrifugation im Optiprep®-Gradienten erfolgte nach der in Kapitel 2.2.5.1 beschriebenen Methode. 120 µl der Fraktionen 1 – 6 dienten der Auftrennung mittels 12% SDS-PAGE, Western Blot-Analyse und ECL-Detektion. Dem biotinylierten Proteingrößenmarker entsprechend sind Molekulargewichtsmarkierungen (kDa) angegeben. Die Position der Lipid Rafts/Caveolae („Rafts"), die relative Position im Gradienten (Fraktion 1 bis Fraktion 6) und die detektierten Proteine sind angegeben.

Abbildung 17 zeigt einen repräsentativen Western Blot von CHO Anx II- und CHO Anx VI-Zellen. Es wurden lediglich die oberen und mittleren Fraktionen des Gradienten (Fraktionen 1 – 6) einer Western Blot-Analyse unterzogen, da sich in diesem Bereich Lipid Rafts/Caveolae befanden und Veränderungen in der Verteilung von Annexin VI und Annexin II für diese Regionen analysiert werden sollten. Die Inkubation mit Calcium-Ionophor (10 µM) führte weder für Annexin VI noch für Annexin II zu einer Veränderung in der Verteilung der Annexin-Proteine in CHO Anx VI- oder CHO Anx II-Zellen (vgl. Abb. 17 A und B). Caveolin blieb durch eine Calcium-Ionophor-Inkubation unbeeinflusst. Vergleichbare Ergebnisse konnten für CHO WT-Zellen (nicht gezeigt) erzielt werden.
Eine weitere Western Blot-Analyse mit Aliquots für CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen mit allen Fraktionen des Lipid Rafts/Caveolae-Gradienten zeigt Abb 18. Die Analyse hatte zum Ziel, die Pro-

teinexpression auch in den Fraktionen 6 – 9 des Gradienten zu überprüfen. Auch in den Fraktionen am Boden des Gradienten war keine Abhängigkeit in der Verteilung von Annexin VI, Annexin II und Caveolin nach der Inkubation mit Calcium-Ionophor für CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen nachweisbar.

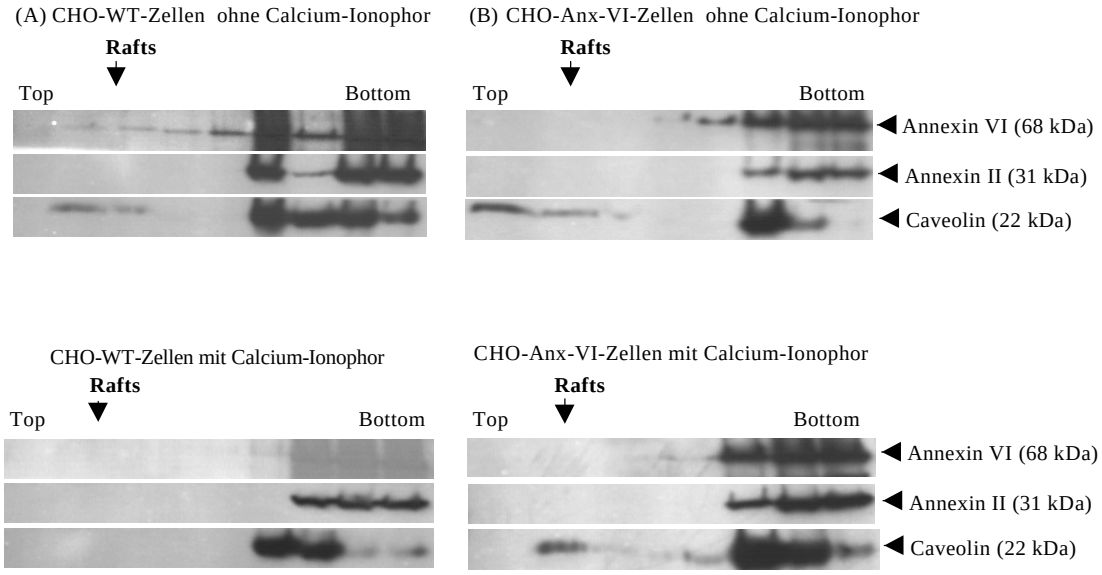


Abb. 18 : Annexin VI- und II-Verteilung in CHO Anx VI- und CHO WT-Zellen nach Inkubation mit Calcium-Ionophor
Experimentelles Vorgehen wie bei Abb. 17. Dabei wurden jedoch alle Proben der Fraktionen 1 - 9 (jeweils 100 µl) des Optiprep®-Gradienten über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Position der Lipid Rafts/Caveolae („Rafts“), die relative Position im Gradienten [Top (oben, Fraktion 1) bis Bottom (unten, Fraktion 9)] und die detektierten Proteine sind angegeben

Parallel zur Western Blot-Analyse (vgl. Abb. 18) wurde eine Bestimmung der Cholesterinverteilung in den Fraktionen des Optiprep®-Gradienten vorgenommen (vgl. Abb. 19). Alle untersuchten Zelllinien (CHO WT-, CHO Anx VI- und CHO Anx II-Zellen) zeigten in den Fraktionen von Lipid Rafts/Caveolae (Fraktionen 2 – 3), nach Inkubation mit Calcium-Ionophor und damit verbundener Ca^{2+}-Freisetzung, eine Abnahme der Cholesterinkonzentration vergleichsweise zur nicht Calcium-Ionophor inkubierten Kontrollgruppe (vgl. Abb. 19). „Schwere Membranen“ (Fraktionen 6 – 9) ließen in den Zelllinien keine systematische Entwicklung in der Cholesterinverteilung nach Calcium-Ionophor-Inkubation erkennen. In den mittleren Fraktionen des Gradienten (Fraktionen 4 und 5) ergaben sich nur geringe Unterschiede in der Cholesterin-Konzentration nach Calcium-Ionophor-Inkubation.

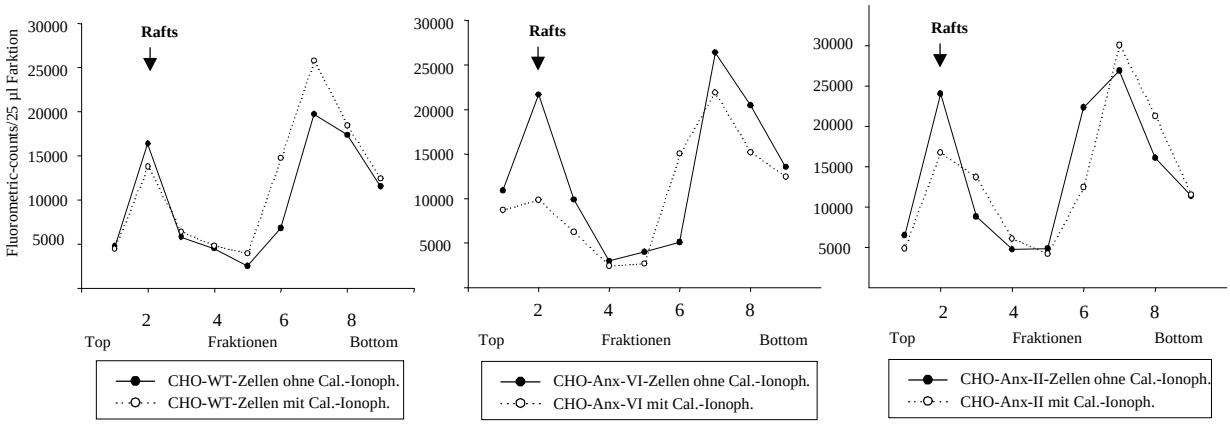


Abb. 19 : Cholesterin-Verteilung nach Inkubation mit Calcium-Ionophor in CHO WT-, CHO Anx VI- und CHO Anx II-Zellen
Mit Aliquots von 25 µl des Experimentes aus Abb. 17 u. 18 erfolgte die fluorometrische Bestimmung des Gesamtcholesterins jeder Fraktion (vgl. Kap. 2.2.6). Gesamtcholesterinkonzentration und relative Position der Fraktionen innerhalb des Gradienten [Top (Fraktion 1) bis Bottom (Fraktion 9)] sind angegeben.

Abbildung 20 zeigt den Verlauf der relativen Cholesterinkonzentration in Lipid Rafts/Caveolae (Fraktionen 1 – 3) im Vergleich mit „schweren Membranen“ (z.B. Plasmamembranen, Fraktionen 6 – 9). Die Kombination meherer Fraktionen und deren Darstellung als Anteil an der Gesamtcholesterinkonzentration in der Zelle ermöglicht es, generelle Entwicklungen in der Cholesterinverteilung nach einer Calcium-Ionophor-Inkubation zu erkennen. Die relative Darstellung der Cholesterinverteilung, bezogen auf die Gesamtcholesterinkonzentration in den Zellen, verdeutlicht, dass sich in der jeweiligen Zelllinie vor der Inkubation mit Calcium-Ionophor ca. 34 – 40% des Cholesterins in Lipid Rafts/Caveolae-Membrandomänen befanden. Nach Inkubation mit Calcium-Ionophor reduzierte sich dieser Anteil auf ca. 26 – 32% je nach betrachteter Zelllinie. In den „schweren Membranfraktionen“ (Fraktionen 6 – 9) zeigte sich nach einer Calcium-Ionophor Inkubation bei allen untersuchten Zelllinien ein Anstieg des Cholesterinanteils in diesen Bereichen des Gradienten.

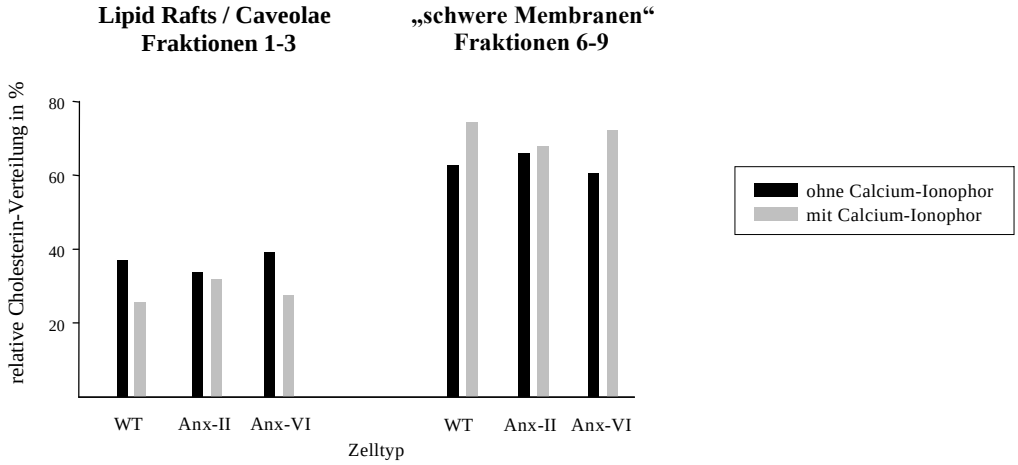


Abb. 20 : Relative Cholesterin-Verteilung in Lipid Rafts/Caveolae und „schweren Membranen“ von CHO WT-, CHO Anx VI- und CHO Anx II-Zellen
Mit den ermittelten Werten aus Abb. 19 wurde die Cholesterin-Konzentration in Lipid Rafts/Caveolae (Fraktionen 1 – 3) sowie „schweren Membranen“ (Fraktionen 6 – 9) vor und nach Calcium-Ionophor-Inkubation zusammengefaßt und auf das Gesamtcholesterin in den Zellen bezogen.

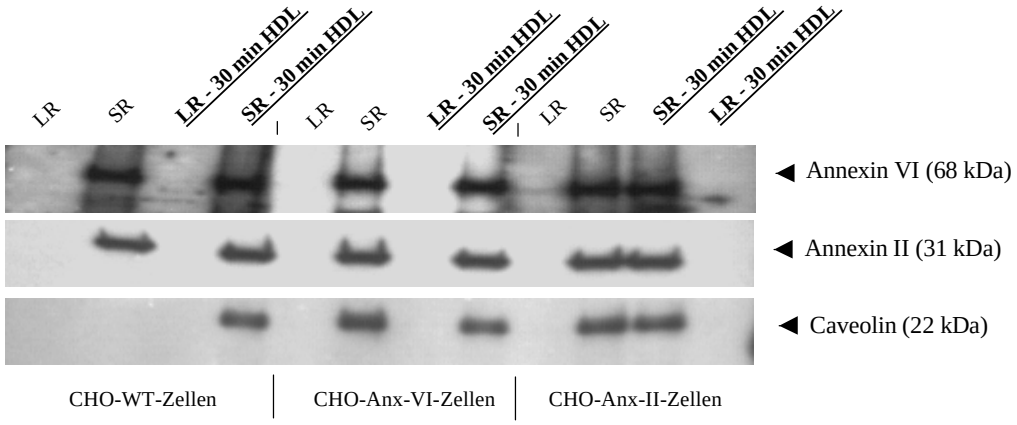
Zusammenfassend waren in der Western Blot-Analyse keine Veränderungen in der Protein- Verteilung von Annexin VI, Annexin II oder Caveolin nach Inkubation mit Calcium-Ionophor nachzuweisen. Die parallel durchgeführte Bestimmung der Cholesterinverteilung im Optiprep®-Gradienten zeigte jedoch für die Fraktionen von Lipid Rafts/Caveolae einen Rückgang der Cholesterinkonzentration nach Inkubation mit Calcium-Ionophor.

3.4 Einfluss von HDL_3 auf die Lokalisation von Annexinen und Cholesterin in Lipid Rafts/Caveolae

3.4.1 Einfluss von HDL_3 auf die Lokalisation von Annexin VI, Annexin II und Caveolin

In den Experimenten des Kapitels 3.1 wurden generelle Veränderungen des Expressionsniveaus von Annexin VI, Annexin II, Caveolin und SR-BI nach LDL-, HDL- und LPDS-Beladung untersucht. Aufgrund der Methodik war eine gesonderte Betrachtung der Protein-Verteilung in Lipid Rafts/Caveolae-Membrandomänen im Vergleich mit anderen Membransystemen nach einer Lipoprotein-Inkubation (z.B. HDL oder LDL) nicht möglich. Nach Etablierung der Methode zur Lipid Rafts-/Caveolae-Präparation in Kapitel 3.2 sollten daher in dem folgenden Experiment mögliche Veränderungen der Proteinverteilung von Annexin VI, Annexin II oder Caveolin im Anschluß an die Inkubation der Versuchszellen mit HDL_3, insbesondere in Lipid Rafts/Caveolae-Membranregionen, untersucht werden. Zum Studium der Proteinexpression nach einer HDL_3-Inkubation wurden CHO Anx VI-, CHO Anx II- und CHO WT-Zellen nach der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Methode kultiviert. Es folgte eine 30-minütige Beladung mit HDL_3-angereichertem Zellkulturmedium (100 µg/ml) mit anschließender Lipid Rafts/Caveolae-Präparation (vgl. Kap. 2.2.5.1). Abweichend von den Versuchen des Kapitels 3.1 wurde mit 30 Minuten eine vergleichweise kurze HDL_3-Inkubationsdauer gewählt, da Verschiebungen in der Verteilung der betrachteten Proteine vor allem in den ersten Minuten nach einer HDL_3-Inkubation zu erwarten waren. Aliquots der Fraktionen sind anschließend über 12%-SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot und ECL-System analysiert worden. Für die Western Blot-Analyse sind Lipid Rafts/Caveolae (Fraktionen 1–5) und „schwere Membranen“ (Fraktionen 6–9) zusammen untersucht („gepoolt“) worden. Abbildung 21 zeigt einen Western Blot des Optiprep®-Gradienten.

„Schwere Membranfraktionen“ („SR“ = zusammengefasste Fraktionen 6 – 9) waren bei allen betrachteten Zelllinien (CHO WT-, CHO Anx VI- und CHO Anx II-Zellen) durch intensive Annexin VI-Proteinbanden gekennzeichnet. Für die zusammengefassten Fraktionen 1 – 5 des Gradienten („LR“), d.h. für Fraktionen von Lipid Rafts/Caveolae, konnten keine Annexin VI-Proteine, weder bei HDL_3-inkubierten (100 µg/ml) noch bei nicht-inkubierten Zellen, nachgewiesen werden. Eine HDL_3-Inkubation hatte keinen Einfluß auf die Signalstärke. Sowohl HDL_3-inkubierte als auch nicht HDL_3-inkubierte Kontrollzellen wiesen vergleichbare Signale auf. Die Analyse von Annexin II und Caveolin zeigte eine entsprechende Proteinverteilung, vergleichbar mit Annexin VI. Auch Annexin II und Caveolin ergaben sich keine inkubationsbedingten Veränderungen in der Verteilung der Proteine. Das fehlende Caveolin-Signal für „schwere Membranen“ nicht HDL_3-inkubierter CHO WT-Zellen ist vermutlich auf einen Analysefehler zurückzuführen.



LR = Lipid Rafts ("gepoolte" Fraktionen 1 - 5)
SR = "schwere Menbranen" ("gepoolte" Fraktionen 6 - 9)

Abb. 21 : Einfluss von HDL_3 auf die Lokalisation von Annexin VI, Annexin II und Caveolin
1 x 10^7 CHO WT-, CHO Anx VI- und CHO Anx II-Zellen wurden nach der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Methode kultviert, nach 24 Stunden in PBS gewaschen und das Zellkulturmedium gegen 10%-LPDS Nährmedium (vgl. Kap. 2.2.3) ausgetauscht. Ein Teil der Zellen jeder Zelllinie wurde zusätzlich für 30 Minuten mit 100 µg/ml HDL_3-angereichertem Zellkulturmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach der in Kapitel 2.2.5.1 beschriebenen Methode aufgearbeitet. Jeweils 20 µl aus den Fraktionen 1 – 5 wurden entnommen und insgesamt 100 µl der zusammengefassten Fraktionen 1 – 5 in reduziertem Zustand mittels 12%-SDS-PAGE aufgetrennt. Ebenso wurden die „schweren Membranfraktionen" „gepoolt" (Fraktionen 6 – 9) und aufgetrennt. Die Verteilung der Proteine wurde anschließend mittels Western Blot und ECL-System analysiert (vgl. Kap. 2.2.8 – 2.2.9). Dem biotinylierten Proteingrößenmarker entsprechend sind Molekulargewichtsmarkierungen (kDa) angegeben. Die Position der Lipid Rafts/Caveolae („LR") und der „schweren Membranen" („SR") sowie die detektierten Proteine sind angegeben. Zu beachten ist die bei HDL_3-inkubierten CHO Anx II-Zellen geänderte Reihenfolge.

Zusammenfassend zeigte sich in diesem Experiment keine signifikant veränderte Lokalisation von Annexin VI, Annexin II oder Caveolin nach HDL_3-Inkubation. Weder Annexin VI, Annexin II noch Caveolin waren mit oder ohne HDL_3-Inkubation in CHO WT-, CHO Anx VI- oder CHO Anx II-Zellen in Lipid Rafts/Caveolae-Membrandomänen („LR" in der Abb.) zu detektieren.

3.4.2 Einfluss von HDL_3 auf die Verteilung von Cholesterin in Lipid Rafts/Caveolae

In diesem Experiment sollten die Auswirkungen einer sehr kurzen (5 – 15 Minuten) HDL_3-Inkubation (100 µg/ml) auf die Verteilung von Cholesterin in cholesterinreichen Membrandomänen (Lipid Rafts/Caveolae) untersucht werden. CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen wurden dazu auf Ø 15 cm Zellkulturschalen kultiviert (vgl. Kap. 2.2.1). Nach 48 Stunden Kultivierungsphase wurden die Versuchszellen über 5 – 15 Minuten mit HDL_3-angreichertem (100 µg/ml) LPDS-Zellkulturmedium inkubiert. Im Anschluß an die Präparation und Zentrifugation der Zellen im Optiprep®-Gradienten entsprechend der in Kapitel 2.2.5.1 beschriebenen Methode erfolgte die Bestimmung des Gesamt-Cholesterins in den Fraktionen 1 – 10 des Gradienten (vgl. Abb. 22) .

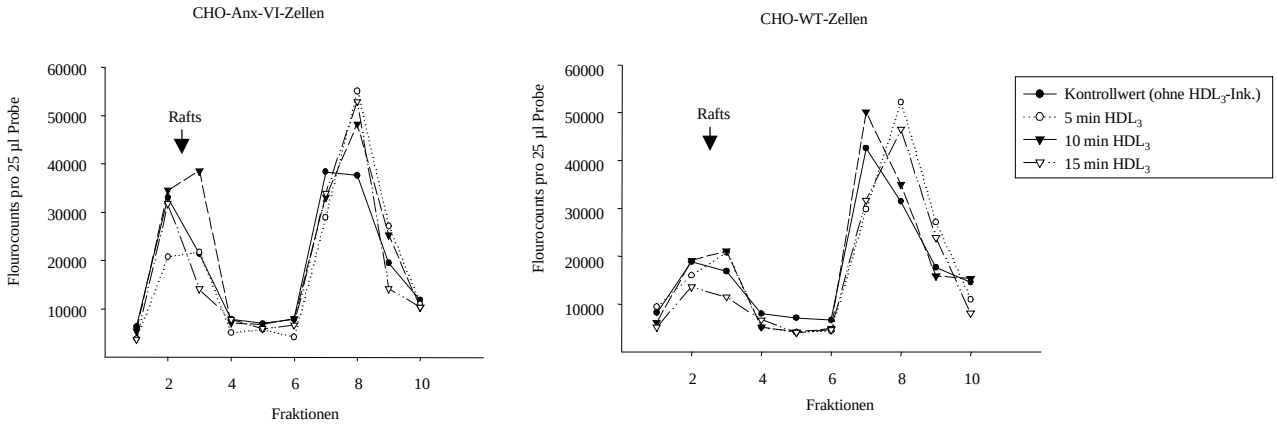


Abb. 22 : Cholesterinverteilung in CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen nach 5 –15 min HDL_3-Inkubation
1 x 10^7 CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen wurden auf Ø 15 cm Petrischalen kultiviert (vgl. Kap. 2.2.1). Nach 48 Stunden und einem PBS Waschgang erfolgte die Beladung mit HDL_3-angereichertem (100 µg/ml) 10%-LPDS-Zellkulturmedium. Nach 5-, 10- und 15- minütiger HDL_3-Inkubation wurde das Versuchsmedium verworfen, die Zellen in PBS gewaschen und im Optiprep®-Gradienten durch Ultrazentrifugation aufgetrennt (vgl. Kap. 2.2.5.1). Aliquots von 25 µl pro Fraktion dienten der fluorometrischen Bestimmung des Gesamtcholesterins (vgl. Kap. 2.2.6) in den Fraktionen. Die erwartete Position von Lipid Rafts/Caveolae liegt zwischen den Fraktionen 2 und 3 ("Rafts"). Die abgebildeten Cholesterin-Meßwerte ergeben sich als Mittelwerte von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Die in Abbildung 22 dargestellten Ergebnisse zeigten keine signifikante Veränderung der Cholesterin-Verteilung nach 5 – 15 minütiger HDL_3-Inkubation von CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen. CHO Anx VI-Zellen wiesen jedoch in den Fraktionen von Lipid Rafts/Caveolae (Fraktionen 2 - 3) höhere absolute Cholesterin-Konzentrationen auf als CHO WT-Zellen. Zum tieferen Verständnis wurden die absoluten Cholesterinwerte ergänzt durch eine relative prozentuale, auf die Gesamtcholesterin-Konzentration bezogene Darstellung (vgl. Abb. 23). Damit ergaben sich jedoch keine signifikanten Veränderungen in der Cholesterinverteilung für die 5 – 15 minütige HDL_3-Inkubation. Dennoch zeichneten sich auch hier CHO Anx VI-Zellen im Vergleich mit CHO WT-Zellen durch einen höheren prozentualen Cholesteringehalt im Bereich von Lipid Rafts-/Caveolae-Membranregionen aus.

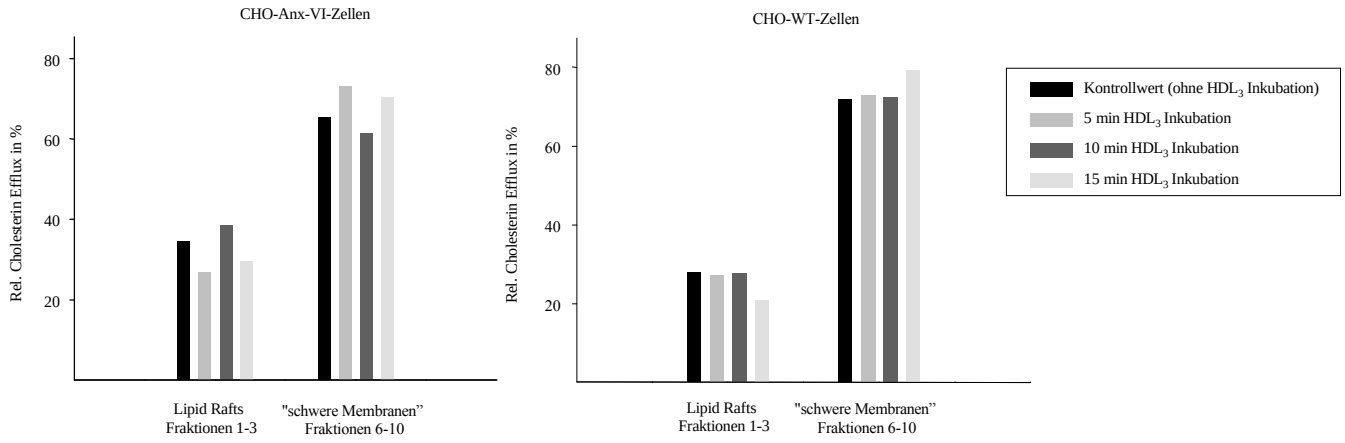


Abb. 23 : Relative Cholesterinverteilung nach 5 – 15-minütiger HDL_3-Inkubation
Die Cholesterin-Messwerte der Fraktionen 1 – 3 (Bereich der Lipid Rafts/Caveolae im Gradienten) und der Fraktionen 6 – 10 des obigen Optiprep®-Gradienten wurden zusammengefasst und als relative Cholesterin-Konzentration, bezogen auf die Gesamt-Cholesterin-Konzentration, dargestellt.

3.5 Einfluss von LDL auf die Cholesterinverteilung in Lipid Rafts/Caveolae

Dieses Experiment sollte klären, ob und gegebenenfalls wie sich die Cholesterinverteilung von Lipid Rafts/Caveolae im Vergleich mit den übrigen Membransystemen nach mehrtägiger LDL-Inkubation entwickelt. 5 x 10^5 CHO WT-, CHO Anx II- und CHO Anx VI-Zellen wurden dazu auf Ø 10 cm Petrischalen ausplattiert und nach der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Methode kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium verworfen, die Versuchszellen in PBS gewaschen und anschließend mit LDL-angereichertem (80 µg/ml) LPDS-Zellkulturmedium inkubiert. Nach 72-stündiger LDL-Inkubation wurden die Zellen entsprechend der in Kapitel 2.2.5.1 beschriebenen Methode aufgearbeitet und in einem Optiprep®-Gradienten durch Ultrazentrifugation aufgetrennt. Abbildung 24 zeigt die Cholesterinverteilung in den Zellen ohne und mit LDL-Inkubation über 72 Stunden.

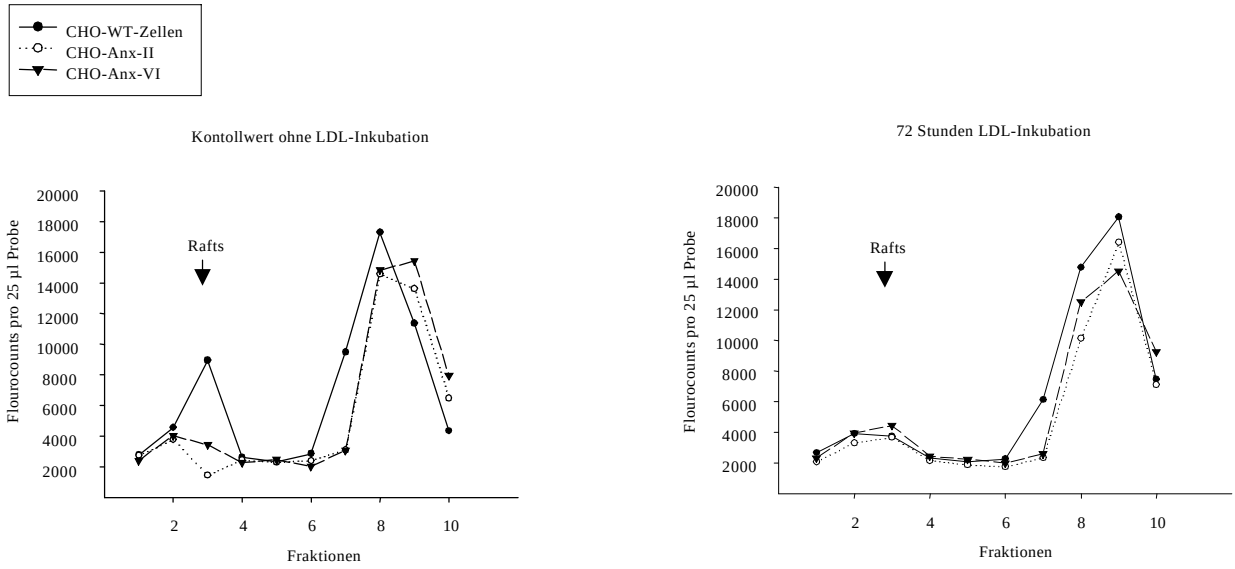


Abb. 24 **:** LDL-Einfluss auf die Cholesterinverteilung in CHO WT-, CHO Anx VI- und CHO Anx II-Zellen
5 x 10^5 CHO WT-, CHO Anx II- und CHO Anx VI-Zellen wurden auf Ø 10 cm Petrischalen ausplattiert und kultiviert (vgl. Kap. 2.2.1). Nach 24 Stunden wurden die Versuchszellen in PBS gewaschen und anschließend mit LDL-angereichertem (80 µg/ml) LPDS-Zellkulturmedium (vgl. Kap. 2.2.3) inkubiert. Nach 72-stündiger LDL-Inkubation wurden die Zellen aufgearbeitet und im Optiprep®-Gradienten durch Ultrazentrifugation aufgetrennt (vgl. Kap. 2.2.5.1). Eine nicht mit LDL inkubierte Zellgruppe diente als Kontrolle. Aliquots von 25 µl pro Fraktion dienten der fluorometrischen Bestimmung des Gesamtcholesterins (vgl. Kap. 2.2.6) in den Fraktionen. Die erwartete Position der Lipid Rafts/Caveolae ist durch eine Pfeilmarkierung gekennzeichnet („Rafts“). Die abgebildeten Cholesterin-Meßwerte ergeben sich als Mittelwerte von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Die Cholesterinverteilung ohne LDL-Inkubation (Abb. 24) wurde als Kontrollwert für alle Zellen nach 24 Stunden Zellwachstum ermittelt. In den oberen Fraktionen (Fraktionen 1 – 3) des Gradienten, in denen Lipid Rafts/Caveolae zu erwarten sind, zeigte sich bei den untersuchten Zelllinien eine geringfügig höhere Cholesterinkonzentration gegenüber den mittleren Fraktionen 4 und 5. Dem Cholesterin-Wert in Fraktion 3 von CHO WT-Zellen liegt vermutlich ein Meßfehler zugrunde, da dieser mit ca. 9000 Flourocounts pro 25 µl Probe bedeutend höher lag als alle übrigen Messwerte im Bereich von Lipid Rafts/Caveolae. Ein derart hoher Messwert in nur einer Fraktion ohne gleichzeitig

deutlich erhöhte Messwerte in den übrigen Fraktionen dieser Zelllinie ist ansonsten nicht zu erklären (vgl. Abb. 24). In den mittleren Fraktionen (Fraktionen 4 - 6) sind bei allen untersuchten Zelllinien etwa gleich hohe Cholesterinkonzentrationen ermittelt worden, diese waren jedoch geringer als für Lipid Rafts/Caveolae (Fraktionen 1 – 3). In den bodennahen Fraktionen des Gradienten (Fraktionen 7 – 10) konnte eine sehr starke Anreicherung mit Cholesterin vergleichsweise zu den übrigen Fraktionen bei allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Im Vergleich der einzelnen Zelllinien untereinander waren keine signifikanten Differenzen in der Cholesterinverteilung festzustellen.

Nach 72-stündiger LDL-Inkubation war keine signifikante Erhöhung der LDL-Cholesterinkonzentration für Lipid Rafts/Caveolae festzustellen (vgl. Abb. 24). Die Cholesterinverteilung in diesem Bereich des Gradienten wies zudem nur sehr geringe Differenzen unter den einzelnen Zelllinien auf. In den bodennahen Fraktionen (7 – 10) konnten, wie bereits für die Kontrollzellen ermittelt, sehr hohe Cholesterin-Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Differenzen in der Cholesterinverteilung der einzelnen Zelllinien waren vergleichsweise auch in diesem Bereich des Gradienten nicht signifikant. Parallel ermittelte Daten für eine 24- und 48-stündige LDL-Inkubation zeigten keine interpretationswürdigen Ergebnisse (nicht gezeigt).

Abbildung 25 zeigt ergänzend eine relative Darstellung der Cholesterinkonzentration in Lipid Rafts/Caveolae (Fraktionen 1 – 3) vor und nach LDL-Inkubation im Vergleich mit „schweren Membranen“ (Fraktionen 6 – 10), um möglicherweise eingetretene inkubationsbedingte Verschiebungen der Cholesterinverteilung übersichtlicher darstellen zu können. Darüberhinaus sind Ergebnisse einer 24-stündigen LDL-Inkubation mitangegeben.

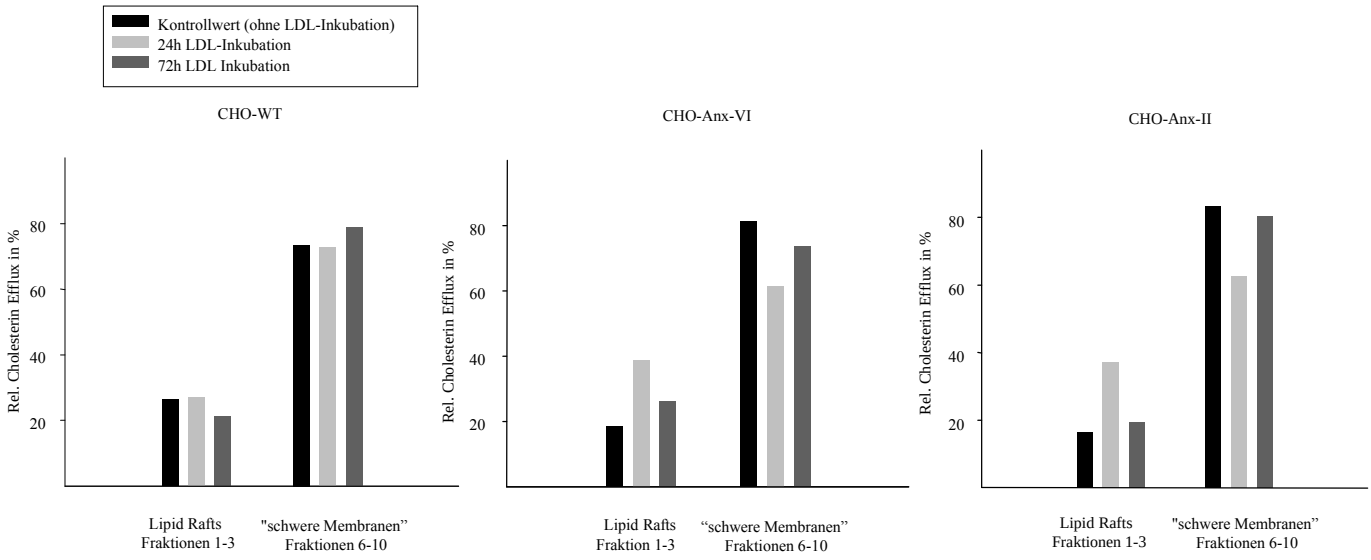


Abb. 25 : Relative Cholesterinverteilung nach LDL-Inkubation
Die Cholesterinmesswerte der Fraktionen 1 – 3 (Bereich von Lipid Rafts/Caveolae) jeder Zelllinie des in Abb. 24 gezeigten Optiprep®-Gradienten wurden addiert und als relative Cholesterin-Konzentration, bezogen auf die Gesamt-Cholesterin-Konzentration, dargestellt. Die Messwerte der Fraktionen 6 – 10 („schwere Membranen“) wurden ebenfalls als relative Cholesterin-Konzentrationen dargestellt. Zusätzlich sind Messwerte für eine 24-stündige LDL-Inkubation aufgetragen.

Die relative Darstellung ergibt bei CHO WT-Zellen für Lipid Rafts/Caveolae keine sigifikanten, auf eine LDL-Inkubation zurückzuführenden, Verschiebungen der Cholesterinverteilung. Bei CHO Anx

VI- und CHO Anx II-Zellen ist nach 24-sündiger LDL-Inkubation ein deutlicher Anstieg der Cholesterinkonzentration im Bereich Lipid Rafts/Caveolae festzustellen. Nach 72-stündiger LDL-Inkubation war keine signifikante Veränderung der Cholesterinkonzentration im Vergleich zum Kontrollwert nachzuweisen. Eine zusätzlich durchgeführte Western Blot-Analyse mit den Fraktionen des obigen Experimentes erbrachte keine interpretationswürdigen Ergebnisse für Annexin VI, Annexin II und Caveolin (nicht gezeigt).

3.6 Cholesterinverteilung in Lipid Rafts/Caveolae nach HDL_3-induziertem Cholesterin-Efflux

In diesem Experiment sind zunächt CHO WT-, CHO Anx VI- und CHO Anx II-Zellen mit LDL-Cholesterin beladen worden. Anschließend wurde der Cholesterin-Efflux durch HDL_3-Inkubation induziert. Die Veränderungen der Cholesterinverteilung in den Zellen sind nach Ultrazentrifugation im Optiprep®-Gradienten und anschließender Cholesterinbestimmung in den Fraktionen des Gradienten ermittelt worden. Für die Versuche wurden 1 x 10^7 Zellen auf Ø 15cm Petrischalen ausplattiert und über 24 Stunden nach der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Methode kultiviert. Anschließend sind die Zellen in PBS gewaschen und mit LDL-angereichertem (50 µg/ml) 10%-LPDS-Zellkulturmedium (vgl. Kap. 2.2.3) über Nacht inkubiert worden. Am nächsten Tag wurde der Cholesterin-Efflux in den Zellen durch Inkubation mit HDL_3-angereichertem Zellkulturmedium (100 µg/ml) über 3-, 6-, 9- und 24-Stunden induziert. Im Anschluß erfolgte die Präparation von Lipid Rafts/Caveolae mittels Ultrazentrifugation im Optiprep®-Gradienten (vgl. Kap. 2.2.5.1) und die fluorometrische Bestimmung des Cholesterins in den Fraktionen des Gradienten jeder Zelllinie (vgl. Kap. 2.2.6). Abbildung 26 zeigt einen Vergleich der Cholesterin-Verteilung der drei Zelllinien nach 3 bis 24-stündiger HDL_3-Inkubation.

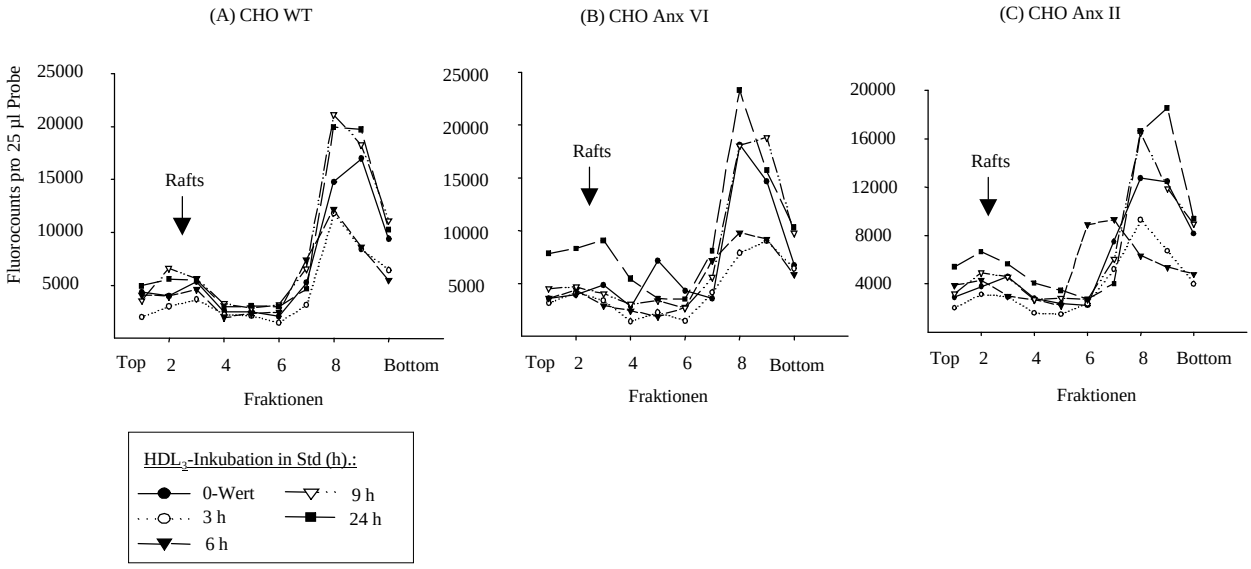


Abb. 26 : Cholesterinverteilung in Lipid Rafts/Caveolae nach HDL_3-induziertem Cholesterin-Efflux
1 x 10^7 CHO WT-, CHO Anx VI- und CHO Anx II-Zellen wurden auf Ø 15 cm Petrischalen ausplattiert und für 24 Stunden kultiviert (vgl. Kap. 2.2.1) sowie anschließend mit LDL-angereichertem (50 µg/ml) 10%-LPDS-Zellkulturmedium über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die 3-, 6-, 9- oder 24-stündige Inkubation der Zellen mit HDL_3-angereichertem (100 µg/ml) LPDS-Zellkulturmedium. Anschließend wurden die Zellen nach der in Kapitel 2.2.5.1 beschriebenen Methode aufgearbeitet (vgl. Kap.

2.2.5.1). Aliquots von 25 µl pro Fraktion dienten der fluorometrischen Bestimmung des Gesamtcholesterins (vgl. Kap. 2.2.6) in den Fraktionen. Die erwartete Position der Lipid Rafts/Caveolae ist durch Pfeilmarkierung gekennzeichnet („Rafts“). Die abgebildeten Cholesterin-Meßwerte ergeben sich als Mittelwerte von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Aus den inkubationsbedingten Veränderungen der Cholesterinverteilung in den Fraktionen der einzelnen Zelllinien lassen nur schwer generelle Aussagen ableiten. Ein Vergleich der Kontrollwerte (Cholesterin-Verteilung ohne HDL_3-Inkubation) mit der Cholesterin-Verteilung nach 24 Stunden HDL-Beladung ergab für sämtliche untersuchten Zelllinien mit HDL-Beladung im Bereich von Lipid Rafts/Caveolae eine vergleichsweise höhere Cholesterinkonzentration. Für die übrigen HDL_3-Inkubationen sind keine eindeutigen Aussagen zur Cholesterinverteilung in Lipid Rafts/Caveolae-Fraktionen zu treffen. In den Fraktionen mit „schweren Membranen“ im Gradienten (Fraktionen 6 – 9) waren aufgrund der sehr variierenden Cholesterin-Meßwerte ebenfalls keine signifikanten, auf die Inkubation zurückzuführenden, Veränderungen der Cholesterinverteilung abzuleiten.

Abbildung 27 zeigt aufbereitete Daten aus dem oben beschriebenen Optiprep®-Gradienten. Diese Darstellung veranschaulicht nochmals, dass durch LDL-Beladung der Zellen und anschließende Induktion des Cholesterin-Efflux mit HDL_3 keine signifikanten Veränderungen der Verteilung von Cholesterin in Lipid Rafts/Caveolae im Gradienten nachweisbar sind. Die Fraktionen von Lipid Rafts/Caveolae (Fraktionen 1 – 3), denen das besondere Interesse galt, zeigten vor allem für die 3-, 6- und 9-stündige HDL_3-Inkubation variierende prozentuale Cholesterin-Meßwerte. Eine eindeutige Abhängigkeit von der Dauer der HDL_3-Inkubation und von der jeweiligen Zelllinie war hieraus kaum abzuleiten.

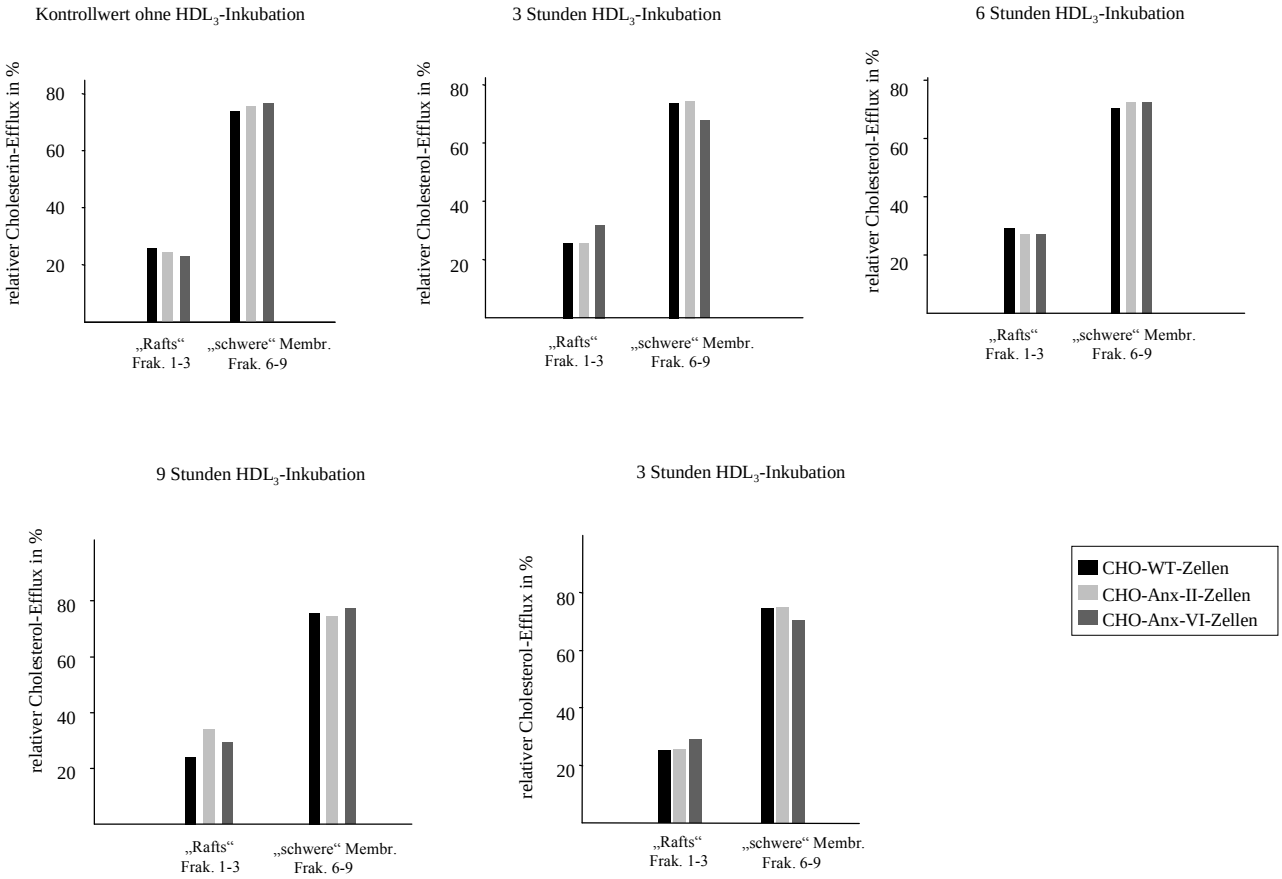


Abb. 27 : Relative Cholesterinverteilung nach HDL_3-Inkubation
Die Cholesterinmesswerte der Fraktionen 1 – 3 (Bereich Lipid Rafts/Caveolae) des in Abb. 26 gezeigten Optiprep®-Gradienten wurden addiert und als relative Cholesterin-Konzentration, bezogen auf die Gesamt-Cholesterin-Konzentration, dargestellt („Rafts“). Die Messwerte der Fraktionen 6 – 10 („schwere Membranen“) wurden ebenfalls als relative Cholesterinkonzentration auf die Gesamt-Cholesterin-konzentration bezogen dargestellt.

3.7 Digitonin-abhängige Annexin-Verteilung in Triton X-100 unlöslichen Membranen

In einem weiteren Versuchsansatz sollte der Einfluß einer Digitonin-Inkubation auf die Verteilung von Annexin VI und Annexin II *in vivo* in Lipid Rafts/Caveolae charakterisiert werden. Digitonin ist ein Cholesterin-sequestrierendes Detergenz, dass die Cholesterin-Konzentration in Membranen reduziert. Zu diesem Zweck erfolgte die Kultivierung von CHO Anx VI-Zellen auf Ø 15 cm Zellkulturschalen. Am nächsten Tag wurden die Versuchszellen mit 0,5 µg/ml Digitonin angereichertem Nährmedium inkubiert. Die Inkubation zeigte keinen Einfluß auf das Zellwachstum. Nach 24 Stunden wurden die Zellen entsprechend der in Kapitel 2.2.5.1 beschriebenen Methode zur Lipid Rafts/Caveolae-Präparation im Optiprep®-Gradienten aufgearbeitet, mit 12%-igem SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot und ECL-System analysiert. Abb 28 zeigt einen repräsentativen Western Blot Digitonin-inkubierter (0,5 µg/ml) CHO Anx VI-Zellen und nicht inkubierter Kontrollzellen.

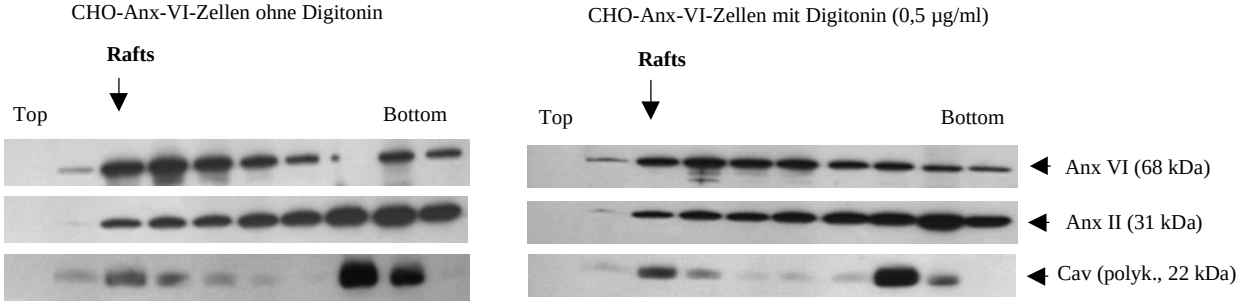


Abb. 28 : Verteilung von Annexinen in Lipid Rafts/Caveolae nach Digitonin-Inkubation
1 x 10^6 CHO Anx VI-Zellen wurden 24 Stunden kultiviert (vgl. Kap. 2.2.1) und anschließend mit 0,5 µg/ml Digitonin (Fluka Chemie) angereichertem Zellkulturmedium über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach der in Kapitel 2.2.5.1 beschriebenen Methode im Optiprep®-Gradienten durch Ultrazentrifugation aufgetrennt. Jeweils 40 µg Zellprotein wurden auf ein 12% Polyacrylamidgel aufgetragen, mit Hilfe der Western Blot-Methode analysiert und über ein ECL-System detektiert. Dem biotinylierten Proteingrößenmarker entsprechend sind Molekulargewichtsmarkierungen (kDa) angegeben. Die Antiköperinkubation erfolgte mit anti-Annexin VI, anti-Annexin II und anti-Caveolin-(polyklonal)-Antikörpern. Die erwartete Position von Lipid Rafts/Caveolae ist durch eine Pfeilmarkierung gekennzeichnet („Rafts“).

Die Proteinbande für Annexin VI von nicht inkubierten CHO Anx VI-Zellen war gekennzeichnet durch ein verstärktes Signal in den Fraktionen 3, 4, 5 und 6. Das Signal für diesen Bereich im Gradienten erscheint erheblich stärker ausgeprägt vergleichsweise zu bisher untersuchten nicht inkubierten CHO Anx VI-Zellen. Die Fraktionen am Boden des Gradienten zeigten ebenfalls eine Anreicherung mit Annexin VI-Proteinen (die Annexin VI-Proteinbande der Fraktion 8 wurde vermutlich fehlerhaft detektiert). Die Annexin II-Proteinbande der nicht inkubierten CHO Anx VI-Zellen war wie erwartet intensiv für die „schweren Membranen“ (Fraktion 6 - 10) und wies auch eine Anreicherung

mit Annexin II-Proteinen im Bereich von Lipid Rafts/Caveolae auf. Die Caveolin-Kontrollbande kennzeichnete im Bereich der Fraktionen von Lipid Rafts/Caveolae (2 - 3) die erwartete Anreicherung für das Protein. Nach Inkubation von CHO Anx VI-Zellen mit Digitonin (0,5 µg/ml) kam es weder für Annexin VI noch für Annexin II zu einer signifikanten Veränderung in der Proteinverteilung.

Eine parallel durchgeführte Analyse der Cholesterin-Verteilung in den Fraktionen 1 – 6 (vgl. Abb. 29) lieferte keinen Hinweis auf eine signifikante Veränderung nach einer Inkubation mit Digitonin (0,5 µg/ml). Die Kontrollzellen wiesen im Vergleich mit Digitonin inkubierten CHO Anx VI-Zellen keine signifikant veränderten Cholesterinwerte in den jeweiligen Fraktionen auf. Somit scheint die *in vivo* Inkubation mit Digitonin keine Reduzierung der Cholesterinkonzentration in Lipid Rafts/Caveolae zu bewirken.

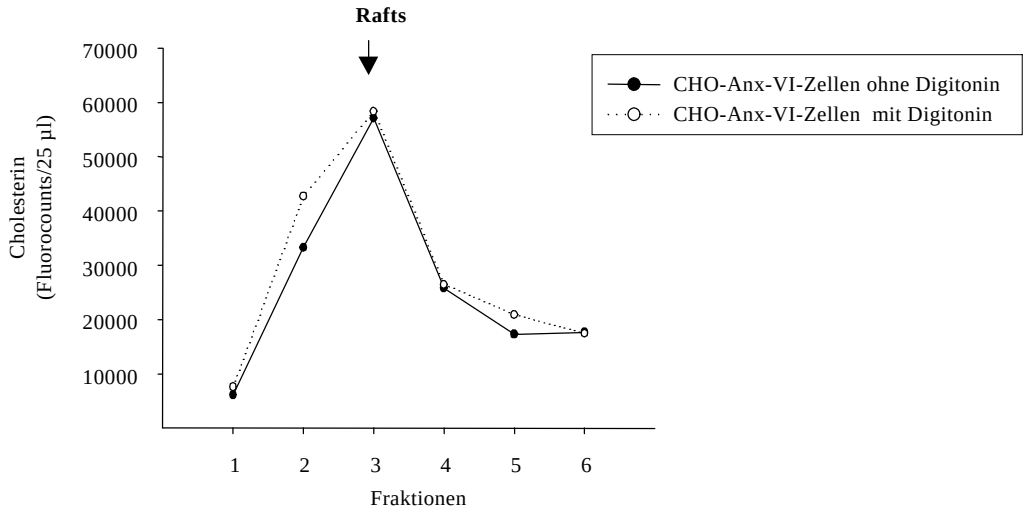


Abb. 29 **:** Cholesterin-Verteilung in den Fraktionen 1 – 6 ohne und nach Digitonin-Inkubation
Cholesterin-Verteilung in den Fraktionen 1 – 6 der obigen Lipid Rafts/Caveolae-Präparation ohne und mit Digitonin-Inkubation (0,5 µg/ml). Aliquots von 25 µl pro Fraktion dienten der fluorometrischen Bestimmung des Gesamtcholesterins (vgl. Kap. 2.2.6). Die erwartete Position von Lipid Rafts bzw. Caveolae liegt zwischen den Fraktionen 2 und 3 (Pfeilmarkierung „Rafts“).

3.8 Triton X-100-Solubilisation

3.8.1 Nachweis von Annexin VI in Triton X-100 unlöslichen Membranen von CHO Anx VI- und CHO WT-Zellen

In dieser Versuchsreihe sollte die calciumabhängige Lokalisation von Annexinen in Lipid Rafts/Caveolae sowie deren cholesterinabhängige Verteilung mit einer alternativen und unabhängigen Methode überprüft werden. Zum Vergleich mit den in der Optiprep®-Dichtegradientenzentrifugation gewonnen Ergebnissen wurde die Methode der Triton X-100-Solubilisation etabliert (Brown and Rose, 1992; Mendez et al., 2001). Für die Experimente wurden 1 x 10^6 CHO Anx VI-Zellen auf Ø 15cm Petrischalen ausplattiert (vgl. Kap. 2.2.1) und über Nacht mit Digitonin (0,5 µg/ml) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nach der in Kapitel 2.2.5.2 beschriebenen Methode in Triton X-100-haltigem MES-Puffer mit einem

Douncer aufgearbeitet. Die lysierten Zellen wurden 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Triton X-100-unlösliche Pellet in Triton X-100-haltigem Hepes-Puffer resuspendiert. Parallel dazu wurden nicht inkubierte CHO Anx VI-Zellen während der Aufarbeitung in MES-haltigem Puffer mit Ca^{2+} (50 µM) oder EDTA (5mM) inkubiert, zentrifugiert und das Pellet in Hepes-Puffer resuspendiert (vgl. Kap. 2.2.5.2). Jeweils 50 µg Zellprotein der Pellets (P) und Überstände (Ü) der nicht inkubierten Kontrollzellen, der Calcium- und der EDTA-inkubierten Zellen sowie 30 µg Zellprotein der Pellets (P) und Überstände (Ü) der Digitonin-inkubierten Zellen wurden in reduziertem Zustand auf ein 12% Polyacrylamidgel aufgetragen, mit Hilfe der Western Blot-Methode analysiert und über ein ECL-System detektiert. Abbildung 30 zeigt eine repräsentativen Western Blot von CHO Anx VI-Zellen aus dieser Versuchsreihe.

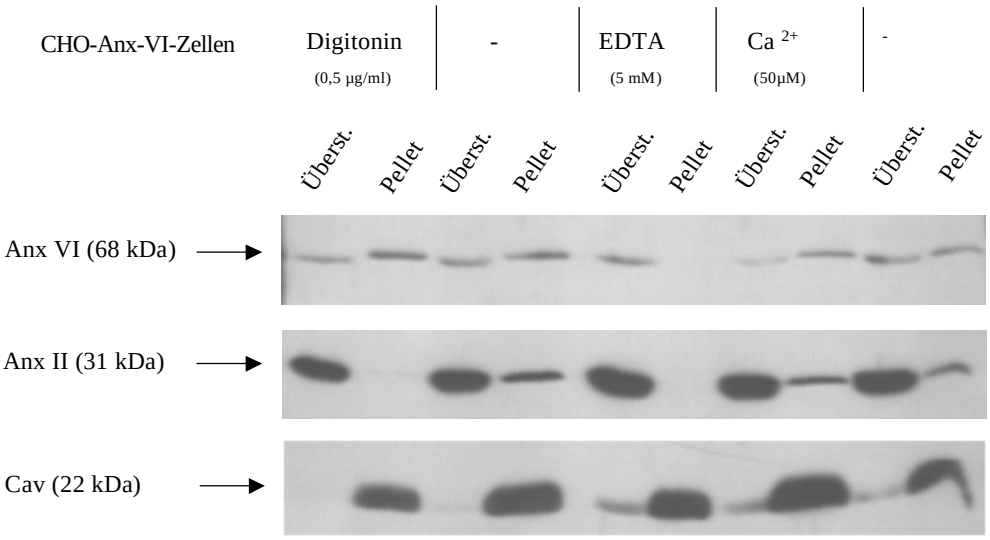


Abb. 30 **:** Calcium- und cholesterinabhängige Lokalisation von Annexinen in Triton X-100 unlöslichen Membranen von CHO Anx VI-Zellen
1 x 10^6 CHO Anx VI-Zellen wurden auf Ø 15cm Petrischalen ausplattiert und über Nacht mit Digitonin (0,5 µg/ml) inkubiert (vgl. Kap. 2.2.1). Nachfolgend wurden die Zellen mit dem in Kapitel 2.2.5.2 beschriebenen Verfahren mit PBS gewaschen und in Triton X-100-haltigem MES-Puffer mit einem Douncer aufgearbeitet (Brown and Rose, 1992; Mendez et al., 2001). Die lysierten Zellen wurden 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Triton X-100 unlösliche Pellet in Triton X-100-haltigem Hepes-Puffer resuspendiert (vgl. Kap. 2.2.5.2). Parallel aufgearbeitete, unbehandelte CHO Anx VI-Zellen wurden während der Aufarbeitung in MES-haltigem Puffer zusätzlich mit Ca^{2+} (50 µM) oder EDTA (5mM) inkubiert, zentrifugiert und das Pellet in Hepes-Puffer resuspendiert (vgl. Kap. 2.2.5.2). Die Inkubation mit Digtonin (0,5 µg/ml) führte zu keiner Veränderung des Zellwachstums.
Jeweils 50 µg Zellprotein der Pellets (P) und Überstände (Ü) der Kontrollzellen, der Calcium- und der EDTA-inkubierten Zellen sowie 30 µg Zellprotein der Pellets (P) und Überstände (Ü) der Digitonin-inkubierten Zellen wurden auf ein 12% Polyacrylamidgel aufgetragen, mit Hilfe der Western Blot-Methode analysiert und über ein ECL-System detektiert. Dem biotinylierten Proteingrößenmarker entsprechend sind Molekulargewichtsmarkierungen (kDa) angegeben. Die Antikörperinkubation erfolgte mit anti-Annexin VI, anti-Annexin II und anti-Caveolin (polyklonal) Antikörpern.

In nicht inkubierten CHO Anx VI-Zellen der Versuchsreihe konnten sowohl Annexin VI als auch Annexin II in Triton X-100 unlöslichen Membranabschnitten, d.h. im Bereich von Lipid Rafts und Caveolae, nachgewiesen werden („Pellet“, vgl. Abb. 30). Ebenso waren beide Proteine im Überstand, den Triton X-100 löslichen Membranabschnitten, zu ermitteln. Das zur Kontrolle detektierte

Markerprotein der Caveolae, Caveolin, war unter allen Inkubationsbedingungen im Pellet (Triton X-100 unlösliche Membranbereiche) und damit in cholesterinreichen Membran-bereichen zu finden.
Die Versuche bestätigten für Annexin VI deutlich eine Ca^{2+}-induzierte (50 µM) Translokation an Triton X-100 unlösliche Membranfraktionen (vgl. Abb. 30, Annexin VI-Verteilung im Überstand, mit und ohne Ca^{2+}-Inkubation). Die Calciumabhängigkeit der Membranassoziation von Annexin VI mit Triton X-100 unlöslichen Membranen bestätigte sich auch nach einer Inkubation von CHO Anx VI-Zellen mit 5 mM EDTA, danach waren keine Annexin VI-Proteine mehr in Triton X-100 unlöslichen Membranabschnitten (Pellets), d.h. im Bereich Lipid Rafts/Caveolae, nachweisbar. Auch für Annexin II-Proteine konnte ebenfalls eine EDTA-abhängige Bindung an Triton X-100 unlösliche Membranen nachgewiesen werden (vgl. Verteilung von Annexin II in EDTA-haltigen und unbehandelten Proben). Allerdings ließ sich die Ca^{2+}-induzierte (50 µM Ca^{2+}) Translokation des Proteins nicht in der Intensität wie für Annexin VI zeigen. (vgl. Abb. 30, Verteilung von Annexin II in Pellets von Ca^{2+}-inkubierten und unbehandelten Proben).
Durch Inkubation der Zellen mit Digitonin (0,5 µg/ml), das den Cholesteringehalt in der Zellmembran verringert, konnte für Annexin VI keine cholesterinabhängige Lokalisation in Triton X-100 unlöslichen Pellets gezeigt werden. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation mit Digitonin zu einer signifikanten Abnahme der Annexin II-Konzentration in Triton X-100 unlöslichen Membranregionen (Pellets). Damit scheint die Inkubation von CHO Anx VI-Zellen mit Digitonin (0,5 µg/ml Digitonin) zu keiner Translokation von Annexin VI aus Triton X-100 unlöslichen Pellets zu führen. Die Verteilung von Annexin VI war, im Gegensatz zu Annexin II, durch Variation der Cholesterinkonzentration in diesem experimentellen System nicht beeinflussbar. Eindeutig ist die Anreicherung mit Caveolin, dem Markerprotein von Lipid Rafts/Caveolae, in Triton X-100 unlöslichen Membranabschnitten („Pellets“) bei allen Inkubationen und bei Kontrollzellen zu erkennen. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass durch das experimentelle Vorgehen 1/10 des Membranpellets, aber nur 1/1000 des Überstandes in dem Western Blot zu sehen sind.

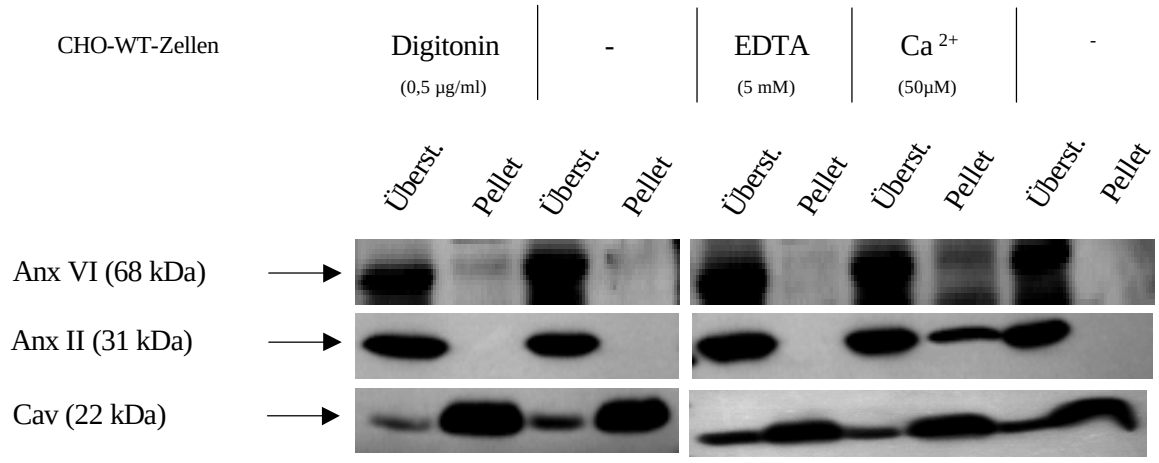


Abb. 31 **:** Calcium- und cholesterinabhängige Lokalisation von Annexinen in Triton X-100 unlöslichen Membranen von CHO WT-Zellen.
Experimentelles Vorgehen wie in Abb. 30, jedoch wurden CHO WT-Zellen inkubiert.

Deutliche Unterschiede in der Lokalisation ergaben sich durch Vergleich der Verteilung von Annexinen in CHO WT- mit CHO Anx VI-Zellen (vgl. Abb. 30 u. Abb. 31). Bei den nicht inkubierten CHO WT-Kontrollzellen (vgl. Abb. 31) konnte Annexin VI nicht im Pellet, d.h. in Triton X-100 unlöslichen Membranbereichen (dem Bereich der Lipid Rafts/Caveolae), nachgewiesen werden. Dies gilt ebenfalls für Annexin II. Der Überstand (Triton X-100-lösliche Abschnitte) enthielt dagegen sowohl Annexin VI als auch Annexin II in hoher Konzentration. Möglicherweise führt die Überexpression von Annexin VI in CHO Anx VI-Zellen (vgl. Abb. 30) zu einer stärkeren Anreicherung von Annexin VI in Lipid Rafts bzw. Caveolae als in CHO WT-Zellen. Nach Inkubation von CHO WT-Zellen mit Digitonin (vgl. Abb. 31) konnten kaum inkubationsbedingte Veränderungen in der Lokalisation von Annexin VI und Annexin II ermittelt werden (vgl. Anx VI- und Annexin II-Proteinbande des Pellets nach Digitonin-Inkubation im Vergleich mit entsprechenden Banden nicht inkubierter CHO WT-Zellen).

Die Inkubation von CHO WT-Zellen mit 50 µM Ca^{2+} bestätigte die calciuminduzierte Translokation von Annexinen in Triton X-100 unlösliche Membranregionen. Dies konnte sowohl für Annexin VI als auch in ausgeprägterer Form für Annexin II gezeigt werden. Nach der Inkubation von CHO WT-Zellen mit EDTA (5 mM) sind weder Annexin VI noch Annexin II, die calciumabhängig an Triton X-100-unlösliche Membranen binden, in Triton X-100 unlöslichen Membranbereichen (Lipid Rafts/Caveolae) nachzuweisen. Unter allen Bedingungen zeigte das Caveolin-Kontrollsignal keine signifikanten inkubationsbedingten Veränderungen.

Insgesamt ist mit dieser neu etablierten Methode die calciumabhängige Translokation sowohl von Annexin VI als auch von Annexin II in CHO Anx VI- sowie in CHO WT-Zellen bestätigt worden. Nach Inkubation der Versuchszellen mit Digitonin (0,5 µg/ml) ergab sich für Annexin II eine cholesterinabhängige Bindung an Triton X-100 unlösliche Membranfraktionen in CHO Anx VI-Zellen. Annexin VI wurde dagegen in seiner Membranaffinität in cholesterinreichen Membranabschnitten („Pellets“) in CHO Anx VI-Zellen von Digitonin nicht beeinflußt.

3.8.2 Einfluß von Calcium und Cholesterin auf die Lokalisation von $p120^{GAP}$, SR-BI und p21-Ras in CHO Anx VI-Zellen

Die in Kapitel 3.8.1 erzielten Ergebnisse sollten dahingehend überprüft werden, ob eine Beeinflussung der Calcium- oder Cholesterin-Konzentration in CHO Anx VI-Zellen zu Veränderungen in der Lokalisation von $p120^{GAP}$, SR-BI oder p21-Ras führt. Der Scavenger-Rezeptor-BI (SR-BI) ist - wie in Kapitel 1.1.4 beschrieben - ein in Lipid Rafts/Caveolae nachgewiesenes 57 kDa Protein, das selektiv die Aufnahme von Cholesterin aus High Density Lipoproteinen (HDL) in die Zelle (Babitt et al., 1997) als auch vermutlich den Efflux zellulären Cholesterins aus der Zelle vermittelt (Ji et al., 1997). Da Caveolin und SR-BI in verschiedenen Zellen in Abhängigkeit von der Cholesterinkonzentration exprimiert werden (Fielding und Fielding, 1997), sollte die Lokalisation des Rezeptors nach Beeinflussung des Cholesteringehaltes durch Digitonin hier gesondert untersucht werden.

In Kapitel 1.2.3.1 wurde bereits auf die mögliche Bedeutung von Lipid Rafts bzw. Caveolae bei der Regulation der p21-Ras vermittelten Signaltransduktion hingewiesen. Die Lokalisation der Proteine p21-Ras und $p120^{GAP}$ ist deshalb von besonderem Interesse, als für Annexin VI eine Interaktion mit

dem Ras-spezifischen GTPase-aktivierenden Protein $p120^{GAP}$ nachgewiesen wurde und Annexin VI damit eine Funktion im Rahmen der zellulären Signaltransduktion zukäme (Davis et al., 1996; Chow et al., 2000). Da $p120^{GAP}$ die Aktivität von p21-Ras reguliert (Chow et al., 2000), sollte die Verteilung beider Proteine in den Fraktionen analysiert werden.

Für das Experiment wurden die Proben des Experiments aus Abb. 30 nach der in Kapitel 2.2.5.2 beschriebenen Methode aufgearbeitet und mittels 12%-SDS-PAGE und anschließender Western Blot-Analyse untersucht. Danach erfolgte eine Analyse der SR-BI-, p21-Ras- und $p120^{GAP}$-Lokalisation in Triton X-100 löslichen und unlöslichen Fraktionen.

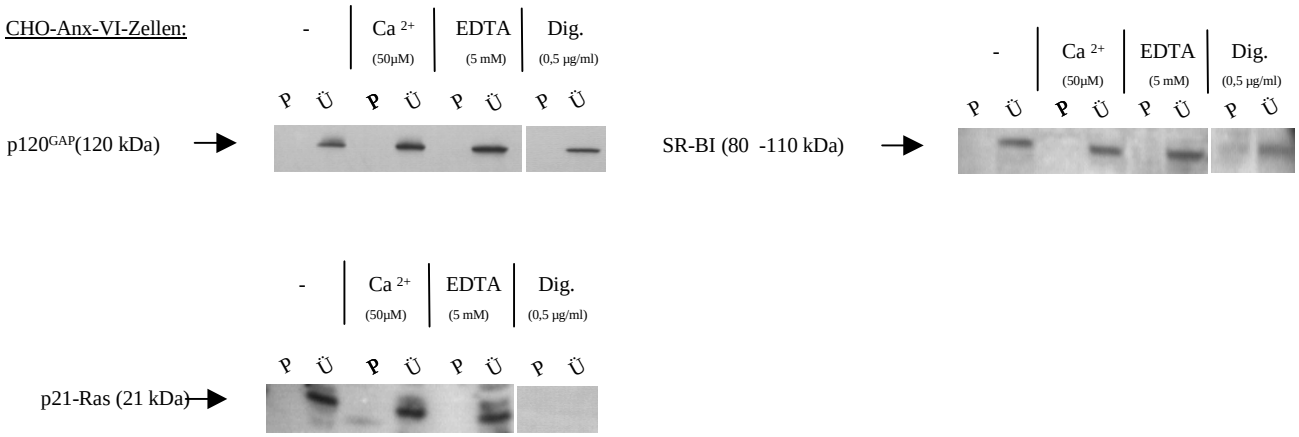


Abb. 32 : Einfluss von Calcium und Cholesterin auf die Lokalisation von $p120^{GAP}$, SR-BI und p21-Ras in CHO Anx VI-Zellen
Die Proben des Experimentes aus Abb. 30 wurden über 12%-SDS-PAGE aufgetrennt, einer Western Blot-Analyse unterzogen und mit dem ECL-System detektiert. Dem biotinylierten Proteingrößenmarker entsprechend sind Molekulargewichtsmarkierungen (kDa) angegeben. Die Antiköperinkubation erfolgte mit anti-$p120^{GAP}$, anti-SR-BI und anti-p21-Ras. (Ü = Überstand – Triton X-100 lösliche Fraktionen; P = Pellet – Triton X-100 unlösliche Faktionen – Bereich der Lipid Rafts/Caveolae).

In unseren Experimenten ließ sich für nicht inkubierte Kontrollzellen, EDTA- und Ca^{2+}-inkubierte CHO Anx VI-Zellen die gleichsinnige Verteilung von $p120^{GAP}$ (als ein Ras-spezifisches GTPase-aktivierendes Protein) und p21-Ras zeigen (vgl. Abb. 32). Wir konnten p21-Ras und $p120^{GAP}$ ausschließlich im Überstand (Triton X-100 lösliche Fraktionen) sowohl der EDTA-, der Ca^{2+}- als auch der nicht-inkubierten CHO Anx VI-Zellen nachweisen. In Triton X-100 unlöslichen Membranabschnitten (Lipid Rafts/Caveolae) war unter diesen Inkubationsbedingungen weder p21-Ras noch $p120^{GAP}$ zu finden. Auffällig war jedoch, dass p21-Ras nach einer Digitonin-Inkubation nicht mehr im Überstand (Triton X-100-lösliche Fraktionen) nachzuweisen war. Im Gegensatz dazu konnte $p120^{GAP}$ auch nach einer Digitonin-Inkubation im Überstand detektiert werden.

Bei der Analyse der SR-BI-Verteilung in CHO Anx VI-Zellen konnte das Protein ausschließlich in Triton X-100 löslichen Abschnitten (Ü) nachgewiesen werden. Es kam weder bei einer EDTA- (5 mM) noch bei einer Calcium-Inkubation (50 µM) zu einer veränderten Lokalisation von SR-BI. Die Inkubation mit Digitonin (0,5 µg/ml) zeigte ebenfalls ein deutliches Signal im Bereich der Triton X-100 löslichen Fraktionen, ließ jedoch ein sehr schwaches Signal im Bereich Triton X-100-unlöslicher

Membranbereiche erkennen. Zusammenfassend konnte für die Lokalisation von $p120^{GAP}$ in Triton X-100 löslichen oder unlöslichen Membranabschnitten keine Cholesterin- oder Calciumabhängigkeit nachgewiesen werden. p21-Ras zeigte ebenfalls keine Calciumabhängigkeit, war aber nach einer Digitonin-Inkubation nicht mehr in Triton X-100 löslichen Fraktionen (Ü) zu bestimmen. SR-BI konnte unter allen Inkubationsbedingungen ausschließlich im Überstand, d.h. in Triton X-100 löslichen Abschnitten, nicht in Lipid Rafts/Caveolae nachgewiesen werden.

3.8.3 Einfluß von Calcium auf die Annexin VI-Lokalisation in Triton X-100 unlöslichen Membranen

Diesem Experiment liegt die Frage zugrunde, ob das Ausmaß der bereits in Kapitel 3.8.1 gezeigten calciumabhängigen Translokation von Annexin VI in Lipid Rafts/Caveolae von der Höhe der Calcium-Inkubation abhängig ist, und ob diese Abhängigkeit auch mit der neu etablierten Methode zur Triton X-100 Solubilsation zu zeigen ist. Die bei den Experimenten in Kapitel 3.8.1 eingesetzte Calcium-Konzentration betrug 50 µM und führte lediglich zu einer teilweisen Translokation von Annexin VI in Lipid Rafts/Caveolae-Membranregionen.

Für die Versuche wurden 1 x 10^6 CHO Anx VI-Zellen auf Ø 15 cm nach der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Methode kultiviert und während der Membranpräparation entsprechend der oben etablierten Methode der Triton X-100-Solubilisation (vgl. Kap. 3.8.1, Brown and Rose, 1992; Mendez et al., 2001) mit 50 µM, 250 µM und 500 µM Ca^{2+} inkubiert. Proben der mit EDTA (5 mM) und Digitonin (0,5 µg/ml) inkubierten CHO Anx VI-Zellen des Experimentes aus Kapitel 3.8.1 dienten als Vergleich und wurden ebenfalls mittels Western Blot sowie ECL-System analysiert.

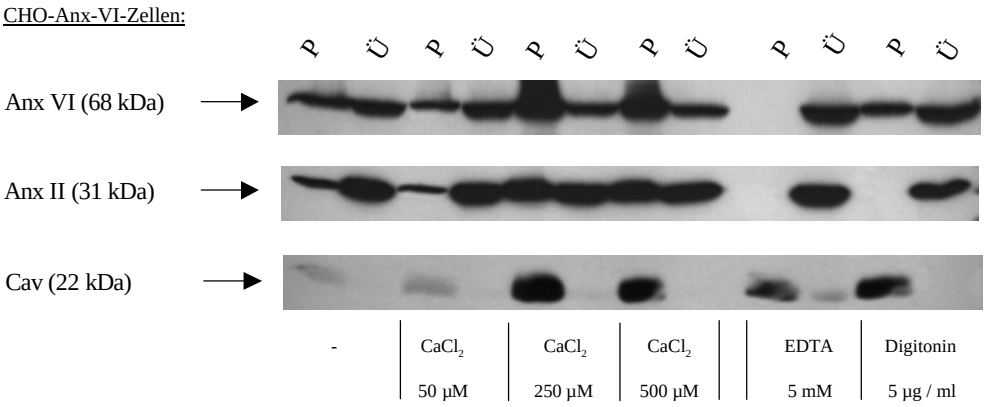


Abb. 33 **:** Calciumabhängige Lokalisation von Annexin VI in Triton X-100 unlöslichen Membranen von CHO Anx VI-Zellen.
1 x 10^6 CHO Anx VI-Zellen wurden auf Ø 15cm Petrischalen kultiviert (vgl. Kap. 2.2.1). Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit dem in Kapitel 2.2.5.2 beschriebenen Verfahren aufgearbeitet. Dabei wurden die Versuchszellen während der Präparation mit 50, 250 und 500 µM Ca^{2+} inkubiert (vgl. Kap. 2.2.5.2). Proben Digitonin-inkubierter (0,5 µg/ml) und EDTA-inkubierter CHO Anx VI-Zellen des Experimentes aus Kapitel 3.8.1 dienten als Vergleich. Jeweils 50 µg Zellprotein der Pellets (P) und Überstände (Ü) der Kontrollzellen, der Calcium- und der EDTA-inkubierten Zellen sowie 30 µg Zellprotein der Pellets (P) und Überstande (Ü) der Digitonin-inkubierten Zellen wurden auf ein 12% Polyacrylamidgel aufgetragen, mit Hilfe der Western Blot-Methode und dem ECL-System analysiert. Dem biotinylierten Proteingrößenmarker entsprechend sind Molekulargewichtsmarkierungen (kDa) angegeben. Die Antiköperinkubation erfolgte mit anti-Annexin VI, anti-Annexin II und anti-Caveolin-Antikörpern.

Bei nicht inkubierten CHO Anx VI-Zellen konnte Annexin VI sowohl in Triton X-100 löslichen („Ü“) als auch in unlöslichen Membranfraktionen („P“) in vergleichbarer Konzentration nachgewiesen werden (vgl. Abb. 33). Annexin II ließ sich ebenfalls sowohl im Überstand, d.h. in Triton X-100 löslichen Fraktionen, als auch im Pellet (Triton X-100 unlöslichen Abschnitten) detektieren. Im Pellet der Triton X-100 unlöslichen Fraktionen war dagegen weniger Annexin II-Protein nachweisbar als im Überstand. Das Markerprotein der Lipid Rafts/Caveolae Caveolin ließ sich in relativ geringer Konzentration im Pellet nachweisen.

Bei der Membranpräparation von CHO Anx VI-Zellen mit 50 µM Ca^{2+} bleibt der größte Teil der Annexin VI-Proteine im Überstand, d.h. in der Triton X-100 löslichen Fraktion, nachweisbar. Nur ein Teil der Annexin VI-Proteine ist in Triton X-100 unlöslichen Membranfraktionen (Pellet) nachweisbar. Für die Protein-Lokalisation von Annexin II gilt dies in vergleichbarer Weise. Caveolin ließ sich auch hier in relativ geringer Konzentration in der Fraktionen von Lipid Rafts/Caveolae nachweisen.

Nach der Inkubation mit 250 µM Ca^{2+} konnte nun der größte Anteil der Annexin VI-Proteine in den Triton X-100 unlöslichen Membranpellets (Lipid Rafts/Caveolae) nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu waren im Überstand signifikant weniger Annexin VI-Proteine zu detektieren. Auch für Annexin II zeigte sich das verschobene Verhältnis in der Lokalisation des Proteins. Im Gegensatz zu Annexin VI waren für Annexin II nach einer Inkubation mit 250 µM Ca^{2+} aber annähernd gleiche Proteinmengen in Triton X-100 unlöslichen (Pellet) wie in löslichen Membranfraktionen (Überstand) nachweisbar. Caveolin konnte bei dieser Inkubation in Triton X-100 unlöslichen Fraktionen in hoher Konzentation gefunden werden.

Eine Verdoppelung der Ca^{2+}-Konzentration auf 500 µM während der Präparation führte zu keinem weiteren Anstieg der Protein-Konzentration von Annexin VI in Lipid Rafts/Caveolae-Membranregionen. Auch bei dieser Ca^{2+}-Konzentration fiel das deutlich zu Gunsten der Triton X-100 unlöslichen Fraktionen verschobene Annexin VI-Verhältnis auf. Für Annexin II konnte ebenfalls keine signifikante Veränderung der Lokalisation des Proteins im Vergleich mit den in einer Höhe von 250 µM Ca^{2+} inkubierten CHO-Anx VI-Zellen ermittelt werden. Caveolin ließ sich in hoher Konzentration ausschließlich in Lipid Rafts/Caveolae-Fraktionen nachweisen.

Nach Inkubation der Versuchszellen mit EDTA während der Präparation konnte der bereits aus den vorherigen Experimenten bekannte Effekt für Annexin II und Annexin VI bestätigt werden. Beide Proteine waren nach einer EDTA-Inkubation (5 mM), d.h. nach Calciumentzug, nicht mehr in Triton X-100 unlöslichen Membranbereichen nachzuweisen und waren nach EDTA-Inkubation lediglich in Triton X-100 löslichen Fraktionen detektierbar. Die Kontrollbande für Caveolin zeigte das Protein auch hier vor allem im Pellet.

Als Bestätigung des Experimentes aus Abb. 30 diente die Detektion von Annexin VI und Annexin II in Digitonin inkubierten CHO-Anx VI-Zellen. Nach einer Inkubation mit 0,5 µg/ml Digitonin konnte eine signifikante Translokation von Annexin II aus Triton X-100 unlöslichen (Pellet) in Triton X-100 lösliche Membranfraktionen (Überstand) festgestellt werden. Im Vergleich dazu translozierte Annexin VI bei dieser Digitonin-Konzentration (0,5 µg/ml) nicht in Triton X-100 lösliche Membranfrak-

tionen und ließ sich weiterhin auch im Bereich von Lipid Rafts/Caveolae (Pellet) nachweisen. Nach Digitonin-Inkubation waren die zur Kontrolle detektierten Caveolin-Proteine ausschließlich im Pellet vorhanden. Bei den nicht inkubierten Kontrollzellen sowie bei den während der Präparation mit 50 µM Ca^{2+} inkubierten CHO Anx VI-Zellen wurde scheinbar weniger Material gelelektrophoretisch aufgetrennt als in den anderen Spuren des Gels. Dies erklärt die vergleichsweise schwachen Proteinbanden der untersuchten Proteine.

Zusammenfassend konnten wir mit der Methode der Triton X-100-Solubilisation deutlich die calciumabhängige Translokation von Annexin VI und Annexin II in Lipid Rafts/Caveolae-Membranregionen zeigen. Durch Inkubation mit Digitonin bestätigte sich die Cholesterin-abhängige Bindung von Annexin II an Lipid Rafts/Caveolae. Annexin VI zeigte keine von der Digitonin-Inkubation abhängigen Veränderungen in der Lokalisation des Proteins.

3.9 HDL_3-vermittelte ^{3}H-Cholesterin-Efflux-Experimente

Verschiedene Arbeiten (vgl. Kap. 1.3.2.3.2) geben Hinweise darauf, dass Annexin VI eine wichtige Rolle beim HDL_3-vermittelten (High Density Lipoprotein) Ausschleusen von Cholesterin aus den Zellen spielen könnte, das vermutlich zu großen Teilen aus Lipid Rafts/Caveolae stammt. Mit den nachfolgenden Experimenten sollte die mögliche Funktion von Annexin VI bei dem HDL_3-stimulierbaren Cholesterin-Efflux untersucht werden.

3.9.1 Inhibitorischer Effekt von Annexin VI auf den HDL_3-vermittelten Cholesterin-Efflux

Zur Charakterisierung der möglichen regulatorischen Funktion von Annexin VI in cholesterinreichen Membrandomänen sollten in dieser Versuchsreihe der HDL_3-vermittelte Cholesterin-Efflux in CHO WT-, CHO Anx VI- und CHO Anx II-Zellen verglichen werden. Die Zellen wurden entsprechend der in 2.2.10.2 beschriebenen Methode über Nacht mit ^{3}H-Cholesterin-LDL (50 µg/ml) inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Inkubation der Versuchs-zellen mit HDL_3 (100 µg/ml). Anschließend wurde der Anteil des freigesetzen und des in den Zellen verbliebenen ^{3}H-Cholesterin bestimmt.

Abbildung 34 zeigt, dass nach einstündiger Inkubation mit HDL_3 (100 µg/ml) je nach Zelllinie 18-24% des internalisierten ^{3}H-Cholesterins aus den Zellen ausgeschleust worden ist, nach 2 Stunden 23-26% , nach 4 Stunden 26-33% und nach 6 Stunden 33-38%. Der Anstieg des Cholesterin-Efflux für die Zellreihen ist in den einzelnen Abschnitten mehr oder weniger stark ausgeprägt. Besonders deutlich erscheinen die Unterschiede im HDL_3-vermittelten Cholesterin-Efflux zwischen CHO Anx VI- und CHO WT-Zellen. Abbildung 34 (B) stellt die experimentellen Daten zur besseren Übersicht in einer anderen Darstellungsweise zusammen. Dabei werden die zunehmenden Cholesterin-Efflux-Raten über die Zeit für alle Zellreihen nochmals hervorgehoben. CHO Anx VI-Zellen zeigten synchron geringere HDL_3-vermittelte Cholesterin-Efflux-Raten als CHO WT-Zellen. Diese Ergebnisse konnten in weiteren Experimenten mehrfach bestätigt werden. Im Gegensatz dazu wiesen CHO Anx II-Zellen einen uneinheitlichen ^{3}H-Cholesterin-Efflux im Vergleich mit Kontrollzellen (CHO WT-Zellen) auf. Bei 1-, 2- und 4-stündiger HDL_3-Inkubation zeigten CHO Anx II-Zellen eine im Vergleich zu Kontrollzellen unterdurchschnittliche Effluxrate, nach 6 Stunden liegen die ^{3}H-Cholesterin-

Effluxdaten über dem Niveau für CHO WT-Zellen. Nicht HDL_3-inkubierte Zellen wiesen gleiche passive Abgaberaten für Cholesterin auf, alle Zellreihen zeigten vergleichbare Aufnahmeraten von ^{3}H-LDL-Cholesterin (Grewal et al., 2000).

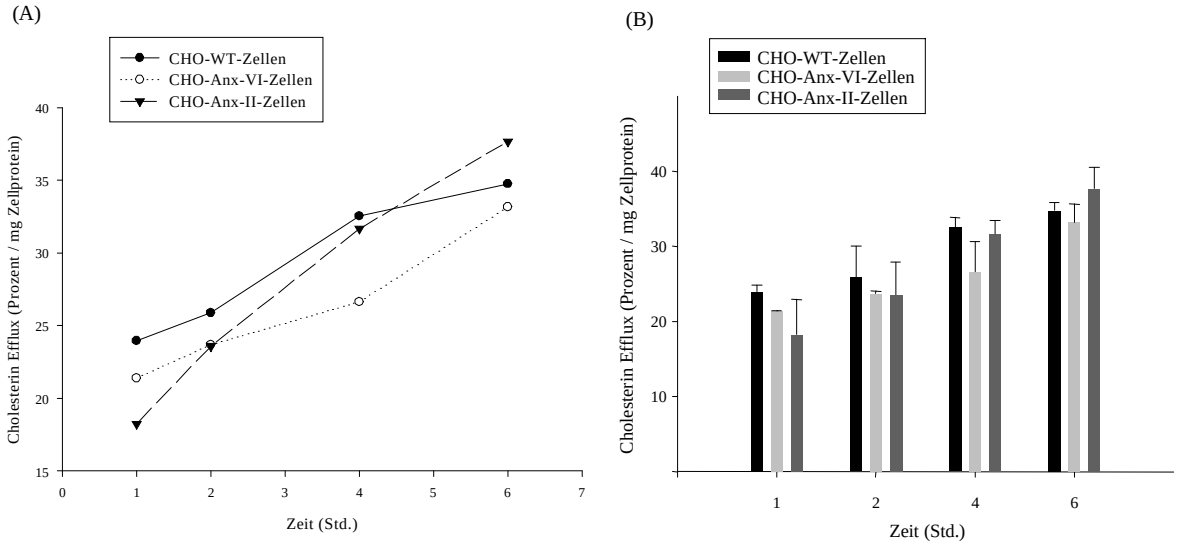


Abb. 34 : Vergleich des HDL-stimulierbaren Cholesterin-Efflux in CHO WT-, CHO Anx VI- und CHO Anx II-Zellen
(A) 1 x 10^5 CHO WT-Zellen pro ml wurden auf 12-well Zellkulturschalen ausplattiert und nach der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Methode für 24 Stunden kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte ein PBS-Waschschritt und die Vorinkubation der Zellen in 10%-LPDS-haltigem Nährmedium (vgl. Kap. 2.2.10.2). Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit ^{3}H-Cholesterin-LDL (50 µg/ml für 24 Stunden bei 37°C. Nach Entfernung nicht aufgenommener und unspezifischer Radioaktivität wurde der ^{3}H-Cholesterin-Efflux aus den Zellen danach mit einem an HDL_3 (100 µg/ml)) angereicherten 10%-LPDS-Zellkulturmedium induziert. Nach einer Inkubationsdauer von 1, 2, 4 und 6 Stunden wurde das Nährmedium zur Bestimmung des an das Medium abgegebenen ^{3}H-Cholesterins in Zählröhrchen überführt. Zur Bestimmung des ^{3}H -Cholesterins, das in den Zellen verblieben war, wurden die Zellen nachfolgend mit 1 ml 0,1 N NaOH pro Well vom Boden der Mehrfachzellkulturschalen gelöst und die Radiaktivität in Zählröhrchen szintillatorisch bestimmt. Nach der Bestimmung der zellassoziierten und nicht-zellassoziierten Radioaktivität wurden die ermittelten Werte auf cpm/µg (counts per minute) Zellprotein korrigiert. Die Grafik zeigt den aus den Daten rechnerisch ermittelten ^{3}H-Cholesterin-Efflux.
(B) Prozentualer Cholesterin-Efflux in Zellen des obigen Experiments in anderer Darstellungsweise.
Die Messwerte der Darstellungen ergeben sich als Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils eine dreifache Bestimmung durchgeführt wurde (Die Standardabweichungen sind in Abb. 34 (B) mitaufgetragen).

Insgesamt wiesen alle Zellreihen eine steigende ^{3}H-Cholesterin-Efflux-Rate über die Versuchszeit von insgesamt 6 Stunden auf. Die geringeren ^{3}H-Cholesterin-Efflux-Raten von CHO Anx VI-Zellen im Vergleich zu CHO WT-Zellen deuten auf die inhibitorische Wirkung einer Überexpression von Annexin VI auf den HDL_3-vermittelten Cholesterin-Efflux hin. Die Efflux-Raten für CHO Anx II-Zellen sind abhängig von der Zeitdauer der Inkubation mit HDL_3 und ließen keine verlässliche Interpretation zu.

3.9.2 Einfluss einer EDTA-Inkubation auf den ^{3}H-Cholesterin-Efflux in CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen

Die Ergebnisse aus 3.9.1 dienten als Grundlage, um in einem weiteren Experiment den Einfluß eines Calcium-Entzuges durch Zusatz des Ca^{2+}-Chelators EDTA (Ethylendiamin-tetraacetat) auf den HDL_3-vermittelten Cholesterin-Efflux von CHO Anx VI- und CHO WT-Zellen vergleichen zu können. EDTA verringert die Calcium-Konzentration im Zytosol der Zellen. Da Annexin VI calciumabhängig an Lipid Rafts/Caveolae binden kann, kommt es in den mit EDTA inkubierten Zellen zu einer reduzierten Affinität von Annexin VI mit Lipid Rafts/Caveolae und anderen Membranen. Die EDTA-inkubierten Zellen könnten somit aufgrund einer veränderten Annexin VI-Lokalisation eine veränderte Cholesterin-Efflux-Rate aufweisen gegenüber Vergleichszellen ohne EDTA-Inkubation. Die Effekte sind in Abbildung 35 dargestellt.

Für das Experiment erfolgte zunächst eine Präinkubation von CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen mit LPDS-haltigem Zellkulturmedium entsprechend der in Kapitel 2.2.10.2 beschriebenen Methode. Daran schloß sich eine 24-stündige Inkubation mit ^{3}H-LDL-Cholesterin (50 µg/ml) an. Sodann wurde das radioaktive Zellkulturmedium verworfen und den Zellen für 1, 2, 4 oder 6 Stunden HDL_3 (100 µg/ml) in LPDS-haltigem Medium als extrazellulären Akzeptor für internalisiertes ^{3}H-Cholesterin angeboten.

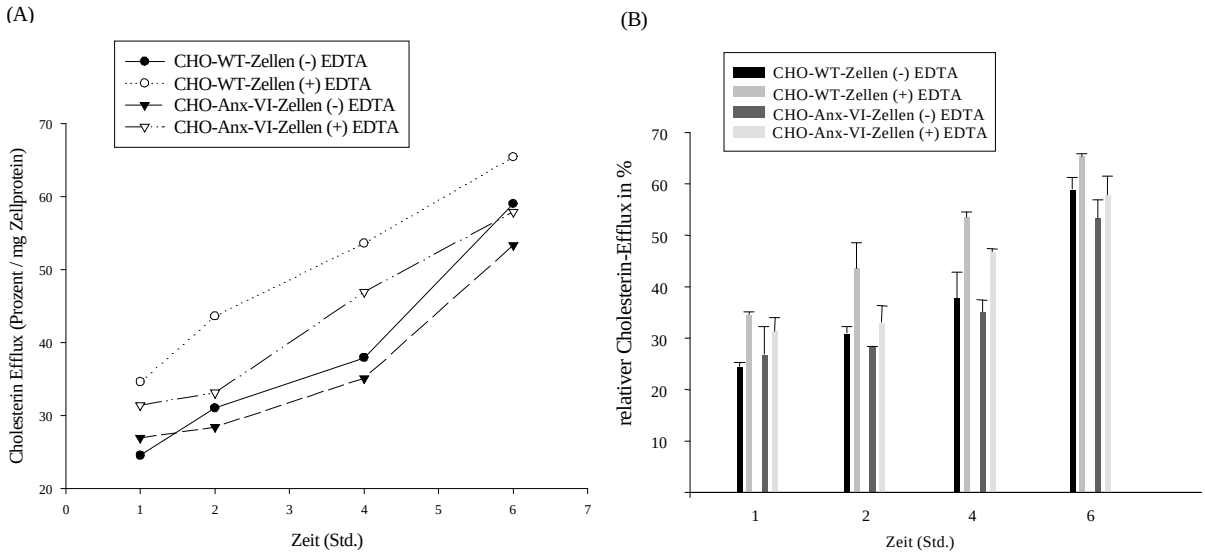


Abb. 35 : Vergleich des HDL_3 -induzierten Cholesterin-Efflux in CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen nach EDTA-Inkubation

(A) 1 x 10^5 CHO WT-Zellen und CHO Anx VI-Zellen pro ml wurden auf 12-well Zellkulturschalen kultiviert und entsprechend der in Kapitel 2.2.10.2 beschriebenen Methode mit ^{3}H-LDL-Cholesterin (50 µg/ml) inkubiert. Nach Entfernung nicht zellassoziierter Radioaktivität wurde der ^{3}H-Cholesterin-Efflux aus den Zellen anschließend mit HDL_3 (100 µg/ml) induziert. Das Medium wurde zusätzlich bei einer Versuchsreihe mit 5 mM EDTA (Ethylendiamin-tetraacetat, 5mM) versetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 1, 2, 4 und 6 Stunden wurde das Nährmedium zur Bestimmung des in das Medium abgegebenen ^{3}H-Cholesterins in Zählröhrchen überführt. Die Zellen wurden nachfolgend mit 1 ml 0,1 N NaOH pro Well vom Boden der Mehrfachzellkulturschalen gelöst, in Zählröhrchen überführt und die Radiaktivität szintillatorisch bestimmt (vgl. Kap. 2.2.10.2). Anschließend wurden die ermittelten Werte auf cpm (counts per minute) pro µg Zellprotein korrigiert.. Die Grafik zeigt den aus den Daten berechneten ^{3}H-Cholesterin-Efflux.

(B) Zeigt die Messergebnisse des obigen Experiments in anderer Darstellung.

Die Messwerte ergeben sich als Mittelwerte dreier Messwerte aus zwei Experimenten (Standardabweichungen sind in Abb. 35 B aufgetragen).

Es zeigte sich mit zunehmender HDL_3-Inkubationsdauer ein Anstieg des HDL_3-induzierten Cholesterin-Efflux (vgl. Abb. 35 A und B). Nach einer Inkubationsdauer mit HDL_3 von einer Stunde konnten ca. 25%, nach 2 Stunden ca. 30%, nach 4 Stunden ca. 39% und nach 6 Stunden ca. 59% des internalisierten ^{3}H-Cholesterins im Medium der nicht EDTA-inkubierten CHO WT-Zellen nachgewiesen werden. In EDTA angereichertem Medium kultivierte CHO WT-Zellen zeigten für alle Inkubationszeiten signifikant höhere ^{3}H-Cholesterin-Efflux-Raten als nicht inkubierte Zellen.

CHO Anx VI-Zellen ergaben ebenfalls eine von der Inkubationsdauer mit HDL_3 abhängige Cholesterin-Efflux-Rate. So stieg der HDL_3-vermittelte Cholesterin-Efflux in diesen Zellen von ca. 27% nach einstündiger HDL_3-Inkubation auf Werte von ca. 53% nach 6 Stunden. Auch in CHO Anx VI-Zellen führte die Kultivierung in EDTA-angereichertem Medium im Vergleich mit nicht EDTA inkubierten CHO Anx VI-Zellen zu erhöhtem Cholesterin-Efflux bei allen Inkubationszeiten.

Der HDL_3-stimulierbare ^{3}H-Cholesterin-Efflux in CHO Anx VI-Zellen ist vergleichsweise zu CHO WT-Zellen geringer. Dies bestätigt Ergebnisse von Efflux-Studien aus Kapitel 3.9.1. CHO WT-Zellen waren nach EDTA-Inkubation mit einem ca. 10 – 15% erhöhten ^{3}H-Cholesterin-Efflux gegenüber den Kontrollzellen durch einen deutlicheren prozentualen Zuwachs gekennzeichnet als EDTA-inkubierte CHO Anx VI-Zellen, die lediglich einen ca. 5 – 10% erhöhten ^{3}H-Cholesterin-Efflux aufwiesen.

Zusammenfassend zeigten CHO WT-Zellen im Vergleich mit CHO Anx VI-Zellen einen geringeren ^{3}H-Cholesterin-Efflux. Die Kultivierung von CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen in EDTA angereichertem Zellkulturmedium führte zu einem signifikant erhöhten ^{3}H-Cholesterin-Efflux in den Zellen.

3.9.3 HDL_3-induzierter ^{3}H-Cholesterin-Efflux in Lipid Rafts/Caveolae

Bisher ist über die Herkunft des Cholesterins, das auf cholesterinarme HDL-Partikel übertragen wird, wenig bekannt. Es könnte sowohl aus cholesterinreichen Lipid Rafts/Caveolae als auch aus anderen Regionen der Plasmamembran stammen. Um ein sensitiveres Verfahren zum Nachweis von LDL-Cholesterin in Lipid Rafts/Caveolae zu entwickeln als dies mit der nicht-radioaktiven Methode des Kapitels 3.6 möglich war, wurden in dem folgenden Experiment CHO WT-Zellen auf Ø 15 cm Zellkulturschalen kultiviert und über Nacht mit 50 µg/ml ^{3}H-Cholesterin-LDL inkubiert. Nach Verwerfen nicht zellassoziierter Radioaktivität wurden die Zellen für 3, 6, 9 und 12 Stunden mit HDL_3 (30 µg/ml) inkubiert und im Optiprep®-Gradienten durch Ultrazentrifugation aufgetrennt. Anschließend wurde der Anteil des ^{3}H-Cholesterins in den Lipid Rafts/Caveolae bestimmt. Eine Kontrollzellgruppe wurde nicht HDL_3-inkubiert und diente als „Nullwert“, d.h. Radioktivität ohne HDL_3-Inkubation. Aliquots der Fraktionen wurden zur Proteinbestimmung herangezogen (Lowry et al., 1951) zwecks Angleichung der gemessenen Radioktivität auf cpm (counts per minute) pro µg Zellprotein.

Abbildung 36 (A) zeigt, dass die Inkubation von CHO WT-Zellen mit ^{3}H-Cholesterin-LDL zu einer Anreicherung von ^{3}H-Cholesterin in Lipid Rafts/Caveolae (Fraktionen 2 – 3) und in „schweren Membranen“ (Fraktionen 6 – 9) der nicht HDL_3-inkubierten Zellen (0h, Kontrollwert, Abb. 35 A) führt. Bereits nach 3-stündiger Inkubation mit HDL_3 konnte eine drastische Reduktion von ^{3}H-

Cholesterin sowohl in Lipid Rafts/Caveolae (Fraktionen 2 – 3) als auch in den „schweren Membranen“ (Fraktionen 6 – 9) beobachtet werden (Abb. 36 A). Nach 6-stündiger HDL_3-Inkubation ergab sich eine zunehmende Reduktion des ^{3}H-Cholesterins nur in Lipid Rafts/Caveolae-Fraktionen. Eine fortgesetzte HDL_3-Inkubation führte zu keiner weiteren Reduktion von ^{3}H-Cholesterin in Lipid Rafts/Caveolae-Fraktionen. In den Fraktionen der „schweren Membranen“ konnten für die 3 – 12-stündige HDL_3-Inkubation relativ gleich hohe ^{3}H-Cholesterin-Konzentrationen ermittelt werden.

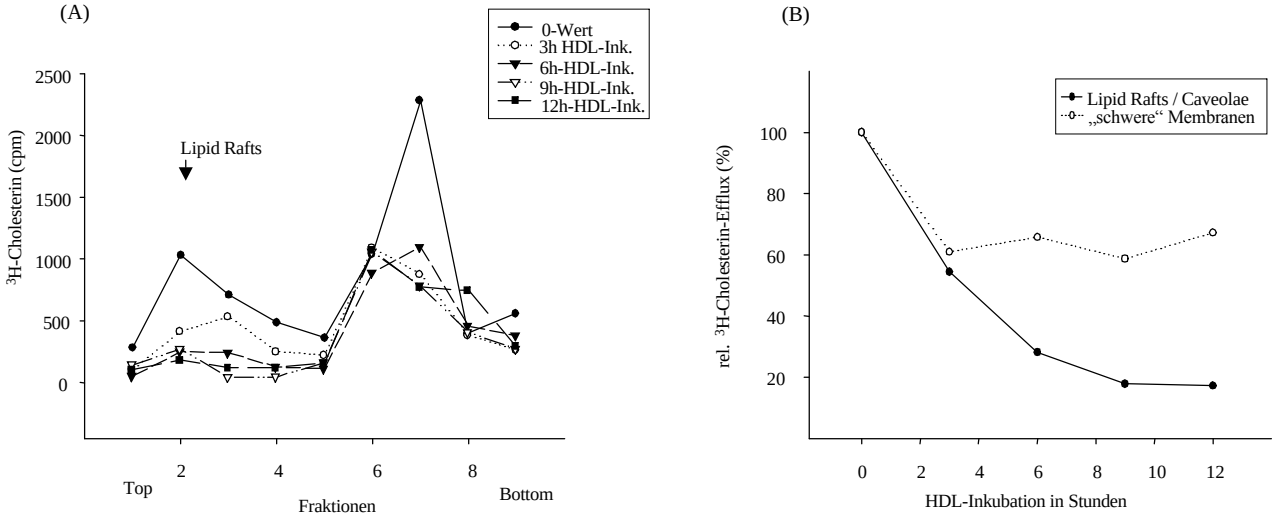


Abb. 36 **:** ^{3}H-Cholesterin-Verteilung in CHO WT-Zellen nach HDL_3-Inkubation
1 x 10^7 CHO WT-Zellen wurden auf Ø 15-cm Zellkulturschalen kultiviert (vgl. Kap. 2.2.1). Nach 24 h erfolgte die Inkubation der Zellen mit ^{3}H-Cholesterin-LDL (50 µg/ml) in 10%-LPDS-haltigem Zellkulturmedium über Nacht (vgl. Kap. 2.2.10.3). Um die Aufnahme des mit ^{3}H-Cholesterin markierten LDL zu erleichtern, wurde jede Petrischale zusätzlich um jeweils 100 µl unmarkiertes LDL (50 µg/ml) ergänzt. Nach Entfernung nicht zellassoziierter Radioaktivität wurde der ^{3}H-Cholesterin-Efflux aus den Zellen anschließend mit einem an HDL_3 (30 µg/ml) angereicherten 10%-LPDS-Zellkulturmedium induziert. Nach einer Inkubationsdauer von 3, 6, 9 und 12 Stunden wurden die Zellen nach der in Kapitel 2.2.5.1 beschriebenen Methode aufgearbeitet und fraktioniert. Die Verteilung des internalisierten ^{3}H-Cholesterins in den Fraktionen des Gradienten wurde ermittelt. Nach Bestimmung der zellassoziierten und nicht-zellassoziierten Radioaktivität wurden die Messwerte auf cpm (counts per minute) pro µg Zellprotein korrigiert.
(A) ^{3}H-Cholesterin in den Fraktionen 1 - 10 des Optiprep®-Gradienten. Die erwartete Position der Lipid Rafts/Caveolae liegt zwischen den Fraktionen 2 und 3 („Lipid Rafts“).
(B) Vergleichende Darstellung des ^{3}H-Cholesterin-Efflux (%) in Lipid Rafts/Caveolae (Fraktionen 1 – 5) und „schweren Membranfraktionen“ (Fraktionen 6 – 9) mit den Daten aus (A) bezogen auf den Gesamt-Cholesterin-Efflux.

Abbildung 36 B veranschaulicht, dass mit zunehmender HDL_3-Inkubationsdauer (6 – 12 Stunden) der ^{3}H-Cholesterin-Anteil in den Fraktionen von Lipid Rafts/Caveolae kontinuierlich abfällt. Dagegen konnte in den Bodenfraktionen des Gradienten nach 3 Stunden HDL_3-Inkubationsdauer keine weitere Abnahme von ^{3}H-Cholesterins festgestellt werden. Die unterschiedlichen Kinetiken für die beiden ^{3}H-Cholesterinpools weisen auf deren unterschiedliche Beteiligung am HDL-induzierbaren Cholesterin-Efflux hin.

4 Diskussion

Zahlreiche Autoren haben in den letzten Jahren die Funktion von Annexin VI bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose untersucht (Grewal et al., 2000; Kamal et al., 1998; vgl. auch Kap. 1.3). Neben dieser gut beschriebenen Rolle von Annexin VI deuten einige Arbeiten (Babiychuk und Draeger, 2000; Lecat et al., 2000) auf eine zusätzliche Lokalisation und regulatorische Funktion von Annexinen in cholesterinreichen, Triton X unlöslichen Membrandomänen, sogenannten Lipid Rafts und Caveolae, hin (vgl. Kap. 1.3). Das zur Familie hochkonservierter calciumabhängiger, phospholipid-bindender Proteine gehörende Annexin VI konnte dabei von einigen Autoren in Lipid Rafts bzw. Caveolae nachgewiesen werden (Schnitzer et al., 1995; Orito et al., 2001; Babiychuk und Draeger, 2000). Nachdem zwei Methoden zur Isolierung von Lipid Rafts bzw. Caveolae im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich etabliert werden konnten, führte die Charakterisierung von Lipid Rafts und Caveolae zur Identifikation der calciumabhängigen Bindung von Annexin VI an cholesterinreiche Membrandomänen. Die sich anschließenden Experimente dienten dazu, einen möglichen Einfluss von Annexin VI auf die Struktur cholesterinreicher Membrandomänen zu untersuchen. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob eine Beeinflussung der Struktur cholesterinreicher Membrandomänen durch Annexin VI oder durch Interaktion hiermit assoziierter Proteine, einen Einfluß auf den HDL-stimulierbaren Cholesterin-Efflux in Caveolae besitzt. Die Experimente dieser Arbeit wurden mit CHO (Chinese Hamster Ovary) Zellen durchgeführt (CHO WT-Zellen), die sich durch eine geringe endogene Annexin VI-Expression auszeichnen (Grewal et al., 2000). Zum Vergleich der Ergebnisse wurden Annexin VI- sowie Annexin II-überexprimierende Zelllinien (CHO Anx VI- und CHO Anx II-Zellen) herangezogen.

4.1 Identifikation von Annexin VI in Lipid Rafts und Caveolae

In einführenden Expressionsstudien (vgl. Kap. 3.1) wurde der Einfluß von Lipoproteinen auf die Expression von Annexinen, Caveolin und SR-BI in CHO Zellen studiert. In den Experimenten konnten durch Inkubation der Zellen mit LDL oder HDL *in vivo* keine signifikanten Einflüsse auf die Expression der untersuchten Proteine (Annexin VI, Annexin II, SR-BI und Caveolin) in CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen gezeigt werden. In der Literatur sind für Caveolin und SR-BI Cholesterin-abhängige Expressionsmuster beschrieben worden (vgl. Kap. 1.2.3.2 und Fielding und Fielding, 2000; Fielding et al., 1997; Fielding und Fielding, 1997). Diese Daten basieren jedoch nicht auf der in unseren Experimeten eingesetzten CHO-Zelllinie. Möglicherweise werden die Proteine in CHO-Zellen nicht cholesterinabhängig exprimiert. Zudem weichen die in anderen Arbeiten eingesetzten Methoden von der hier eingesetzten Präparation ab, sodass auch dies zu von der Literatur abweichenden Ergebnissen geführt haben könnte.

Im Anschluß an die einführenden Expressionsstudien wurden in der Arbeitsgruppe Grewal bisher nicht eingeführte biochemischen Methoden der Isolation von Lipid Rafts/Caveolae etabliert, um die Lokalisation und Verteilung von Annexin VI zu studieren. Neben der Methode zur Isolation von cholesterinreichen Membranen (Lipid Rafts/Caveolae) im diskontinuierlichen Optiprep®-Gradienten (vgl. Kap. 3.2; Lafont et al., 1998) konnte in dieser Arbeit zusätzlich die „Triton X-100-

Solubilisation“ nach der Methode von Brown and Rose für Lipid Rafts/Caveolae erfolgreich etablieren (vgl. Kap. 3.8.1; Brown and Rose, 1992; Mendez et al., 2001).

Nach Ultrazentrifugation im Optiprep®-Gradienten konnten sowohl in CHO Anx VI- als auch in CHO Anx II-Zellen Regionen der Lipid Rafts/Caveolae in den Fraktionen 2 und 3 im Gradienten identifiziert werden (vgl. Kap. 3.2). Diese Fraktionen zeichneten sich durch Anwesenheit des Caveolae-Markerproteins Caveolin (vgl. Abb. 12) sowie durch erhöhte Cholesterin- als auch gleichfalls erhöhte Phospholipid-Konzentrationen aus (vgl. Abb. 14). In den proteinreichen Bodenfraktionen des Gradienten („schwere“ Fraktionen, Fraktionen 7 – 10 im Gradienten) waren dagegen sowohl Plasmamembran-assoziierte Proteine wie Dynamin als auch Annexin VI, Annexin II und Caveolin in hoher Konzentration nachweisbar (vgl. Abb. 12). In den sehr proteinreichen bodennahen Fraktionen (7 – 10) sind neben Triton X-100 löslichen Proteinen z.B. auch Teile des Golgi-Apparates, endosomale Strukturen oder Teile der Plasmamembran angereichert (Lecat et al., 2000). Caveolin als Markerprotein von Caveolae ließ sich sowohl in cholesterinreichen Fraktionen als auch in den „schweren“ Fraktionen nachweisen. Dies könnte Arbeiten bestätigen, die dem Cholesterin-bindenden Protein Caveolin eine herausgehobene Stellung innerhalb des intrazellulären Transports von Cholesterin in Richtung Plasmamembran zuschreiben, indem es zwischen intrazellulären Strukturen wie Golgi-Apparat, Lipid Rafts, Plasmamembran und Caveolae hin und her pendelt (Smart et al., 1996).

Mit Hilfe einer zweiten alternativen und unabhängigen Methode zur Präparation von Lipid Rafts und Caveolae (Präparations-Methode nach Brown and Rose, 1992) konnten Lipid Rafts bzw. Caveolae in Triton X-100 unlöslichen Fraktionen von aufgearbeiteten CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen in hoher Konzentration nachgewiesen werden (vgl. Abb. 30 und 31). In Triton X-100 unlöslichen Bereichen ließ sich das Caveolae Markerprotein Caveolin in hohen Konzentrationen finden. Membrangebundenes Annexin VI wurde in CHO Anx VI-Zellen sowohl im Membranpellet (P), somit in Triton X-100 unlöslichen Strukturen (Lipid Rafts und Caveolae), als auch in Triton X-100 löslichen Abschnitten (Überstand [Ü]) in vergleichbarer Konzentration bestimmt. Annexin II-Proteine waren ebenfalls in Triton X-100 löslichen wie unlöslichen Fraktionen zu detektieren. Allerdings zeigte sich der überwiegende Teil von Annexin II-Proteinen im Überstand (Ü), d.h. in Triton X-100 löslichen Abschnitten. In CHO WT-Zellen sind im Gegensatz zu CHO Anx VI-Zellen Annexin VI-Proteine lediglich in Triton X-100 löslichen Abschnitten, jedoch nicht in Lipid Rafts/Caveolae-Regionen nachweisbar. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine Annexin VI-Überexpression in den CHO Anx VI-Zellen möglicherweise zu einer Anreicherung von Annexin VI in Lipid Rafts/Caveolae-Regionen führt.

4.2 Modell der calciuminduzierten Proteintranslokation von Annexin-Proteinen in Lipid Rafts und Caveolae

Annexine lassen sich durch eine calciumabhängige Bindung an vorzugsweise negativgeladene Phospholipide charakterisieren (vgl. Kap. 1.3 und Liemann und Huber, 1997; Huber et al., 1992). Für die Aktivierung von Annexin VI scheint ebenfalls die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration von entscheidender Bedeutung zu sein. So führte die Charakterisierung cholesterinreicher Membrandomänen in dieser Arbeit zur Identifikation der Ca^{2+}-abhängigen Assoziation von Annexin VI mit Caveolae

und intrazellulären Lipid Rafts (vgl. Kap. 3.3 und 3.8, vgl. Abb. 37). Die Ergebnisse deuten für Annexin VI und Annexin II auf unterschiedliche Membranaffinitäten in den betrachteten Versuchzellen hin. So translozierte bei einer Ca^{2+}-Konzentration von 50 µM Ca^{2+} lediglich ein Teil, bei 250 µM Ca^{2+} dagegen über 50% der membranassoziierten Annexin VI-Proteine aus CHO Anx VI-Zellen in Lipid Rafts- bzw. Caveolae-Membranregionen. Im Gegensatz dazu war für eine vergleichbare Translokation von Annexin II-Proteinen in cholesterinreiche Membranregionen von CHO Anx VI-Zellen eine weitaus höhere Ca^{2+}-Konzentrationen (1 mM) erforderlich. Im Vergleich dazu konnte in Annexin II überexprimierenden CHO Anx II-Zellen erst ab einer Ca^{2+}-Konzentration von 250 µM eine Translokation von Annexin VI in cholesterinreiche Membranregionen nachgewiesen werden. Es translozierte bei dieser Ca^{2+}-Konzentration jedoch deutlich weniger als 50 % Annexin VI in cholesterinreiche Membranregionen (vgl. Kap. 3.3.2).

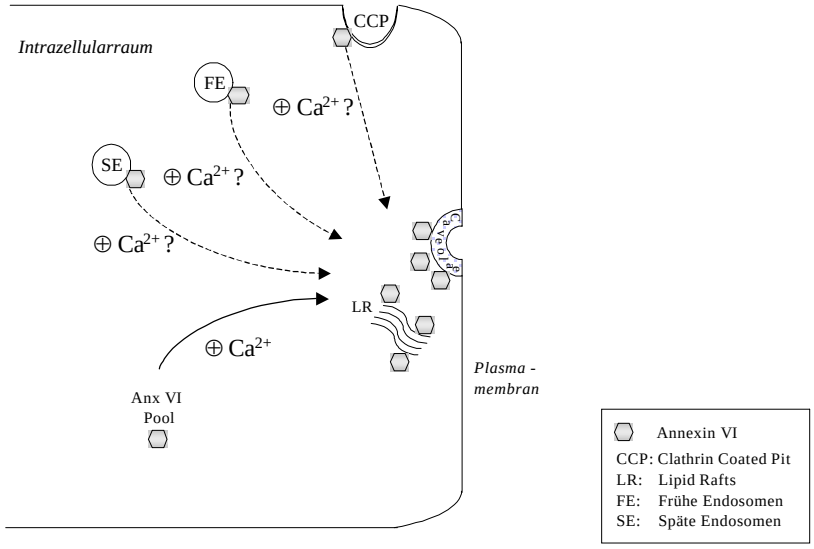


Abb. 37 : Modell der calciumabhängigen Translokation von Annexin VI in cholesterinreiche Membrandomänen
Die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration führt zu einer konsekutiven Translokation von Annexin VI-Proteinen in Lipid Rafts und Caveolae. Neben Annexin VI-Proteinen aus dem freien intrazellulären Annexin VI-Proteinpool ist auch eine Translokation von Annexin VI-Proteinen aus endosomalen Kompartimenten (z.B. Frühe Endosomen, Späte Endosomen oder „Clathrin Coated Pits“) vorstellbar. Steigende Calciumkonzentration (50 µM – 1 mM) führt zudem zu einem signifikanten Abfall der Cholesterinkonzentration in Lipid Rafts/Caveolae-Membranregionen (nicht gezeigt).

Die Ca^{2+}-abhängige Membranassoziation von Annexin VI ließ sich ebenfalls durch Inkubation der Zellen mit EDTA (Ethylendiamin-tetraacetat) bzw. EGTA (Ethylenglykol-bis-N,N,N`,N`-tetraecetat) bestätigen. In diesen Experimenten waren nach Inkubation mit EDTA bzw. EGTA (5 mM) bei allen untersuchten Zelllinien weder Annexin VI noch Annexin II im Bereich Lipid Rafts bzw. Caveolae nachzuweisen (vgl. Kap. 3.3). Mit den Experimenten konnte sowohl für Annexin VI als auch für Annexin II eindrucksvoll die calciuminduzierbare und EDTA-inhibierbare Assoziation mit cholesterinreichen Membrandomänen (Lipid Rafts/Caveolae) aufgezeigt werden. Während Annexin VI und Annexin II in Abhängigkeit von der Ca^{2+}-Konzentration in Lipid Rafts/Caveolae nach-

zuweisen waren, diente die Membranassoziation von Caveolin mit Lipid Rafts/Caveolae als Kontrolle und ließ sich durch Ca^{2+}- oder EDTA-Inkubationen nicht in der Membranaffinität beeinflussen.
Mit der ebenfalls neu etablierten Präparationsmethode von Lipid Rafts und Caveolae nach Brown and Rose (Brown and Rose, 1992) konnten die calciuminduzierbare und EDTA-inhibierbare Assoziation von Annexin VI mit cholesterinreichen Membrandomänen ebenso eindrucksvoll bestätigt werden (vgl. Kap. 3.8). Die parallel durchgeführte Untersuchung mit SR-BI führte zu einem bemerkenswerten Ergebnis. SR-BI wird in der Literatur als ein vermutlich in Caveolae lokalisierter Rezeptor beschrieben (Babitt et al., 1997), der eine wichtige Funktion beim Cholesterin-Efflux übernimmt (Krieger, 1999; vgl. auch Kap. 1.1.4). In den Experimenten des Kapitels 3.8 konnte SR-BI in Annexin VI-überexprimierenden CHO Anx VI-Zellen ausschließlich in Triton X-100 löslichen Bereichen nachgewiesen werden. Das Fehlen von SR-BI in Triton X-100 unlöslichen Fraktionen von CHO Anx VI-Zellen, d.h. in dem Bereich von cholesterinreichen Mebrandomänen, könnte eventuell auf eine veränderte Struktur der Caveolae und einer daraus möglicherweise veränderten Lokalisation von SR-BI in diesen Zellen hindeuten.
Für die Fraktionen des Optiprep®-Gradienten wurden zudem die Cholesterin- und Phospholipid-Verteilung nach Calcium-Inkubation ermittelt (vgl. Kap. 3.3.1). Dabei führte die Ca^{2+}-abhängige Assoziation von Annexin VI und Annexin II zu einer deutlichen Veränderung der Lipid-Komposition von Lipid Rafts bzw. Caveolae, die sich in einer veränderten Cholesterin- und Phospholipid-Verteilung wiederspiegelt (vgl. Abb. 14). Mit zunehmender Höhe der Calcium-Inkubation kommt es hier zu einer signifikanten Abnahme der Cholesterinkonzentration in den Fraktionen der Lipid Rafts und Caveolae, während in den Regionen der „schweren Membranen“ am Boden des Gradienten diese Veränderungen in der Cholesterinkonzentration nach Calcium-Inkubation nicht nachgewiesen werden konnten.
Für *in vitro* Membranassoziationen von Annexinen werden relativ hohe Ca^{2+}-Konzentrationen benötigt (Gerke und Moss, 1997). So waren auch für die *in vitro* Translokation von Annexin VI und Annexin II in Lipid Rafts/Caveolae in unseren Experimenten mit 50 µM - 1 mM relativ hohe Ca^{2+}-Konzentrationen erforderlich (vgl. Kap. 3.3 und 3.8), die vermutlich die verfügbaren intrazellulären „Calcium-Pools“ der Zellen übersteigen. Auf der anderen Seite konnten wir durch eine intrazelluläre Calcium-Mobilisation mit Hilfe von Calcium-Ionophor weder eine Translokation von Annexin VI- noch von Annexin II-Proteinen in Lipid Rafts/Caveolae-Fraktionen im Gradienten beobachten (vgl. Kap. 3.3.4). Allerdings zeigte sich bei den *in vivo* Inkubationen mit Calcium-Ionophor, wie bereits bei den *in vitro* Calcium-Inkubationen (vgl. Kap. 3.3. und 3.8), ein Abfall der Cholesterin-Konzentration in cholesterinreichen Membrandomänen bei allen untersuchten Zelllinien (vgl. Abb. 19). Die Inkubation mit Calcium-Ionophor bewirkt somit eine deutliche Veränderung der Lipid-Komposition in Lipid Rafts/Caveolae. Möglicherweise kommt es durch Calcium-Ionophor lediglich zu einer geringen intrazellulären Calcium-Mobilisation, die nicht ausreicht, um eine Translokation von Annexin VI in Lipid Rafts/Caveolae-Membrandomänen mit den von uns eingesetzten Methoden zu zeigen. Die Einflüsse dieser Inkubation lassen sich somit nur in einer signifikanten Veränderung der Cholesterin-Verteilung in diesen Membranbereichen erkennen, die aber keine Entsprechung in einer veränderten Proteinverteilung für Annexin VI oder Annexin II in den betrachteten Membranbe-

reichen finden. Die Experimente deuten zudem darauf hin, dass weitere Mechanismen bei der Assoziation von Annexin VI mit cholesterinreichen Membrandomänen von Bedeutung sein müssen (Gerke und Moss, 1997). Außerdem besitzt Annexin VI auch einen nicht membranassoziierten Anteil im Zytosol (Grewal et al., 2000; Kamal et al., 1998). Möglicherweise stellt die Cholesterin-abhängige Membranbindung des Calcium-unabhängigen Annexin VI-Pools einen weiteren Mechanismus der Annexin VI-Assoziation mit cholesterinreichen Membrandomänen dar (Gerke und Moss, 1997; Ayala-Sanmartin, 2001).

In den Fraktionen der calciuminkubierten CHO Anx II-Zellen wurden zusätzlich Dynamin und SR-BI-Proteine detektiert. Dabei wiesen Dynamin und SR-BI keine veränderte Lokalisation nach Ca^{2+}-Inkubation auf. Beide Proteine ließen sich unabhängig von der Ca^{2+}-Konzentration ausschließlich am Boden des Gradienten, jedoch nicht in Lipid Rafts/Caveolae-Fraktionen nachweisen (vgl. Kap. 3.3.1 und 3.3.3). Dieser Befund ist bedeutsam, da in der Literatur das Plasmamembran-assoziierte Dynamin als Interaktionspartner von Annexin VI beschrieben wird (vgl. Kap. 1.3) und SR-BI, wie oben erwähnt, ein vermutlich in Caveolae lokalisierter Rezeptor ist (Babitt et al., 1997). Scheinbar hat auch die Annexin II-Überexpression in CHO Anx II-Zellen einen negativen Einfluß auf die Lokalisation von SR-BI in Lipid Rafts und Caveolae. Möglicherweise liegt SR-BI bei den durchgeführten Ca^{2+}-Inkubationen aber auch in einer so geringen Konzentration vor, dass mit der von uns eingesetzten Methode die Nachweisgrenze unterschritten wird. Zudem gelingt mit der dargestellten Präparationsmethode lediglich eine undifferenzierte Extraktion von Lipid Rafts/Caveolae-Fraktionen, sodass durchaus SR-BI-Proteine mit anderen Extraktionsmethoden, d.h. ohne den Einsatz von Triton X-100, nachgewiesen werden könnten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es nach einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration in Lipid Rafts/Caveolae-Membrandomänen zu einer deutlichen Umgestaltung der Proteinverteilung kommt. Annexin VI wie auch Annexin II translozieren calciumabhängig in diese Membrandomänen (vgl. Abb. 37). Gleichzeitig führt die Calcium-Inkubation zu einer veränderten Cholesterin- und Phospholipidkomposition in Lipid Rafts/Caveolae-Membranregionen. Während die C-terminale „Core"-Domäne vermutlich die Ca^{2+}-regulierte Membranaffinität des Annexin VI-Moleküls ermöglicht (Avila-Sakar et al., 1998), könnte über den N-terminalen Bereich die Bindung spezifischer Proteine bewirkt werden, die die subzelluläre Lokalisation und Aktivität des Proteins im Bereich von Lipid Rafts/Caveolae beeinflussen. Dies könnte die Stabilität und strukturelle Integrität von Lipid Rafts und Caveolae beeinflussen und eine wichtige Vorbedingung bei der Etablierung von Proteinkomplexen der Signaltransduktion in Lipid Rafts bzw. Caveolae darstellen (de Camilli et al., 1996). Die *in vitro*- und *in vivo*-Daten unserer Experimente deuten aber auch darauf hin, dass neben einer Ca^{2+}-Freisetzung zusätzliche Mechanismen bei der Assoziation von Annexin VI an Lipide von Lipid Rafts/Caveolae eine Rolle spielen könnten. Diese Vermutung wird auch dadurch gestützt, dass durch *in vivo* Inkubation mit Calcium-Ionophor keine Veränderung der Lokalisation von Annexin VI zu beobachten war (vgl. Kap. 3.3.4). In diesem Zusammenhang könnte neben weiteren Faktoren auch der Cholesteringehalt in den Membranen von Lipid Rafts/Caveolae von Bedeutung sein (Ayala-Sanmartin, 2001).

4.3 Einfluss von Cholesterin auf die Membranaffinität von Annexin VI in Lipid Rafts und Caveolae

Neben der in dieser Arbeit eindrucksvoll gezeigten calciumabhängigen Assoziation von Annexin VI mit cholesterinreichen Membrandomänen, geben neuere Veröffentlichungen Hinweise auf die mögliche Bedeutung von Cholesterin bei der Membranassoziation von Annexinen (Ayala-Sanmartin, 2001; Ayala-Sanmartin et al., 2001). Obwohl Annexin-Proteine, wie bereits in der Einleitung erläutert, nicht direkt an Cholesterin, sondern an benachbarte Phospholipide von Membranen binden können (Ayala-Sanmartin, 2001), beeinflusst Cholesterin scheinbar die Membranaffinität von Annexin-Proteinen (Harder et al., 1997; Ayala-Sanmartin, 2001). Da Caveolae cholesterinreiche Membrandomänen sind, wurde der Einfluss von Cholesterin auf die Membranaffinität von Annexin VI in Lipid Rafts/Caveolae untersucht. Um eine mögliche cholesterinabhängige Membranbindung von Annexin VI-Proteinen in cholesterinreichen Membranregionen zu überprüfen, führten wir verschiedene Experimente mit Digitonin, einem Cholesterin sequestrierenden Detergenz, *in vivo* durch. Durch Inkubation von CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen mit Digitonin (0,5 µg/ml) konnten wir keine cholesterinabhängige Membranaffinität von Annexin VI-Proteinen in Lipid Rafts und Caveolae nachweisen (vgl. Kap. 3.7 und 3.8). Dieser Befund erscheint vor dem Hintergrund der von Ayala-Sanmartin (Ayala-Sanmartin, 2001) erzielten Ergebnisse beachtenswert, da Ayala-Sanmartins Daten auf eine cholesterininduzierbare und zudem calciumabhängige Assoziation von Annexin-Proteinen hindeuten. Die Ergebnisse unserer Versuche weisen dagegen lediglich auf eine Calcium-regulierte Assoziation von Annexin VI-Proteinen mit Lipid Rafts und Cavaolae in CHO Anx VI-Zellen hin (vgl. Kap. 3.8). Möglicherweise lässt sich für Annexin VI-Proteine lediglich eine Cholesterinabhängige Membranbindung im calciumunabhängigen Annexin VI-Pool nachweisen. So zeigte sich in anderen Arbeiten eine Digitoninsensitivität für Annexin VI-Proteine in Endosomen nur nach Vorbehandlung mit EDTA, somit nur für den Ca^{2+}-unabhängigen Annexin VI-Pool (De Diego et al., 2002).

Neuere *in vitro* Studien (Ayala-Sanmartin et al., 2001) weisen auf eine cholesterinabhängige Membranbindung calciumabhängiger Annexin II-Proteine hin. In den Experimenten des Kapitels 3.8 konnte für Annexin II-Proteine eine cholesterinabhängige Bindung auch in Lipid Rafts/Caveolae-Membranregionen von CHO Anx VI-Zellen gezeigt werden. So führte die Inkubation der Zellen mit Digitonin zu einem starken Verlust der Membranaffinität von Annexin II-Proteinen mit Triton X-100 unlöslichen Membranpellets, d.h. in Membranregionen von Lipid Rafts bzw. Caveolae (vgl. Kap. 3.8). In den Experimenten ließen sich die beschriebenen Effekte einer Digitonin-Inkubation für Annexin II aber lediglich in Annexin VI-überexprimierenden CHO Anx VI-Zellen, dagegen nicht in CHO WT Zellen zeigen, da Annexin II in Triton X-100 unlöslichen Pellets von CHO WT Zellen lediglich nach Ca^{2+}-Inkubation nachzuweisen war. Ebenfalls waren Annexin VI-Proteine lediglich in CHO Anx VI-Zellen, dagegen nicht in CHO WT-Zellen in Triton X-100 unlöslichen Membranpellets detektierbar. Möglicherweise führt eine Überexpression von Annexin VI dazu, dass in den betroffenen CHO Anx VI-Zellen mehr Annexin VI-Proteine in Triton X-100 unlöslichen Membranpellets nachzuweisen sind als in CHO WT-Zellen mit ihrer nur geringen endogenen Annexin VI Produktion

(vgl. Kap. 4.1). Als Negativkontrolle diente die Membranassoziation von Caveolin, die sich durch die Inkubation mit Digitonin nicht beeinflussen ließ (König und Gerke, 2000).

Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse auf einen spezifischen Effekt von Cholesterin auf die Membranaffinität von Annexin II-Proteinen in cholesterinreichen Membrandomänen hin. Im Gegensatz dazu zeigt Digitonin in den Versuchen in dieser Arbeit keinen Einfluss auf die Affinität von Annexin VI mit Lipid Rafts bzw. Caveolae (vgl. Kap. 3.8). Dies deutet darauf hin, dass die cholesterinabhängige Interaktion von Annexin VI und Annexin II mit Phospholipiden in Lipid Rafts bzw. Caveolae verschiedenartig reguliert sein könnte oder durch spezifische Faktoren beeinflusst wird. In Endosomen ließ sich eine Digitoninsensitivität für Annexin VI-Proteine nur nach Vorbehandlung mit EDTA, somit nur für den Ca^{2+}-unabhängigen Annexin VI-Pool zeigen (De Diego et al., 2002). Möglicherweise beeinflusst Cholesterin die Membranaffinität von Annexin VI in Caveolae oder Lipid Rafts ebenfalls nur nach EDTA-Vorbehandlung. Zudem könnte Cholesterin im Bereich von Lipid Rafts bzw. Caveolae einen unterschiedlichen Einfluß auf die Membranaffinität der einzelnen Mitglieder der Annexin-Proteinfamilie haben, sodass eine Digitoninsensitivität eventuell nur für Annexin II-Proteine zu zeigen ist.

4.4 Einfluß von Annexin VI auf den HDL-stimulierbaren Cholesterin-Efflux

Der als Cholesterin-Efflux bezeichnete Vorgang der Übertragung von Cholesterin auf Transportmoleküle, wie z.B. lipidarme HDL-Partikel, ist der initiale Schritt im Rahmen des Reversen Cholesterintransports (Barter und Rye, 1996). Caveolae übernehmen als cholesterinreiche Membrandomänen der Plasmamembran eine bedeutende Funktion bei dem Efflux von intrazellulärem Cholesterin auf Transportpartikel, wie z.B. HDL (Fielding und Fielding, 1997; Smart et al., 1996; von Eckardstein et al., 2001). Die Identifikation der Calcium-abhängigen Bindung von Annexin VI an cholesterinreiche Membrandomänen (vgl. Kap. 4.2) und die für Annexin VI beschriebene stabilisierende Funktion in Lipid Rafts bzw. Caveolae (Babiychuk und Draeger, 2000; Orito et al., 2001) sowie die Cholesterin-induzierbare Membranaffinität von Annexin VI (Ayala-Sanmartin, 2001) deuten auf eine mögliche Funktion von Annexin VI im Rahmen des intrazellulären Cholesterin Membrantransportes hin.

Zur Charakterisierung der möglichen regulatorischen Funktion von Annexin VI im Rahmen des HDL-vermittelten Cholesterin-Efflux sind in dieser Arbeit Annexin VI-überexprimierende CHO Anx VI-Zellen und CHO WT-Zellen hinsichtlich des HDL-stimulierbaren Cholesterin-Efflux verglichen worden. Eine Analyse unserer Experimente ergab den Nachweis eines signifikant erniedrigten HDL-stimulierbaren ^{3}H-Cholesterin-Efflux in Annexin VI-überexprimierenden CHO Anx VI-Zellen im Vergleich mit CHO Wildtyp-Zellen (vgl. Kap. 3.9.1). Die Ergebnisse verweisen auf eine inhibitorische Wirkung von Annexin VI bei dem HDL-stimulierten Cholesterin-Efflux in CHO Zellen. Die Abbildungen 38 A und B geben eine modellhafte Interpretation der in den ^{3}H-Cholesterin-Efflux-Studien (vgl. Kap. 3.9.1) gewonnenen experimentellen Daten für die Einflußnahme von Annexin VI auf den HDL-stimulierbaren Cholesterin-Efflux wieder.

(A)

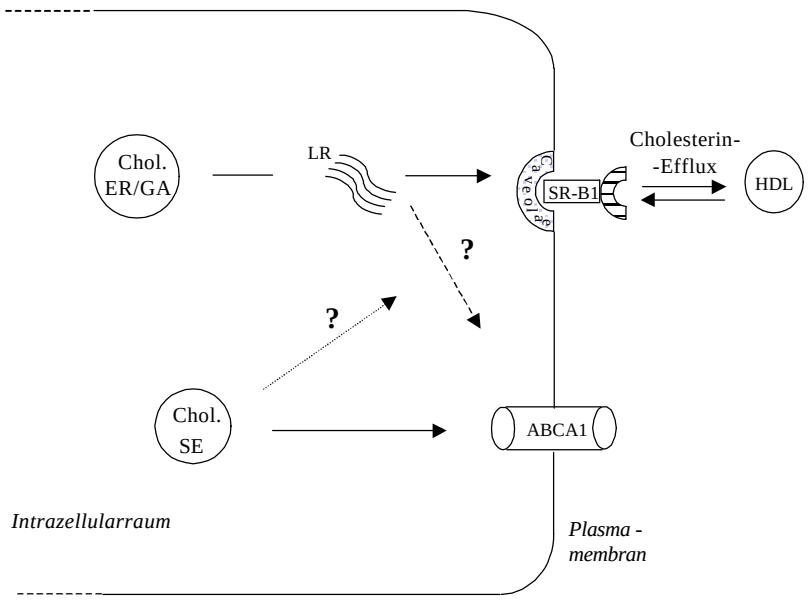


Abb. 38 : Modell für den Einfluss einer Annexin VI-Überexpression auf den HDL-stimulierbaren Cholesterin-Efflux in CHO Anx VI-Zellen
(A) Modell für den Cholesterin-Efflux ohne Annexin VI-Überexpression [vgl. auch Abb. 38 (B), S. 99]: Intrazelluläres Cholesterin kann neben einer Rezeptor-unabhängigen Diffusion unter Vermittlung des HDL-Rezeptors SR-BI oder auch über ABCA1 auf HDL transferiert werden. Über den in Caveolae lokalisierten SR-BI Rezeptor erfolgt vermutlich nach Bindung von HDL-Partikeln eine passive Diffusion von nicht verestertem membranständigen Cholesterin auf HDL-Partikel. Vom ER (Endoplasmatisches Retikulum) und GA (Golgi-Apparat) ausgehend, gelangt Cholesterin in Form von caveolinhaltigen Lipid Rafts zur Zelloberfläche und ist die Voraussetzung für den Efflux von intrazellulärem Cholesterin auf z.B. HDL. Möglicherweise stammt ein Teil des Cholesterins auch aus endosomalen Kompartimenten (z.B. SE - Späte Endosomen). Daneben kann intrazelluläres Cholesterin, vermutlich aus endosomalen Kompartimenten, möglicherweise auch aus dem TGN (GA), unabhängig von SR-BI unter Vermittlung des ABCA1-Transporters die Zelle verlassen.

Intrazelluläres Cholesterin kann, wie bereits in Kapitel 1.1.4 dargestellt, neben einer Rezeptor-unabhängigen Diffusion unter Vermittlung der HDL-Rezeptoren SR-BI (Scavenger-Rezeptor-B1) (Ji et al., 1997) oder ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A type 1) (Rogler et al., 1995) auf Plasma-Akzeptoren wie z.B. HDL transferiert werden (vgl. Abb. 38 A) (von Eckardstein et al., 2001). Über den in Caveolae lokalisierten SR-BI Rezeptor erfolgt vermutlich nach Bindung von HDL-Partikeln eine passive Diffusion von nicht verestertem membranständigen Cholesterin auf HDL-Partikel (Ji et al., 1997). Die Bindung von HDL an SR-BI ermöglicht einen im Vergleich zum ABCA1-Transporter langsamen, bidirektionellen Cholesterinaustausch entlang eines Konzentrationgefälles zwischen HDL-Partikel und den Caveolae der Plasmamembran. Vom ER (Endoplasmatischen Retikulum) und TGN (Trans-Golgi-Netzwerk) ausgehend, gelangt dabei vermutlich Cholesterin in Form von caveolinhaltigen Lipid Rafts zur Zelloberfläche (Liscum und Munn 1999; Simons und Ikonen, 1997) und ist im exozytotischen Membranverkehr die Voraussetzung für den Efflux von intrazellulärem Cholesterin auf extrazelluläre Akzeptoren (Fielding und Fielding, 1997; von Eckardstein et al., 2001). Möglicherweise stammt ein Teil des über SR-BI auf HDL-Partikel transferierten Cholesterins auch aus endosomalen Kompartimenten (z.B. Späte Endosomen). Einen wichtigen Hinweis auf einen derartigen Mechanismus liefert der Nachweis von Annexin VI (vgl. Kap. 3.3) sowie

von Proteinen früher endosomaler Kompartimente in Caveolae (Pol et al., 1999; Schnitzer et al., 1995). Zudem sind umgekehrt in frühen endosomalen Kompartimenten sowohl Caveolin als auch die Caveolin-assoziierten und Annexin-bindenden Proteine $p120^{GAP}$ als auch Raf-1 nachweisbar (Pol et al., 1999; Pol et al., 2000). Daneben kann intrazelluläres Cholesterin unabhängig von SR-BI mit Hilfe eines aktiven, energieabhängigen Cholesterin-Efflux unter Vermittlung des ABCA1-Transporters die Zelle verlassen (von Eckardstein et al., 2001; Orso et al., 2000). Das über den ABCA1-Transporter ausgeschleuste Cholesterin stammt vermutlich aus endosomalen Kompartimenten (Chen et al., 2001), möglicherweise aber auch aus dem TGN (vgl. Abb. 38A).

(B)

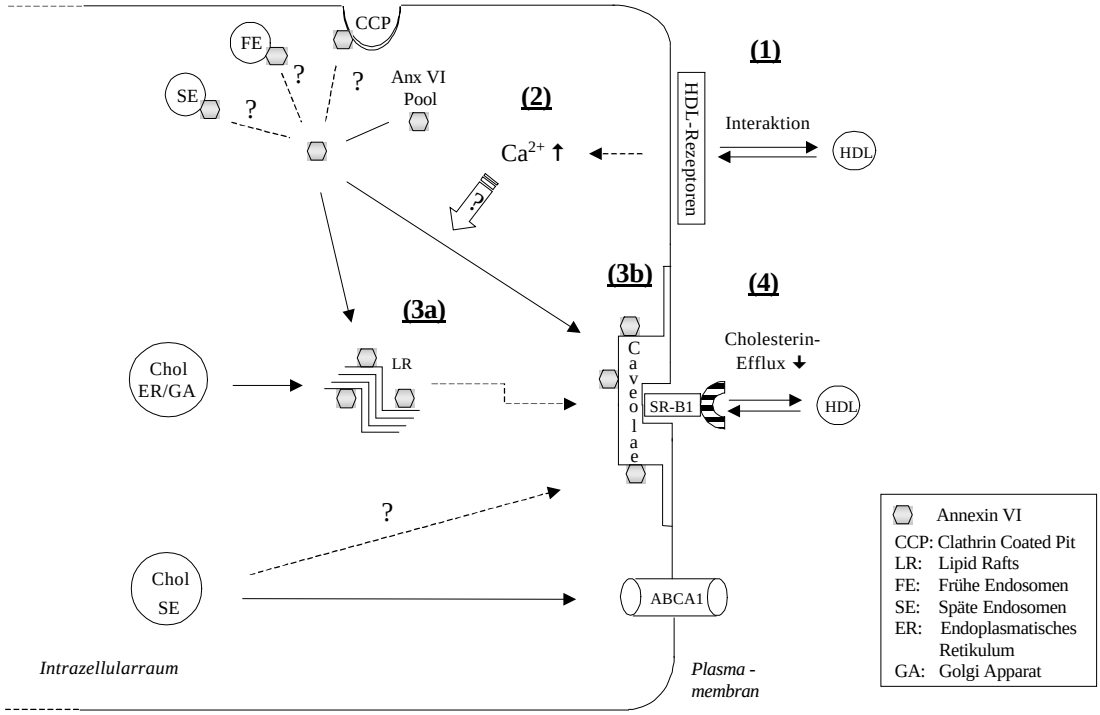


Abb 38 (B): Modell für den Cholesterin-Efflux in Annexin VI überexprimierenden CHO Anx VI-Zellen:
Die Interaktion des HDL-Partikels mit in Caveolae lokalisierten HDL-Rezeptoren (1) führt zur Aktivierung spezifischer Signalketten u. zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration (2). Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration würde zu einer Translokation von Annexin VI aus dem freien Annexin VI-Pool u. aus weiteren intrazellulären Kompartimenten (z.B. CCP, FE, SE) in Lipid Rafts- und Caveolae-Membranregionen führen. Die vermehrte Assoziation von Annexin VI-Proteinen mit cholesterinreichen Membrandomänen in Annexin VI-überexprimierenden Zellen könnte zu einer gestörten Struktur und veränderten Mobilität intrazellulärer Lipid Rafts beitragen (siehe (3a), veränderte Struktur in der Grafik symbolisch eckig dargestellt), sodass unter dem Einfluss einer Überexpression von Annexin VI Cholesterin möglicherweise nicht mehr ausreichend von intrazellulären Kompartimenten (ER bzw. TGN) in Richtung Plasmamembran transportiert werden würde, um über in Caveolae lokalisierte SR-BI Rezeptoren auf z.B. HDL übertragen zu werden. Der reduzierte Transfer von Cholesterin in die Plasmamembran könnte zusätzlich, neben der durch Annexin VI bedingten strukturellen Veränderung der Lipid Rafts, zu einem Verlust der Stabilität der Caveolae beitragen (siehe (3b); symbolisch eckig dargestellt). Die aus einer Überexpression von Annexin VI bedingten strukturellen Veränderungen von Caveolae könnten sich auf die Lokalisation oder Funktionsfähigkeit von HDL-Rezeptoren wie SR-BI negativ auswirken (4). Möglicherweise führt dies zu einer reduzierten Bindung der HDL-Partikel an normalerweise in Caveolae lokalisierte SR-BI-Rezeptoren u. würde den reduzierten Cholesterin-Efflux in Annexin VI-überexprimierenden CHO Anx VI-Zellen gegenüber CHO WT-Zellen erklären.

Abb. 38 B zeigt eine nach den Experimenten dieser Arbeit entwickelte Modellvorstellung für den reduzierten ^{3}H-Cholesterin-Efflux in Annexin VI-überexprimierenden CHO Anx VI-Zellen. Durch

bisher noch nicht vollständig bekannte Mechanismen könnte die Interaktion des HDL-Partikels mit in Caveolae lokalisierten HDL-Rezeptoren (siehe (1) in Abb. 38B) zur Aktivierung spezifischer Signalketten und zu einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration führen (siehe (2) in Abb. 38B). Die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration würde konsekutiv zu einer Translokation von Annexin VI-Proteinen aus dem freien Annexin VI-Pool, aber möglicherweise auch aus weiteren intrazellulären Kompartimenten in Lipid Rafts- und Caveolae-Membranregionen führen. Die vermehrte Assoziation von Annexin VI-Proteinen mit cholesterinreichen Membrandomänen in Annexin VI-überexprimierenden CHO Anx VI-Zellen könnte zu einer gestörten Struktur und veränderten Mobilität intrazellulärer Lipid Rafts beitragen (siehe (3a) in Abb. 38B, in der Grafik symbolisch dargestellt). Da der Cholesterin-Efflux vermutlich die Translokation von Cholesterin aus intrazellulären Kompartimenten in Caveolae voraussetzt (Smart et al., 1996; Uittenbogaard und Smart, 2000), könnte unter dem Einfluss einer Überexpression von Annexin VI Cholesterin möglicherweise nicht mehr in ausreichendem Maße von intrazellulären Kompartimenten wie dem ER bzw. dem Trans-Golgi-Netzwerk mit Hilfe caveolinhaltiger intrazellulärer Lipid Rafts in Richtung Plasmamembran transportiert werden, um dort über in Caveolae lokalisierte SR-BI Rezeptoren auf z.B. HDL übertragen zu werden. Die für die Translokation von Cholesterin in Caveolae der Plasmamembran erforderlichen Signalketten sind noch nicht vollständig verstanden (von Eckardstein, 2001). Neben einer Reihe weiterer Proteine könnte dem cholesterinbindenden Protein Caveolin eine besondere Bedeutung im Rahmen dieses Transfers von intrazellulärem Cholesterin an die Plasmamembran zukommen (Fielding und Fielding 2000; Smart et al., 1996), da das Protein zwischen intrazellulären Strukturen wie dem ER, Golgi-Apparat, intrazellulären Lipid Rafts und Plasmamembran hin- und zurückwandert (Smart et al., 1996). Eine direkte Übertragung des Cholesterins vom Caveolin-Molekül auf HDL-Rezeptoren erscheint dabei nicht wahrscheinlich. Allerdings bildet Caveolin, gemeinsam mit Sphingolipiden, Cholesterin und einer Reihe weiterer kleinerer Lipide wie Ganglioside, Ceramide oder Diacylglycerol (vgl. Tab. 3) das Grundgerüst der Caveolae. Damit könnte Caveolin durch Bereitstellung des gebundenen Cholesterins auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran die Cholesterinkonzentration in Caveolae direkt beeinflussen und somit diese Strukturen mit Cholesterin aus intrazellulären Cholesterinpools versorgen (Fielding und Fielding, 2000). Der verminderte Cholesterin-Efflux in Annexin VI-überexprimierenden CHO Anx VI-Zellen (vgl. Kap. 3.9.1) deutet darauf hin, dass trotz fehlender Ko-Lokalisation von Annexin VI mit Caveolin, Annexin VI an der Regulation des intrazellulären Membranverkehrs von Caveolin und Cholesterin beteiligt ist.

Der auf diese Weise reduzierte Transfer von Cholesterin in die Plasmamembran könnte zusätzlich, neben der durch Annexin VI bedingten strukturellen Veränderung der Caveolae, zu einem Verlust der Stabilität der Caveolae beitragen (siehe (3b) in Abb. 38B; symbolische Darstellung der veränderten Struktur der Caveolae). Der reduzierte Cholesteringehalt in cholesteinreichen Membrandomänen nach Calcium-Inkubation der Experimente des Kapitels 3.3 wäre eventuell auch durch die beschriebenen Veränderungen zu erklären (vgl. Kap. 3.3). Diese Interpretation wird durch Arbeiten gestützt, die bei einem Entzug von Cholesterin eine strukturelle und funktionelle Beeinträchtigung von Caveolae beschreiben (Pike and Miller, 1998; Furuchi und Anderson, 1998). Zudem wird diese Vermutung

unterstrichen durch die Identifikation einer gestörten Struktur der Caveolae in Annexin VI überexprimierenden Zellen (vgl. jüngste Experimente der Arbeitsgruppe Grewal, nicht unveröffentlicht).
Die aus einer Überexpression von Annexin VI bedingten strukturellen Veränderungen von Caveolae könnten sich auf die Lokalisation oder Funktionsfähigkeit von HDL-Rezeptoren wie SR-BI negativ auswirken. Möglicherweise führt dies zu einer reduzierten Bindung der HDL-Partikel an normalerweise in Caveolae lokalisierte SR-BI-Rezeptoren. Die verringerte Bindung von HDL-Partikeln an dann in ihrer Funktionsfähigkeit eingeschränkte oder in geringerem Ausmaße vorhandenen Rezeptoren würde den reduzierten Cholesterin-Efflux in Annexin VI-überexprimierenden CHO Anx VI-Zellen gegenüber CHO WT-Zellen erklären (siehe (4) in Abb. 38B). Auf diese Weise wäre der reduzierte Cholesterin-Efflux für Cholesterin aus dem ER/TGN, aber auch möglicherweise für Cholesterin aus endozytierten Lipoproteinen, das über LDL-Rezeptoren in späte endosomale Kompartimente gelangt, zu erklären. Die Identifikation von Proteinen früher endosomaler Kompartimente in Caveolae (Schnitzer et al., 1995; Pol et al., 1999) sowie umgekehrt die Identifikation Caveolin-assoziierter Proteine in Frühen Endosomen (Pol et al., 1999) spräche für eine derartige Interaktion von endosomalen Kompartimenten und Lipid Rafts bzw. Caveolae.
Die Beteiligung des ABCA1 Transporters am gestörten Cholesterin-Transport und -Efflux in Lipid Rafts/Caveolae von CHO Anx VI-Zellen ist nicht vollkommen ausgeschlossen (Schmitz et al., 2000), muss jedoch aufgrund des fehlenden Nachweises von ABCA1 in Lipid Rafts (Mendez et al., 2001) und ABCA1-Lokalisationsstudien (Neufeld et al., 2001) als unwahrscheinlich angesehen werden. Da in CHO Anx VI-Zellen der HDL-stimulierbare Cholesterin-Efflux lediglich um ca. 10 – 20% gegenüber Wildtypzellen vermindert ist, scheinen CHO Anx VI-Zellen darüberhinaus über alternative Mechanismen zu verfügen, um Cholesterin aus der Zelle zu transferieren. Dies könnte z.B. unter anderem mittels ABCA1-Transporter erfolgen, über den Cholesterin aus Späten Endosomen und Lysosomen (Chen et al., 2001) weiterhin die Zelle verlassen könnte (vgl. Abb. 38B). Möglicherweise ist aber lediglich der Lipid Rafts-vermittelte Transport von Cholesterin aus dem TGN über intrazelluläre Lipid Rafts in Caveolae in Annexin VI-überexprimieren CHO Anx VI-Zellen reduziert und die Zellen können weiterhin Cholesterin aus endosomalen Kompartimenten über Caveolae auf HDL-Partikel übertragen.

Die inhibitorische Wirkung von Annexin VI auf den HDL-stimulierbaren Cholesterin-Efflux wird weiterhin durch die Experimente des Kapitels 3.9.2 unterstrichen. Hier konnte der HDL-stimulierbare ^{3}H-Cholesterin-Efflux in CHO Anx VI- und CHO WT-Zellen bei Kultivierung in EDTA-angereichertem Nährmedium vergleichsweise zu nicht EDTA-inkubierten Kontrollzellen gesteigert werden. Da Annexin VI Ca^{2+}-abhängig an Phospholipide binden kann (vgl. Kap. 1.3), könnte die EDTA-abhängige Steigerung des ^{3}H-Cholesterin-Efflux möglicherweise als Effekt der verringerten Annexin VI-Affinität mit Lipid Rafts/Caveolae interpretiert werden. Der EDTA-abhängige Ca^{2+}-Entzug würde somit zu einer reduzierten Affinität der Annexin VI-Proteine mit Lipid Rafts/Caveolae-Membrandomänen führen und den gesteigerten Cholesterin-Efflux nach EDTA-Inkubation erklären. Abbildung 39 zeigt ein mögliches Modell für diese Effekte. Zudem wiesen auch

in diesen Experimenten CHO Anx VI-Zellen unter allen Inkubationsbedingungen signifikant erniedrigte Cholesterin-Efflux-Raten gegenüber CHO Wildtyp-Zellen auf.

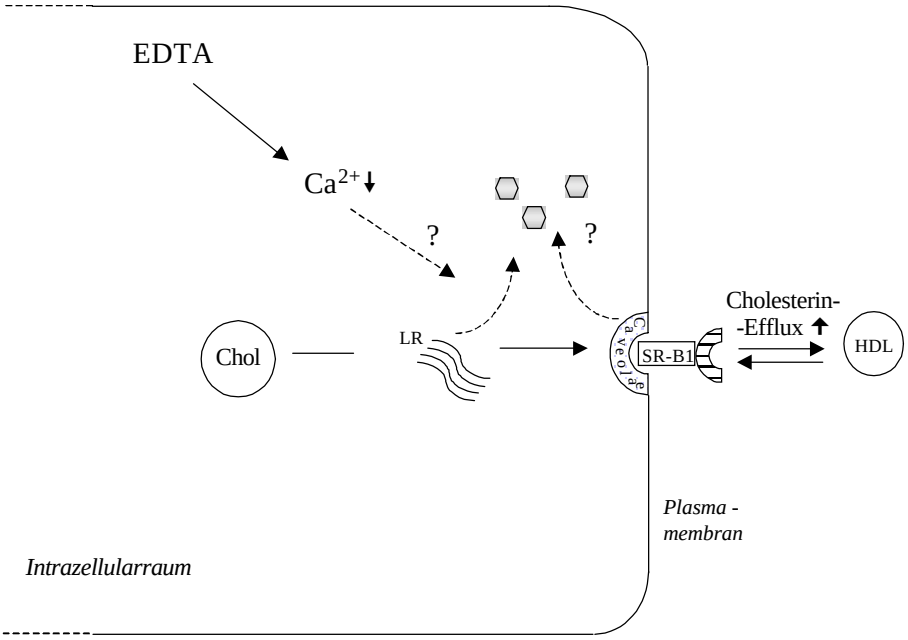


Abb. 39 : Modell für den Einfluß von EDTA auf den HDL-stimulierbaren Cholesterin-Efflux
In den Experimenten des Kapitels 3.9.2 konnte der HDL-stimulierbare ^{3}H-Cholesterin-Efflux in CHO Anx VI- und CHO WT-Zellen bei Kultivierung in EDTA-angereichertem Nährmedium vergleichsweise zu nicht EDTA-inkubierten Kontrollzellen gesteigert werden. Abb. 39 zeigt ein mögliches Modell für diesen Effekt in graphischer Darstellung. Da Annexin VI Ca^{2+}-abhängig an Phospholipide binden kann, könnte die EDTA-abhängige Steigerung des ^{3}H-Cholesterin-Efflux möglicherweise als Effekt der verringerten Annexin VI-Affinität mit Lipid Rafts/Caveolae interpretiert werden. Der EDTA-abhängige Ca^{2+}-Entzug würde somit zu einer reduzierten Affinität der Annexin VI-Proteine mit Lipid Rafts/Caveolae-Membrandomänen führen und den gesteigerten Cholesterin-Efflux nach EDTA-Inkubation erklären.

Der geringere Cholesterin-Efflux von CHO Anx VI-Zellen (vgl. Kap. 3.9) wurde zudem daraufhin untersucht, ob eine Annexin VI-Überexpression einen Einfluss auf die Verteilung von Annexin VI, Annexin II, SR-BI, Caveolin oder auf die Cholesterinverteilung nach Inkubation mit Lipoproteinen (HDL, LDL) besitzt. Diverse Arbeiten konnten für SR-BI und Caveolin (Fielding und Fielding, 2000; Babitt et al., 1997) ein cholesterinabhängiges Expressionsmuster nachweisen. Zudem ist für Annexin VI eine Cholesterin-vermittelte Erhöhung der Membranbindung beschrieben worden (Ayala-Sanmartin, 2001). In diesen Experimenten wurden die Zellen mit HDL und LDL (ohne den Einsatz von ^{3}H-Cholesterin) beladen und nach Proteinextraktion, Lipid Rafts-Präparation und anschließender Western Blot-Analyse entweder die Proteinverteilung oder die Cholesterin-verteilung ermittelt. Dabei zeigte eine differenzierte Analyse der Verteilung von Annexin VI, Annexin II und Caveolin in Lipid Rafts bzw. Caveolae nach einer Stimulation des Cholesterin-Efflux durch HDL-Inkubation der Zellen (vgl. Kap. 3.4.1) keine Veränderung in der Verteilung von Annexin VI, Annexin II oder Caveolin in Fraktionen von Lipid Rafts/Caveolae im Gradienten. In einer Reihe weiterer Experimente (vgl. Kap. 3.4, 3.5 und 3.6) wurde die Cholesterin-Verteilung in den Fraktionen der cholesterinreichen Membrandomänen nach LDL- oder HDL-Inkubation der Zellen untersucht. In

diesen Experimenten ließen sich bei allen untersuchten Zelllinien keine signifikanten und eindeutig zu interpretierenden Veränderungen in der Cholesterin-Konzentration im Bereich der cholesterinreichen Membranen zeigen. Eine Erklärung dafür könnte darin begründet liegen, dass die Zellen nach LDL- oder HDL-Inkubation ihre endogene Cholesterin-Synthese anpassen. Somit konnten in diesen Experimenten ohne den Einsatz von ^{3}H-Cholesterin keine signifikanten Veränderungen in der Cholesterin-Konzentration ermittelt werden. Für weitere Experimente würde sich auch hier der Einsatz von radiaktiv markiertem Cholesterin anbieten.

4.5 Bedeutung von Lipid Rafts bzw. Caveolae im Rahmen des Cholesterin-Efflux

In diesen Experimenten konnten wir durch HDL-Inkubation von zuvor mit ^{3}H-Cholesterin-LDL beladenen CHO WT-Zellen eine Mobilisierung von ^{3}H-Cholesterin aus mindestens zwei intrazellulären Cholesterinpools beobachten (vgl. Kap. 3.9.3). In den Efflux-Studien war dabei der HDL-stimulierte Cholesterin-Efflux im Bereich Triton X-100 löslicher Membranen („schwere Membranen“ Fraktionen 6 – 9 im Gradienten) nach wenigen Stunden durch längere HDL-Inkubation nicht weiter zu stimulieren. Im Gegensatz dazu zeigte der HDL-vermittelte Cholesterin-Efflux aus Lipid Rafts bzw. Caveolae mit zunehmender zeitlicher HDL-Inkubation eine kontinuierliche Zunahme.

Die Übertragung intrazellulären und membranständigen Cholesterins auf extrazelluläre Akzeptoren wie z.B. HDL erfolgt, wie bereits erläutert (vgl. Kap. 1.1.4 und 4.4), neben einer Rezeptor-unabhängigen Diffusion unter Vermittlung von HDL-Rezeptoren wie SR-BI (Ji et al., 1997; Krieger, 1999) und ABCA1 (Orso et al., 2000; Wang et al., 2001). Die experimentell ermittelten Daten zeigen für beide Membranbereiche eine unterschiedliche Beteiligung am HDL-vermittelten ^{3}H-Cholesterin-Efflux. Möglicherweise reflektiert dies zwei verschiedenartige Funktionsmechanismen des HDL-stimulierbaren Efflux von Cholesterin in CHO Zellen in Form eines aktiven und eines passiven Transfers von intrazellulärem Cholesterin auf extrazelluläre Akzeptoren. Die experimentellen Daten für die Fraktionen der cholesterinreichen Membrandomänen sprechen mit einem kontinuierlichen und nur langsam saturierbaren Austritt von Cholesterin aus Lipid Rafts bzw. Caveolae für eine passive und möglicherweise SR-BI-vermittelte Diffusion von Cholesterin aus Caveolae auf HDL-Partikel. Neben der oben angeführten Rezeptor-unabhängigen Diffusion ist sowohl eine passive als auch eine bidirektionale Diffusion von Cholesterin für den SR-BI Rezeptor (Scavenger-Rezeptor-BI) beschrieben worden (Ji et al., 1997; Mendez, 1997; Trigatti et al., 2000). Die von Babitt nachgewiesene Lokalisation von SR-BI in Caveolae deutet auf einen derartigen Mechanismus hin (Babitt et al., 1997). Die Deutung des reduzierten Cholesterin-Efflux in CHO Anx VI-Zellen vergleichsweise zu CHO WT-Zellen als eine Folge einer gestörten Struktur der Caveolae und Lipid Rafts und einer daraus veränderten Lokalisation des normalerweise in Caveolae lokalisierten SR-BI-Rezeptors (vgl. Kap. 4.4; 3.9.1), könnte somit durch diese Ergebnisse gestützt werden. Zudem scheinen die experimentellen Daten des Kapitels 3.8.2 diese Annahme ebenfalls zu bestätigen, da in diesen Experimenten SR-BI nicht in Triton X-100 unlöslichen Fraktionen von CHO Anx VI-Zellen nachgewiesen werden konnte. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass der Nachweis von SR-BI in Caveolae auf Experimenten mit Detergenz-freien Präparationen beruht (Babitt et al., 1997). Die von uns in Kapitel

3.8.2 beschriebenen Western Blot-Analysen erfolgten unter Einsatz von Triton X-100 und lieferten möglicherweise auch aus diesem Grund keinen Nachweis von SR-BI in Triton X-100 unlöslichen Membranfraktionen von CHO Zellen, da SR-BI mittels Western Blot-Analyse möglicherweise nur aus Detergenz-freien Präparationen zu identifizieren ist. Die Efflux-Daten der bodennahen Fraktionen des Gradienten (vgl. Kap. 3.9.3), in denen sich u.a. Strukturen von z.B. Plasmamembran oder Golgi-Apparat finden lassen, sprechen dagegen mit ihrem nach wenigen Stunden nicht weiter stimulierbaren Cholesterin-Efflux eher für einen nicht über SR-BI vermittelten Efflux-Mechanismus.

Der HDL-stimulierte Cholesterin-Efflux als Teil des Reversen Cholesterin Transports (RCT) setzt eine HDL-vermittelte Mobilisierung von Cholesterin aus intrazellulären Cholesterinpools voraus. Die dafür verantwortlichen Signalketten sind noch nicht vollständig aufgedeckt (von Eckardstein et al., 2001). Möglicherweise sind Aktivierungsmechanismen von p21-Ras Signaltransduktionsmechanismen in Lipid Rafts/Caveolae von entscheidender Bedeutung (von Eckardstein et al., 2001). Die Interaktion von HDL mit HDL-Rezeptoren scheint zunächst die wesentliche Voraussetzung für die Translokation von intrazellulärem Cholesterin in Richtung Plasmamembran zu sein (Fielding und Fielding 2000; von Eckardstein, 2001). Die den Cholesterin-Efflux stimulierende Interaktion des HDL-Partikels mit HDL Rezeptoren (Mendez et al., 1991) führt neben einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration (Pörn et al., 1991) und einer Aktivierung der Proteinkinasen A und C (von Eckardstein et al., 2001) auch zu einer HDL-induzierten Aktivierung p21-Ras abhängiger MAP Kinasen (Deeg et al., 1997). Aus diesem Grunde wurde neben Annexin VI zusätzlich die Lokalisation von p21-Ras und dem p21-Ras regulatorischen Protein $p120^{GAP}$ (GTPase aktivierendes Protein) experimentell bearbeitet (Chow et al., 2000). Es sollte vor allem die für Annexin VI beschriebene Interaktion mit $p120^{GAP}$ (Chow and Gawler, 1999) und die für p21-Ras beschriebene Interaktion mit in Caveolae assoziierten Caveolin-Proteinen (Song et al., 1996) studiert werden. Dabei ließen sich im Ausgangszustand beide Proteine ausschließlich in Triton X-100 löslichen Fraktionen von CHO Anx VI-Zellen nachweisen (vgl. Kap. 3.8.2). Zudem konnten wir durch eine Variation der Ca^{2+}-Konzentration *in vitro* (50 µM) oder nach Ca^{2+}-Entzug mit EDTA (5 mM) für p21-Ras wie für $p120^{GAP}$ keine Veränderung in der Lokalisation beobachten (vgl. Kap. 3.8.2). Damit konnten Hinweise aus neuesten Arbeiten, die darauf hindeuten, dass Annexin VI möglicherweise an der Steuerung der Formation und Aktivität p21-Ras abhängiger Signaltransduktionsmechanismen in Lipid Rafts/Caveolae beteiligt ist, nicht bestätigt werden. Jedoch deuten diese Arbeiten darauf hin, dass Annexin VI die Translokation von Regulatoren (z.B. $p120^{GAP}$) und Effektoren (z.B. Raf-1) der p21-Ras Kinase regulieren könnte (Pons et al., 2001b). So ist in Annexin VI-überexprimierenden CHO Anx VI-Zellen vermutlich die Aktivierung des MAP Kinaseweges durch p21-Ras, aufgrund der vermehrten Interaktion von Annexin VI mit dem p21-Ras regulatorischen Protein $p120^{GAP}$ und der dadurch reduzierten GTP-Produktion, inhibiert (Pons et al., 2001b).

Zusammengefaßt fungieren Lipid Rafts und Caveolae somit als ein zentrales regulatorisches Element im intrazellulären Cholesterin Membranverkehr (Uittenbogaard et al., 2000). Cholesterin kann dabei Lipid Rafts- und Caveolin-vermittelt zur Plasmamembran transportiert werden und die Zelle über plasmamembranständige Caveolae verlassen, um auf extrazelluläre Akzeptoren übertragen werden. Dabei deuten die Ergebnisse auf eine erhebliche Beteiligung von Lipid Rafts bzw. Caveolae am pas-

siven, über den Scavenger Rezeptor-B1 (SR-BI) vermittelten Cholesterin-Efflux hin. Zudem scheint Annexin VI an der Regulation von p21-Ras Signaltransduktions-mechnismen in cholesterinreichen Membrandomänen beteiligt zu sein.

4.6 Ausblick

Um das Verständnis der Funktion von Annexin VI in cholesterinreichen Membrandomänen und im Rahmen des Cholesterin Efflux zu erweitern, ist es von Interesse, Zusammenhänge zwischen Annexin VI, endosomalen Kompartimenten, intrazellulären Lipid Rafts/Caveolae und Signaltransduktionsmechanismen in cholesterinreichen Membrandomänen weiter aufzuklären. In diesem Zusammenhang sind die Ermittlung zusätzlicher Bindungspartner von Annexin VI in Lipid Rafts und Caveolae sowie die für den Cholesterin-Efflux relevanten Transportsysteme von Bedeutung. Auch die Kenntnis möglicher Interaktionen zwischen cholesterinreichen Membrandomänen und endosomalen Kompartimenten ist ein weiterer Ansatzpunkt für künftige Forschungsaktivitäten. Insbesondere erscheint die Untersuchung der Funktion von Annexin VI in p21-Ras Signaltransduktionsmechanismen in cholesterinreichen Membrandomänen ein Ausgangs-punkt für weitergehende Untersuchungen. Diesbezüglich und zur weiteren Klärung der Funktion von Annexin VI im Rahmen des Cholesterin-Efflux und des intrazellulären Cholesterintransports bietet sich der experimentelle Einsatz von Annexin VI „Knock-out"-Mäusen" an, um auch eine *in vivo* Beteiligung von Annexin VI an der Regulation dieser Prozesse zu prüfen. Die Ergebnisse werden zeigen, in welche Proteininteraktionen und Signalketten Annexin VI in Caveolae bzw. Lipid Rafts eingebunden ist.

5 Zusammenfassung

Die Experimente dieser Arbeit zeigen, dass Annexin VI mit den cholesterinreichen Membranen von Lipid Rafts und Caveolae interagieren kann. Im ersten Teil dieser Arbeit konnten zwei Methoden zur Isolierung von Lipid Rafts und Caveolae erfolgreich etabliert werden. Sowohl die Methode zur Präparation von Lipid Rafts und Caveolae im diskontinuierlichen Optiprep®-Gradienten als auch die Triton X-100-Solubilisation nach Brown und Rose ließen sich in den Experimenten erfolgreich und reproduzierbar einsetzen. Die Charakterisierung von Lipid Rafts und Caveolae führte zur Identifikation der calciumabhängigen Assoziation von Annexin VI an cholesterinreiche Membrandomänen. Auf dieser Grundlage konnte ein Modell für die calciumabhängige Translokation von Annexin VI in cholesterinreiche Membrandomänen entwickelt werden. Neben dem Einfluss von Calcium galt das Interesse auch der Bedeutung von Cholesterin für die Membranbindung von Annexin VI mit cholesterinreichen Membrandomänen. In den Experimenten mit Digitonin-Inkubationen der Versuchszellen zeigte sich keine cholesterinabhängige Membranaffinität von Annexin VI mit Lipid Rafts/Caveolae. In vergleichenden Analysen von Wildtyp CHO Zellen mit Annexin VI überexprimierenden CHO Zellen (CHO Anx VI) nach HDL- oder LDL-Inkubationen ergaben sich keine signifikanten Veränderungen in der Cholesterinverteilung in Lipid Rafts und Caveolae Membranregionen. Es konnte jedoch für Annexin II eine sowohl calciuminduzierbare als auch cholesterinabhängige Membranaffinität in Lipid Rafts/Caveolae nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die mögliche Funktion von Annexin VI beim HDL-vermittelten Cholesterin-Efflux untersucht. In diesen Experimenten mit ^{3}H-Cholesterin-LDL beladenen CHO Zellen gelang der Nachweis eines signifikant erniedrigten HDL-induzierten ^{3}H -Cholesterin-Efflux in CHO Anx VI im Vergleich zu CHO Wildtypzellen. In ^{3}H -Cholesterin-Efflux-Studien mit EDTA-Zusatz konnte in Annexin VI überexprimierenden Zellen zudem ein tendenziell calciumabhängiger Cholesterin-Efflux nachgewiesen werden.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der Experimente darauf hin, dass Annexin VI calciumabhängig mit Proteinen in Lipid Rafts (Caveolae) interagieren kann und an der Regulation des HDL-vermittelten Cholesterin-Efflux sowie dem Cholesterin Membrantransport in Caveolae entscheidend beteiligt ist.

6 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABCA1	ATP-Binding Cassette Transporter AI
ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
ALLN	N-Acatyl-Leucyl-Leucyl-Norleucinal
Anx	Annexin
AP	Adaptor-Protein
AP2	Adaptor-Protein 2
Apo	Apolipoprotein
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktoren
ATP	Adenosinnukleotidtriphosphat
BHK	Baby Hamster Kidney
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca^{2+}	Calcium
cAMP	3´,5´-cyclo-Adenosinmonophosphat
Cav	Caveolin
CCP	Clathrin Coated Pit
CCV	Clathrin Coated Vesikel
CE	Cholesterinester
CHO	Chinese Hamster Ovary
Chol	Cholesterin
CLIP	Cytoplasmic linker protein
COP	Coat Protein
CP	Coated Pit
Cpm	Counts per minute
CURL	Compartment of Uncoupling of Receptors and Ligands
d	Dichte
DAG	Diacylglycerol
Del	Delta
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
Dyn	Dynamin
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECV	Endosomale Carrier Vesikel
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGF-R	EGF-Rezeptor
EGTA	Ethylenglykol-bis-N,N,N`,N`-tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FC	Freies Cholesterin
FCS	Fetal Calf Serum
ff.	fortfolgende
GA	Golgi-Apparat
GAP	GTPase Activating Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosinnukleotidtriphosphat
GTPase	GTP spaltendes Enzym
h	Stunden
^{3}H	Tritium
HDL	High Density Lipoprotein
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethanolsulfonsäure

HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase
HRP	Horseradish Peroxidase
HTGL	Hepatic Triglyceride Lipase
IDL	Intermediate Density Lipoproteins
IP3	Inositol-Triphosphat
Kap.	Kapitel
kDa	Kilo Dalton
LAMP	Lysosome associated membrane protein
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-R	LDL-Rezeptor
LE	Late Endosomes
LPDS	Lipoprotein deficient serum
Lpg120	Lysosomal glykoprotein 120
LPL	Lipoprotein Lipase
LRP	LDL-R related protein
Lys	Lysosomen
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MES	2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid
Min	Minute
MVB	Multivesicular Bodies
NCEH	neutrale Cholesterinesterhydrolase
NPC	Niemann-Pick-Erkrankung Typ C
NPC1	Niemann-Pick-Erkrankung Typ C Protein 1
NSF	N-Ethylmaleimide sensitive fusion protein
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Plateled Derives Growth Factor
Pel	Pellet
PIC	Proteinase Inhibitor Cocktail
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
ρ	Dichte
RC	Recycling Compartment
RCT	Reverse Cholesterol Transport
RRC	Receptor Recycling Compartment
SDS	Natrium Dodecylsulfat
SE	Späte Endosomen
SNAP	Soluble NSF Attachment Protein
SNARE	SNAP Rezeptor
SR-BI	Scavenger Rezeptor BI
SRE	Sterol responsive elements
ß-Met	ß-Mercaptoethanol
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloracetic acid
TD	Tangier Disease
TGN	Trans Golgi Apparat
Tris	Trishydroxyaminomethan
t-SNARE	Target SNAP-Receptor
TX-100	Triton X-100
U/min	Umdrehungen pro Minute
Vgl.	Vergleiche
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
v-SNARE	Vesicle SNAP-Receptor

WB	Western Blot
WT	Wildtyp

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abb. 1 : Grundentwurf der Rezeptor-vermittelten Endozytose von LDL nach Brown und Goldstein 6
Abb. 2 : Modell des strukturellen Aufbaus von Caveolae 17
Abb. 3 : Struktur der Annexine 25
Abb. 4 : Schematische Darstellung des Annexin VI-Moleküls 31
Abb. 5 : Proteinexpression und Cholesterinkonzentration in CHO WT-Zellen nach Lipidbeladung 54
Abb. 6 : Proteinexpression und Cholesterinkonzentration in CHO Anx II-Zellen nach Lipidbeladung 56
Abb. 7 : Proteinexpression und Cholesterinkonzentration in CHO Anx VI-Zellen nach Lipidbeladung 56
Abb. 8 : Vergleichende Darstellung der Cholesterinkonzentrationen der Experimente der Abb. 5 bis 7 57
Abb. 9 : Charakterisierung der SR-BI-Expression nach LDL-, HDL- und LPDS-Beladung 58
Abb. 10 : Annexin VI-, Annexin II-, Caveolin- und SR-BI-Expression in CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen nach HDL-Inkubation 59
Abb. 11 : Annexin VI-, Annexin II-, Caveolin- und SR-BI-Expression in CHO Anx II-Zellen nach HDL-Inkubation 60
Abb. 12 : Lipid Rafts/Caveolae-Präparation von CHO Anx VI-Zellen 62
Abb. 13 : Calciumabhängige Verteilung von Annexinen in Lipid Rafts/Caveolae von CHO Anx VI-Zellen 63
Abb. 14 : Cholesterin- und Phospholipid-Verteilung in CHO Anx VI-Zellen nach Calcium-Inkubation 64
Abb. 15 : Calciumabhängige Verteilung von Annexinen in Lipid Rafts/Caveolae von CHO Anx II-Zellen 65
Abb. 16 : Einfluss von Calcium auf die intrazelluläre SR-BI-Verteilung in CHO Anx II-Zellen 67
Abb. 17 : Annexin VI- und II-Verteilung in CHO Anx II- und CHO Anx VI-Zellen nach Inkubation mit Calcium-Ionophor 68
Abb. 18 : Annexin VI- und II-Verteilung in CHO Anx VI- und CHO WT-Zellen nach Inkubation mit Calcium-Ionophor 69
Abb. 19 : Cholesterin-Verteilung nach Inkubation mit Calcium-Ionophor in CHO WT-, CHO Anx VI- und CHO Anx II-Zellen 70
Abb. 20 : Relative Cholesterin-Verteilung in Lipid Rafts/Caveolae und „schweren Membranen“ von CHO WT-, CHO Anx VI- und CHO Anx II-Zellen 70
Abb. 21 : Einfluss von HDL_3 auf die Lokalisation von Annexin VI, Annexin II und Caveolin 72
Abb. 22 : Cholesterinverteilung in CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen nach 5 –15 min HDL_3-Inkubation 73
Abb. 23 : Relative Cholesterinverteilung nach 5 – 15-minütiger HDL_3-Inkubation 73
Abb. 24 : LDL-Einfluss auf die Cholesterinverteilung in CHO WT-, CHO Anx VI- und CHO Anx II-Zellen 74
Abb. 25 : Relative Cholesterinverteilung nach LDL-Inkubation 75
Abb. 26 : Cholesterinverteilung in Lipid Rafts/Caveolae nach HDL_3-induziertem Cholesterin-Efflux 76
Abb. 27 : Relative Cholesterinverteilung nach HDL_3-Inkubation 78
Abb. 28 : Verteilung von Annexinen in Lipid Rafts/Caveolae nach Digitonin-Inkubation 78
Abb. 29 : Cholesterin-Verteilung in den Fraktionen 1 – 6 ohne und nach Digitonin-Inkubation 79

Abb. 30 : Calcium- und cholesterinabhängige Lokalisation von Annexinen in Triton X-100 unlöslichen Membranen von CHO Anx VI-Zellen 80
Abb. 31 : Calcium- und cholesterinabhängige Lokalisation von Annexinen in Triton X-100 unlöslichen Membranen von CHO WT-Zellen. 81
Abb. 32 : Einfluss von Calcium und Cholesterin auf die Lokalisation von $p120^{GAP}$, SR-BI und p21-Ras in CHO Anx VI-Zellen 83
Abb. 33 : Calciumabhängige Lokalisation von Annexin VI in Triton X-100 unlöslichen Membranen von CHO Anx VI-Zellen. 84
Abb. 34 : Vergleich des HDL-stimulierbaren Cholesterin-Efflux in CHO WT-, CHO Anx VI- und CHO Anx II-Zellen 87
Abb. 35 : Vergleich des HDL_3 -induzierten Cholesterin-Efflux in CHO WT- und CHO Anx VI-Zellen nach EDTA-Inkubation 88
Abb. 36 : ^{3}H-Cholesterin-Verteilung in CHO WT-Zellen nach HDL_3-Inkubation 90
Abb. 37 : Modell der calciumabhängigen Translokation von Annexin VI in cholesterinreiche Membrandomänen 93
Abb. 38 : Modell für den Einfluss einer Annexin VI-Überexpression auf den HDL-stimulierbaren Cholesterin-Efflux in CHO Anx VI-Zellen 98
Abb. 39 : Modell für den Einfluß von EDTA auf den HDL-stimulierbaren Cholesterin-Efflux 102

Tabellen:

Tab. 1: Serumlipoproteineinteilung nach Ultrazentrifugation 2
Tab. 2: Kennzeichen endosomaler Kompartimente 7
Tab. 3: Spezifische Lipid- und Proteinzusammensetzung in Caveolae 19
Tab. 4: Intrazelluläre Lokalisation der Annexine 27

8 Literaturverzeichnis

Acton S, Rigotti A, Landschultz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. Science 271: 518 - 520

Anderson HA, Chen Y, Norkin LC (1996) Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membranes domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. Mol Biol Cell 7: 1825 – 1834

Anderson RG, Kamen BA, Rothberg KG, Lacey SW (1992) Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. Science 255: 410 – 411

Anderson RGW (1993) Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. Proc Natl Acad Sci USA 90: 10909 – 10913

Anderson RGW (1993) Potocytosis of small molecules and ions by caveolae.Trends Cell Biol 3: 69 - 72

Anderson RGW (1998) The caveolae membrane system. Annu Rev Biochem 67: 199 - 225

Anderson RGW, Brown MS, Beisiegel U, Goldstein JL (1982) Surface distribution and recycling of the LDL receptor is visualized by anti-receptor antibody. J Cell Biol 93: 523 - 531

Anderson RGW, Brown MS, Goldstein JL (1977) Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. Cell 10: 351 – 364

Anderson RGW, Goldstein JL, Brown MS (1976) Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their abcence in cells from a familial hypercholesterolemia homocygote. Proc Natl Acad Sci USA 73: 2434 - 2438

Ando Y, Imamura S, Hong YM, Owada MK, Kakunaga T, Kannagi R, (1989). Enhancement of calcium sensitivity of lipocortin I in phospholipid binding induced by limited proteolysis and phosphorylation at the amino terminus as analysed by phospholipid affinity column chromatography, J Biol Chem 264: 6948 – 6955

Aniento F, Gu F, Parton RG, Gruenberg J (1996) An endosomal ß-COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes. J Cell Biol 133: 29 – 41

Aunis D, Bader MF (1988) The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. J Exp Biol 139: 253 – 266

Avila-Sakar AJ, Creutz CE, Kretsinger RH (1998) Crystal structure of bovine annexin VI in a calcium-bound state. Biochim Biophys Acta 1387: 103 – 116

Ayala-Sanmartin J (2001) Cholesterol enhances phospholipid binding and aggregation of Annexins by their core domain. Biochim Biophys Res Comm 283: 72 – 79

Ayala-Sanmartin J, Henry JP, Pradel LA (2001) Cholesterol regulates membrane binding and aggregation by annexin 2 at submicromolar Ca^{2+} concentrations. Biochim Biophys Acta 1510: 18 – 28

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

Babiychuk EB, Draeger A (2000) Annexins in cell membrane dynamics; Ca^{2+}-regulated association of lipid microdomains. J Cell Biol 150: 1113 – 1123

Babiychuk EB, Palstra RJ, Schaller J, Kämpfer U, Draeger A (1999) Annexin VI participates in the formation of a reversible, membrane-cytoskeleton complex in smooth muscle cells. J Biol Chem 274: 35191 – 35195

Babiychuk VS, Draeger A, Babiychuk EB (2000) Smooth muscle actinomysin promotes Ca^{2+}-dependent interactions between annexin VI and detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membrane domains. Acta Biochim Pol 47: 579 – 589

Bandorowicz J, Pikula S, Sobota A (1992) Annexin IV (p32) and VI (p68) interact with erythrocyte membrane in a calcium-dependent manner. Biochin Biophys Acta 1105: 201 – 206

Barter JP, Rye KA (1996) Molecular mechanisms of reverse cholesterol transport. Curr Opin Lipid 7: 82 – 87

Barter P (1993) High-density Lipoproteins and reverse cholesterol transport. Curr Opin Lipid 4/3: 210 – 217

Beisiegel U (1995) Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role inlipoprotein metabolism. Curr Opin Lipidol 6: 117 – 122

Beisiegel U, Krapp A, Weber W, Olivecrona G (1994) The role of $alpha_2$M receptor/LRP in chylomicron remnant metabolism. In: Borth W, Feinmann RD, Gonias SL, Quigley JP, Strickland DK (ed) Biology of $alpha_2$macroglobin, its receptor and related proteins. Annals of New York Acadamy of Science. Vol 737, New York: p53 – 69

Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G (1991) Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomi-

crons to low density lipoprotein receptor-related protein. Proc Natl Acad Sci USA 88: 8342 - 8346

Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK (1989) The LDL-receptor-related protein, LRP, in an apolipoprotein E binding protein. Nature 341: 162 – 164

Benmerah A, Lamaze C, Begue B, Schmid SL, Dautry-Versad A, Cerf-Bensussan N (1998) AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis. J Cell Biol 140: 1055 – 1062

Bennett V (1990) Spectrin-based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm. Physiol Rev 70: 1029 – 1065

Benz J, Bergner A, Hofmann A, Götting P, Liemann S, Huber R, Voges D (1996) The structure of recombinant human Annexin VI in crystals and membrane.bound. J Mol Biol 260: 638 - 643

Bernard D, Rodriguez A, Rothblat GH, Glick JM (1991) camp stimulates cholesteryl ester clearence to high density lipoproteins in J774 macrophages. J Biol Chem 266: 710 – 716

Blackwood RA, Ernst JD (1990) Characterisation of Ca^{2+}-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins. J Biochem 266: 195 – 200

Brambilla R, Zippel R, Sturani E, Morello L, Peres A, Alberghina L, (1991) Characterisation of the tyrosine phosphorylation of calpactin I (annexin II) induced by platelet-derived growth factor, Biochem J: 447 – 452

Brown DA, London E (1998) Function of lipid rafts in biological membranes. Annu Rev Cell Dev Biol 14: 111 – 136

Brown DA, Rose JK, (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical surface. Cell 68: 533-544.

Brown MS und Goldstein JL (1975) Regulation of the activity of low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. Cell 6: 307 – 316

Brown MS, Goldstein JL (1976) Receptor-Mediated Control of Cholesterol Metabolism. Science 191: 150 – 154

Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 232: 34 – 47

Brown MS, Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Cell 89: 331 – 340

Bucci C, Parton RG, Mather ICH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M (1992) The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. Cell 70: 715 – 728

Casey PJ (1995) Protein lipidation in cell signalling. Science 268: 221 – 225

Castelli WP (1996) Lipids, risk factors and ischaemic heart disease. Atherosclerosis 124, Suppl: S1 – S9

Chavrier P, Goud B (1999) The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. Curr Opin Cell Biol 11: 466 – 475

Chavrier P, Goud B (1999) The role of ARF and rab GTPases in membrane transport. Curr Opin Cell Biol 11: 466 – 475

Chen H, Fre S, Slepnev VI, Capua MR, Takei T, Butler MH, Di Fiore PP, De Camilli P (1998) Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis, Nature 394: 793 – 797

Chen W, Sun Y, Welch C, Gorelik A, Leventhal A, Tabas I, Tall AR (2001) Preferential ATP-binding cassette transporter A1 -mediated cholesterol efflux from late endosomes/lysosomes. J Biol Chem 276: 43564 – 43569

Chen YA, Scheller RH (2001) SNARE-mediated membrane fusion. Nature 2: 98 – 106

Chen YA, Scheller RH (2001) SNARE-mediated membrane fusion. Nature Reviews. Molecular Cell Biology 2: 98 – 106

Chow A, Davis AJ, Gawler DJ (1999) Investigating the role played by protein-lipid and protein-protein interactions in the membrane association of the $p120^{GAP}$ CaLB domain. Cell Signal 6: 443 - 451

Chow A, Davis AJ, Gawler DJ (2000) Identification of a novel protein complex containing annexin VI, Fyn, Pyk2, and the $p120^{GAP}$ C2 domain. FEBS Letters 469: 88 – 92

Chow A, Gawler DJ (1999) Mapping the site of interaction between annexin VI and the $p120^{GAP}$ C2 domain. FEBS Letters 460: 166 – 172

Clark DM, Moss SE, Wright NA; Crumpton MJ (1991) Expression of annexin VI (p68, 67 kDa-calelectrin) in normal human tissues: evidence for developmental regulation in B- and T-lymphocytes. Histochemistry 96: 405 – 412

Conrad PA, EJ Smart, Ying YS, Anderson RGW, Bloom GS (1995) Caveolin cycles between plasma membrane caveolae and the Golgi complex by microtubule-dependent and microtubule-independent steps. J Cell

Biol 131: 1421 – 1433

Couet J, Li SW, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP (1997) Identification of peptide and protein ligands for the caveolin scaffold domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. J Biol Chem 272: 6525 – 6533

Crespo P, Leon J (2000) Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. Cell Mol Life Sci 57: 1613 - 1636

Creutz CE (1992) The Annexins and exocytosis. Science 258: 924 - 931

Creutz CE, Zaks WJ, Hamman HC, Crane S, Martin WH, Gould KL, Oddie KM, Parsons SJ (1987) Identification of chromaffin-granule binding proteins. J Biol Chem 262: 1860 – 1868

Crompton MR, Owens RJ, Totty NF, Moss SE, Waterfield MD, Crumpton MJ (1988). Primary structure of the human, membrane-associated Ca2+-binding protein p68 a novel member of a protein family. EMBO J 7: 21-27

Czernecka H, Yokohama S (1995) Lecithin-cholesterol acyltransferase reaction on cellular lipid released by free apolipoprotein-mediated efflux. Biochem 34: 4385 - 4392

Dargel R (1991) Biochemie und Pathobiochemie der Lipoproteine. 1. Auflage, Akademie Verlag, Berlin

Daro E, van der Sluijs P, Galli T, Mellmann I (1996) Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. Proc Natl Acad Sci USA 93: 9559 – 9564

Davidson NO, Anant S, MacGinnitie AJ (1995) Apolipoprotein B messenger RNA editing: insights into the molecular regulation of post-transcriptional cytidine deamination. Curr Opin Lipidol 6: 70 – 74

Davidson WS, Gilotte KL, Lund-Katz S, Johnson WJ, Rothblat GH, Phillips MC (1995) The effect of high density lipoprotein phospholipid acylchain composition on the efflux of cellular free cholesterol. J Biol Chem 270: 5882 – 5890

Davis AJ, Butt JT, Walker JH, Moss SE, Gawler DJ (1996) The Ca^{2+}-dependent lipid binding domain of $P120^{GAP}$ mediates protein-protein interactions with Ca^{2+}-dependent membrane-binding proteins. J Biol Chem 271: 24333 – 24336

De BK, Misono KS, Lukas TJ, Mroczkowski B, Cohen S (1986) A calcium-dependent 35-kilodalton substrate for epidermal growth factor receptor/kinase isolated from normal tissue, J Biol Chem 15: 13784 – 13792

De Camilli P, Emr SD, McPherson PS, Novick O (1996) Phosphoinositides as regulators in membrane trafficking. Science 271: 1533 – 1539

De Diego I, Schwartz F, Siegfried H, Dauterstedt P, Heeren J, Beisiegel U, Enrich C, Grewal T (2002) Cholesterol modulates the membrane binding and intracellular distribution of annexin 6. J Biol Chem (im Druck)

De LA Fuente M, Parra AV (1995) Vesicle aggregation by annexin I: role of a secondary membrane binding site : Biochemistry 34: 10393 – 10399

Deckelbaum RJ, Shipley GG, Small DM (1977) Structure and interactions of lipids in human plasma low density lipoproteins. J Biol Chem 252: 744 – 754

Deeg MA, Bowen RF, Oram JF, Bierman EL (1997) High Density Lipoproteins stimulate Mitogen-Activated Protein Kinases in human skin fibroblasts. Arterioscl Thromb Vasc Biol 17, 1667 - 1674

Desjardins M, Celis JE , van Meer G, Dieplinger H, Jahraus A, Griffiths G, Huber LA (1994) Molecular characterisation of phagosomes. J Biol Chem 269: 32194 – 32200

Dietschy JM, Turley SO, Spady DK (1993) Role off liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species including humans. J Lipid Res 34: 1637 - 1639

Donnelly SR, Moss SE (1997) Annexin in the secretory pathway. Cell Mol Life Sci 53: 533 - 588

Driessen HPC Newman RH, Freemont PS, Crumpton MJ (1992) A model of the structure of human annexin VI bound to lipid monolayers. FEBS 306: 75 – 79

Dunn KW, Maxfield FR (1992) Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. J Cell Biol 117: 301 – 310

Dunn WA, Conolly TP, Hubbard A (1986) Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by rat hepatocytes: receptor pathway. J Cell Biol 102: 24 – 36

Eckardstein von A, Huang Y, Assmann G (1994) Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. Curr Opin Lipidol 5: 404 – 416

Eckardstein von A, Jauhiainen M, Huang Y, Metso J, Langer C, Pussinen P, Wu S, Ehnholm C, Assmann G (1996) Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins (HDL) generates generation of preß$_1$-HDL. Biochim Biophys Acta 1301: 255 – 261

Eckardstein, von A (1996) Cholesterol efflux from macrophages and other cells. Curr Opin Lipidol 7: 308 – 319

Eckardstein, von A, Huang Y, Wu S, Saadat Sarmadi A, Schwarz S, Steinmetz A, Assmann G (1995) Lipoproteins containing apolipoprotein A-IV but not apolipoprotein A-I take up and esterify cell-derived cholesterol in plasma. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15: 1755 - 1763

Eckardstein, von A, Nofer J-R, Assmann G (2001) High Density Lipoproteins and Arteriosklerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21: 13 – 27

Edwards HC, Booth AG (1987) Calcium-sensitive, lipid-binding cytoskeletal proteins of the human placental microvillar region. J Cell Biol 105: 303 – 311

Elovson J, Jacobs JC, Schumaker VN, Puppione DL (1985) Moleular weigths of apoprotein B obtained from human low density lipoprotein (apoprotein B-PI) and from rat very low density lipoprotein (apoprotein B-PII). Biochemistry 24: 1569 – 1578

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

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

Feng Y, Press B, Wandlinger-Ness (1995) Rab7: an important regulator of late endocytotic membrane traffick. J Cell Biol 131: 1435 – 1452

Fiedler K, Lafont F, Parton RG, Simons K (1995) Annexin XIIIb: a novel epithelial specific annexin is implicated in vesicular traffic to the apical plasma membrane. J Cell Biol 128: 1043 - 1053

Fielding CJ, Bist A, Fielding PE (1997). Caveolin mRNA levels are upregulated by free cholesterol and downregulated by oxysterols in fibroblasts monolayers. Proc Natl Acad Sci USA 94: 3753 – 3758

Fielding CJ, Fielding PE (1997) Intracellular cholesterol Transport. J Lipid Res 38: 1503 – 1521

Fielding CJ, Fielding PE (2000) Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. Biochim Biophys Acta 1529: 210 – 222

Fielding PE und Fielding CJ (1996) Intracellular transport of low density lipoprotein derived free cholesterol begins at clathrin-coated pits and terminates at cell suface caveolae. Biochemistry 35: 14932 – 14938

Fielding PE, Fielding CJ (1995) Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. Biochemistry 34: 14288 –14292

Fleet A, Ashworth R, Kubista H, Edwards H, Bolsover S, Mobbs P, Moss SE (1999) Inhibition of EGF-dependent calcium influx by annexin VI is splice form-specific. Biochem Biophys Res Com 260: 540 – 546

Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG (1995) De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. Proc Natl Acad Sci USA 92: 8655 - 8659

Francis GA, Tsujita M, Terry TL (1999) Apolipoprotein A-I efficiently binds to and mediates cholesterol and phospholipid efflux from human but not from rat aortic smooth muscle cells. Biochem 38: 16315 – 16322

Francone OL, Royer L, Haghpassand M (1996) Increased preß-HDL levels, cholesterol efflux, and LCAT-mediated esterification in mice expressing the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and human apolipoprotein A-I (apo A-I) transgene. J Lipid Res 37: 1268 - 1277

Frank PF, Galbiati F, Volonte D, Razani B, Cohen ED, Marcel YL, Lisanti MP (2001) Influence of Caveolin-1 on cellular cholesterol efflux mediated by high density lipoproteins. Am J Physiol Cell Physiol 280: C1204 – C1214

Fukui K, Sasaki T, Imazumi K, Matsuura Y, Nakanishi H, Takai Y (1997) Isolation and characterization of a GTPase activating protein specific for the Rab3 subfamily small G proteins. J Biol Chem 272: 4655 - 4658

Furuchi T, Anderson RGW (1998) Cholesterol depletation of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). J Biol Chem 273: 21099 – 21104

Futter CE, Felder S, Schlessinger J, Ullrich A, Hopkins CR, (1993). Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor, J Cell Biol 120: 77 – 83

Garbuglia M., Verzini M., Donato R., (1989). Annexin VI binds S100A1 and S100B and blocks the ability of S100A1 and A100B to inhibit desmin and GFAP assembliess into intermediate filaments, Cell Calcium 24: 177 – 191

Garver WS, Erickson RP, Wilson JM, Colton TL, Hossain GS, Kozloski MA, Heidenreich RA (1997) Altered expression of caveolin-1 and increased cholesterol in detergent insoluble membrane fractions from liver in mice with Niemann-Pick disease type C. Biochim et Biophys Acta 1361: 272 – 280

Gaw A, Packard CJ, Lindsay GM, Griffin BA, Caslake MJ, Lorimer AR, Shepherd J (1995) Overproduction of small very low density lipoproteins (Sf 20-60) in moderate hypercholesterolemia: Relationship between apolipoprotein B kinetics and plasma lipoproteins. J Lipid Res 36: 158 – 171

Gerke V, Moss S E (1997) Review: Annexins and membrane dynamics, Biochim et Biophys Acta 1357: 129 –

154

Gerke V, Weber K (1984) Identity of p36K phosporylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein from brush borders; calcium-dependent binding to nonerythroid spectrin and F-actin, EMBO J 3: 227 – 233

Ghosh RN, Gelman DL, Maxfield FR (1994) Quantification of low density lipoprotin and transferrin endocytic sorting in HEp2 cells using confocal microscopy. J Cell Sci 107: 2177 – 2189

Giambanco I, Verzini M, Donato R (1993) Annexins V and VI in rat tissues during post-natal development: immunochemical measurements. Biochem Biophys Res Commun 196: 1221 – 1226

Gibbons GF (1990) Assembly and secretion of very–low-density lipoprotein. Biochem J 268: 1 – 13

Gil G, Faust FR, Chin DJ, Goldstein JL, Brown MS (1985) Membrane-bound domain of HMGCoA reductase is required für sterol-enhanced degradation of the enzyme. Cell 41: 249 – 258

Ginsberg HN (1994) Lipoprotein metabolism and its relationship to artherosclerosis. Med Clin North Am 78: 1 –20

Glenney JR, Tack BF (1985) Amino-terminal sequence of p36 and associated p10: identification of the site of tyrosine phosphorylation and homology with S-100. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 82: 7884 – 7888

Glenney JRJ, Tack B, Powell M A (1987) Calpactins: two distinct Ca2+-regulated phospholipid- and actin-binding proteins from lung and placenta, J. Cell. Biol. 104: 503 – 511

Gofman JW, DeLalla O, Glazier F, Freeman NK, Lindgren FT, Nichols AV, Strisower B, Tamplin AR (1954) The serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, artherosclerosis and coronary heart disease. Plasma (Milano) 2: 413 – 428

Goldberg J, Le NA, Paterniti JRJ, Ginsberg HN, Lindgren FT, Brown WV (1982) Lipoprotein metabolism during acute inhibition of hepatic triglyceride lipase in the cynomolgus monkey. J Clin Invest:1184 – 1192

Goldberg RI, Smith RM, Jarett L (1987) Insulin and alpha 2-macroglobin-methylamine undergo endocytosis by different mechanismus in rat adipocytes: II. Comparison of intracellular events. J Cell Physiol 133: 213 – 218

Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway, Nature 343: 425 – 430

Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ (1985) Receptormediated endocytosis: concepts emerging from LDL receptor system. Annu Rev Cell Biol 1: 1 – 39

Goldstein JL, Brown MS, Anderson RGW, Russel DW, Schneider WJ (1985) Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. Annu Rev Cell Biol 1: 1 – 39

Goldstein JL, Dana SE, Brown MS (1974) Esterification of low density lipoprotein cholesterol in human fibroblasts and its absence in homozygous familial hypercholesterolemia. Proc Natl Acad Sci USA 71: 4288 – 4292

Goldstein JL, Hobbs H, Brown MS (1995) Familiar hypercholesterolemia. In: Scrivter CR (ed) The metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw-Hill, New York, NY, p.1981 – 2030

Gorvel JP, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg (1991) Rab5 controls early endosome fusion *in vitro*. Cell 64: 915 – 925

Gotto AM, Pownall HJ, Havel RJ (1986) Introduction to the plasma lipoproteins. Method Enzymol 128: 3 – 41

Grewal T, Heeren J, Mewawala D, Schnittgerhans T, Wendt D, Salomon G, Enrich C, Beisiegel U, Jäckle S (2000) Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of low density lipoprotein to the Prälysosomal compartment, J Biol Chem 275: 33806-33813

Griffin BA, Packard CJ (1994) Metabolism of VLDL and LDL subclasses. Curr Opin Lipidol 5: 200 - 206

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

Gruenberg J, Griffiths G, Howell KE (1989) Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles *in vivo* and with an assay of vesicle fusion *in vitro*. J Cell Biol 108: 1301 – 1316

Gruenberg J, Maxfield FR (1995) Membrane transport in the endocytic pathway. Curr Opin Cell Biol 7: 552 – 563

Haigler HT, Schlaepfer DD, Burgess WH (1987) Characterization of lipocortin I and an immunologically unrelated 33-kDa protein as epidermal growth factor receptor/kinase substrates and phospholipase A_2 inhibitors. J Biol Chem 262: 6921 – 6930

Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, Lucuani M-F, Oti F, Chalin S, Freyssinet J-M, Devaux PF, Mc Neish J, Marguet D (2000) ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. Nat Cell Biol 2: 399 – 406

Harder T, Gerke V (1993) The subcellular distribution of early andosomes is affected by the annexin II-2 p11-2 complex. J Cell Biol 123: 1119 – 1132

Harder T, Kellner R, Parton RG, Gruenberg J (1997) Specific release of membrane bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestrationof membrane cholesterol. Mol Biol Cell 8: 533 – 545

Harder T, Simons K (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. Curr Opin Cell Biol 9: 534 – 542

Harris AS, Morrow JS (1990) Calmodulin and calcium-dependent protease I coordinately regulate the interaction of fodrin with actin. Proc Natl Acad Sci USA 87: 3009 – 3013

Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH (1953) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum, J Clin Invest, 34: 1345 – 1353

Havel RJ, Hamilton RL (1988) Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. Hepatology 8: 1689 – 1704

Hayashi H, Owada M K, Sonobe S, Kakunga T (1989) Characterisation of two distinct Ca^{2+}-dependent phospholipid-binding proteins of 68-kDa isolated from human placenta, J Biol Chem 264: 17222 – 17230

Hazarika P, Kaetzel MA, Sheldon A, Karin NJ, Fleischer S, Nelson TE, Dedman JR (1991) Annexin VI is associated with calcium-sequestering organelles. J Cell Biochem 46: 78 – 85

Heeren J, Weber W, Beisiegel U (1999) Intracellular processing of Endozytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. J Cell Sci 112: 349 – 359

Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA (1998) Dynamin-mediated internalization of caveolae. J Cell Biol 141: 85 – 99

Herbst JJ, Opresko LK, Walsh BJ, Lauffenburger DA, Wiley HS (1994) Regulation of postendocytotic trafficking of the epidermal growth factor receptor through endosomal retention. J Biol Chem 269: 12865 – 12873

Hinshaw JE (2000) Dynamin and ist role in membrane fission. Annu Re Cell Dev Biol 16: 483 - 519

Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL (1992) Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. Hum Mutat 1: 445 – 466

Holleran EA, Tokito MK, Karki S, Holzbaur EL (1996) Centractin (ARPI) associates with spectrin revealing a potential mechanism to link dynactin to intracellular organelles. J Cell Biol 135: 1815 – 1829

Hope HR, Pike LJ (1996) Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. Mol Biol Cell 7: 843 – 851

Hopkins CR (1983) The importance of the endosome in intracellular traffic. Nature 305: 684 - 685

Huang Y, von Eckardstein A, Wu S, Maeda N, Assmann G (1994) A plasma lipoprotein containing only ApoE and with gamma-mobility on electrophoresis releases cholesterol from cells. Proc Natl Acad Sci USA 91: 1834 – 1838

Huber R., Berendes R., Burger A., Schneider M., Karshikov A., Luecke H., (1992). Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family proteins. J. Mol. Biol. 223: 683 – 704

Hussain MM, Kancha RK, Zhou Z, Luchoomun J, Zu H, Balillah A (1996) Chylomicrons assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors: Biochim Biophys Acta 1300: 151 – 170

Jäckle S, Beisiegel U, Rinninger F, Buck F, Grigoleit A, Block A, Gröger I, Greten H, Windler E (1994) Annexin VI, a Marker Protein of Hepatocytic Endosomes, J Bio Chem 269: 1026 – 1032

Jahraus A, Storrie B, Griffiths G, Desjardins M (1994) Evidence for retrograde traffic between terminal lysosomes and the Prälysosomal/late endosome compartment. J Cell Sci 107: 145 – 157

Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB, Tall AR (1997) Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. J Biol Chem 272: 20982 – 20985

Johnstone SA, Hubaishy I, Waisman DM (1992) Phosporylation of annexin II tetramer by protein kinase C inhibits aggregation of lipid vesicles by the protein, J Biol Chem 267: 25976 – 25981

Johnstone SA, Hubaishy I, Waisman DM (1993) Regulation of annexin I-dependent aggregation of phospolipid vesicles by protein kinase C, Biochem J 15: 801 –807

Jost M, Zeuschner D, Seemann J, Weber K, Gerke V (1997) Identification and characterization of a novel type of annexin-membrane interaction: Ca^{2+} is not required for the association of annexin II with early endosomes, J Cell Sci 110: 221 – 228

Junker M, Creutz CE (1993) Endonexin (annexin VI)-mediated lateral segregation of phosphatidylglycerol in phosphatidylglycerol/phosphatidylcholine membranes. Biochemistry 32: 9968 - 9974

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

Kane JP (1996) Structure and function of the plasma lipoproteins and their receptors. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ (ed) Artherosclerosis and coronary disease. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia: 89-103

Kartenbeck J, Stukenbrok H, Helenius A (1989) Endocytosis of simian virus 40 into the endoplasmatic reticulum. J Cell Biol 109: 2721 – 2729

Keller P, Simons K (1997) Post-Golgi biosynthetic trafficking. J Cell Sci 110: 3001 – 3009

Kirchhausen T (1999) Adaptors for Clathrin-mediated traffic. Annu Rev Cell Dev Biol 15: 705 - 732

Kirchhausen T (2000) Clathrin. Annu Rev Biochem 69: 699 – 727

Klausner RD, van Renswode J, Ashwell G, Kempf C, Schechter AN, Dean A, Bridges KR (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin in K562 cells. J Biol Chem 258: 4715 – 4724

Kojima K, Utsumi H, Ogawa H, Matsumoto I (1994) Highly polarized expression of carbohydrate-bindin protein p33/41 (annexin IV) on the apical plasma membrane of epithelial cell in renal proximal tubules. FEBS Lett 342: 313 – 318

König J, Gerke V (2000) Modes of annexin-membrane interactions analysed by employing chimeric annexin proteins. Biochim Biophys Acta 1498: 174 – 180

Kostner GM, März W (1995) Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine. In: Schwandt P, Richter WO, Handbuch der Fettstoffwechselstörungen, Schattauer, Stuttgart New York, 2 Aufl.: 1 - 57

Kreis TE, Pepperkok R (1994) Coat proteins in intracellular membrane transport. Curr Opin Cell Biol 6: 533 – 537

Krieger M (1999) Charting the fate of the “good-cholesterol”: Identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. Ann Rev Biochem 68: 523 – 558

Krieger M, Herz J (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). Annu Rev Biochem 63: 601 – 637

Ktistakis NT, Brown HA, Waters MG, Sternweis PC, Roth MG (1996) Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles. J Cell Biol 134: 295 – 306

Kuitake ST, Mendel CM, Hennessey LK (1992) Interconversion between apolipoprotein A-I-containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities. J Lipid Res 33: 1807 - 1816

Kurzchalia TV, Parton RG (1996) Dynamic properties of caveolae. FEBS Letters 389: 52 – 54

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227: 680 – 685

Lafont F, Lecat S, Verkade P, Simons K (1998) Annexin XIIIb associates with lipid microdomain to function in apical delivery. J Cell Biol 142: 1413 – 1427

Lange Y, Steck TL (1996) The role of intracellular cholesterol transport in cholesterol homeostatsis. Trends Cell Biol 6: 205 – 208

Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani M-F, Chimini G, Kaminski WE, Schmitz G (1999) Molecular cloning of the human ATP binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. Biochim Biophys Res Commun 257: 29 – 33

Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wanfg X, Schwarttz K, Porter JG, Seiilhamer JJ, Vaughan AM, Oram JF (1999) The Tangier disease gene product controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. J Clin Invest 104: R25 – R31

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

Lecat S, Verkade P, Thiele C, Fiedler K, Simons K und Lafont F (2000) Different properties of two isoforms of annexin VIII in MDCK cells. J Cell Sci 113: 2607-2618.

Li S, Okamoto T, Chun M, Sargiacomo M, Casanova JE, Hansen SH, Nishimoto I, Lisanti MP (1995) Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G protein and caveolin. J Biol Chem 270: 15693 – 15701

Li SW, Couet J, Lisanti MP (1996) Src tyrosine kinases, G(alpha) subunits and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the autoactivation of Src tyrosine kinases. J Biol. Chem 271: 29182 – 29190

Liemann S. und Huber R., (1997). Three-dimensinal structure of annexins, Cell. Mol. Life Sci. 53: 516 – 521

Lin HC, Südhof TC, Anderson RGW (1992) Annexin VI is required for budding of clathrin-coated pits. Cell 70: 283 – 291

Linardic CM, Hannun YA (1994) Identification of a distinct pool of sphingomyelin involved in the sphingo-

myelin cycle. J Biol Chem 269: 23530 – 23537

Linderman JJ; Lauffenburger DA (1988) Analysis of intracellular receptor/ligand sorting in endosomes. J Theor Biol 132: 203 – 245

Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M (1994) Charakterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. J Cell Biol 126: 111 – 126

Liscum L, Munn NJ (1999) Intracellular cholesterol transport. Biochim Biophys Acta 1438: 19 – 37

Liu P, Anderson RGW (1995) Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. J Biol Chem 270: 27179 – 27185

Liu P, Ying Y, Ko YG, Anderson RG (1996) Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phophorylation cascade to caveolae. J Biol Chem 271: 10299 – 10303

Lombardi D, Sodati T, Riederer MA, Goda Y, Zerial M, Pfeffer S (1993) Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans-Golgi network. EMBO J 12: 677 – 682

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, J Bio Chem 193, 165-175

Lu Y, Bazzi MD, Nelsestuen GL (1995) Kinetics of Annexin VI, calcium, and phospholipid association and dissociation. Biochemistry 34: 10777- 10785

Luskey KL, Faust JR, Chin DJ, Brown MS, Goldstein JL (1983) Amplification of the gene für 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, but not for the 53 kDa protein, in UT-1 cells. J Biol Chem 258: 8462 – 8469

Marais R, Marshall CJ (1996) Control of the ERK-MAP kinase cascade by Ras and Raf. Cancer Surv 27: 101 – 125

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

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

Maxfield FR, Yamashiro DJ (1991) Acidification of organelles and the intracellular sorting of proteins during endocytosis. In: Steer CJ, Hannover JA (ed) Intracellular trafficking of proteins. Cambridge University Press, Cambridge: 157 – 182

Mayorga LS, Beron W, Sarrouf MN, Colombo MI, Creutz CE, Stahl PD (1994) Calcium-dependent fusion among endosomes. J Biol Chem 269: 30927 - 30934

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

Meers P, Mealy T, Paylotsky N, Tauber AI (1992) Annexin I-mediated vesicular aggregation: mechanism and role in human neutrophils. Biochemistry 31: 6372 - 6382

Mendez AJ (1997) Cholesterol efflux mediated by apolipoproteins is an actice cellular process distinct from efflux mediated by passive diffusion. J Lipid Res 38: 1807 - 1821

Mendez AJ, Lin G, Wade DP, Lawn RM, Oram FJ (2001) Membrane lipid domains distinct from cholesterol/sphingomyelin-rich rafts are involved in the ABC-A1-mediated lipid secretory pathway. J Biol Chem 276: 3158 – 3166

Mendez AJ, Oram JF, Biermann EL (1991) Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein dependent efflux from intracellular cholesterol. J Biol Chem 266: 10104 – 10111

Mineo C, James GL, Smart EJ, Anderson RGW (1996) Localization of epidermal growth factor stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. J Biol Chem 271: 11930 - 11935

Mizutani A, Tokumitsu H, Kobayashi R, Hidaka H (1993) Phosphorylation of annexin XI (CAP-50) in SR-3Y1 cells. J Biol Chem 268: 15517 – 15522

Mizutani A, Usada N, Tokumitsu, Minami H, Yasui K, Kobayashi R, Hidaka H (1992) CAP-50, a newly identified annexin, localizes in nuclei cultured fibroblast 3Y1 cells. J Biol Chem 267: 13498 - 13504

Mollenhauer J (1997) Annexins: what are they good for?, Cell Mol Life Sci 53: 506 - 507

Monier S, Dietzen DJ, Hastings DM, Lublin DM, Kurzchalia TV (1996) Oligomerization of VIP21-caveolin *in vitro* is stabilized by long chain fatty acylation of cholesterol. FEBS Lett 388: 143 - 149

Morgan RO, Fernandez M (1997) Annexin gene structures and moleculary evolutionary genetics, Cell Mol Life Sci 53: 505 – 515

Morgan RO, Fernandez MP (1997) Annexin gene structures and molecular evolutionary genetics, Cell Mol

Life Sci 53: 508 – 515

Moringa N, Kaihou Y, Vitale N (2001) Involvement of ADP-ribosylation factor 1 in cholera toxin-induced morphological changes in Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem: 22838 - 22843

Moss SE (1995) Annexins taken to task. Nature 378: 446 – 447

Moss SE, Crompton MR, Crumpton MJ (1988) Molecular cloning of murine p68, a calcium-binding protein of the lipocortin family. Eur J Biochem 177: 21 – 27

Moss SE, Crumpton MJ (1990) Alternative splicing gives rise to two forms of the p68 Ca^{2+}-binding protein. FEBS 261: 299 – 302

Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR (1997) Endocytosis. Physiolog Rev 77: 759 – 803

Mukherjee S, Maxfield F (2000) Role of membrane organization and membrane domains in endocytic lipid trafficking. Traffic 1: 203 – 211

Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol binding protein. Proc Natl Acad Sci USA 92: 10339 - 10343

Nakata T, Soboe K, Hirokawa N (1990) Conformational change and localization of caolpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry. J Cell Biol 110: 13 – 25

Neufeld EB, Cooney AM, Pitha J, Dawidowicz EA, Dwyer NK, Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ (1996) Intracellular Trafficking of Cholesterol Monitored with a Cyclodextrin. J Biol Chem 271, 21604 - 21613

Neufeld EB, Remaley AT, Demosky SJ, Stonik JA, Cooney AM, Comly M, Dwyer NK, Zhang M, Blanchette-Mackie J, Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr (2001) Cellular localization and trafficking of human ABC1 transporter, J Biol Chem 276, 27584 – 27590

Neufeld EB, Wastney M, Patel S, Suresh S, Cooney AM, Dwyer NK, Roff CF, Ohno K, Morris JA, Carstea ED, Incardona JP, Strauss JF,Vanier MT, Patterson MC, Brady RO, Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ (1999) The Niemann-Pick C1 Protein Resides in a Vesicular Compartment Linked to Retragrade Transport of Multiple Lysosomal Cargo. J Biol Chem 274: 9627 – 9635

Nielsen E, Severin F, Backer JM, Hyman AA, Zerial M (1999) Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. Nat Cell Biol 1: 376 – 382

Ohnishi M, Tokuda M, Masaki T, Fujimara T, Tai Y, Itano T, Matsui H, Ishida T, Konishi R, Takahara JEA (1995) Involvement of annexin I in glucose-induced insulin secretion in rat pancreatic islets. Endocrinology 136: 2421 – 2426

Ohta T, Saku K Takara K, Nakamura R, Ikeda Y, Matsuda I (1995) Different effect of subclasses of HDL containing apoA-I but not apoA-II (LpA-I) of cholesterol esterification in plasma and net cholesterol efflux from foam cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15: 956 - 962

Ooi CE, Dell'Angelica EC, Bonifacino JS (1998) ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) regulates recruitment of the AP-3 adaptor complex to membranes. J Cell Biol 142: 391 – 402

Oram JF, Yokoyama S (1997) Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. J Lipid Res. 37: 2473 - 2491

Orito A, Kumanogoh H, Yasaka K, Sokowa J, Hidaka H, Sokowa Y, Maekawa S (2001) Calcium-dependent association of Annexin VI, Protein Kinase Cα, and Neurocalcin α on the rafts fraction derived from the synaptic plasma membrane of rat brain. J Neurosci Res 64: 235 – 241

Orso E, Broccardo C, Kaminski WE, Böttcher A, Liebisch G, Drobnik W, Götz A, Chambenoit O, Diederich W, Langmann T, Spruss T, Luciani MF, Rothe G, Lackner KJ, Chimini G, Schmitz G (2000) Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice. Nat Genet 24: 192 – 196

Ortega D, Pol A, Biermer M, Jäckle S, Enrich C (1998) Annexin VI defines an apical "early" recycling endocytic compartment in rat liver hepatocytes, J Cell Sci 111: 261-269

Osborn M., Johnsson, Wehland J., Weber K., (1988). The submembraneous location of p11 an its interaction with the p36 substrate of pp60src kinase in situ, Exp. Cell Res. 175: 81-96

Owens RJ, Crumpton MJ (1984) Isolation and characterization of a novel 68000-$M_r Ca^{2+}$-binding protein of lymphocyte plasma membrane. J Biochem 219: 309 – 316

Owens RJ, Gallagher CJ, Crumpton MJ (1984) Cellular distribution of p68, a new calcium-binding protein from lymphocytes. EMBO 3: 945 – 952

Palade GE (1953) The fine structure of blood capillaries. J Appl Phys 24: 1424

Park DS, Woodman SE, SchubertW, Cohen AW, Frank PG, Chandra M, Shirani J,Razani B, Tang B, Jelicks LA, Factor SM, Weiss LM, Tanowitz HB, Lisanti MP (2002) Caveolin-1/3 double-knockout mice are viable,

but lack both muscle and non-muscle caveolae, and develop a serve cardiomyopathic phenotype. Americ J Path 160, 2207 – 2217

Parton RG (1994) Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. J Histochem Cytochem 42: 155 – 166

Parton RG (1996) Caveolae and caveolins. Curr Opin Cell Biol 8: 542 - 548

Parton RG (2001) Life without Caveolae. Science 293: 2404 – 2405

Parton RG, Simons K (1995) Digging into caveolae. Science 269: 1398 – 1399

Pfeffer SR (1994) Rab GTPases: masters regulators of membrane trafficking. Curr Opin Cell Biol 6: 522 – 526

Pierre P, Scheel J, Rickard JE, Kreis TE (1992) CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. Cell 70: 887 – 900

Pike JL, Miller JM (1998) Cholesterol depletation delocalizes phospatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone stimulated phosphatidylinositol turnover. J Biol Chem 273: 22298 – 22304

Poirier MA (1998) The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle. Net Struct Biol 5: 765 – 769

Pol A, Calvo M, Lu A, Enrich C (1999) The "early-sorting" endocytic compartment of rat hepatocytes is envolved in the intracellular pathway of caveolin-1 (VIP-21). Hepatology 29: 1848 - 1857

Pol A, Calvo M, Lu A, Enrich C (2000) EGF triggers caveolin redistribution from the plasma membrane to the early/sorting endocytic compartment of hepatocytes. Cell Signal 12: 537 – 540

Pol A, Lu A, Pons M, Peiró S, Enrich C (2000) Epidermal growth factor mediated caveolin recruitment to early endosomes and MAPK activation. Role of cholesterol and actin cytoskeleton, J Biol Chem 275: 30566 – 30572

Pons M, Grewal T, Rius E, Schnitgerhans T, Jäckle S, Enrich C (2001) Evidence for the Involvement of Annexin 6 in the Trafficking between the Endocytic Compartment and Lysosomes. Exp Cell Res 269: 13 – 22

Pons M, Ihrke G, Koch S, Biermer M, Pol A, Grewal T, Jäckle S, Enrich C (2000) Late endocytic compartments are major sites of annexin VI localization in NRK fibroblasts and polarized WIF-B hepatoma cells. Exp Cell Res 257: 33 – 47

Pons M, Tebara F, Kirchhoff M, Peiró S, de Diego I, Grewal T, Enrich C (2001b) Activation of Raf-1 is defective in annexin 6 overexpressing Chinese hamster ovary cells. FEBS Lett 501: 69 – 73

Pörn MI, Ackermann KEO, Slotte JP (1991) HDL induce a rapid and transient release of Ca2+ in cultured fibroblast. Biochem J 279: 29 – 33

Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, Edwards YH, Knott TJ, Scott J (1987) A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in instestine. Cell 50: 831 - 840

Powell MA und Glenney JR (1987) Regulation of calpactin I phospolipid binding calpaction I light-chain binding and phosphorylation by p60v-src, Biochem J 247: 321 – 328

Qualmann B, Kessels MM, Kelley RB (2000) Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. J Cell Biol 150: F111 – F116

Rainteau D, Mansuelle P, Rochat H, Weinman S (1995) Characterization and ultrastructural localization of annexin VI from mitochondria. FEBS Lett 360: 80 – 84

Ramaley AT, Schumacher K, Stonik JA, Farsi BD, Nazih H, Brewer HB, jr. (1997) Decreased reverse cholesterol transport from Tangier disease fibroblasts: acceptor specificity and effect of brefeldin on lipid effux. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17: 1813 – 1821

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

Raziani B, Rubin CS, Lisanti MP (1999) Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A. J Biol Chem 274: 26353 – 26360

Resh MD (1999) Fatty acylation of proteins:new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. Biochim Biophys Acta 1451: 1 – 16

Rety S, Sopkova J, Renouard M, Osterloh D, Gerke V, Tabaries S, Russo-Marie F, Lewit-Bentley A (1999) The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide, Nat. Struct. Biol. 6: 89 – 95

Riederer MA, Soldati T, Shapiro AD, Lin J, Pfeffer SR (1994) Lysosome biogenesis requires rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network. J Cell Biol 125: 573 – 582

Rietveld A, Neutz S, Simons K, Eaton S (1999) Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with Drosophila raft lipid microdomains. J Biol Chem 274: 12049 – 12054

Robinson MS (1992) Adaptins. Trends Cell Biol 2 : 293 – 297

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

Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying Y-S, Glenney JR (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. Cell 68: 673 – 682

Rothberg KG, Ying YS, Kamen BA, Anderson RGW (1990) Cholesterol controls the clustering of Glycophospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltatrahydofolate. J Cell Biol 111: 2931 – 2938

Rothblat GH, de la Llera Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillipis MC (1999) Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. J Lipid Res 40: 781 – 796

Rothman JE (1996) The protein machinery of vesicle budding and fusion. Proten Sci 5: 185 – 194

Rothman JE, Schmid SL (1986) Enzymatic recycling of clathrin from coates vesicles. Cell 46: 5 – 9

Rothut B (1997) Participation of annexins in protein phosphorylation, Cell Mol Life Sci 53: 522 – 526

Schekman R, Orci L (1996) Coat proteins and vesicle budding. Science 271: 1562 – 1531

Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelmann JA, Galbiati F, Couet J, Kohtz DS, van Donsslaar E, Peters P, Lisanti MP (1997) Cell-type and tissue-spezific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex *in vivo*. J Biol Chem 272: 29337 – 29346

Schlaepfer DD, Haigler HAT (1987) Characterisation of Ca2+-dependent phospholipid binding and phosphoylation of lipocortin I, J Biol Chem 15: 6931 – 6937

Schlaepfer DD, Haigler HAT (1990) Expression of annexins as a function of cellular growth state. J Cell Biol 111: 229 –238

Schmid SL, Smythe E (1991) Stage-specific assays for coated pit formation and coated vesicle budding *in vitro*. J Cell Biol 114: 869 – 880

Schmitz G, Assmann G, Robenek H, Brennhausen B (1985) Tangier disease: a disorder of intracellular membrane traffic. Proc Natl Acad Sci USA 82: 6305 - 6311

Schmitz G, Kaminski WE, Orso E (2000) ABC transporters in cellular lipid trafficking. Curr Opin Lipidol 11: 493 – 501

Schmitz G, Orsó E (2001) Intracellular Cholesterol and Phospholipid Trafficking: Comparable Mechanisms in Marcrophages and Neuronal Cells. Neurochem Res 26, 1045 - 1068

Schmitz-Pfeiffer C, Browne CL, Walker JH, Bide TJ (1998) Activated proteinkinase C α associates with annexin VI from skeletal muscle. J Biochem 330: 675 - 681

Schnitzer JE, Liu J, Oh P (1995) Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, Annexins, and GTPases. J Biol Chem 270: 14399 – 14404

Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J (1994) Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: Reduced transcytosis, scvebger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. J Cell Biol 127: 1217 – 1232

Schröder S, Ungewickell E (1991) Subunit interaction and function of clathrin-coated vesicle adapters from Golgi and the plasma membrane. J Biol Chem 266: 7910 – 7918

Schwartz AL (1995) Receptor cell biology: Receptor-mediated endocytosis. Pediatric Res 38: 835 – 842

Seemann J, Weber K, Gerke V (1996) Structural requirements for annexin I-S100C complex formation, Biochem J 319: 123 – 129

Senda T, Okabe T, Matsuda M, Fujita H (1994) Quick-freeze, deep-etch visualisation of exocytosis in anterior pituitary secretory cells: localisation and possible roles of actinfilament bundling. Cell Tiss Res 277: 51 -60

Silva FG, Sherill K, Spurgeon S, Südhof TH, Stone DK (1986) High-level expression of the 32.5-kilodalton calelectrin in ductal epithelia as revealed by immunocytochemistry. Differentiation 33: 175 – 183

Simionescu N, Simionescu M, Palade GE (1973) Permeability of muscle capillaries to exogenous myoglobin. J Cell Biol 57: 424 – 452

Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. Nature 387: 569 - 572

Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. Nature Reviews. Molecular Cell Biology 1: 31 – 39

Skibbens JE, Roth MG, Matlin KS (1989) Differential extractibility of influenza virus hemagglutinin during intracellular transport in polarized epithelial cells and nonpolar fibroblasts. J Cell Biol 108: 821 – 832

Smart EJ, Ying Y, Donzell WC, Anderson RG (1996) A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmatic reticulum to plasma membrane. J Biol Chem 271: 29427 – 29435

Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelmann JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. Mol Cell Biol 19: 7289 - 7304

Smart EJ, Ying YS, Conrad PA, Anderson RG (1994) Caveolin moves from caveolae to the Golgi apperatus in response to cholesterol oxidation. J Cell Biol 127: 1185 – 1197

Smart EJ, Ying YS, Mineo C, Anderson RG (1995) A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci USA 92: 10104 – 10108

Smith PD, Moss SE (1994a) Structural evolution of the annexin supergene family, Trends Genet 10: 241 – 246

Smith PD, Moss SE (1994b) Z-DNA-forming sequences at a putative duplication site in the human Annexin VI-encoding gene. Gene 138: 239 – 242

Smythe E, Smith PD, Jacob SM, Theobald J, Moss SE (1994) Endocytosis occurs independently of Annexin VI in human A431 cells. J Cell Biol 124: 301 – 306

Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument.Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. Nature 362: 318 – 324

Song KS, Li S, Okamoto T, Quilliam LA, Sargiacomo M, Lisanti MP (1996) Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane proteine of caveolae microdomains: detergent-free purification of caveolae microdomains. J Biol Chem 271: 9690 – 9697

Song W, Vaerman JP, Mostov K (1995) Dimeric and tetrameric IgA are tanscytosed equally by the polymeric Ig receptor. J Immunol 155: 715 – 721

Sorkin A (2000) The endocytosis machinery. J Cell Sci 113: 4375 – 4376

Spang A, Matsuoka K, Hamamoto S, Schekman R, Orci L (1998) Coatomer, ARF1p, and nucleotide are required to bud coat protein complex I-coated vesicles from large synthetic liposomes. Proc Natl Acad Sci USA 95: 11199 – 11204

Spreca A, Rambotti MG, Giambanco I, Pula G, Bianchi R, Ceccarelli P, Donato R (1992) Immunocytochemical localization of annexin V (CaBP33), a Ca^{2+}-dependent phospholipid- and membrane-binding protein, in the rat nervous system and skeletal muscles and in the porcine heart. J Cell Physiol. 152: 587 – 598

Stenmark H, Parton HG, Steel-Mortimer O, Lütcke A, Gruenberg J, Zerial M (1994) Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. EMBO J 13: 1287 - 1296

Stenmark H, Vitale G, Ullrich O, Zerial m (1995) Rabaptin.5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. Cell 83: 423 – 432

Südhof TC, Slaughter CA, Leznicki I, Barjon P, Reynolds GA (1988) Human 67-kDa calelectrin contains a duplication of four repeats found in 35-kDa lipocortins, Proc Natl Acad Sci USA: 664 – 668

Swairjo MA, Seaton BA (1994) Annexin structure and membrane. Interactions: A molecular perspective, Annu Rev Biophys Biomed Struct 23: 193 – 213

Tabas I (1995) The stimulation of the cholesterol esterification pathway by artherogenic lipoproteins in macrophages. Curr Opin Immunol 6: 260 – 268

Tagoe CE, Boustead CM, Higgins SJ, Walker JH (1994) Characterization and immunolocalization of rat liver annexin VI. Biochim Biophys Acta 1192: 272 – 280

Tang ZL, Scherer PE; Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DA, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP (1996) Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. J Biol Chem 271: 2255 – 2261

Thiel C, Osborn M, Gerke V (1992) The tight association of the tyrosine kinase substrate annexin II with the submembraneous cytoskeleton depends on intact p11- and Ca^{2+}-binding sites, J Cell Sci 103: 733 – 742

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

Tokumitsu H, Mizutani A, Minami H, Kobayashi R, Hidaka H (1992) A calcyclin-associated protein is a newly identified member of the Ca^{2+}/phospholipid-binding proteins, annexin family, J Biol Chem 267: 8919 – 8924

Towbin H, Staehelin T, Gorgon J (1979) Elektrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76: 4350 – 4354

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

Tso P, Balint JA (1986) Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics. Am J Physiol 250: G715 –726

Turpin E, Russo-Marie F, Dubois T, de Paillerets C, Alfsen A, Bomsel M, (1999). In adrenocortical tisue,

annexins II and VI are attached to clathrin coated vesicles in a calcium-independent manner. Biochim Biophys Acta 1402: 115 – 130

Tycko B, Maxfield FR (1982) Acidification of endocytotic vesicles containing α_2-macroglobin. Cell 28: 643 – 651

Uittenbogaard A, Everson WV, Matveev SV, Smart EJ (2002) Cholesteryl Ester is transported from caveolae to internal membranes as part of a caveolin-annexin II lipid-protein complex. J Biol Chem 277: 4925 - 4931

Uittenbogaard A, Smart EJ (2000) Palmitoylation of Caveolin-1 is required for cholesterol binding. Chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae. J Biol Chem 275: 25595 – 25599

Uittenbogaard A, Ying Y-S, Smart EJ (1997) Characterisation of a cytosolic Heat-shock Protein-Caveolin Chaperone complex. J Biol Chem 273: 6525 – 6532

Ullrich O, Reinsch S, Urbe S, Zerial M, Parton RG (1996) Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. J Cell Biol 135: 913 – 924

Van der Sluijs P, Hull P, Webster P, Male P, Goud B, Mellmann I (1992) The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. Cell 70: 729 – 740

Van Meer G (1989) Lipid trafficking in animal cells. Annu Rev Cell Biol 5: 247 – 275

Vance DE, Vance JE (1991) Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. New Comprehensive Biochemistry 20. Elsevier, Amsterdam

Vance JE, Vance DE (1990) Lipoprotein assembley and secretion by hepatocytes. Ann Rev Nutr 10: 337 – 356

Von Deurs B, Holm PK, Kayser L, Sandvig K, Hansen SH (1993b) Multivesicular bodies in HEp2 cells are maturating endosomes. Eur J Cell Biol 61: 208 – 224

Von Deurs B, Holm PK, Sandvig K, Hansen SH (1993) Are caveolae involved in clathrin independent endocytosis? Trends Cell Biol 3: 249 – 251

Wagner RC, Kreiner P, Barrnett RJ, Bitensky MW (1972) Biochemical characterization and cytochemical localization of a ctacholamine-sensitive adenylate cyclase in isolated capillary endothelium. Proc Natl Acad Sci USA 69: 3175 – 3179

Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR (1999) Specific binding of apoA-I, enhanced cholesterol efflux and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. J Biol Chem 275: 33053 – 33058

Wang N, Silver DL, Thiele C, Tall AR (2001) ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. J Biol Chem 276: 23742 – 23747

Wang W, Creutz CE (1994) Role of the amino-terminal domain in regulating interactions of annexin I with membranes: effects of amino-terminal truncation and mutagenesis of the phosporylation sites, Biochem 33: 275 – 282

Watanabe T, Inui M, Chen BY, Iga M, Sobue K (1994) Annexin VI-binding proteins in brain. Interaction of annexin VI with amembrane skeletal protein, calspectin (brain spectrin of fodrin). J Biol Chem 269: 17656 – 17662

Weinman JS, Feinberg JM, Rainteau DP, Gaspera BD, Weinman SJ (1994) Annexins in rat enterocyte and hepatocyte: an immunogold electron-microscope study. Cell Tissue Res 278: 389 – 397

Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJ, Thorpe GH (1979) Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. Clin Chem 25: 1531 – 1546

Wice BM, Gordon JL (1992) A strategy for isolation of cDNAs encoding proteins affecting human intestinal epithelial cell growth and differentiation: characterization of a novel gut-spezific N-myristoylated annexin. J Cell Biol 116: 405 – 422

Wigge P, McMahon HT (1998) The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. Trends Neurosci 21:339 – 344

Wilson DW, Whiteheart SW, Wiedmann M, Brunner M, Rothmann JE (1992) A multisubunit particle implicated in membrane fusion. J Cell Biol 117: 531 - 538

Yamada E (1955) The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. J Biophys Biochem Cytol 1: 445 – 458

Zaks WJ, Creutz CE (1991) Ca^{2+}-dependent annexin self-association on membrane surfaces. Biochemistry 30: 9607 – 9615

Zaks WJ, Creutz CE (1990) Annexin-chromaffin granule membrane interactons : a comperativ study of synexin, p37 and p67. Biochim Biophys Acta 1020: 149 – 160

Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. Nature 2: 107 – 117

Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. Nature Reviews. Molecular Cell Biology

2: 107 – 117

Zerial M, Stenmark H (1993) Rab GTPases in vesicular transport. Curr Opin Cell Biol 5: 613 – 620

Zhu Y, Liao HL, Wang N, Yuan Y, Ma KS, Verna L, Stemerman MB (2000) Lipoprotein promotes caveolin-1 and Ras translocation to caveolae. Role of cholesterol in endothelial signaling. Arterioscl Thromb Vasc Biol 20: 2465 – 2470

Zhu Y, Liao HL, Wang NP, Yuan X, Ma KS, Verna T, Lisanti MP, Stemerman MB (1999) Regulation of caveolin-1 by low density lipoprotein in human endothelial cells. Circulation 100: 694

9 Danksagung

Ich möchte mich im Besonderen bei Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel für die Unterstützung bei der Durchführung sowie für die Überlassung des Themas der Arbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt auch Herrn PD Dr. Thomas Grewal für die hervorragende und motivierende wissenschaftliche Betreuung und kompetenten Anregungen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Walter Tauscher, Herrn Dennis Mewawala und Herrn Prof. Dr. Rinninger für die praktische Anleitung, technische und materielle Unterstützung. Ebenfalls danke ich den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Beisiegel für die herzliche Aufnahme und technische Hilfe.

Ich danke meinen Eltern für ihr Verständnis und die langjährige Unterstützung. Mein herzlicher Dank gilt Christine Wenig, deren Verständnis und Ermutigungen maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Henrik Kurt Fock
Geburtsdatum:	23. Februar 1971
Geburtsort:	Hamburg
Eltern:	Dr. Kurt Friedrich Johann Fock Monika Fock, geb. Bäcker

Schulausbildung:

1977 – 1981	Grundschule Horst, Maschen/Seevetal
1981 – 1983	Drei-Linden-Schule, Neuenhain
1983 – 1987	Leibniz Gymnasium, Frankfurt
1987 – 1990	Friedrich-Dessauer-Gymnasium, Frankfurt
1990	Abitur

Wehrdienst:

1990 – 1991	Sanitätsbataillon 3, Hamburg

Studium:

1992 – 1998	Studium der Betriebswirtschaftslehre an der Universität Hamburg Abschluß als Diplom-Kaufmann
1997	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg
1999	Ärztliche Vorprüfung
2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2001	Beginn der Dissertation im April 2001 im Labor von Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Abteilung für Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

11 Erklärung

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

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

_____

Henrik Fock