Aus der Abteilung für Molekulare Zellbiologie
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
am Universitätskrankenhaus Eppendorf
Direktorin: Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h. c. Ulrike Beisiegel

Charakterisierung der Deletionsmutante AnnexinVI$_{1-175}$

Dissertation

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

Carolina Barbara Drys
aus Stettin
Hamburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit der Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter:

I. EINLEITUNG 7

1. Die Annexine 7
2. Annexine in der Exocytose 9
3. Annexine in der Endocytose 9
4. AnnexinII 10
5. AnnexinVI 11
5.1. Struktur 11
5.2. Lokalisation 12
5.3. Funktionen 12
5.4. Interaktionspartner 15
6. Dynamin 16
7. Endocytose 17
7.1. Clathrin-abhängige Rezeptor-vermittelte Endocytose 18
7.1.1. Clathrin 19
7.1.2. Adapterproteine 19
7.2. Transport durch die endocytotischen Kompartimente 20
7.2.1. Die frühen endocytotischen Kompartimente 20
7.2.1. Die späten endocytotischen Kompartimente 22
7.3. Andere Arten von Endocytose 23
7.3.1. Phagocytose 23
7.3.2. Coated-pit unabhängige Endocytose 24
7.3.2.1. Fluid-Phase-Marker 24
7.3.2.2. Caveolae und Potocytose 24
8. Das Ziel der Arbeit 25

II. MATERIAL UND METHODEN 26

1. Materialien und Bezugsquellen 26
1.1. Geräte 26
1.2. Verbrauchsmittel 26
1.3. Chemikalien 27
1.4. Antikörper 30

2. Methoden 31
2.1. Zellkultur 31
2.1.1. Kultivierung der adhärent wachsenden CHO – Zellen
2.1.2. Ausplattieren von Zellen 32
2.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen 33
2.2. Transfektion 34
2.3. Proteinextraktion aus Zellen 35
2.4. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry 36
2.5. Herstellung einer stabilen Zelllinie 37
2.6. Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese 37
2.7. Western Blot 40
2.7.1. Proteintransfer 40
2.7.2. Färbung der transferierten Proteine 41
2.7.3 Immunodetektion 41
2.7.3.1. Bindung des Erst- und des Zweit-Antikörpers 41
2.7.3.2. Visualisierung mittels Chemiluminiszenz 42
2.8. Silberfärbung 43
2.9. Proteinfällung 44
2.10. Subzelluläre Fraktionierung von Zelllinien 45
2.10.1. Endosomepräparation 45
2.11.1. Bindungsversuche von GST-Fusionsproteinen an Membranen 46
2.11.2. Expression von GST-Fusionsproteinen in E. coli 47
2.11.3. Reinigung der GST-Fusionsproteine 48
2.12. Bindungsversuche mit GST-Fusionsproteinen an Proteine aus CHO-Wildtyp-Extrakten (GST-pulldown-Versuche) 49
2.13. Immunfloureszenz 50

III. ERGEBNISSE 52

1. Darstellung des AnnexinVI mittels Immunfloureszenz 52
1.1. Darstellung des AnnexinVI in CHO-Wildtypzellen mittels Immunfloureszenz 53
1.2. Darstellung des AnnexinVI in einer AnnexinVI-überexprimierenden Zelllinie mittels Immunfloureszenz 54

1.3.	Darstellung der Deletionsmutante AnnexinVI$_{1-175}$ mittels Immunfloureszenz	55
2.	Darstellung des AnnexinVI und der Deletionsmutante AnnexinVI$_{1-175}$ mittels Western Blot	56
3.	Induktion von GST-Fusionsproteinen in JM 109-Escheria coli-Bakterien	57
4.	Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen des AnnexinVI und AnnexinVI$_{1-175}$ mittels GST-pulldown-Versuchen	58
5.	Bindung von GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an CHO-Wildtypmembranen	59
5.1.	Calcium-abhängige Bindung von GST-AnnexinVI an CHO-Wildtypmembranen	59
5.2.	Bindung von GST-AnnexinVI, GST-AnnexinVI$_{1-175}$, GST an CHO-Wildtypmembranen bei aufsteigenden Calcium-Konzentrationen	61
5.3.	Bindung des GST-AnnexinVI und des GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an CHO-Wildtypmembranen bei steigenden Proteinkonzentrationen	64
5.4.	Bindung des GST-AnnexinVI und des GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an CHO-Wildtypmembranen bei steigendem Membranangebot	65
5.5.	Interaktion des Dynamins mit CHO-Wildtypmembranen	66
6.	Bindung von GST-AnnexinVI und AnnexinVI$_{1-175}$ an Membranen von AnnexinVI-überexprimierenden CHO-Zellen	67
6.1.	Darstellung der Membranbindung des endogenen AnnexinVI in AnnexinVI-überexprimierenden CHO-Zellen unter Zugabe von steigenden Calcium-Konzentrationen	67
6.2.	Bindung von GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an Membranen von AnnexinVI-überexprimierenden CHO-Zellen bei steigendem Membranangebot	69
6.3.	Bindung des GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an Membranen AnnexinVI-überexprimierender CHO-Zellen bei steigenden Proteinkonzentrationen	70
7.	Bindungsstudien mit GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an Endosomen	71

7.1. Bindung des GST-AnnexinVI und des GST-AnnexinVI$_{1-175}$ bei Calcium-Zugabe 71

7.2. Identifizeirung der frühen Endosomen mittels Rab5 73

7.3. Darstellung der Lipidkomposition der frühen, der späten Endosomen und der schweren Membranen 74

8. Identifikation weiterer Interaktionspartner des GST-AnnexinVI 75

IV. DISKUSSION 76

1. Herstellung der stabilen Zelllinie AnnexinVI$_{1-175}$ 76
2. Interaktion des AnnexinVI mit Dynamin 77
3. Interaktion des GST-AnnexinVI mit anderen Proteinen 79
4. Unterschiedliches Bindungsverhalten von GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an Membranen 79
5. Intensive Bindung von GST-AnnexinVI an späte Endosomen 81
6. Perspektiven 83

V. ZUSAMMENFASSUNG 84

VI. LITERATURVERZEICHNIS 85

VII. DANKSAGUNG 97

VIII. LEBENSLAUF 98

XI. ERKLÄRUNG 99

I. Einleitung

1. Die Annexine

1.1. Struktur

Die Annexinfamilie umfasst nach heutigen Erkenntnissen 18 Proteine in verschiedenen Spezies, wobei bis zu 10 Mitglieder in Säugetieren identifiziert werden konnten. Um der Annexinfamilie anzugehören, müssen Proteine zwei Kriterien erfüllen. Sie müssen die Eigenschaft besitzen, an millimolare Mengen Calcium und Calcium-abhängig an saure Phoshpholipide und zelluläre Membranen zu binden (Gerke und Moss, 1997; Raynal und Pollard, 1994) und einen klar definierten Aufbau der Polypeptidkette aufweisen. Diese besteht aus 4 oder 8 hoch konservierten, 70 Aminosäuren langen Domänen ähnlicher Struktur mit einer zentralen hydrophilen Öffnung (Crompton et al., 1988; Liemann und Huber, 1997). Jede Domäne, auch „Annexin repeat“ genannt, wird aufgebaut aus einem Bündel von 5 α-Helices, welche mit den Buchstaben A, B, C, D und E benannt worden sind. Die Helices A, B, D und E sind antiparallel angeordnet, C steht senkrecht zu den anderen. Die Helices verlaufen gewunden in einer rechtsdrehenden Superhelix und sind über kurze loops miteinander verbunden. In den loops befinden sich die Calcium-Bindungsstellen, die in zwei Arten eingeteilt werden, nämlich in den Typ II und den Typ III (Gerke und Moss, 1997). Als Typ I wird die EF-Hand, z. B. des Calmodulins, bezeichnet (Kretsinger et al., 1986).

1.2. Eigenschaften

Über die für Annexine geltende Definition ist es gelungen, diese in weitem Maße verbreiteten Proteine, als Annexine zu identifizieren. Nahezu jede Zelle und jeder Zelltyp enthält Mitglieder dieser Familie, welche bis zu 1 % des Gesamtzellproteins ausmachen können (Creutz, 1992). In der Zelle liegen die Annexine in membrangebundener Form oder im Zytoplasma vor, wobei die Lokalisation der Mitglieder differiert. Annexin I und Annexin II liegen beispielweise in der Nähe der Plasmamembran, während Annexin V zytoplasmatisch lokalisiert ist.

Trotz teilweise sehr unterschiedlicher Lokalisation ist allen Annexinen die Fähigkeit an Membranen zu translozieren oder an diese zu binden, gemein. Die Bindung an Membranen ist ein reversibler Prozess (Bazzi und Nelsestuen, 1991a). Begünstigende Faktoren für eine Membranbindung sind ein Calcium-Anstieg und das Erscheinen negativ geladener Domänen, wie der Phospholipide, in der Membran. Die für die Protein-Membran-Bindung benötigte Konzentration an Calcium ist, je nach Annexintyp, unterschiedlich und außerdem nach der angebotenen Menge an sauren Phospholipiden ausgerichtet (Lu et al., 1995). Es wird postuliert, dass das Annexin VI mit seinen 8 Annexin-repeats im Gegensatz zu den anderen, aus 4 repeats bestehenden Annexinen, eine geringere Calcium-Konzentration benötigt (Evans und Nelsestuen, 1994). Ein Anstieg des Angebots an sauren Phospholipiden sowie ein Austausch des Phosphatidylcholins durch Phosphatidylethanolamin senkt den Calcium-Bedarf des Annexin VI, sowie auch der anderen Annexine (Bazzi et al., 1992; Lu et al., 1995).

Wie bereits erwähnt, lassen sich Annexine in nahezu jedem Zelltyp nachweisen. Ihre Zuordnung zu den einzelnen Zelltypen geschieht wahrscheinlich während ihrer Entwicklung durch Modifikationen des N-terminalen Endes der Polypeptidkette (Gruenberg und Emans, 1993). Dieses variiert in Länge (11 bis 196 Reste) und Sequenz. Es wird vermutet, dass diese Region sowohl einen regulatorischen Charakter besitzt, als auch für die Spezifität der Mitglieder verantwortlich ist (Liemann und Huber, 1997). So finden sich in den Amino-Termini beispielsweise potentielle Bindungsstellen für Proteine, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, wie der Proteinkinase C (Gloud et al., 1986) oder der Tyrosin-spezifischen Proteinkinase (Radke et al., 1980).

1.3. Funktionen

Während die Struktur der Annexine allgemein definiert ist, zeigen die Erkenntnisse über die Funktionen ein uneinheitliches Bild. Annexinen wird eine Rolle in den unterschiedlichsten intrazelullären Prozessen zugeschrieben, zu denen Interaktionen mit dem Cytoskelett, Signaltransduktion, DNA Replikation, Zelltransformation, Membrantransport und Ionenleitung zählen. Darüber hinaus wird eine Beteiligung in extrazellulären Prozessen, wie der Entzündungshemmung und der Antikoagulation, postuliert (Gruenberg und Emans, 1993).

Eine bedeutende Funktion einzelner Annexine ist die Beteiligung an Schritten der Exocytose (Creutz, 1992) und der Endocytose (Gruenberg und Emans, 1993), welche in den Membranbindenden Eigenschaften begründet liegt.

2. Annexine in der Exocytose

Die Fähigkeit Kontakte zwischen benachbarten Membranen herzustellen, hat die Annexine mit der Exocytose in Zusammenhang gebracht. Über diesen Vorgang werden zu sezernierende, in Vesikel verpackte Produkte, wie kleinste Moleküle oder Proteinkomplexe, aus der Zelle geschleust.

Ein an der Exocytose beteiligtes Protein ist das Annexin VII, auch bekannt unter dem Namen Synexin (Creutz, 1978). Es katalysiert die Aggregation und die Fusion von Liposomen oder sekretorischen Vesikeln in Gegenwart hoher Calcium-Konzentrationen. Ein anderes Mitglied, das Annexin II, benötigt für die gleichen Vorgänge sehr viel niedrigere Calcium-Konzentrationen (Drust und Creutz, 1988). In Experimenten mit permeabilisierten Zellen konnte eine direkte Beteiligung des Annexin II an der Fusion sekretorischer Vesikel an die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran gezeigt werden (Gerke, 1989). Die Lokalisation des Annexin II an den apikalen Membranen zum Zeitpunkt der laktierenden Brustdrüse (Handel et al., 1991) verdeutlicht ebenfalls dessen Rolle in sekretorischen Prozessen.

Ein Gegenspieler des Annexin II und des Annexin VII scheint das Annexin VI zu sein. Es wird postuliert, dass es einen inhibitorischen Effekt auf die sekretorischen Ereignisse ausübt (s. Annexin VI).

3. Annexine in der Endocytose

Die Bedeutung der Annexine in der Endocytose wird verdeutlicht durch ihre Beteiligung an wichtigen Schritten dieses Prozesses. Die Involvierung des Annexin VI bei der Bildung der Clathrin coated Vesikel konnte von Lin und Mitarbeitern gezeigt werden (Lin et al., 1992). In Experimenten führte das Entfernen des Annexin VI zu einer Inhibiton

dieses Vorgangs, während die Zugabe von aufgereinigtem Annexin VI die Aktivität wieder in Gang setzte.

Die Rolle des Annexin II in der Endocytose liegt in der Fusion früher Endosomen. In vitro Experimente zeigten, dass ein Proteintransfer von einer Donor- zu einer Akzeptormembran, während der Fusion früher Endosomen stattfand. Von ungefähr 50 Proteinen wurden lediglich das Annexin II und vier weitere Proteine nachgewiesen, als der Donor in viele kleine Vesikel abgebaut wurde (Emans et al., 1993). Ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung ist die Identifikation des Annexin II in cisternen und tubulären Regionen der frühen Endosomen (Gruenberg und Emans, 1993).

Eine Teilnahme an der Endocytose wird auch für das Annexin I postuliert. Es wird mit der Vesikelbildung innerhalb der multivesicular bodies (MVB) in Verbindung gebracht. Diese Assoziation stützt sich auf das Schicksal des EGF-Rezeptors, der nach Bindung seines Liganden einem Abbau innerhalb der Lysosomen unterliegt (Jäckle et al., 1991). Zwecks Degradierung müssen die EGF-Rezeptoren mit Hilfe einer EGF-Rezeptor-Kinase den innerhalb der MVB liegenden Vesikeln zugeführt werden. In Experimenten ist es Futter und Mitarbeitern gelungen (Futter et al., 1993), die innerhalb der MVBs phosphorylierten Sustrate als EGF-Rezeptor und Annexin I zu identifizieren.

4. Annexin II

Annexin II ist ein Calcium-reguliertes, 22 kDa Membran- und Zytoskelett-bindendes Protein, welches an Membrantransportprozessen der Calcium-regulierten, sekretorischen und frühen endocytotischen Schritte beteiligt ist. Es nimmt Teil an der Anhaftung und Fusionierung sekretorischer Vesikel mit der Plasmamembran sowie an der Positionierung und Fusion früher Endosomen (Creutz, 1992; Gruenberg und Emans, 1993; Harder und Gerke, 1993).

Das Annexin II kann in zwei Formen vorliegen, als Monomer oder als Heterotetramer. Die Heterotetramere Form wird wegen einer Komplexbildung mit einem Mitglied der S100 Proteinfamilie, dem p11, als Annexin II-p11-Heterotetramer bezeichnet. Zum Aufbau des Komplexes lässt sich sagen, dass zwei Annexin II Moleküle durch zwei p11

Moleküle verbunden werden. Aufgrund der beiden Annexin II-cores bietet die heterotetramere Form zwei Phospholipid- und/ oder Zytoskelett-bindende Domänen. Stabilisiert wird der Komplexe durch hydrophobische Interaktionen (Gerke und Weber 1985; Johnson et al., 1988). Die Bindungsseite für das p11 liegt in dem 14 Reste langen N-Terminus des Annexin II-Moleküls.

Während die Lokalisation des Monomers hauptsächlich zytosolisch ist, befindet sich die heterotetramere Form in den kortikalen Regionen der Zelle, wie der Plasmamembran (Zokas und Glenney, 1987) und den frühen Endosomen. Hier erfüllt der Komplex seine Membran-assoziierten Funktionen, indem er periphere Membranen, z. B. von sekretorischen Vesikeln (in chromaffinen Zellen) oder frühen Endosomen, miteinander verbindet oder Verbindungen zwischen ihnen und anderen Plasmamembranen bildet (Harder und Gerke, 1993; Nakata et al.,1990).

Beide Formen des Annexin II sind in der Lage, in Anwesenheit von Calcium an periphere, negativ geladene, endosomale Membranphospholipide zu binden. König und Gerke (König und Gerke, 2000) postulieren jedoch noch eine zusätzliche Calcium-unabhängige Interaktion zwischen dem N-Terminus des Annexin II und endosomalen Membranstrukturen. Die Interaktionen mit den Plasmamembranen scheinen aber einer strikten Calcium-Abhängigkeit zu unterliegen.

5. Annexin VI

5.1. Struktur

Das Annexin VI nimmt mit einem Molekulargewicht von 68 kDa eine Sonderstellung in der Annexinfamilie ein. Es unterscheidet sich strukturell von den anderen Annexinen durch seine 8 Annexin repeats (Südhof et al., 1988), welche vermutlich das Ergebnis einer Genduplikation sind (Crompton et al., 1988).
Aufgebaut ist das Molekül aus zwei Hälften, benannt mit den Buchstaben A (von Rest 16 bis 324) und B (von Rest 325 bis 673), welche jeweils die charakteristische 4 Annexin repeat-Struktur des Annexin I aufweisen und mittels eines 49 Aminosäuren langen α-helicalen Segments miteinander verbunden sind. Beide Hälften sind in der

kristallinen und vermutlich auch in der gelösten Form in einem Winkel von 90° zueinander angeordnet (Kawasaki et al., 1996), so dass die Calcium- und die Membranbindungstellen nicht in der selben Ebene angeordnet zu sein scheinen (Liemann und Huber, 1997). Analysen der membrangebundenen Form des Annexin VI zeigen eine coplanare Anordnung beider Hälften zur Membran (Driessen et al., 1992). Die Fähigkeit zur Konformationsänderung deutet auf eine Flexibilität hin, mit der vermutlich die Annexin VI-vermittelte Membranbindung und Vesikelaggregation erleichtert wird (Zaks und Creutz, 1990 a, b, 1991).
Die Ähnlichkeit beider Hälften beträgt ca. 45 % und ist damit nicht größer als zu den 4 Domänen der anderen Mitglieder der Annexinfamilie (Smith et al., 1993). Der 15 Reste lange Amino-Terminus ist nicht näher definiert.
Annexin VI erscheint in der SDS-Page als Doppelbande, was auf die Anwesenheit zweier Splice-Formen schließen läßt (Moss und Crompton, 1990).

5.2. Lokalisation

Aufgrund der weiten Verbreitung des Annexin VI in vielen Geweben und Zelltypen, wird eine Teilnahme dieses Proteins in verschiedene Prozessen angenommen.
Annexin VI ist erstmals auf der Plasmamembran von Lymphocyten (R.J.Owens und M.J. Crumpton, 1984), Rattenhepaocyten (Tagoe et al., 1994; Weinmann et al., 1994), Eytrhocyten (Bandorowicz et al., 1992) und Brustgewebe (Lavialle et al., 2000) entdeckt worden. Weitere Lokalisationen in Phagosomen von J774 Makrophagen (Desjardins et al., 1994), im Aktin-Zytoskelett von Fibrocyten (Hosoya et al., 1992), im Sarkoplasmatischen Retikulum der Skelettmuskelzellen, in Strukturen ähnlich des endoplasmatischen Retikulums in den nicht-Muskelzellen (Hazarika et al., 1991), als auch in Strukturen des endocytotischen Kompartiments (Ortega et al., 1998; Seemann et al., 1996), sind beschrieben worden.

5.3. Funktionen

Eine der wichtigsten Funktionen des Annexin VI scheint die Beteiligung an der Endocytose zu sein (Gruenberg und Emans, 1993). Es hat sich herausgestellt, dass

Annexin VI sowohl an frühen, als auch an späten endocytotischen Vorgängen beteiligt ist. Die Rolle des Annexin VI bei der Abschnürung der Clathrin coated Vesikel von der Plasmamembran wurde schon vielfach kontrovers diskutiert. Den Ergebnissen von Lin und Mitarbeitern (Lin et al., 1992), die eine stimulierende Aktivität des Annexin VI in der Clathrin coated Vesikel-Bildung nachgewiesen haben, stehen Experimente von Smith und Mitarbeitern (Smith et al., 1994) gegenüber. Sie konnten in der Annexin VI-freien Karzinomzelllinie A431 keine Veränderungen in der Endocytose beobachten. Diese Diskrepanz wird damit erklärt, dass es zur Bildung von coated Vesikeln vermutlich auch Annexin VI-unabhängige Mechanismen gibt (Kamal et al., 1998).

Die Lokalisation des Annexin VI in hepatischen Endosomen der Ratte deutet darauf hin, dass die Rolle des Annexin VI in der Endocytose nicht nur auf die Teilnahme an der Abschnürung der Clathrin coated pits und damit der Bildung der Clathrin coated Vesikell beschränkt ist (Jäckle et al., 1994). Die Anreicherung in den drei endosomalen Fraktionen, CURL (Compartment of uncoupling of receptors and ligands) oder auch sorting Endosomen genannt, RRC (receptor recyling compartment), MVB (multivesicular bodies) sowie seine polarisierte Lokalisation in apikalen Rattenhepatozyten (Ortega et al., 1998) könnte auf eine Teilnahme in dem Recycling von Rezeptoren (Jäckle et al. 1996, Ortega et al., 1998) oder dem Transport zu späten endocytotischen bzw. lysosomalen Kompartimenten hinweisen (Ortega et al., 1998). Es wird vermutet, dass Annexin VI an der Calcium-abhängigen Endosomenfusion in Form eines Calcium-Homeostase-erhaltenden Parameters beteiligt sein könnte. Dieser Zusammenhang verdeutlicht somit eine Regulation später endocytotischer Fusionsereignisse durch das Annexin VI (Moss, 1997).
Die Beteiligung an späten endocytotischen Ereignissen wird durch die Kolokalisation von Annexin VI mit den Markern der prelysosomalen und lysosomalen Kompartimente in NRK Zellen untermauert (Pons et al., 2000). Grewal und Mitarbeiter (Grewal et al., 2000) konnten außerdem zeigen, dass Annexin VI bei der Zustellung von Liganden, beispielsweise des LDLs, an die Lysosomen und damit vermutlich an den finalen Schritten der Endocytose beteiligt ist.

Eine weitere Funktion des Annexin VI scheint die Inhibition sekretorischer Prozesse zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass Annexin VI sich in einer Vielzahl von Organen und Zelltypen, die im Zusammenhang mit der Sekretion stehen, wie beispielsweise

Schweißdrüsen und Speicheldrüsen sowie in endokrinen Geweben nachweisen lässt (Clark et al., 1991). Dem Annexin VI wird darüber hinaus die Eigenschaft zugeordnet, die Annexin II- und Annexin VII-vermittelte Aggregation und Fusion von Vesikeln zu hemmen (Zaks und Creutz, 1990). Ein Erklärungsmodell dafür ist, dass das Annexin VI aufgrund seiner räumlichen Ausdehnung die Brückenbildung zwischen zwei Annexin II-Molekülen stört, indem es mit dem Annexin II um die Bindungsstellen an der Plasmamembran konkurriert (Donnelly und Moss, 1997).
Interessant erscheint in diesem Zusammenhang, dass Annexin VI im Gegensatz zu den sekretionsfördernden Annexinen, wie dem Annexin II und VII, in der laktierenden Brustdrüse nicht nachweisbar ist. Es wird postuliert, dass das Prolaktin einen down-regulatorischen Effekt auf das Annexin VI haben könnte (Donnelly und Moss, 1997).

Theobald und Mitarbeiter (Theobald et al., 1994) postulieren eine Beteiligung des Annexin VI in der Zellwachstumsregulierung. Sie konnten zeigen, dass nach Transfektion des Annexin VI-Gens die Proliferation in A431-Karzinomzellen stoppte und das Tumorwachstum in Mäusen kleiner war als in nicht-Transfizierten (Theobald et al., 1995). Die Rolle des Annexin VI in der Tumorsuppression wird durch die Ergebnisse von Francia und Mitarbeitern (Francia et al., 1996) bestätigt. Ein Vergleich der syngeneic murine B16F10 (metastatisches Melanom) mit der Melan-a-immortalized Melanozten Zelllinie zeigt eine verminderte Expression des Annexin VI in B16F10. Mit immunhistochemischen Verfahren lässt sich in humanen Melanomproben eine Abnahme der Annexin VI-Expression bei der Progression des Melanoms zeigen. Während die eben aufgeführten Beispiele den Annexinen und speziell dem Annexin VI eine Tumorsupressive Funktion zuordneten, liegen aber auch Hinweise auf eine Tumorwachstum-fördernde Beeinflussung vor. Annexin VI und Annexin II scheinen in der Pathogenese maligner Tumoren, in Form von Adhäsionsmolekülen bei der Zell-Zell-Interaktion metastatischer RAW117 Riesenzell Lymphomazellen, eine Rolle zu spielen. Bei Einsatz von Antikörpern gegen beide Annexine konnte eine Reduzierung der Tumorzell- Endothelzellbindung gezeigt werden (Tressler et al.,1993; Tressler et al., 1994).

Studien über die Bedeutung des Annexin VI in Zusammenhang mit Auoimmunerkrankungen sind von Dubois und Mitarbeitern durchgeführt worden (Dubois et al., 1995). Im Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis konnten sie höhere

Spiegel an Autoantikörpern gegen Annexin V und VI nachweisen als in Kontrollsera. Eine Rolle in der Inhibition der Phospholipase A_2 wurde neben dem Annexin I und V auch dem Annexin VI zugeschrieben (Aarsman et al., 1987; Davidson et al., 1987; Coméra et al., 1990). Die Aufhebung der antiinflammatorischen Effekte durch Annexin-Antikörper untermauert diese Behauptung.

Dem Annexin VI wird auch eine Rolle in der Erregung-Kontraktions-Kopplung zugeschrieben. Es wird postuliert, dass Annexin VI ein physiologischer Modulator der Aktivität des Calcium-Kanals im Sinne einer Verlängerung der Kanalöffnungszeit ist. (Diaz et al., 1990).

5.4. Interaktionspartner

Ein Interaktionspartner des Annexin VI an der Plasmamembran ist das Spektrin. Die Annexin VI-vermittelte Umformung des Spektrin-Aktin-Zytoskelett führt zu einer erleichterten Abschnürung der Vesikel von der Plasmamembran. Die Bindung des Annexin VI an β-Spektrin führt zu einer Aktivierung des Calpain I, welches das Spektrin-Aktin-Zytoskelett spaltet und auf diese Weise die frühen Schritte der Endocytose ermöglicht (Kamal et al., 1998).
Es gibt mittlerweile auch Hinweise auf Annexin VI-Spektrin-Interaktionen in den späten Schritten der Endocytose. Bei dem Transport von LDL aus dem prelysosomalen Kompartiment zu den Lysosomen wurden die von Kamal und Mitarbeitern nachgewiesen Mechanismen beobachtet (Grewal et al., 2000).

Eine anderer Interaktionspartner in den frühen Schritten der Endocytose ist die GTPase Dynamin. Es ist an der Abschnürung der Clathrin coated Vesikel von der Plasmamembran beteiligt. Versuche mit Dynaminmutanten führten zu einer Anhäufung von Clathrin coated pits und tiefen Einstülpungen an der Plasmamembran, denen keine Abschnürung zu Vesikeln folgte (Kosaka et al., 1983; Tsuruhara et al., 1990).

Durch eine Interaktion des Annexin VI mit P120 $_{GAP}$, einer Ras-spezifischen GTPase, wird vermutlich durch Inaktivierung des Onkogenprodukts $p21_{ras}$ eine Tumorsuppression

eingeleitet (Davies et al., 1996), was wiederum die Rolle des Annexin VI in Zellwachstums- und Tumorprozessen verdeutlicht (siehe 5.3. Funktionen).

6. Dynamin

Dynamin ist ein Mitglied der GTPase Superfamilie mit einem Molekulargewicht von 100 kDa. Mit der Entdeckung des Dynamins stellte sich natürlich auch die Frage nach der Bedeutung und Funktion dieses Proteins. Der erste Versuch der Zuordnung dieses bis dahin unbekannten Proteins als ein Mikrotubuli-bindendes Protein (Paschal et al., 1987) konnte in vivo nicht bestätigt werden (Scaife und Margolis, 1990; Noda et al., 1993). Die Behauptung, dass es sich bei dem Dynamin um ein Substrat der Proteinkinase C handele (Robinson et al., 1994), gilt nach heutigen Erkenntnissen nur für die neuronale Isoform des Dynamins, das sogenannte Dynamin 1. Die Sequenzierung des Drosophilagens shibire, welches homolog zu Dynamin ist (van der Bliek und Meyerowitz, 1991; Chen et al., 1991), verdeutlichte schließlich dessen Rolle in der Endocytose. Durch Mutationen in Shibire konnte eine Beteiligung in der Bildung der Clathrin coated Vesikel nachgewiesen werden. Die Mutanten führten zu einer Akkulmulation der coated pits und tiefer Invaginationen der Plasmamembran (Kosaka und Ikeda, 1983; Tsuruhara et al., 1990). Damke und Mitarbeiter konnten ähnliche Ereignisse für das humane Dynamin nachweisen (Damke et al., 1994).
Erklärungsmodelle für die Funktion des Dynamins bei der Abschnürung und damit der Bildung der coated Vesikel sind begründet in der Fähigkeit des Dynamins ringfömige Strukturen zu bilden, die sich um die Hälse der coated pits anordnen und deren Abschnürung in Gang setzen (Hinshaw und Schmid, 1995; Takei et al., 1995).
Neben der Beteiligung in der Rezeptor-vermittelten Endocytose spielt das Dynamin eine Rolle in dem Recycling der synaptischen Vesikel und der Internalisation von Caveolae (Hinshaw, 2000). Vermutet wird außerdem eine Teilnahme am Vesikeltransport vom und zum Golgi-Apparat (Nicoziani et al., 2000).

In Säugetieren existieren 3 Isoformen : Dynamin 1, Dynamin 2 und Dynamin 3.
Sie unterscheiden sich durch die verschiedene Anzahl von Splice-Varianten. Die verschiedenen Isoformen und Splice-Varianten weisen auf eine Teilnahme in verschiedenen Regionen der Zelle hin.

Das 8 Splice-Varianten enthaltende Dynamin 1 (Cao et al., 1998) wurde in neuronalen Geweben gefunden (Scaife und Margolis, 1990; Powell und Robinson, 1995). Dynamin 2, welches ubiquitär exprimiert wird (Cook et al., 1994; Sontag et al., 1994) enthält 4 Splice-Varianten (Cao et al., 1998). Die Verbreitung des 3 Spilce-Varinaten enthaltenden Dynamin 3 hingegen, ist auf drei Gewebe, nämlich Scrotum (Nakata et al., 1993), die Pulmo und Neuronen (Cook et al., 1996) beschränkt.

Dynamin ist aus 5 Domänen aufgebaut. Am N-Terminus befindet sich die GTP hydrolisierende Domäne, eine hoch konservierte Region (Warnock und Schmid, 1996; van der Blieck, 1999), welche eine hohe GTPase Aktivität besitzt (Warnock und Schmid, 1996). Unter bestimmten Voraussetzungen, wie beispielsweise der Zusammenlagerung des Dynamins in Oligomeren, kann diese noch gesteigert werden (Tuma und Collins 1994; Warnock et al., 1995, 1996). Es folgt eine mittlere Domäne, die in eine N-terminale und eine C-terminale Hälfte, welche die verschiedenen Splice-Varianten enthält, geteilt wird. Die N-terminale Hälfte ist an Dynamin-Dynamin-Zusammenlagerungen beteiligt (Smirnova et al., 1999; Okamoto et al., 1999b). Eine weitere Domäne ist die PH Domäne. Diese Domäne entspringt den Protein Pleckstrin, welches ein Substrat für PKC in Thrombozyten darstellt. Diese, vorzugsweise an $PI(4,5)P_2$ bindende Domäne, ist entscheidend für die Lokalisation des Dynamins an Membranen und bei der Rezeptor-vermittelten Endocytose (Salim et al., 1996). Eine andere Domäne ist die GTPase Effektor Domäne (GED). Ihre Beteiligung mit Protein-Protein-Interaktionen (Lupas et al., 1991) konnte durch die Interaktion mit der GTPase Domäne nachgewiesen werden (Muhlberg et al., 1997; Sever et al., 1999). Die GED ist essentiell für die Dynamin-Zusammenlagerung. Durch ihre Fähigkeit mit der GTPase in Form einer Aktivierung zu interagieren, ist sie ein GTPase-aktivierendes Element des Dynamins (Muhlberg et al 1997; Sever et al. 1999). Am C-terminalen Ende steht die Prolin-reiche Domäne. Sie enthält einige Bindungsstellen für SH_3 Domänen, welche eine bedeutende Rolle in Protein-Protein-Interaktionen zahlreicher zellulärer Prozesse, einschließlich der Clathrin-vermittelten Endocytose, spielen (Simpson et al., 1999).

7. Endocytose

Eine Vielzahl der zellulären Funktionen benötigen eine von dem Extrazellularraum z. B.

durch Plasmamembranen abgegrenzte Umgebung. Ein Weg extrazellulärer Moleküle durch diese Plasmamembranisolierung in den Intrazellulärraum stellt die Endocytose dar. Somit besitzt der Prozess der Endocytose eine fundamentale Bedeutung in der Zustellung verschiedener Nährstoffe, Metaboliten, Wachstumsfaktoren und Hormone an die Zelle, welche für die Entwicklung und Erhaltung normaler Gewebe verantwortlich ist. Mittels der Endocytose wird es dem Organismus außerdem ermöglicht, für den Abbau bestimmte Proteine und Proteinkomplexe, z. B. Antigen-Antikörperkomplexe, aufzunehmen und an die Lysosomen zu übergeben. Die Abweichungen in den Vorgängen der Endocytose sind mit diversen Krankheiten, wie Atherosklerose und Diabetes mellitus, vergesellschaftet. Ein anderer Aspekt der Endocytose ist ihre Rolle als Eintrittspforte für Pathogene, wie beispielsweise für Viren, Bakterien, symbiotische Mikroorganismen und Toxine (Mukherjee et al., 1997).

Die Zellen der Säugetiere haben unterschiedliche Mechanismen zur Aufnahme der Moleküle und Teilchen entwickelt. Der Begriff Endocytose (de Duve, 1963) umfasst mehrere Aufnahmemechanismen, wie die Clathrin-abhängige Rezeptor-vermittelte Endocytose, die Clathrin-unabhängige Endocytose, die Phagocytose und die Pinocytose.

7.1. Clathrin-abhängige Rezeptor-vermittelte Endocytose

Die Clathrin-abhängige Rezeptor-vermittelte Endocytose ermöglicht die Aufnahme einer Vielzahl von Ligand-Rezeptor-Komplexen. Zu den internalisierten Liganden zählen LDL (Brown und Goldstein, 1979; 1986) und Transferrin (Hanover und Dickson, 1985), modifizierte Moleküle aus dem Blutkreislauf, wie die Plasminogen Aktivator-Inhibitor-Komplexe (Morton et al., 1989), Hormone, z. B. Insulin und EGF (Burwen und Jones, 1991) und viele andere mehr.
Die Aufnahme von Ligand-Rezeptor-Komplexen in die Zelle verläuft über Bereiche der Plasmamembran, welche als „coated pits“ bezeichnet werden. Die Bezeichnung ist auf die Beobachtung einer eingestülpten Struktur auf der Membranoberfläche von Insektenoozyten zurückzuführen (Roth und Porter, 1964). Roth und Porter beobachteten neben den Invaginationen auch abgeschnürte Vesikel mit einer charakteristischen Umhüllung.

Die coated pits besetzen ungefähr 2 % der Oberfläche der meisten Zellen (Anderson et al., 1976; Orci et al., 1978). In diesen spezialisierten Bereichen kommt es zu einer Ansammlung von Rezeptorproteinen, welche spontan (z. B. der LDL-Rezeptor) oder durch Ligandenbindung (z. B. EGF-Rezeptor oder Fc-Rezeptor) getriggert wird (Anderson et al., 1982; Anderson et al., 1977; Dunn et al., 1984; Miettinen et al., 1992). Die Zusammenlagerung der meisten Rezeptoren in coated pits ist das Ergebnis einer Interaktion zytoplasmatisch lokalisierter Rezeptordomänen mit intrazellulären Clathrin-coat bindenden Proteinen, den sogenannten Adapterproteinen (Kirchhausen, 1993).

7.1.1. Clathrin

Sowohl die coated pits als auch die coated Vesikel werden von einer Proteinkomponente umhüllt, die erstmals von Pearse (Pearse, 1975) entsprechend der käfigähnlichen Struktur als „Clathrin“ bezeichnet wurde. Clathrin ist ein Trimer aus drei leichten Ketten (25 kDa) und drei schweren Ketten (190 kDa), die eine dreibeinige Struktur bilden, welche als „Triskelion“ bezeichnet wird. Dieses Gebilde entsteht durch das Zusammenstoßen der C-terminalen Enden der drei schweren Ketten, so dass drei Beine radiär von einem Mittelpunkt ausgehen. Die Beine werden in einen proximalen und einen distalen Teil unterteilt. Dem proximalen Teil lagern sich die leichten Ketten an.
Die Triskelionmoleküle fügen sich auf der zytoplasmatischen Seite der Membran zu einem polyedrischen Gitterwerk zusammen (Ungewickell und Branton, 1981; Kirchhausen und Harrison, 1981).

7.1.2. Adapterproteine

In den coated Vesikeln bilden, neben dem Clathrin selbst, die sogenannten Clathrin-Adapterprotein-Komplexe eine zweite, sehr bedeutende Komponente. Die Adapterkomplexe vermitteln neben einer Konzentrationserhöhung, die Einschließung membranverankerter Proteine in die sich abschnürenden (budding) coated pits (Hirst und Robinson, 1998; Kirchhausen et al., 1997, 1999; Schmid et al., 1997). Dafür scheint

die Positionierung des Adapterproteins zwischen das Clathrin-Gitterwerk und die Membranvesikel notwendig zu sein.

Es werden bisher 4 Arten von Adapterproteinen in Säugetieren unterschieden: AP1, AP2, AP3 und AP4. Das AP1 ist mit den coated Vesikeln am Trans-Golgi-Netzwerk assoziert, das AP2 ist in coated Vesikeln an den Plasmamembranen lokalisiert worden (Ahle et al., 1988; Robinson und Pearse, 1986). Ap3 ist in der Nähe von Endosomen (Dell`Angelica et al., 1998; 1997; Simpson et al., 1997) nachgewiesen worden, während Ap4 nahe des TGN zu liegen scheint (Dell`Angelica et al., 1999; Hirst et al., 1999). Eine Assoziation von AP3 und AP4 mit Clathrin scheint nach bisherigen Erkenntnissen nicht vorzuliegen.
Der Aufbau der Adapter Komplexe besteht aus großen α und β Ketten sowie aus μ und δ Ketten. Bei der α Kette werden 4 Typen unterschieden, die je nach Adapterprotein vorkommen (Kirchhausen, 2000).
Die β-Untereinheit scheint an der Bindung des Adapterproteins an Clathrin beteiligt zu sein (Ahle und Ungewickell, 1989), während die anderen Untereinheiten für die Bindung an die Rezeptormoleküle von Bedeutung sein könnten (Schroder und Ungewickell, 1991).

Die für die Abschnürung notwendige Fusion der coated pit Membranen ist bisher ein nicht bekannter Mechanismus und Gegenstand intensiver Forschung. Man weiß allerdings, dass dieser Prozess ATP-abhängig sein muss. Schmid und Mitarbeiter haben herausgefunden, dass die coated pits trotz Mangel an ATP, in der Lage sind, die Einstülpung und die Konzentrierung der Rezeptoren durchzuführen, dass die Abschnürung der coated Vesikel jedoch zum Erliegen kommt (Schmid et al., 1990).
An der Bildung der coated Vesikel sind weitere Proteine beteiligt, wie beispielsweise die GTPase Dynamin (siehe 6) und das Annexin VI (siehe 5.3).

7.2. Transport durch die endocytotischen Kompartimente

7.2.1. Die frühen endocytotischen Kompartimente

Nach dem Eintritt der Rezeptoren und ihrer Liganden in die Zelle werden die coated Ve-

sikel von dem Clathrin befreit. Dieser Prozess geschieht durch ein 70 kDa Enzym, welches ATP-abhängig ist (Braell et al., 1984).

Nach 1 Minute können die eingeschleusten Moleküle dann in den sogenannten „sorting“ Endosomen lokalisiert werden (Dunn et al., 1989). Eine andere in der Literatur gängige Bezeichnung für dieses Kompartiment ist „compartment of uncoupling of receptor and ligand“, abgekürzt CURL (Geuze et al., 1983). Der genaue Ablauf zwischen dem Eintritt der coated Vesikel in die Zelle und der Fusion mit den sorting Endosomen ist nicht bekannt. Die sorting Endosomen sind eines der beiden Kompartimente der frühen Endosomen. Sie enthalten Recyclingmoleküle, wie das Transferrin sowie zum Abbau bestimmte Liganden wie LDL.

Das andere Kompartiment, das sogenannte Recyclingkompartiment, enthält im Gegensatz zu den sorting Endosomen lediglich Recyclingmoleküle (Yamashiro et al., 1989).

Die Funktion der sorting Endosomen wird bereits durch dessen Bezeichnung deutlich. Es handelt sich um Organellen, welche die internalisierten Liganden und Rezeptoren ihrem Schicksal entsprechend dem Recyclingkompartiment oder den Lysosomen zuordnen. Ein Beispiel für diesen Sortierungsmechanismus ist der Weg des LDL-Rezeptors, der aus den sorting Endosomen in das Recyclingkompartiment eintritt, während sein Ligand den späten Endosomen/ Prelysosomen zugeteilt wird. Im Gegensatz dazu wird Transferrin, nach Abgabe des Eisens, zusammen mit dem Rezeptor recycelt. Das Recycligkompartiment befördert die ihm zugeteilten Rezeptoren bzw. Rezeptor-Ligand-Komplexe an die Zelloberfläche zurück (Kenneth et al., 1989).

Die verschiedenen Funktionen der beiden Kompartimente sind sowohl in der unterschiedlichen Form, in der Lokalisation, als auch in dem pH-Wert begründet. Die sorting Endosomen haben eine tubulovesikuläre Gestalt. Von dem vesikulären Teil, dessen Durchmesser 250 - 400 nm beträgt, strahlen Tubuli mit einem Durchmesser von 50 - 60 nm und einer Länge von 4 µm aus (Geuze et al., 1983; Gruenberg et al.,1989; Marsh et al., 1986). Es wird vermutet, dass die Tubuli sich abschnüren und dem Recyclingkompartiment die membranassoziierten Komponenten zustellen (Dunn et al., 1983). Morphologisch stellt sich das Recyclingkompartiment als eine Ansammlung von Tubuli mit einem Durchmesser von 50-70 nm dar (Ghosh et al., 1995; Marsh et al., 1995; Mc Graw et al., 1988).

Die zelluläre Verteilung der sorting Endosomen befindet sich peripher. Die Lage des Recyclingkompartiments hingegen ist variabel. Es konnte sowohl verstreut im Zytoplasma als auch juxtanukleär lokalisiert werden (Mukherjee et al., 1997).

Eine essentielle Eigenschaft für die Funktion der Kompartimente ist ihr charakteristischer pH-Wert. Ein pH-Wert von 5.9-6.0 erlaubt den sorting Endosomen, Liganden von ihren Rezeptoren zu trennen, um dann die getrennten Wege von Rezeptoren und Liganden zu ermöglichen. Eine Erklärung für die Dissoziation basiert auf der pH-Wert-bedingten Konformtionsänderung der Rezeptoren, wie im Falle der EGF- und Asiaglycoproteinrezeptoren (Maxfield, 1984). Im Kontrast zu den sorting Endosomen weist das Recyclingkompartiment einen höheren pH-Wert, nämlich 6.4 - 6.5 auf (Mukherijee et al., 1997).

Ein wesentliches Kriterium zur Unterscheidung der frühen endocytotischen Kompartimente von den späten endocytotischen Kompartimenten, sind die auch als Marker verwendeten GTP-bindenden Proteine Rab 4, Rab 5 und Rab 11.

7.2.2. Die späten endozytotischen Kompartimente

Zu den späten endocytotischen Kompartimenten zählen die endocytic carrier vesicle-multivesicular bodies (ECV-MVBs), die späten Endosomen und die Lysosomen. Diese differieren in Bezug auf Lokalisation, Morphologie, pH-Wert, spezifische Rezeptoren und Membranproteine.
Bei den ECV-MVBs handelt es sich um im gesamten Zytoplasma vorkommende kugelförmige Gebilde mit einem pH-Wert von < 6.0.
Die späten Endosomen dienen der Zerstörung der internalisierten Moleküle, wie LDL und α_2-Macroglobulin. Sie enthalten dagegen niemals Transferrin oder Recyclingrezeptoren.
In Bezug auf das Entstehen der späten Endosomen herrscht Unklarheit. Der Theorie, dass es sich bei den späten Endosomen um stabile, persistierende Strukturen handelt, steht die Vermutung, dass die späten Endosomen aus der Reifung von sorting Endosomen entstehen, entgegen (Kenneth et al., 1992)

Die späten Endosomen sind wie die Lysosomen vorwiegend im perinukleären Bereich lokalisiert. Morphologisch weisen sie eine komplexe Struktur (oft zwiebelförmig) auf. Sie ähneln den sorting Endosomen in Bezug auf ihren Umfang, unterscheiden sich jedoch von diesen durch ihre höhere Anzahl vesikulärer Strukturen. Der pH-Wert der späten Endosomen liegt bei 5.0 - 6.0 (Mukherjee et al., 1997).
Charakteristisch für die späten Endosomen ist der Rezeptor CI-MPR. Dieser Rezeptor transportiert lysosomale Hydrolasen von Trans-Golgi-Netzwerk zu den späten Endosomen. Aufgrund der Tatsache, dass er die Lysosomen nicht betritt, dient der Rezeptor als Marker für das späte endocytotische Kompartiment. Bezüglich der spezifischen Membranproteine gelten die Lamps (lysosome-associated membrane proteins) als wichtige Vertreter. Sie reichern sich sowohl in den späten Endosomen, als auch in den Lysosomen an (Kornfeld et al., 1992; Kornfeld und Mellman, 1989) .

Die Lysosomen bilden die letzte Station der endocytotischen Transportwege. Ihre Funktion ist der endgültige Abbau der aufgenommenen Moleküle sowie die Lagerung von unverdaulichen Material.
Die Lysosomen sind aufgrund ihrer uneinheitlichen Morphologie schwer einzuordnen.
Sie können sich beispielsweise als tubuläre Strukturen darstellen oder späten Endosomem ähneln (Holtzman, 1989; Kornfeld und Mellman, 1989). In den Lysosomen herrscht ein pH-Wert von 5.0 - 5.5 (Mukherjee et al., 1997).

7.3. Andere Arten der Endocytose

7.3.1. Phagocytose

Die Phagocytose ist ein Rezeptor- und Aktin-abhängiger, aber clathrin-unabhängiger Prozess zur Aufnahme von Partikeln und Mikroorganismen einer Größe von >0,5 µm (Rabinovitch, 1995). Die phagocytotische Aufnahme wird in Säugetierzellen von sogenannten „professionellen Phagocyten“, wie beispielsweise den Monocyten, neutrophilen Granulocyten, Makrophagen und anderen Zellen der myeloischen Reihe, übernommen (Falkow et al., 1992; Goldman, 1977).
Der Mechanismus der Phagocytose wird über das „zipper Modell“ erklärt (F. M. J. Griffin et al., 1975; 1976). Gemäß des „zipper Modells“ wird zu Beginn der Phagocytose eine

nahe der Plasmamembran gelegene Position eines Partikels als essentieller Schritt angesehen. Um ein Partikel dann aufzunehmen, lagert sich um dieses herum ein Pseudopod in Form zweier Arme an, dessen Rezeptoren mit den Proteinen der oftmals opsonierten Partikel interagieren. Die Ausbreitung des Pseudopods kann daher lediglich nach Bindung eines Liganden an dessen Rezeptoren analog den Zähnen eines Reißverschlusses stattfinden. Nach Fusion der beiden Arme des Pseudopods wird der Partikel aufgenommen und ein früher Phagosom geformt (Swanson und Baer, 1995). Der Abbau des phagocytierten Partikels verlangt die Reifung des Phagosoms zu einem Phagolysosom. Dieser komplexe Prozess schließt verschiedene Organellen der Endocytose und Exocytose ein. Trotz vieler Unklarheiten über die Abläufe der phagocytotischen Prozesse, gibt es Ähnlichkeiten zur Rezeptor-vermittelten Endocytose. Bei der Aufnahme von Partikeln in die Zelle könnten Vorgänge, wie das Abschnüren von Vesikeln und deren Fusion sowie die Aufarbeitung des phagocytierten Matrerials in den frühen Endosomen, vorkommen (Aggeler und Werb, 1982; Pitt et al., 1992; M. Dejardins et al., 1994).

7.3.2. Coated pit-unabhängige Endocytose

7.3.2.1. Fluid-phase-Marker

Ein Beweis für die Existenz einer Clathrin-coated-pit-unabhängigen Endocytose ist die Internalisation von Membranen und Aufnahme von fluid-phase-Markern, wie der horseradish peroxidase (HRP) und Dextran nach einer Inhibition der Clathrin-abhängigen Endocytose. Das Ausmaß dieses in vielen Zellen vorkommenden Aufnahmewegs ist unklar. Es wird vermutet, dass die Inhibition der Clathrin-abhängigen Endocytose eine Induktion der Clathrin-coated-pit-unabhängigen-Endocytose bewirkt (Damke et al., 1995; Sandvig et al., 1991; van Deurs et al., 1989).

7.3.2.2. Caveolae und Potocytose

Die Aufnahme zahlreicher, aber nicht aller Moleküle, über Clathrin-coated-pits oder die Makropinocytose verdeutlichte die Anwesenheit eines weiteren Aufnahmewegs über so-

genannte Caveolae.
Caveolae sind Invaginationen mit einem Durchmesser von 50 - 80 nm (Van Deurs et al., 1993), die sich in Cholesterol anreichern und ein transmembranöses Protein „Caveolin“ mit einem Molekulargewicht von 22 kDa enthalten (Montesano et al., 1982; Rothberg et al., 1990, 1992; Parton, 1994). Caveolae wurden in einer Vielzahl von Zellen, wie Fibroblasten, Adipocyten, Endothelzellen und zahlreichen Epithelzellen beobachtet (Goldberg et al., 1987; Severs, 1988; van Deurs und Nilausen, 1982). Die Beobachtung, dass Caveolae befähigt sind, Vesikel von der Plasmamembran kultivierter Fibroblasten abzuspalten, verdeutlichte deren Rolle in der Endocytose (Huet et al., 1980; Montesano et al., 1982; Parton et al., 1994). Eine weitere Funktion ist ein Prozess, der als „Potocytose“ bezeichnet wird. Die Potocytose ist ein Mechanismus mit dem Caveolae kleine Moleküle direkt ins Zytoplasma einschleusen, ohne dabei die Nähe der Plasmamembran zu verlassen. Gezeigt werden konnte dieses Phänomen für die Aufnahme des Folats, das nach Bindung an seinen GPI-verankerten Rezeptor, eine Bildung von Caveolae bewirkt, welche das Folat dann ohne Änderung der Position ins Zytoplasma befördern (Anderson et al., 1993). Demgegenüber steht der Nachweis, dass sich GPI-verankerte Proteine, wie der Folatrezeptor, unter nativen Konditionen nicht in Caveolae konzentrieren (Fiedler et al., 1994; Mayor et al., 1994; Parton et al., 1994). Diese Diskrepanz veranschaulicht die ungeklärte physiologische Bedeutung der Caveolae.

8. Das Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war die Erforschung der Funktion des Annexin VI. Diesem wird eine Beteiligung an vielen Prozessen zugesprochen. Interessant für diese Arbeit war insbesondere die Rolle des Annexin VI in der Endocytose. Um das Ziel zu erreichen, sollte das Deletionsprodukt Annexin VI_{1-175} im Hinblick auf seine Eigenschaften untersucht und mit Annexin VI verglichen werden. Über den Vergleich beider Proteine sollte ein Rückschluss auf die Funktionen und Interaktionen von Annexin VI gewonnen werden. Jede Veränderung des Verhaltens von AnnexinVI_{1-175} gegenüber dem Annexin VI sollte dokumentiert und anschließend diskutiert werden.

II. Material und Methoden

1. Materialien und Bezugsquellen

1.1. Geräte:	Firma:
Axio Cam	Zeiss
Blotting-Kammer	Biorad
Elektrophoresekammer	Biorad
Neugebauer-Zählkammer	
Zellkultur-Mikroskop	Leitz
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus Instruments
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge J2HC	Beckmann
Zentrifuge Universal 16 R	Heraeus Christ

1.2. Verbrauchsmittel:		Firma:
Bakterienkultur:	Bakterienkulturschalen (9 cm)	Costar
	Sterile Röhrchen (17,0/ 100 mm)	Greiner Labortechnik
	Einmal-Impfschlingen	Nunc
Chamberslides		Nunc
Deckgläschen (20 x 20 mm)		Superior
Dialyseschlauch		Serva
Einmalspritzen		Becton Dickinson
Gel-Blotting-Papier GB 002		Schleicher & Schüll
Injektionskanülen Sterican 27 G		Braun
Messküvetten halb-micro (10 x 10 x 45 mm)		Greiner Labortechnik
PD 10 Säule		Pharmacia Biotech
Pipetten (Glas)		Brand
Pipetten (Plastik)		Becton Dickinson
Pipettenspitzen		Greiner Labortechnik

Protran Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schüll
Quick-Seal-Röhrchen	Beckmann
Reagenzgläser (3,5 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße	Greiner Labortechnik
Röntgenfilm Biomax MR (18 x 24)	Kodak
Sterilfilter (0,45 µm)	Nunc
Zählröhrchen (5 ml) PP test tube und Verschlüsse	Packard
Zellscharber	Costar
Zentrifugenbecher	Beckmann
Zellkulturmaterial: Cryoröhrchen (1,8 ml)	Nunc
Gewebekulturschalen (Ø 14,5 cm)	Nunc
Neugebauer-Zählkammer	
Plastikzentrifugenröhrchen (15 ml + 50 ml)	Falcon/ Becton-Dickinson
6-Loch-Zellkulturplatten (6-wells)	Costar
12-Loch-Zellkulturplatten (12-wells)	Costar
Zellkulturflaschen (72 cm² + 162 cm²)	Costar

1.3. Chemikalien: **Firma:**

Wenn nicht anderweitig angegeben, waren die Chemikalien von höchsten Reinheitsgrad.

Aceton	Merck
Acrylamid (30 %)-Bisacrylamid (0,8 %)	Boehringer Mannheim
Agarose	Biorad
$AgNO_3$ (Silbernitrat)	Merck
Albumin Standart (2 mg/ ml)	Pierce
Anti-Biotin-Antikörper HRP-konjugiert	Sigma
Antikörper für Western Blots (siehe Tabelle 1+2)	
Antikörper für Immunfloureszenzen (s. Tab. 3+4)	

Antiproteasen: Antipain	Calbiochem
Chymostatin	Calbiochem
Leupeptin	Calbiochem
Pepstatin	Calbiochem
Ammonium Persulfat (AP)	Biorad
Bakterienkulturmedien	
und Chemikalien: Agar	Difco
Ampicillin	Sigma
Hefeextrakt	Difco
Isopropyl β-D-Thiogalactosidase (IPTG)	Pharmacia Biotech
Trypton	Difco
Benzamidine	Sigma
Borsäure	Merck
Bovines Serum Albumin	Sigma
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Merck
$CuSO_4$ (Kupfersulfat)	Merck
DAPI (2,6-Diaminophenolindol)	Hoechst
Dithioerythriol (DTT)	Sigma
ECL-Chemoluminiszenz-Kit	Pharmacia Biotech
Essigsäure (CH_3COOH)	Merck
Ethanol (CH_3CH_2OH)	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
Ethylenglykol-bis-N, N, N', N'-tertraacetat (EGTA)	Sigma
Färbereagenzien: Bromphenolblau	Sigma
Folin-ciocalteus Phenolreagenz	Merck
Ponceau-S Lösung 0,2 % in 3 % TCA	Serva
Protein-Silberfärbekit	Pharmacia Biotech
Fugene 6 Transfection Reagent	Boehringer Mannheim
Glutathion Sepharose 4B	Pharmacia Biotech
Glutathion	Sigma
Glycerol	Sigma

Glycin	Sigma
Iodmonochlorid	Merck
Isopropanol (2-Propanol)	Merck
Kaliumacetat	Merck
Kaliumbromid	Merck
Kaliumiodid	Merck
Kaliumnatriumtartrat	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Kupfersulfat ($CuSO_4$)	Merck
Methanol (CH_3OH)	Merck
Mowiol	Calbiochem
N, N, N', N'-Tetramethylenethylendiamin (Temed)	Biorad
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	J. T. Baker
Natronlauge (NaOH)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Non-Fat Dry Milk (Milchpulver)	Biorad
Proteingrößenmarker: Biotinylierter Proteinmarker [35 µg/ ml]	Biolabs
Bovines Leber-AnnexinVI [0,5 mg/ ml]	Biodesign Int.
Rainbow Coloured Protein Weight Markers RPN 756	Pharmacia Biotech
Salzsäure (HCL)	Merck
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Merck
Zellkulturmedien: DMSO (Dimetylsulfoxid)	Sigma
F 12 (HAM) Nutrient Mixture	Gibco-Brl
FCS (Fötales Kälber Serum)	Gibco-Brl
Geneticin G-418 Sulfat	Gibco-Brl
L-Glutamin	Gibco-Brl
PBS Dulbeccos	Gibco-Brl

Penicillin/ Streptomycin	Gibco-Brl
Trypsin-EDTA Lösung	Gibco-Brl

1.4. Antikörper

Antigen	Ursprung	Herkunft	Verdünnung	Firma
Synthetishes Peptid des Annexin VI N-Terminus: MAKIAQGAMYR aus Rattus norwegicus (Grewal et al., 2000)	Schaf	Polyklonal (Affinitätsreinigung)	1:250 für Western Blots 1:10 für Immunfloureszenzen	AB3718
Annexin II H7 (Volker Gerke)	Maus	Monoklonal	1:1000 für Western Blots	
Dynamin	Maus	Polyklonal	1:1000 für Western Blots	D 25520 / Becton Dickinson
Caveolin	Maus	Polyklonal	1:1000 für Western Blots	C 13630 / Becton Dickinson
GST-Annexin VI (Monica Pons)	Hase	Monoklonal	1:250 für Western Blots	
Pan-Ras	Maus	Monoklonal	1:1000 für Western Blots	OP22 / Oncogene Research Products
Anti-Human GTPase Activating Protein (GAP)	Maus	Monoklonal	1:1000 für Western Blots	05-178 / Biomol
Rab 5 (Volker Gerke)	Maus	Monoklonal	1:1000 für Western Blots	

Tabelle 1

Bezeichnung	Firma
Hase-anti-Schaf F(ab')2-Fragmente HRP-konjugiert	Jackson Immuno Research
Ziege-anti-Hase F(ab')2-Fragmente HRP-Konjugiert	Jackson Immuno Research
Ziege-anti-Maus F(ab')2-Fragmente HRP-Konjugiert	Jackson Immuno Research

Tabelle 2

Bezeichnung	Firma
Esel-anti-Schaf cy3	Jackson Immuno Research
Esel-anti-Schaf cy2	Jackson Immuno Research

Tabelle 3

2. Methoden

2.1. Zellenkultur

2.1.1. Kultivierung der adhärent wachsenden CHO-Zellen

Zelllinie: Chinese Hamster Overy Cells
Diese Zelllinie ist dadurch gekennzeichnet, dass sie sich problemlos kultivieren und gut transfizieren lässt.

Materialien:

- Kulturmedium (steril): F12 (HAM) Nutrient Mixture + 10 % fötales Kälberserum + 1 % Glutamin + 1 % Penicillin/ Streptomycin auf 37°C temperiert
- Bei CHO-Zellklonen: Kulturmedium (steril) + 1 mg/ ml G-418
- PBS (steril)
- Trypsin-EDTA (steril)
- Sterile Pipetten

Durchführung:

Die Chinese Hamster Overy Cells wurden in 72 cm² Zellkulturflaschen bei 37˚C, einem Luft-CO_2-Gehalt von 5 % und wassergesättigter Luftatmosphäre in einem Zellinkubator kultiviert.
Alle 2 - 3 Tage wurde unter der sterilen Zellkulturwerkbank das Kulturmedium gewechselt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit frischem Kulturmedium versorgt.
Bei Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen kurz mit PBS gewaschen und mit 5 ml Trypsin-EDTA vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Dieser Vorgang wurde durch kräftiges Schütteln der verschlossenen Zellkulturflasche beschleunigt. Die Proteolyse wurde durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium pro Flasche gestoppt. Die 15 ml Gesamtvolumen wurden auf drei neue Zellkulturflaschen verteilt, die dann jeweils auf 15 ml Gesamtvolumen mit Kulturmedium aufgefüllt wurden.

2.1.2. Ausplattieren von Zellen

Für das Ausplattieren von Zellen wurden ausschließlich vitale Zellen verwendet, deren Zahl vorher bestimmt worden ist.

Materialien:

- Zellsuspension
- Neubauer-Zählkammer
- Mikroskop
- 6-Loch-Platte/ 12-Loch-Platte

Durchführung:

Es wurden 2 Tropfen der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und mindestens 4 Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen} \times ml^{-1} = \frac{\text{Zellzahl} \times 4 \times 10^2 \times ml^{-1}}{\text{Zahl der Großquadrate}}$$

Entsprechend der Zellzahl wurde ein Aliquot in eine 6-Loch-Platte/ 12-Loch-Platte überführt und mit Kulturmedium auf ein Gesamtvolumen von 1,5 ml bzw. 2 ml aufgefüllt.

2.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur dauerhaften Lagerung wurden Dauerkulturen angelegt. Diese Zellen wurden tiefgefroren, bei Bedarf aufgetaut und wieder kultiviert.

Materialien:

- Kryoröhrchen
- Flüssiger Stickstoff
- Wasserbad mit Temperatur von 37°C
- 15 ml Zentrifugenröhrchen
- Gefrierlösung (steril): 80 % Kulturmedium auf 37°C temperiert + 10 % DMSO + 10 % fötales Kälberserum

Durchführung:

Einfrieren von Zellen:
Nach dem Ablösen der Zellen von der Kulturfläche wurde durch Zugabe von Kulturmedium eine Zellsuspension hergestellt. Die suspendierten Zellen wurden in 15 ml-Röhrchen bei 1800 rpm in der Eppendorf 5810 R für 5 Minuten zentrifugiert.

Das Pellet wurde in 1 ml Gefrierlösung resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Nach mehrstündiger Vorkühlung bei 4°C wurden die Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren. Nach 3 Tagen erfolgte der Transfer in flüssigen Stickstoff.

Auftauen von Zellen:
Die Kryoröhrchen wurden für 90 Sekunden bei 37°C erwärmt. Die Zellen wurden sofort in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und in einem 15 ml-Röhrchen bei 1800 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und in die Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2. Transfektion

Mit der Transfektion ist es möglich, Plasmid DNA in ein Wirtsgenom zu integrieren.
Bei den Transformationsexperimenten wurden vitale Zelllen verwendet, die sich in der Wachstumsphase befanden. Die zu transfizierenden CHO-Zellen wurden ca. 24 - 48 Stunden vor der Transfektion in 6-Loch-Platte oder 12-Loch-Platte ausgesät.
Bei einer Konfluenz von 50 - 70 % wurden sie transfiziert. Entsprechend der verwendeten Platten, wurde 2 µg Plasmid DNA oder 1 µg Plasmid DNA transfiziert.

Materialien:

- Plasmid DNA
- Transfektionsreagenz: Fugene
- Basalmedium: F 12 (HAM) Nutrient Mixture
- 6-Loch-Platte/ 12-Loch-Platte
- Eppendorf-Tubes

Durchführung:

Pro µg DNA wurden 2 µl Fugene in 100 µl F 12 (1:2:100) inkubiert und in einem Eppendorf-Tube nach vorsichtigem Schwenken 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Transfektionsreagenz in Basismedium wurde auf die Plasmid DNA geträufelt, vorsichtig geschwenkt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsmix aus DNA und Transfektionsreagenz in Basismedium wurde auf die 6-Loch-Platten/ 12-Loch-Platten verteilt.

2.3. Proteinextraktion aus Zellen

Zur weiteren Analyse der exprimierten Proteine, nach Transfektion oder nach dem Herstellen einer stabilen Zelllinie, wurden die Proteine extrahiert.

Materialien:

- 1 x PBS: 140 mM NaCl + 2,5 mM KCl + 8,1 mM Na_2HPO_4 + 1,5 mM KH_2HPO_4 pH 7,3
- Solubilitätspuffer: 1 % Triton x-100 + 50 mM Tris + 2 mM $CaCl_2$ + 80 mM NaCl + Pic 1/1000
- Pic: Proteaseinhibitorcocktail aus 1mM Pepstatin A + 10 mM Chymostatin + 10 mM Leupeptin + 10mM Antipain
- Zellscharber
- Eppendorf Zentrifuge 5810 R

Durchführung:

Die vorzugsweise in einer 6-Loch-Platte gewachsenen Zellen wurden bei einer Zelldichte von 70 - 80 % geerntet.
Die Zellen wurden von ihrem alten Nährmedium befreit und 2 x mit kaltem 1 x PBS gewaschen. Mit einem Zellscharber wurden die mit 1 x PBS bedeckten Zellen vom Boden der Loch-Platten abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei 1800 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zur Lysierung bei Raumtemperatur für 30 Minuten in 200 µl Solubilitätspuffer aufgenommen. Das Zelllysat wurde anschließend bei 13.000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert und der proteinreiche Überstand wurde abgezogen.

2.4. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung des Proteingehalts wurde nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951) durchgeführt. Es wurde ein Aliquot der zu bestimmenden Probe entnommen und mit 2 Proteinstandartreihen photometrisch gemessen. Mit Hilfe der Standartreihen wurde eine Eichgrade erstellt, der Steigung die Umrechnung von der Extinktion auf die Konzentrationen der Proben erlaubte.

Materialien:

- Rinderalbumin (2mg/ ml)
- 3,5 ml Eppendorf-Tubes
- Lowry-Lösung : Lowry A + Lowry B + Lowry C im Verhältnis 65:1:1
- Lowry A: 3 % Na_2CO_3 in 0,15 N NaOH
- Lowry B: 2 % Kaliumnatriumtartrat
- Lowry C: 1 % $CuSO_4$ x 5 H_2O
- Folinreagenz + Aqua bidest im Verhältnis 1:1
- Photometerküvetten
- Lambda 20 Photometer

Durchführung:

Für die Proteinstandartreihen wurde Rinderalbumin in aufsteigender Konzentration, von 0 bis 20 µl, in 3,5 ml-Tubes überführt. Jeder Tube wurde mit H_2O auf 400 µl Volumen aufgefüllt.
Den zu untersuchenden Proben wurden Aliquots entnommen, je nach erwarteter Proteinkonzentration zwischen 5 µl und 100 µl. Diese wurden in 3,5 ml-Tubes überführt und mit Aqua bidest auf 400 µl Volumen aufgefüllt.
Jedem Tube wurde 1 ml Lowry-Lösung zugefügt und nach vorsichtigem Vortexen, wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 125 µl (mit Aqua bidest 1:1 verdünnten) Folinreagenz. Nach gründlichem Vortexen und Inkubation für 30 Minuten wurden die Proben in Photometerküvetten überführt. Mit einem Lambda 20 Photometer wurde bei einer Wellenlänge von 750 nm die Extinktion gemessen.

2.5. Herstellung einer stabilen Zelllinie

Es ist möglich durch Transfektion der entsprechenden DNA eine stabile Zelllinie aus CHO-Zellen herzustellen, die AnnexinVI$_{1-175}$ überexprimiert.

Materialien:

CHO-Zellen
Gewebekulturschalen
Kulturmedium
Geneticin (G-418)
AnnexinVI$_{1-175}$ Plasmid DNA

Durchführung:

Für die Herstellung einer stabilen Zelllinie wurden CHO-Zellen in Gewebekulturschalen ausplattiert und nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37°C bei 80 % Konfluenz mit 10 µg AnnexinVI$_{1-175}$ Plasmid DNA transfiziert. Nach einer Inkubatoin von 24 Stunden bei 37°C wurde, aufgrund des im Plasmid integrierten neo-Resistenzgens, zur Erzeugung einer Selektion, das Aminoglycosidantibiotikum Geneticin (G-418) in der Konzentration 1 mg/ ml zugefügt. Selektiert wurden die Zellen, die die transfizierte DNA mit dem neo-Resistenzgen nicht in ihr Genom integriert hatten. Innerhalb einer Woche wurde das Kulturmedium mit dem G-418 alle 2 Tage gewechselt. Die gewachsenen Zellklone wurden in Zellkulturflaschen überführt und kultiviert.
Zur Überprüfung der Expression des transfizierten Gens wurden die Zellen einer Proteinextraktion unterzogen. Der Auftrennung der Proteine in der SDS-Page folgte die Analyse mittels Western Blot.

2.6. Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Die Methode wurde nach Protokollen von Lämmli (Lämmli et al., 1970) durchgeführt.
Um Proteine aufzutrennen, bedient man sich der SDS-Polyacrylamidelektrophorese. Ein hochgradig vernetztes Polyacrylamidgel dient als Matrix, durch das die Proteine in

Richtung Anode wandern. Die Proteine werden dafür zuerst denaturiert und mit anionischen Detergenz SDS behandelt, was zu einer Ausbildung von SDS-Protein-Komplexen mit negativer Gesamtladung führt.

Im diskontinierlichen System, bestehend aus oberen Sammelgel und unteren Trenngel, passiert die Probe zuerst das Sammelgel und wandert dann in das Tenngel ein, wo die SDS-Komplexe aufgrund ihrer molekularen Größe aufgetrennt werden. Das Gel funktioniert dabei wie ein Molekülsieb, das die kleinen Moleküle schneller zur Anode wandern lässt als die Großen.

Materialien:

- Eppendorf-Tubes
- Pobenpuffer: 0,1 M Tris-HCL pH 6,8 + 2 % Natriumdodecylsulfat (SDS) + 20 % Glycerol + 1 % β-Mercaptoäthanol + 0,1 % Bromphenolblau
- Rainbow Marker RPN 756
- Biotinylierter Protein Marker
- Elektrophhorekammer
- Trenngel: 12,5 ml Acrylamid bis + 7,5 ml 1,5 M Tris-HCL pH 8,8 + 9,3 ml Aqua bidest + 6 ml 10 % SDS (Natriumdodecylsulfat) + 0,2 ml 10 % Ammonium Persulfat + 10 µl Temed
- Sammelgel: 2,4 ml 30 % Acrylamid + 0,8 % Bisacrylamid + 5 ml 0,5 M Tris-HCL pH 6,8 + 12,5 ml Aqua bidest + 0,2 ml 10 % SDS + 0,3 ml 10 % Ammonium Persulfat + 10 µl Temed
- Isobutanol
- Lämmli-Laufpuffer: 0,25 M Tris + 0,2 M Glycin + 1 % SDS pH 8,8
- Kämme
- Powersupply
- Biometra Gelsystem
- Hamiltonspritze

Durchführung:

Probenvorbereitung:

Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden mit Lämmli-Laufpuffer in ihrem Volumen angeglichen, mit Probenpuffer reduziert und beschwert und bei 95°C für 5 Minuten hitzedenaturiert. Dabei bildeten sich negativ geladene SDS-Protein-Komplexe aus.
Als Kontrolle wurde Rinderalbumnin oder eine bekannte Proteinmischung, die wie die Proteinproben vorbereitet wurde, aufgetragen.
Zur Ermittlung der Molekulargewichte wurden Markerproteine, wie beispielsweise der Rainbowmarker und ECL Marker, verwendet.

Herstellung des Polyacrylamidgels:
Für die Herstellung des Polyacrylamidgels wurden 2 gründlich gereinigte und mit Aceton entfettete Glasplatten mit den entsprechenden Abstandhaltern zu einem Sandwich zusammengebaut und in eine Halterung geschoben. Nach Überprüfung der Dichtigkeit des Sandwichs mit Wasser wurde dieses entfernt und die Kammer mit Filterpapier getrocknet.
Das Trenngel wurde unter Rühren in einem Messbecher vorbereitet und mit einer Pasteurpipette luftblasenfrei in die Gelkammer eingefüllt. Die Trennlösung wurde anschließend mit Isobutanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel unter Rühren vorbereitet. Das Isobutanol wurde gründlich aus der Gelkammer entfernt, diese mit Lämmli-Laufpuffer gereinigt und mit Filterpapier getrocknet. Dann wurde das Sammelgel mit einer Pasteurpipette bis zum oberen Rand der Gelkammer eingefüllt und der Kamm mit der entsprechenden Anzahl von Taschen eingesetzt.
Nach dem Polymerisieren wurde der Kamm vorsichtig aus der Gelkammer herausgezogen und diese mit Lämmli-Laufpuffer gespült, um nicht polymerisiertes Acrylamid zu entfernen. Nachdem die Taschen der Gelkammer mit Lämmli-Laufpuffer gefüllt worden sind, wurden die Proben durch den Puffer hindurch mit Hilfe einer Hamiltonspritze auf den Boden der Taschen eingebracht.
Die Gelkammer wurde in die Elektrophoresekammer eingebaut und an den Power Supply angeschlossen.
Die Elektrophorese wurde zunächst bei einer Stromstärke von 10mA durchgeführt und verdoppelt, als die Bromphenolblau-Front das Trenngel erreichte. Bei Erreichen des unteren Gelrands wurde das Gel aus der Kammer befreit und geblottet oder der Silberfärbung unterzogen.

Bei Anwendung des Biometra-Gelsystems betrugen die Probenansätze 1/10 der beschriebenen Volumina. Die Stromstärke wurde auf 5 mA eingestellt bis die Bromphenolblau-Front das Trenngel erreichte. Dann wurde die Stromstärke verdoppelt.

2.7. Western Blot

2.7.1. Proteintransfer

Der Proteintransfer wurde nach Towbin (Towbin et al., 1979) durchgeführt.
Nach Beenden der SDS-Page werden die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf Nitrocellulosemenbran geblottet. Die Durchführung des elektrophoretischen Transfers mit dem Wet-Blot Verfahren zeichnet sich durch einen schonenden Transfer und eine geringfügige Erwärmung der geblotteten Proteine aus.

Materialien:

- Plastikwanne
- Blottingpuffer: 3 % Borsäure + 20 % Methanol pH 9,0
- 2 Schwämme
- 4 Fiterpapiere
- 2 Nitrocellulosemembranen
- Kunststoffgitter
- Transfertank

Durchführung:

In einer mit Blottingpuffer gefüllten Plastikwanne wurde das Kunststoffgitter sandwichartig beladen. Es wurden nacheinander ein Schwamm, 2 Filterpapiere und 2 Nitrocellulosemembranen in das aufgeklappte Gitter gelegt. Das Gel wurde luftblasenfrei auf die Membranen geschoben und mit 2 Filterpapieren und einem Schwamm bedeckt. Anschließend wurde das Kunststoffgitter zusammengepresst und nach Verriegeln in einen mit Blottingpuffer gefüllten Transfertank überführt. Dabei war

das Gel zur Kathode und die Membran zur Anode ausgerichtet. Geblottet wurde für 5 Stunden bei 4°C bei einer Stromstärke von 250 mA.

2.7.2. Färbung der transferierten Proteine

Zur Überprüfung der Transfereffizienz können die Proteine mit dem Ponceau-S-Farbstoff nach Salinovich und Montelaro (Salinovich und Montelaro, 1986) angefärbt werden. Die Anfärbung ist nicht permanent und interferiert weder mit Nachweis- noch mit Visualisierungsverfahren.

Materialien:

- Ponceau-S-Farbstoff (Fertiglösung)
- Ponceou-S-Lösung: Ponceau-S-Farbstoff + Aqua bidest im Verhältnis 1:10
- Inkubationsschale

Durchführung:

Die Membran wurde in einer Inkubationsschale mit der Ponceau-S-Lösung bedeckt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Um überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurde die Membran mehrmals mit PBS gewaschen. Nach dem Fotografieren der Membran wurde diese entweder gelagert oder für vorgesehene Nachweisverfahren mit PBS vollständig entfärbt.

2.7.3. Immunodetektion

2.7.3.1. Bindung des Erst- und des Zweit-Antikörpers

Die Nachweisreaktion wurde nach Protokollen von Whitehead (Whitehead et al., 1979) durchgeführt.
Das Funktionsprinzip beruht auf der Bindung des Erst-Antikörpers an eines der transferrierten Proteine. Zur Visualisierung dieses Immunkomplexes ist der Einsatz

eines Enzymmarkierten Zweit-Antikörpers notwendig. Dieser stammt aus einer anderen Spezies und richtet sich gegen konstante Bereiche des Erst-Antikörpers.
Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, ist es vor dem Nachweisverfahren notwendig, die überschüssigen Proteinbindungsstellen zu saturieren.

2.7.3.2. Visualisierung mittels Chemilumineszenz

Die Enzymmarkierung erlaubt eine indirekte Visualisierung der antikörpergebundenen Proteine (Ramlau, 1987; Kricka, 1993). Diese Methode hat den Vorteil, dass weder radioaktiver Abfall produziert wird, noch hoher apparativer Aufwand erforderlich ist. Bei Verwendung der Meerrettichperoxidase wird nach Zugabe entsprechender Substanzen ein Licht emittierendes Produkt gebildet, das die Position der gebundenen Antikörper sichtbar macht. Die Dokumentation erfolgt über die Exposition eines Röntgenfilms.

Materialien:

- Inkubationsschale
- Blocking-Puffer: 0,1 % Tween + 10 % Milchpulver in PBS
- 0,1 % Tween in PBS
- 0,3 % Tween in PBS
- Erst-Antikörper-Lösung: Erst-Antikörper + 0,1 % Tween + 5 % BSA gelöst in PBS (Verdünnung des Antikörpers nach Erfahrungswerten/ Herstellerangaben)
- Zweit-Antikörper-Lösung: Zweit-Antikörper-Konjugat + 0,1 % Tween + 5 % BSA gelöst in PBS
- ECL Chemolumineszenz-Kit
- Röntgenfilm
- Filmkassette
- Schüttler

Durchführung:

Die mit PBS entfärbte Membran wurde zum Saturieren in einer mit Blocking-Puffer ge-

füllten Inkubationsschale für 45 Minuten auf dem Schüttler geschwenkt. Nach dem Blocken wurde die Membran mit der Erst-Antikörper-Lösung für 1 Stunde unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 mal 10 Minuten in 0,1 % Tween PBS gewaschen. Die Inkubation der Membran mit der Zweit-Antikörper-Lösung wurde unter Schütteln für 45 Minuten durchgeführt.
Für die Visualisierung des Zweit-Antikörpers, wurde die Membran 3 mal 5 Minuten mit 0,3 % Tween PBS gewaschen und mit dem ECL-Chemolumineszenz-Kit für 1 Minute inkubiert. Dabei wurde das Luminol von der Meerrettichperoxidase oxidiert. Der Membran wurde in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm aufgelegt, zwischen 5 Sekunden und 5 Minuten exponiert und entwickelt. Die Befestigung der Membran in einer Filmkassette ermöglichte Expositionszeiten von 30 Minuten bis 24 Tage.
Die Position der Nachweisreagenzien wurde durch Lichtemission im Wellenlängenbereich von 428 nm über eine Schwärzung des Films sichtbar gemacht.

2.10. Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine empfindliche Methode zum Nachweis von Proteinen, die sogar Konzentrationen bis zu 1 ng Protein pro Bande noch erfasst. Dieses Verfahren basiert auf der Komplexierung von Ag+-Ionen mit Aminosäurenseitenketten, speziell mit Carboxyl- und Sulfhydrylgruppen.

Mateialien:

- Färbekit der Firma Amersham Pharmacia Biotech
- Fixationslösung: 100 ml Ethanol + 25 ml Essigsaüre + 125 ml Aqua bidest
- Sensitizing-Lösung: 75 ml Ethanol + 1,25 ml 25 % Glutardialdehyd + 10 ml 5 % Natriumthiosulfat + 17 g Natriumazetat + 164 ml Aqua bidest
- Silberfärbelösung: 25 ml 2,5 % Silbernitrat + 0,1 ml 37 % Formaldehyd + 225 ml Aqua bidest
- Entwicklungslösung: 6,25 g Natriumcarbonat + 0,05 ml 37 % Formaldehyd + 250 ml Aqua bidest
- Stoplösung: 3,65 g EDTA-Na_2 ●$2H_2O$ + 250 ml Aqua bidest
- Inkubationsschale

- Schüttler

Durchführung:

Nach Beenden der SDS-Page wurde das Gel unter leichtem Schütteln nacheinander für 30 Minuten in der Fixations-Lösung und der Sensitizing-Lösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel dreimal für 5 Minuten in Aqua bidest gewaschen.
Für die Silberreaktion wurde das Gel für 20 Minuten in die Silberfärbelösung überführt Nach zweimaligem Waschen des Gels für je 1 Minute in Aqua bidest, folgte die Inkubation in der Entwicklungslösung für 2 - 5 Minuten. Dieser Vorgang wurde durch die 10 Minuten lange Inkubation des Gels in der Stopplösung beendet. Anschließend wurde das Gel dokumentiert.

2.11. Proteinfällung

Die nach Zellaufschluss mit Kohlenhydraten, Nucleinsäuren und niedermolekularen Verbindungen in Lösung vorliegenden Proteine, werden durch das Ausfällen von diesen Komponenten isoliert.

Materialien:

- 3 M Trichloressigsäure
- 10 % Triton-x-100
- Hettich Universal Zentrifuge
- Kaltes Aceton
- Heizblock
- 10 % SDS
- Eppendorf-Tubes

Durchführung:

1 ml Proteinlösung wurde in ein Eppendorf-Tube überführt, mit 300 µl 3 M TCA und 150 µl 10 % Triton-x-100 gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach

Zentrifugation bei 13.000 rpm bei 4°C für 15 Minuten wurde das Pellet 2 mal mit 1 ml kaltem Aceton gewaschen und jeweils für 10 Minuten bei 13.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet auf dem Heizblock getrocknet und mit 50 - 100 µl 10 % SDS resuspendiert.

2.10. Subzelluläre Fraktionierung von Zelllinien

2.10.1. Endosomenpräparation

Die Präparation der Endosomen und deren Fraktionierung in frühe Endosomen, späte Endosomen und schwere Membranen beruht auf der Bildung eines Dichtegradienten, wobei PNS (post nuclear supernatant) mit unterschiedlich konzentrierten Sucrose-Lösungen behandelt und zentrifugiert wird. Mit einem Fraktionsteiler ist es möglich, die Fraktionen abzunehmen und zu den drei oben aufgeführten Fraktionen zu poolen.

Materialien:

- 1 x PBS
- HB-Puffer: 250 mM Sucrose + 3 mM Imidazol pH 7,4 + Pic 1/1000
- Pic: Proteaseinhibitorcocktail aus 1mM Pepstatin A + 10 mM Chymostatin + 10 mM Leupeptin + 10 mM Antipain
- Zellscharber
- 50 ml-Falcon
- Hettich Universal Zentrifuge
- Injektionskanüle G23
- Eppendorf-Tubes
- 62 % Sucrose-Lösung: 62 % Sucrose + 3 mM Imidazol
- 35 % Sucrose-Lösung: 35 % Sucrose + 3 mM Imidazol
- 25 % Sucrose-Lösung: 25 % Sucrose + 3 mM Imidazol
- Swing-out Beckmann SW-40 Rotor
- Fraktionsteiler

Durchführung:

10 große mit CHO- bzw. Annexin VI-überexprimierenden CHO-Zellen dicht besetzte Petrischalen wurden jeweils 2 mal mit kaltem PBS gewaschen. Jeder Petrischale wurde 5 ml HB-Puffer zugefügt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellscharbers vom Boden gelöst und in ein 50 ml-Falcon überführt.
Dieser wurde bei 4ºC in der Hettich Universal Zenrifuge bei mit 2500 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml HB + 1/1000 Pic resuspendiert. Zum Aufbrechen der Zellen wurde die Zellsuspension 15 - 20 mal mit der Injektionsspritze G23 passagiert und anschließend 15 Minuten bei 3.400 rpm bei 4°C in der Hettich Universal Zentrifuge pelletiert. Das PNS wurde abgenommen.
In ein Zentrifugations-Tube wurde 3ml HB überführt und nacheinander mit 2 ml 25 % Sucrose-Lösung, 3 ml 35 % Sucrose-Lösung und anschließend mit einem Gemisch aus 1160 µl 62 % Sucrose-Lösung und 840 µl PNS unterschichtet.
Die Dichtegradientenzentrifugation wurde für 90 Minuten bei 35.000 rpm bei 4°C im Swing-out Beckmann SW-40 Rotor durchgeführt. Im Anschluss wurden die Fraktionen mit einem Fraktionsteiler entnommen und auf 11 Eppendorf-Tubes verteilt. Für die schweren Membranen (bottom) wurden Fraktion 1 + 2, für die frühen Endosomen Fraktionen 4 + 5 + 6 und für die späten Endosomen (top) Fraktionen 7 + 8 + 9 + 10 gepoolt.

2.11.1. Bindungsversuche mit GST-Fusionsproteinen an Membranen

Materialien:

- PNS
- Frühe Endosomen
- Späte Endosomen
- Schwere Membranen
- Schüttler
- Zentrifuge 5810 R
- HB-Puffer: 250 mM Sucrose + 3 mM Imidazol pH 7,4 + Pic 1/1000

- Pic: Proteaseinhibitorcocktail aus 1 mM Pepstatin A + 10 mM Chymostatin + 10 mM Leupeptin + 10 mM Antipain

Durchführung:

Für die Membranbindungsversuche wurde PNS oder die nach Endosomenpräparation erhaltenen Fraktionen mit GST-Fusionsproteinen für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde bei 50000 rpm in der Eppendorf Zentrifuge 5810 R bei 4°C zentrifugiert. Sowohl der Überstand, als auch das in HB-Puffer resuspendierte Pellet, wurde in Eppendorf-Tubes überführt.

2.11.2. Expression von GST-Fusionsproteinen in E. coli

Um eine hohe Ausbeute eines rekombinanten Proteins zu gewinnen, wird ein dafür codierendes Gen in einen Vektor eingeführt und dieser in ein Wirtssystem, z.B. E. coli, eingebracht. Über die Zugabe von IPTG wird die Expression induziert.

Materialien:

- Transformierte E.coli JM 109 auf ampicillinhaltiger LB-Agar-Platte
- Ampicillinhaltiges LB-Medium
- Schüttelinkubator
- Photometer
- Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG)
- Beckmann J2HC
- PBS + Pic 1/1000
- Ultraschallgerät
- 10 % Triton-x-100
- Hettich Zentrifuge

Durchführung:

4 ml ampicillinhaltiges LB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie einer ampicillinhaltigen LB-Agar-Platte beimpft und über Nacht bei 37˚C kultiviert. 1 ml der

Übernachtkultur wurde in 200 ml ampicillinhaltiges LB-Medium überführt und bei 37°C geschüttelt. Das Zellwachstum wurde durch Trübungsmessung bei 600 nm alle 30 Minuten kontrolliert. Bei Erreichen einer optischen Dichte zwischen 0,5 und 0,8, erfolgte die Induktion mit 0,4 mM IPTG von 0,6 - 0,8. Die Kultur wurde für 4 Stunden oder über Nacht bei 37˚C im Schüttelinkubator inkubiert.
Nach dieser Inkubationszeit wurde die Kultur für 5 Minuten bei 5000 rpm in der Beckmann J2HC bei 4˚C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 2 ml PBS + Pic 1/1000 resuspendiert. Um die Bakterienzellen zu lysieren, wurde 3 x 10 Sekunden bei 60 Watt sonifiziert. Um eine Erwärmung zu vermeiden wurde dieser Arbeitsschritt auf Eis und mit einminütigen Pausen durchgeführt. Im Anschluss wurde der Bakteriensuspension 250 µl 10 % Triton-x-100 zugefügt und 30 Minuten bei 4˚C geschüttelt. Das Zentrifugieren für 10 Minuten bei 12.000 rpm in der Hettich Zentrifuge führte zu einem Zellwandfragmente enthaltenden Sediment und einem Proteine enthaltenden Überstand, der aufbewahrt wurde.

2.11.3. Reinigung der GST- Fusionsproteine

Nach der Induktion der Bakterien führt die Extrahierung der Proteinen zu einer unspezifischen Proteinlösung, aus der die GST-Fusionsproteine isoliert werden müssen. Dafür werden diese an Gluthation-Sepharose 4B gekoppelt. Der Sepharoseanteil erlaubt eine Abzentrifugation, nach der die GST-Fusionsproteine dann wieder von der Sepharose abgespalten werden können.

Materialien:

- Glutathion-Sepharose 4B
- PBS + Pic 1/1000
- Biofuge
- Elutionspuffer: 10 mM Glutathion in 50 mM Tris pH 8,0
- End-zu-End-Schüttler
- Eppendorf-Tubes

Durchführung:

Um die GST-Fusionsproteine an Gluthation-Sepharose zu binden, wurde die Ethanol enthaltene Gluthation Sepharose 4B erst von diesem befreit. Dafür wurden 200 µl Glutathion-Sepharose 4B für 5 Minuten bei 2600 rpm in der Biofuge 13 zentrifugiert. Der Ethanolhaltige Überstand wurde abgehoben, das Sediment mit 1 ml PBS + Pic gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 2600 rpm in der Biofuge 13 zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 200 µl PBS + Pic resuspendiert.
Um die GST-Fusionsproteine an die gewaschene Sepharose zu binden, wurde mit 1,5 ml Proteinlösung inkubiert und für 30 Minuten bei 4°C End-über-End gerollt. Zur Entfernung der nicht gebundenen Proteine wurde für 5 Minuten bei 2600 rpm in der Biofuge 13 zentrifugiert. Der Überstand mit dem ungebundenen Material wurde verworfen. Das Pellet wurde 3 mal mit 500 µl PBS + Pic gewaschen und für 5 Minuten bei 2600 rpm in der Biofuge 13 zentrifugiert.
Um die GST-Fusionsproteine dann von der Sepharose abzukoppeln, wurde das Pellet mit 150 µl Elutionspuffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das anschließende Zentrifugieren für 5 Minuten bei 2600 rpm führte zu einem GST-Fusionsproteinreichen Überstand, der vorsichtig abgehoben und in Eppendorf-Tubes überführt wurde. Das Pellet wurde einer weiteren Elution unterzogen. Der abgenommene Überstand wurde dann mit dem aus der ersten Elution gepoolt und über Nacht dialysiert. Die Ausbeute an GST-Fusionsproteinen wurde nach Durchführung einer SDS-Page über Silberfärbung nachgewiesen.

2.12. Bindungsversuche mit GST-Fusionsproteinen an Proteine aus CHO-Wildtyp-Extrakten (GST-pulldown-Versuche)

Die Inkubation der GST-Fusionsproteine mit Zellextrakten kann zur Prüfung der Protein-Protein-Interaktion durchgeführt werden. Das Verfahren beruht auf einer Bindung von Proteinen an Glutathion-Sepharose 4B gekoppelte GST-Fusionsproteine, die über Abzentrifugation isoliert und dann abgelöst werden können.

Materialien:

- Glutathion-Sepharose 4B

- Dithioerythrol
- PBS
- Lysispuffer: 150 mM NaCl + 1 % Triton + 20 mM Tris pH 8,0
- End-zu-End-Schüttler
- CHO-Proteinextrakt
- Biofuge 13
- 10 % SDS

Durchführung:

Für die Bindung der GST-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose 4B wurde diese vom Ethanol befreit (s. 11.2).
20 - 40 µl GST-Fusionsprotein wurden mit 50 µl Glutathion-Sepharose 4B und 100 mM Dithioerythriol gemischt. Dieser Ansatz wurde auf ein Endvolumen von 1 ml mit PBS aufgefüllt und für 2 Stunden bei 4°C End-zu-End gerollt. Mit der anschließenden Zentrifugation für 5 Minuten 3500 rpm erhielt man ein Sediment, das aus einem Sepharose-GST-Fusionsprotein-Komplex bestand.
Das Sediment wurde 3 mal mit 1 ml Lysispuffer gewaschen und im Anschluss mit 400 - 800 µl CHO-Proteinextrakt für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Um Proteine, die an diesen Komplex gebunden haben, von den nicht Gebundenen zu trennen, wurde für 5 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert. Das komplexhaltige Sediment wurde 3 mal mit 1 ml PBS gewaschen. Der Überstand mit den nicht gebundenen Proteinen wurde aufbewahrt.
Für die darauffolgende Trennung der Proteine von den GST-Fusionsproteinen wurde das Sediment mit 25 µl 10 % SDS für 3 Minuten bei 92°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für wenige Sekunden bei 13.000 rpm wurde der an abgetrennten Proteinen reiche Überstand abgenommen und mit Nachweisverfahren analysiert.

2.13. Immunfluoreszenz

Die Immunfloureszenz erlaubt die Darstellung zellulärer Strukturen, die mikroskopisch betrachtet werden können. Die Methode beruht auf einer Immunodetektion, bei welcher der sekundäre Antikörper einen floureszierenden Farbstoff enthält, der dann die Betrachtung im Mikroskop ermöglicht.

Materialien:

- Coverslips
- 1 x PBS
- 100 % Methanol
- Blocklösung: 1 x PBS; 0,5 % Glycin; 1 % BSA
- Antikörper
- 0,001 % Bisbenzimid
- Mowiol
- PPD

Durchführung:

Die mit Zellen behafteten coverslips wurden in 1 x PBS 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf den coverslips mit 100 % Methanol für 2,5 Minuten bei -20°C fixiert.
Die coverslips wurden dann in 1 x PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die coverslips für 20 - 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer Blocklösung geschüttelt. Es folgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper. Dafür wurde dieser in gewünschter Konzentration der Blocklösung zugefügt, diese dann gevortext, abzentrifugiert und dann auf die coverslips verteilt. Pro coverslip wurden 60 µl dieser Lösung aufgetragen und für 1 Stunde bei 37° C lichtgeschützt inkubiert. Die coverslips wurden danach 2 mal in 1 x PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Das Procedere wurde für die Inkubation mit dem 2. Antikörper wiederholt. Dabei wurde die gewünschte Konzentration des 2. Antikörpers eingesetzt. 60 µl der Blocklösung mit dem 2. Antikörper wurden dann auf die Coverslips aufgetragen und es wurde lichtgeschützt für 45 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Coverslips 3 mal in 1 x PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen.
Die sich anschließende Zellkernfärbung erfolgt in 1 x PBS + 0,001 % Bisbenzimid für 3 Minuten bei Raumtemperatur. Nachdem 3 mal in 1 x PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen wurde, erfolgte das Eindeckeln der Coverslips mit 5 µl Mowiol und PPD im Verhältnis 5:1.

III. Ergebnisse

1.1. Darstellung des Annexin VI mittels Immunfluoreszenz

Annexin VI ist ein viel untersuchtes, aber bis heute immer noch weitgehend unbekanntes Protein. Trotz intensiver Forschung und bereits vorliegender Erkenntnisse über Struktur, Lokalisation und Funktion, ist die Frage nach der Hauptfunktion dieses Proteins nach wie vor ungeklärt. Bekannt ist, dass Annexin VI in einer Vielzahl von Geweben und Zelltypen verbreitet ist. Je nach Zelltyp und Zustand einer Zelle, kann die zelluläre Verteilung des Annexin VI in unterschiedlichen Strukturen, wie der Plasmamembran, dem Aktinzytoskelett, dem Sarkoplasmatische Retikulum und den endocytotischen Kompartimenten, nachweisbar sein. Die weite Verbreitung des Annexin VI deutet bislang auf eine Rolle als multifunktionelles Protein hin. Die Kolokalisationen mit den aufgezählten zellulären Strukturen könnten auf eine Interaktion mit diesen hindeuten. Ein Beispiel hierfür ist die Anreicherung des Annexin VI entlang der Plasmamembran, das die Rolle dieses Proteins in der Endocytose untermauert.
In den folgenden Versuchen sollte die zelluläre Verteilung des Annexin VI in CHO-Zellen dargestellt und mit der von AnnexinVI$_{1\text{-}175}$ verglichen werden. Das Ziel dieses Experiments war, durch mögliche Differenzen in der Lokalisation, Rückschlüsse auf die Funktionen zu erlangen. Als dritter Vergleichspartner wurde außerdem noch eine Annexin VI-überexprimierende CHO-Zelllinie herangezogen.

Die Darstellung des endogenen Annexin VI in CHO-Wildtypzellen in der Immunfloureszenz ist aufgrund einer sehr schwachen Floureszenz relativ schwierig. Die Erklärung dafür liegt in der niedrigen zellulären Konzentration des Annexin VI. In Folge dessen, erforderte die Darstellung deutlicher Signale ein Anheben der zellulären Annexin VI-Konzentration, das mittels transienter Transfektion von Annexin VI-DNA erreicht werden konnte.

Die Abbildung 1b zeigt eine transfizierte neben zwei nicht-transfizierten Zellen. Der Unterschied in der Intensität der Floursezenz ist in der Abbildung deutlich sichtbar. Darüber hinaus zeichnet sich die transfizierte Zelle durch eine punktförmige Floureszenz unterhalb der Plasmamembran und im perinukleären Bereich aus.

Abb.1a: Zellkernfärbung von CHO-Wildtypzellen nach transienter Transfektion mit AnnexinVI-DNA

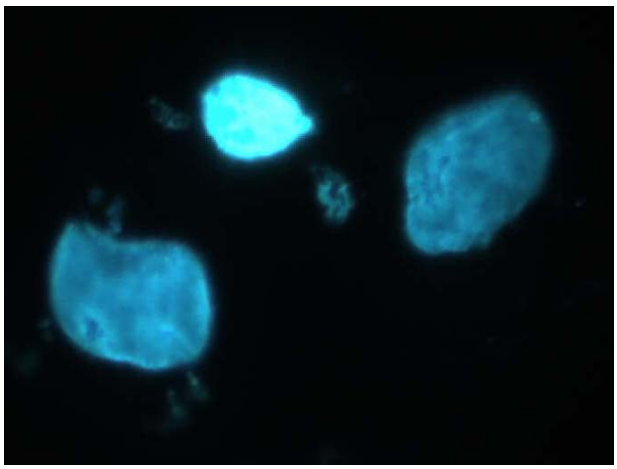
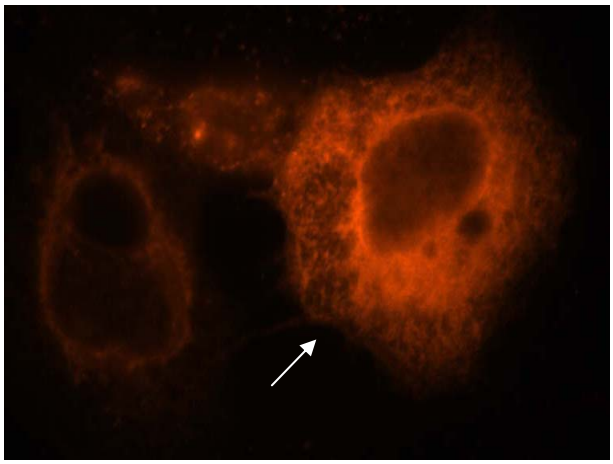


Abb.1b:Darstellung von AnnexinVI in CHO-Wildtypzellen. Der verwendete 1. Antikörper α-AnnexinVI wurde in einer Konzentration von 1:10, der 2. Antikörper α-Schaf 1:250, eingesetzt.

Am rechten Bildrand erkennt man eine mit AnnexinVI-DNA transfizierte Zelle. Im Kontrast dazu stehen die am linken Bildrand nicht transfizierten Zellen.



1.2. Darstellung des AnnexinVI in einer AnnexinVI-überexprimierenden Zelllinie

Neben der transienten Transfekton ist es möglich, die für die Immunfloureszenz erforderliche AnnexinVI-Konzentration, durch die Herstellung einer AnnexinVI-überexprimierenden Zelllinie, zu erhöhen.

Die Abblidung 2 zeigt eine AnnexinVI-überexprimierende CHO-Zelllinie. Man erkennt ein starkes Floureszieren des gesamten Zytoplasmas. Im Gegensatz dazu erscheint der Zellkern ausgespart. Der perinukleäre Bereich, sowie die Plasmamembran, treten durch besonders intensives Floureszieren in den Vordergrund.

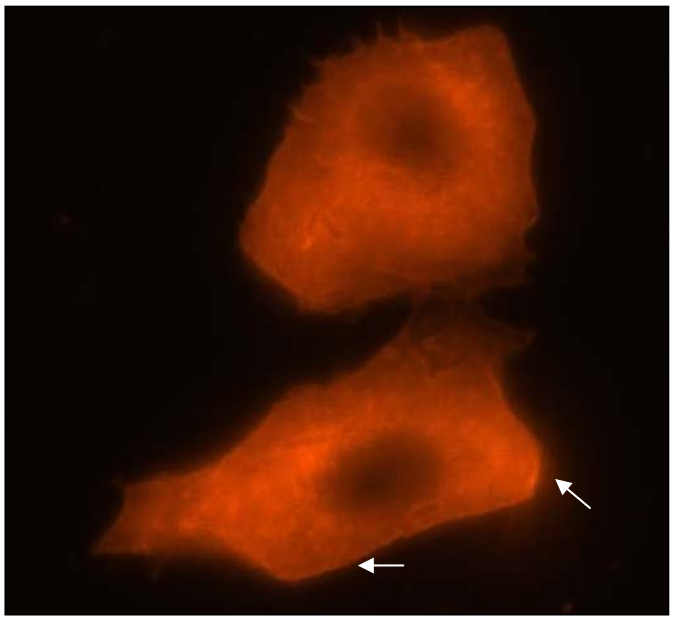


Abb.2: Darstellung des AnnexinVI zweier AnnexinVI-überexprimierender Zellen. Der 1. Antikörper α-AnnexinVI wurde in einer Konzentration 1:20 eingesetzt. Als 2. Antikörper wurde α-Schaf 1:250 verwendet.

Pfeile entlang des rechten Bildrands: Floureszenz der Plasmamembran

1.3. Darstellung des AnnexinVI$_{1-175}$ mittels Immunfloureszenz

Um AnnexinVI$_{1-175}$ in der Immunfloureszenz darzustellen, musste man eine transiente Transfektion der entprechenden DNA in CHO-Wildtypzellen durchführen. Diese für die CHO-Wildtypzellen unpysiologische AnnexinVI-Mutante zeichnete sich in der Versuchsreihe durch problematischen Umgang aus.

Die Abbildung 3b zeigt AnnexinVI$_{1-175}$ in CHO-Wildtypzellen. Im Gegensatz zu den nicht transfizierten CHO-Wildtypzellen, ist die AnnexinVI-Mutante durch intensivere Floureszenz gekennzeichnet. Ein ausgeprägtes Floureszieren bemerkt man hauptsächlich im perinukleären Bereich.

Abb.3a: Zellkernfärbung von AnnexinVI$_{1-175}$ in CHO-Wildtypzellen nach erfolgreicher transienter Transfektion.

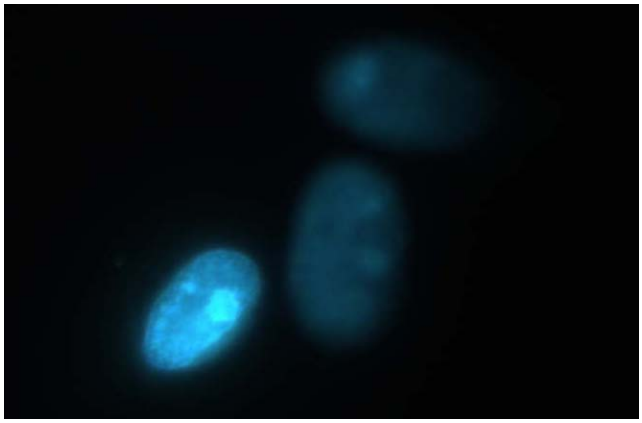
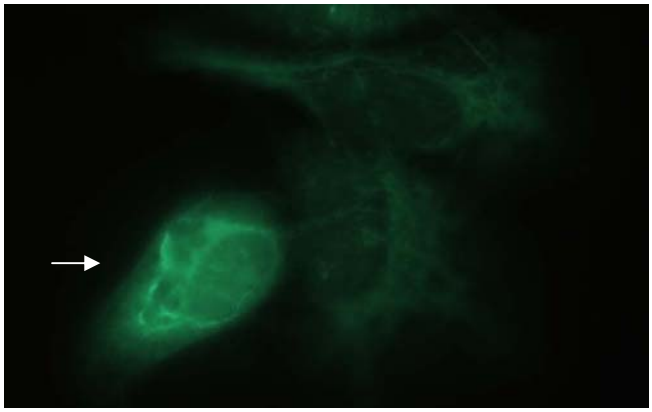


Abb.3b: Darstellung von AnnexinVI$_{1-175}$.
Als 1. Antikörper wurde α-AnnexinVI 1:10 verwendet.
Als 2. Antikörper wurde α-Schaf 1:250 eingesetzt.
Unten links: AnnexinVI$_{1-175}$ exprimierende CHO-Wildtypzelle
Mitte und oben: zwei nicht transfizierte CHO-Wildtypzellen



2. Darstellung des AnnexinVI und der Deletionsmutante AnnexinVI$_{1-175}$ mittels Western Blot

Für die Darstellung des AnnexinVI und der Deletionsmutante AnnexinVI$_{1-175}$ wurden die Proteine aus unterschiedlichen Zelllinien präpariert. Während das AnnexinVI in CHO-Wildtypzellen und in einer AnnexinVI-überexprimierenden CHO-Zelllinie nachgewiesen werden konnte, ist es nicht gelungen, die stabile Expression in einer AnnexinVI$_{1-175}$-exprimierenden Zelllinie (trotz neoR) nachzuweisen, was auf eine reduzierte Stabilität der AnnexinVI-Mutante deutet. Die Problematik in der Herstellung der stabilen Zelllinie führte letztlich zu der Expression des AnnexinVI$_{1-175}$ durch transiente Transfektion der entsprechenden DNA in CHO-Wildtypzellen. Die Proteine wurden in einer 12,5 % SDS-Page aufgetrennt und der Western Blot-Analyse unterzogen. Die schwache Expression des AnnexinVI$_{1-175}$ konnte nur mit einem polyklonalen (unspezifischen) AnnexinVI Antikörper nachweisen werden.

AnnexinVI wird im Western Blot in Höhe von 68 kDa dargestellt. Das endogene AnnexinVI der CHO-Wildtypzellen zeigt eine dezente Bande. Im Kontrast dazu steht die intensive Bande der AnnexinVI überexprimierdenden CHO-Zelllinie. AnnexinVI$_{1-175}$ wird durch eine schwache 20 kDa Bande dargestellt.

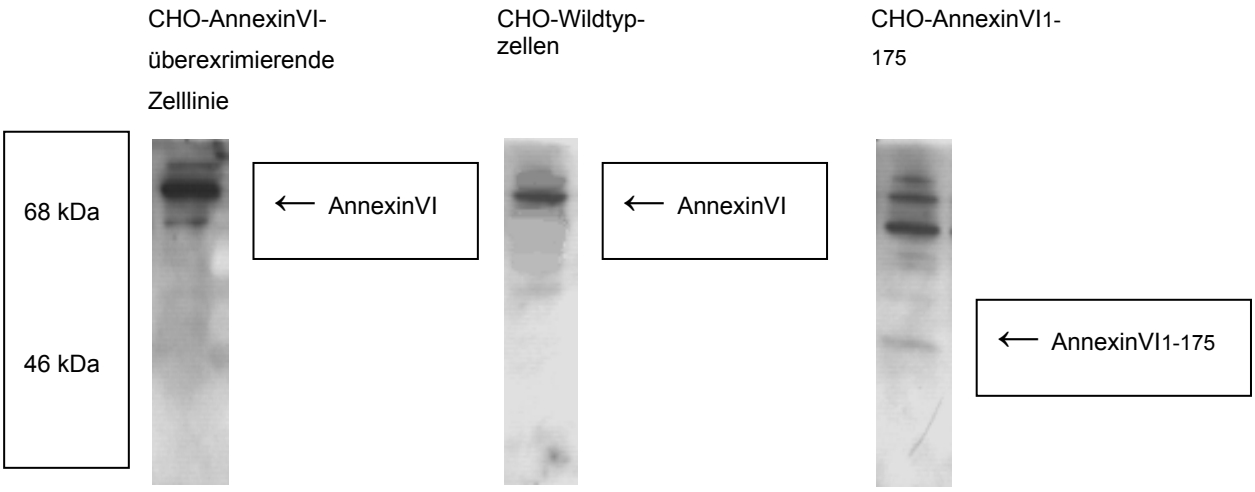


Abb.4: Darstellung von AnnexinVI und AnnexinVI$_{1-175}$. Nach Beenden der 12,5 % SDS-Page ist in der Western Blot-Analyse mit dem polyklonalen 1. Antikörper α-AnnexinVI 1:50 inkubiert worden. Als 2. Antikörper wurde α-Schaf 1:1000 verwendet.

3. Induktion von GST-Fusionsproteinen in JM 109-Escheria coli-Bakterien

Mit Hilfe der Induktion mit Isopropyl-ß-D-Thiogalactosidase sollte das 94 kDa schwere GST-AnnexinVI aus GST-AnnexinVI transformierten Bakterien gewonnen werden. Zu diesem Zweck wurden die GST-AnnexinVI-transformierten Bakterienkulturen mit 0,4 mM IPTG über Nacht induziert. Anschließend wurde das GST-AnnexinVI mittels Glutathion-Sepharose-beads isoliert.

Um zu untersuchen ob die Ausbeute an GST-AnnexinVI gelungen ist, wurde die erste Elutinon der aufgereinigten Proteine in unterschiedlichen Volumina (10 µl, 50 µl und 100 µl) sowie 100 µl mit IPTG induzierte, lysierte Bakterienpellets und 100 µl nicht induzierte, lysierte Bakterienpellets in 10 % SDS-Page aufgetrennt und mit der Silberfärbung dargestellt.

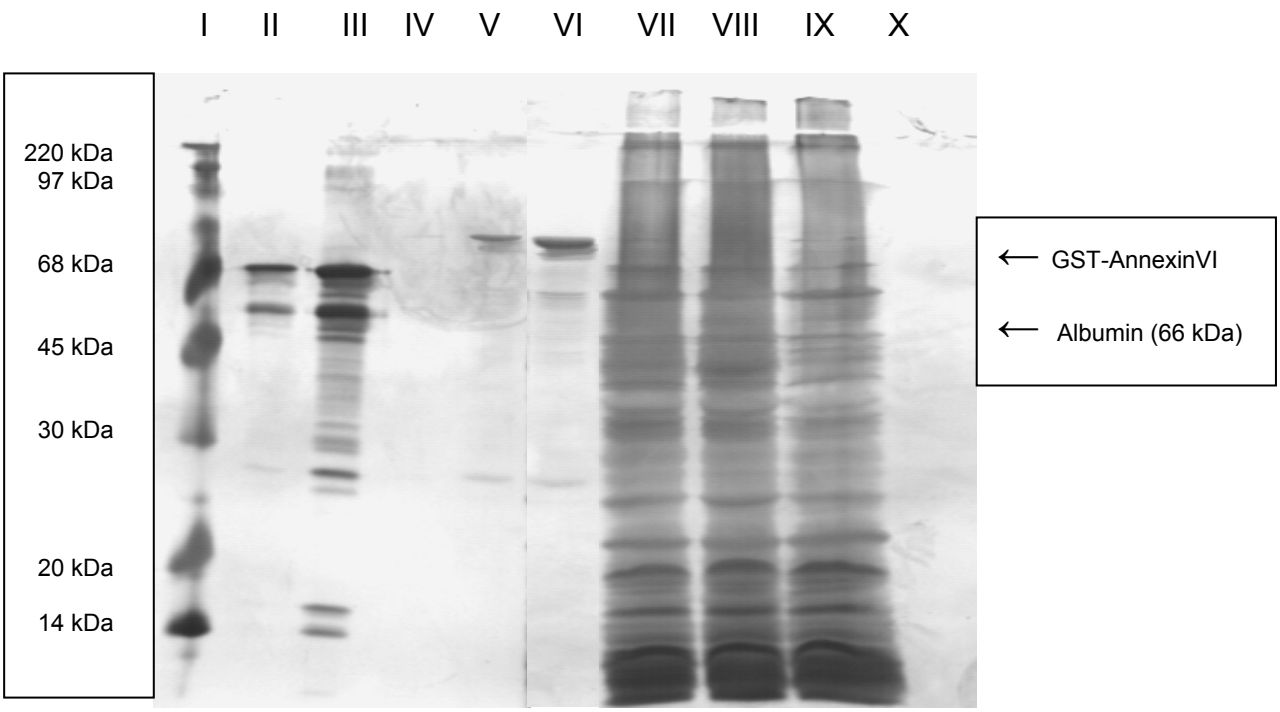


Abb.5: Silbergel zum Nachweis der Induktion von GST-AnnexinVI in JM-109 E.coli

Lane I: Rainbow Coloured Protein Weight Marker
Lane II: 1 µg Albumin
Lane III: 0,2 µg Albumin
Lane IV: 10 µl Eluat
Lane V: 50 µl Eluat
Lane VI: 100 µl Eluat
Lane VII, IX: 100 µl Lysat + IPTG
Lane VIII, X: 100 µl Lysat

4. Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen des AnnexinVI und AnnexinVI$_{1-175}$ mittels GST-pulldown-Versuchen

AnnexinVI interagiert vermutlich mit einer Vielzahl von Proteinen. Ein sehr bekannter Interaktionspartner scheint das Dynamin zu sein. Aber auch anderen Proteinen, wie dem Caveolin, dem GAP (GTPase Activating Protein) und dem Pan-Ras, wird diese Eigenschaft nachgesagt. Um dies zu überprüfen, wurden GST-pulldown-Versuche durchgeführt. Das Prinzip dieser Versuche beruht auf Sepharose-gekoppelten GST-Fusionsproteinen, die bei Inkubation mit Zellextrakten anderen Proteinen die Bindung an den Sepharose-GST-Fusionsprotein-Komplex ermöglichen. Das an diesen Komplex nicht gebundenen Material wird dann durch Zentrifugation abgelöst.

Die Abbildung 6 zeigt in Lane VII und VIII A eine Bande in Höhe von 100 kDa, welche typisch für das Dynamin ist. Damit konnte die Interaktion des GST-AnnexinVI mit Dynamin nachgewiesen werden. Bei dem Einsatz von Antikörpern gegen Caveolin (Lane VII und VIII A) , GAP (Lane VII und VIII B) und Pan-Ras (Lane VII und VIII B) wurden keine Banden sichtbar.
Das GST-AnnexinVI$_{1-175}$ zeigt weder eine Interaktion mit Dynamin (Lane V und VI A), noch mit Caveolin (Lane V und VI A), GAP (Lane V und VI B) und Pan-Ras (Lane V und VI B).

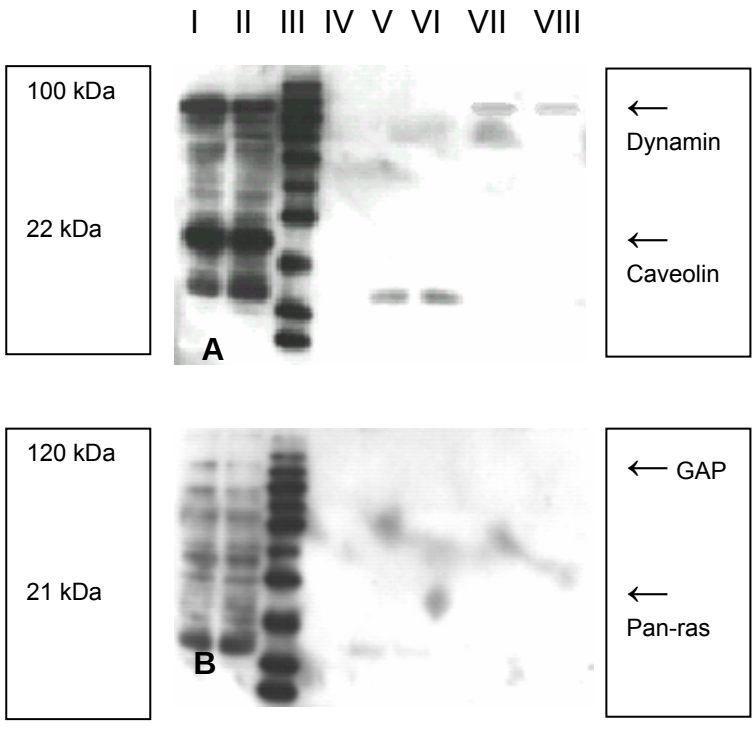


Abb. 6: Darstellung der Protein-Protein-Interaktionen von GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ mit Dynamin, Caveolin, GAP (GTPase Activating Protein) und Pan-Ras.
Eingesetzte 1. Antikörper: α-Dynamin 1:1000, α-Caveolin 1:1000, α-GAP 1:1000 und α-Pan-Ras 1:1000. Visualisiert wurde jeweils mit dem 2. Antikörper α-Maus 1:1000.
Lane I A, B: Überstand mit GST-AnnexinVI$_{1-175}$
Lane II A, B: Überstand mit GST-AnnexinVI
Lane III A, B: ECL-Marker
Lane IV A, B: frei
Lane V, VI A, B: GST-AnnexinVI$_{1-175}$
Lane VII, VIII A, B: GST-AnnexinVI

5. Bindung von GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an CHO-Wildtypmembranen

AnnexinVI stimuliert aufgrund seiner membranbindenden Eigenschaften die Endocytose. Die Bindung an Membranen geschieht unter Anwesenheit von Calcium, das somit eine entscheidende Rolle bei der Membranbindung zu spielen scheint. Die Deletionsmutante AnnexinVI$_{1-175}$ scheint dagegen, die Fähigkeit an Membranen zu binden, verloren zu haben. Dies könnte auf die Deletion am C-terminalen Ende zurückzuführen sein, da dort die Bindungsstellen für das Calcium vermutet werden. Die durchgeführten Experimente sollten die Calcium-abhängige Membranbindung von AnnexinVI, sowie die Auswirkungen der Deletion der Calcium-Bindungsstellen analysieren. In Experimenten wurde das Bindungsverhalten der Proteine an Membranen in Abhängigkeit von Calcium, Proteinen und Membranen untersucht.

5.1. Calcium-abhängige Bindung von GST-AnnexinVI an CHO-Wildtyp-membranen

In diesem Experiment wurde das Bindungsverhalten des zugeführten GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an Membranen unter Zugabe von $CaCl_2$, sowie unter $CaCl_2$-Entzug mittels EGTA untersucht.
Es wurden 5µg GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ mit 20µl PNS (post nuclear supernatant), das aus CHO-Wildtypzellen präpariert wurde, inkubiert. Nach Zufügen von 5mM EGTA bzw. 500µM $CaCl_2$ wurde mit HB-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 50µl aufgefüllt. Nachdem 1 Stunde bei 4°C inkubiert wurde, schloss sich eine Zentrifugation in der TL Beckmann bei 50000 rpm für 1 Stunde bei 4°C an. Nach Entnahme des Überstands, wurde das Pellet in 50µl HB-Puffer resuspendiert.
Das Pellet, das die membrangebundene Fraktion und der Überstand, der die im Cytosol befindliche ungebundene Fraktion darstellt, wurden einer Western Blot-Analyse unterzogen. Auf diese Weise konnte das unterschiedliche Bindungsverhalten an CHO-Wildtypmembranen von GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ verdeutlicht werden.

GST-AnnexinVI bindet unter Calcium-Zugabe an Membranen (Lane VI), während der Calcium-Entzug durch EGTA ein Ausbleiben der Membranbindung bewirkt (Lane VIII).

Das GST-AnnexinVI$_{1-175}$ deutet dagegen auf eine Calcium-unregulierte Bindung an Membranen hin. Die Deletionsmutante ist in der Lage eine schwache Bindung an Membranen sowohl unter Calcium als auch unter EGTA-Zugabe einzugehen (Lane II und IV).

Als Kontrollmaßnahme wurde die Bindung des endogenen AnnexinII aller Proben untersucht. Die Western Blot-Analyse verdeutlicht, dass das AnnexinII bei seiner Bindung an Membranen einer Calcium-Regulation ähnlich dem GST-AnnexinVI, unterliegt (Lane I - VIII).

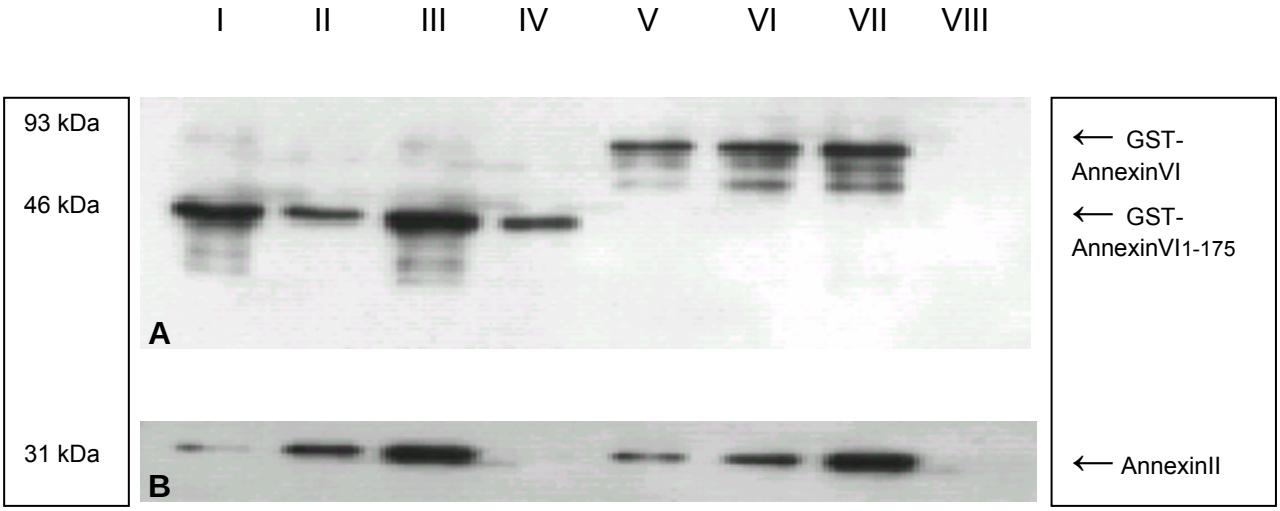


Abb.7: Nachweis der Calcium-abhängigen Bindung von GST-AnnexinVI an Membranen. Das 12,5% Minigel wurde nach SDS-Page der Western Blot -Analyse unterzogen. In A wurde als 1. Antikörper α-AnnexinVI 1:50, sowie der 2. Antikörper α-Schaf 1:1000 eingesetzt. In B wurde der 1. Antikörper α-AnnexinII H7 1:1000 und als 2. Antikörper α-Maus 1:1000 eingesetzt.

Lane I A: Ungebundenes GST-AnnexinVI$_{1-175}$ + $CaCl_2$
Lane II A: Membrangebundenes GST-AnnexinVI$_{1-175}$ + $CaCl_2$
Lane III A: Ungebundenes GST-AnnexinVI$_{1-175}$ + EGTA
Lane IV A: Membrangebundenes GST-AnnexinVI$_{1-175}$ + EGTA
Lane V B: Ungebundenes AnnexinII + $CaCl_2$
Lane VI B: Membrangebundenes AnnexinII + $CaCl_2$
Lane VII B: Ungebundenes AnnexinII + EGTA
Lane VIII B: Membrangebundenes AnnexinII + EGTA

5.2. Bindung von GST-AnnexinVI, GST-AnnexinVI$_{1-175}$, GST an CHO-Wildtypmembranen bei aufsteigenden Calcium-Konzentrationen

Um die Calcium-abhängige Membranbindung deutlicher darzustellen, wurde das unter 5.1. beschriebene Experiment modifiziert. GST-AnnexinVI als auch GST-AnnexinVI$_{1-175}$ wurden mit aufsteigenden Calcium-Konzentrationen inkubiert. Zur Kontrolle des Einflusses des GST-Anteils bei der Membranbindung wurde auch dieses mit aufsteigenden Calcium-Konzentrationen titriert. Drei Versuchsreihen wurden ausgearbeitet. In zwei Experimenten wurden GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ (Abb. 8) unterschiedlichen Calcium-Konzentrationen ausgesetzt, in einem dritten Versuch wurde GST (Abb. 10) untersucht. 5 µg GST-AnnexinVI, GST-AnnexinVI$_{1-175}$ und GST wurden mit 20 µl CHO-Wildtyp-PNS (post nuclear supernatant) inkubiert. Zusätzlich wurde 250 nM $CaCl_2$, 1 µM $CaCl_2$, 25 µM $CaCl_2$ und 50 µM $CaCl_2$ sowie 5 mM EGTA, 50 µM $CaCl_2$, 250 µM $CaCl_2$ und 500 µM $CaCl_2$ hinzugefügt.

Die Abbildung 8 verdeutlicht, dass die Calcium-Titration die Bindung von GST-AnnexinVI an Membranen steigert (Lane I - IV A). Das GST-AnnexinVI$_{1-175}$ zeigt dagegen keine sichtbare Zunahme der Membranbindung (Lane I - IV B).

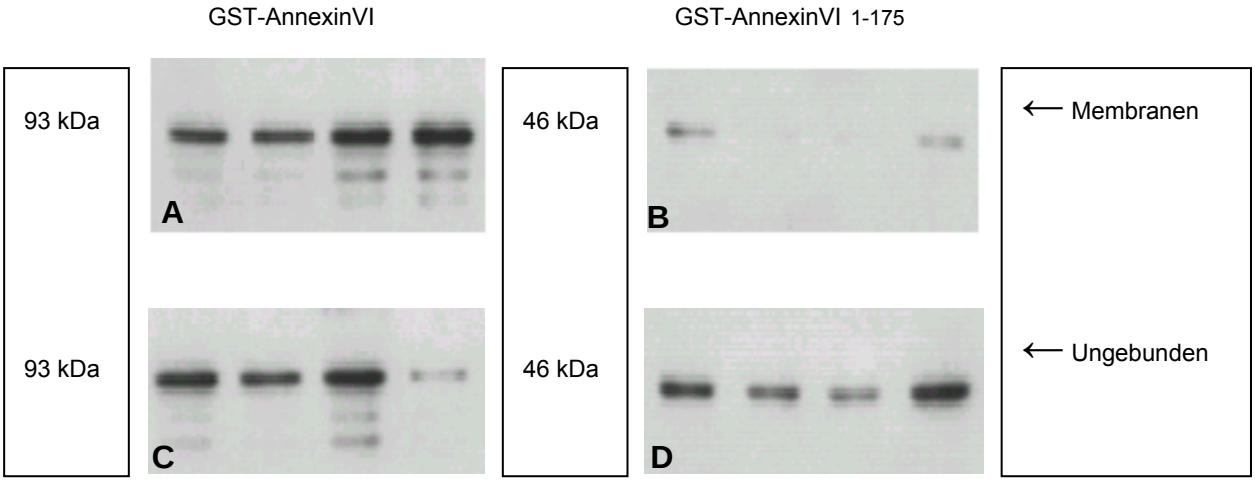


Abb.8: Minigele zum Nachweis der Bindungszunahme des GST-AnnexinVI an Membranen. Nach 12 % SDS-Page wurde im Western Blot mit dem ploy klonalen 1. Antikörper α-AnnexinVI 1:50 inkubiert und mit dem 2. Antikörper α-Schaf 1:1000 visualisiert.

Lane I A, B, C, D: 250 nM $CaCl_2$ Lane III A, B, C, D: 25 µM $CaCl_2$

Lane II A, B, C, D: 1 µM $CaCl_2$ Lane IV A, B, C, D: 50 µM $CaCl_2$

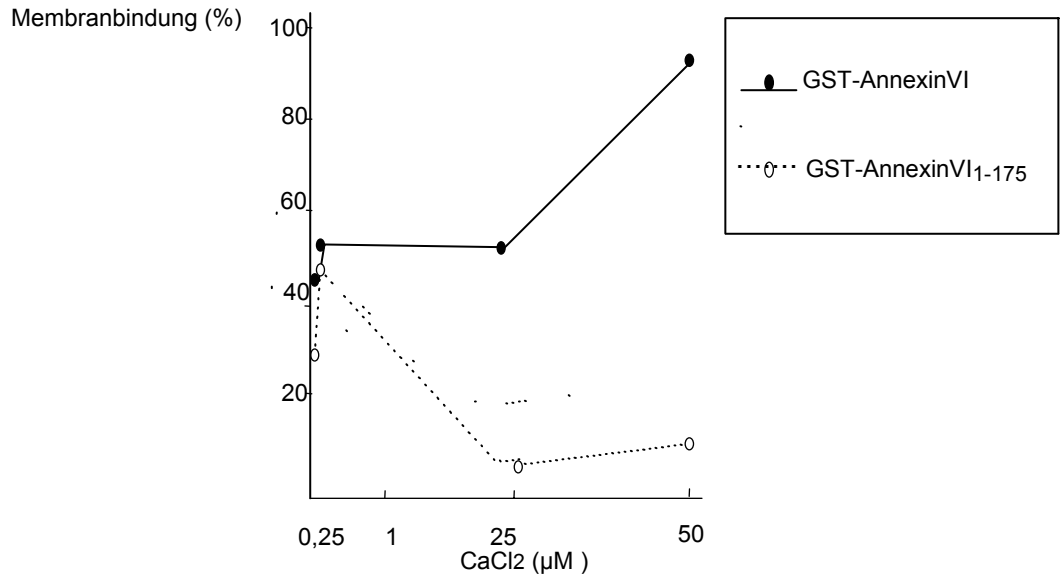


Abb.9: Graphische Gegenüberstellung des Bindungsverhaltens von GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI1-175.

In Abbildung 9 ist das Membranbindungsverhalten des GST-AnnexinVI dem des GST-AnnexinVI1-175 graphisch gegenübergestellt. Es wird deutlich, dass die Bindung des GST-AnnexinVI an Membranen bei Calcium-Konzentrationen von 25 – 50 µM eine starke Zunahme zeigt. Die verhältnismäßig intensive Membranbindung bei 250 nM $CaCl_2$ könnte aufgrund Pipettierfehler verursacht worden sein.

Die Abbildung 10 stellt die Bindung des GST-Anteils an Membranen dar (C). Man erkennt eine intensive Membranbindung. Möglicherweise ist diese auch die scheinbare Bindung des GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an Membranen verantwortlich (B).

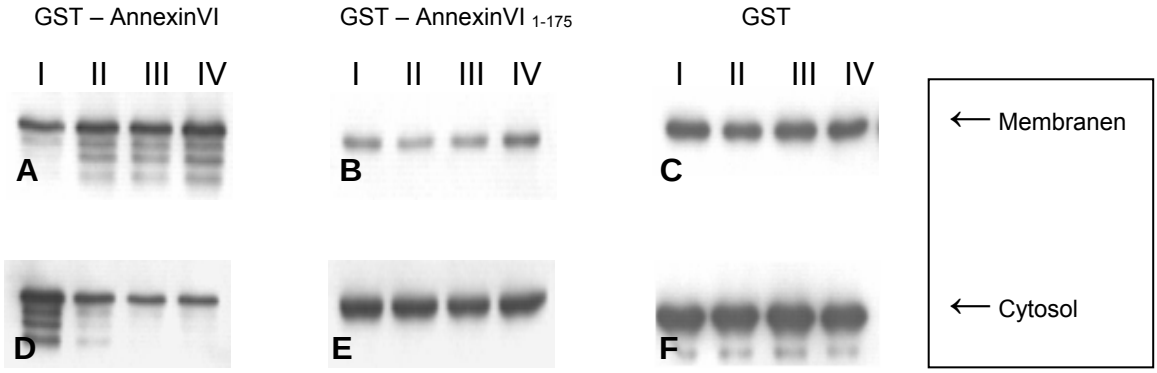


Abb.10: Vergleich des Bindungsverhaltens von GST-AnnexinVI, GST-AnnexinVI$_{1-175}$ und GST an Membranen bei Zugabe steigender Calcium-Konzentrationen. Nach 12 % SDS-Page wurde in der Western Blot-Analyse mit dem monoklonalen Antikörper α-GST-AnnexinVI 1:250 inkubiert. Als 2. Antikörper wurde α-Hase 1:1000 eingesetzt.

1. Lane I A, B, C, D, E, F: 5 mM EGTA
2. Lane II A, B, C, D, E, F: 50 µM $CaCl_2$
3. Lane III A, B, C, D, E, F: 250 µM $CaCl_2$
4. Lane IV A, B, C, D, E, F: 500 µM $CaCl_2$

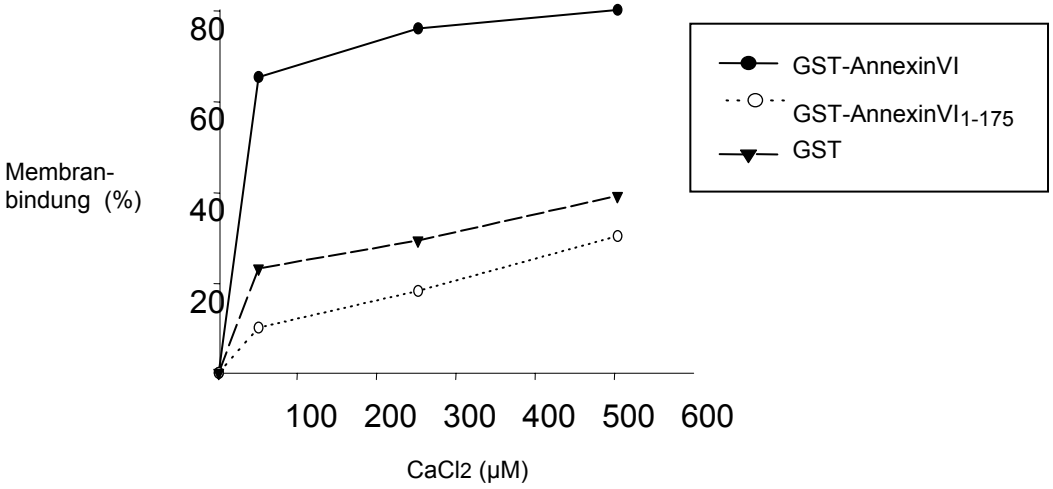


Abb.11 Graphische Gegenüberstellung des Bindungsverhaltens von GST-AnnexinVI, GST-AnnexinVI$_{1-175}$ und GST an CHO-Wildtypmembranen bei steigenden Calcium-Konzentrationen.

5.3. Bindung des GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an CHO-Wildtypmembranen bei steigenden Proteinkonzentrationen

Um die Bindungskapazität von GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ bei steigendem Proteinangebot zu untersuchen, wurden Konzentrationen von 2 µg, 4 µg, 8 µg und 10 µg mit 25 µM $CaCl_2$ und 40 µl Membranextrakt inkubiert.

In der Western Blot-Analyse wurde nachgewiesen, dass steigende GST-AnnexinVI-Konzentrationen zu einer verstärkten Bindung an CHO-Wildtypmembranen führen. Das Bindungspotential des GST-AnnexinVI$_{1-175}$ wird mit zunehmender Titration ebenso intensiviert.

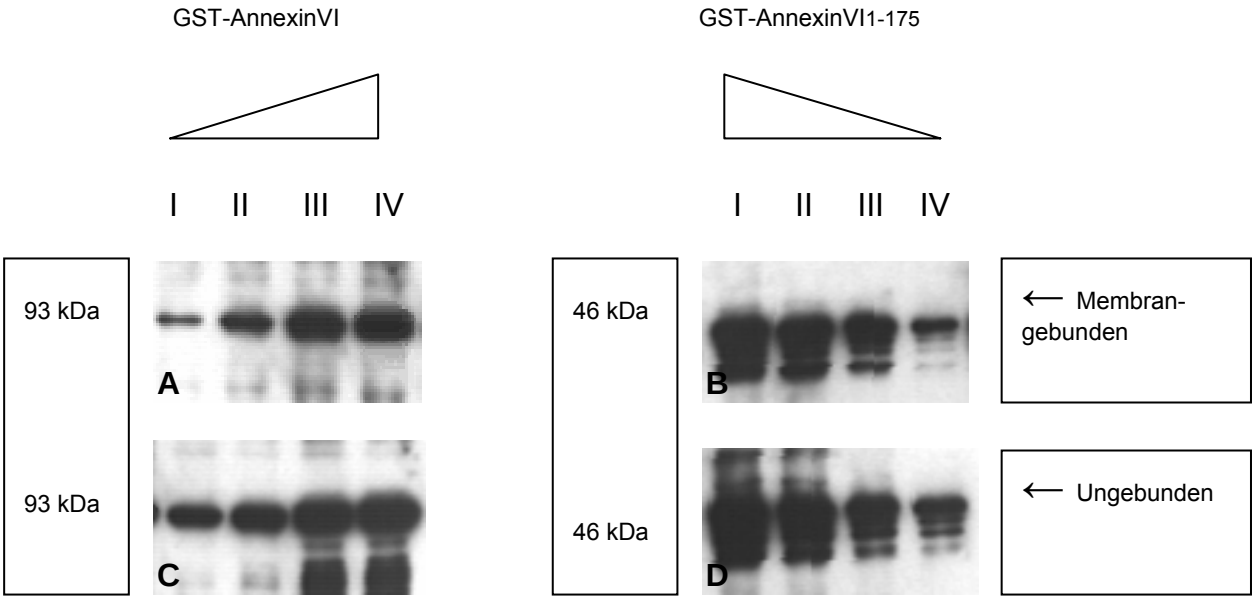


Abb.12: Darstellung der Membranbindung von GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ bei steigenden Proteinkonzentrationen. In der Western Blot-Analyse ist der polyklonale 1. Antkörper α-AnnexinVI 1:50 eingesetzt worden. Detektiert wurde mit dem 2. Antikörper α-Schaf in der Konzentration 1:1000.

Lane I A, C: 2 µg GST-AnnexinVI
Lane II A, C: 4 µg GST-AnnexinVI
Lane III A, C: 8 µg GST-AnnexinVI
Lane IV A, C: 12 µg GST-AnnexinVI

Lane I B, D: 12 µg GST-AnnexinVI$_{1-175}$
Lane II B, D: 8 µg GST-AnnexinVI$_{1-175}$
Lane III B, D: 4 µg GST-AnnexinVI$_{1-175}$
Lane IV B, D: 2 µg GST-AnnexinVI$_{1-175}$

5.4. Bindung des GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an Membranen von CHO-Wildtypzellen bei steigendem Membranangebot

Diese Experimente sollten Aufschluss über das Membranbindungsverhalten des GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ in Abhängigkeit von der eingesetzten Membrankonzentration geben. Dazu wurden GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ mit 10 µl, 25 µl, ,50 µl und 100 µl PNS (post nuclear supernatant) aus CHO-Wildtypmembranen und 25 µl $CaCl_2$ inkubiert.

Die Abbildung 13 A stellt die Zunahme der Membranbindung des GST-AnnexinVI bei steigendem Membranangebot dar. Im Gegensatz dazu wird bei GST-AnnexinVI$_{1-175}$ keine Bindungszunahme deutlich (Abbildung 13 B).
Bei der Untersuchung des endogenen AnnexinII beider Proben wird deutlich, dass eine intensive Zunahme der Membranbindung in Abhängigkeit von der eingesetzten Membrankonzentration erfolgt (Abbildun 13 C und D).

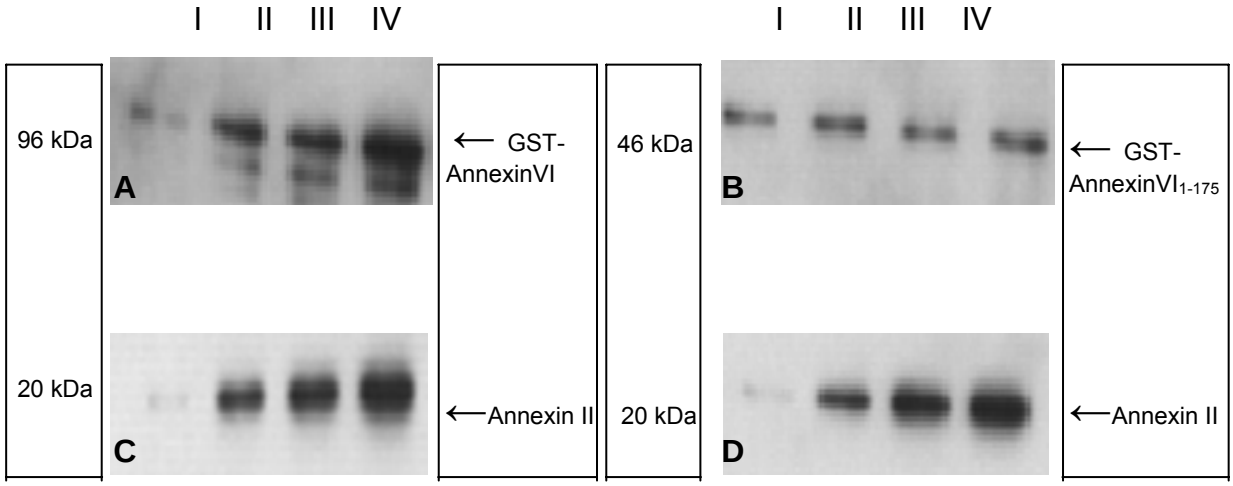


Abb. 13 A und B: Minigele zur Darstellung der Bindungszunahme des GST-AnnexinVI bei steigenden Membrankonzentrationen. Nach 12,5 % SDS-Page wurde zum Nachweis des GST-AnnexinVI und GST-Annexin1-175 der polyklonale 1. Antikörper α-AnnexinVI 1:50 eingesetzt. Mit dem 2. Antikörper α-Schaf 1:1000 wurde visualisiert.
Abb. 13 C und D: Minigele zum Nachweis der Bindungszunahme des endogenen AnnexinII an Membranen beii steigendem Membranangebot. Eingesetzt wurde der 1. Antikörper α-AnnexinII H7 1:1000 und der 2. Antikörper α-Maus 1:1000.

Lane I A, B, C, D: 10µ l PNS
Lane II A, B, C, D: 20µ l PNS
Lane III A, B, C, D: 40 µl PNS
Lane IV A, B, C, D: 80 µl PNS

5.5. Interaktion des Dynamins mit CHO-Wildtypmembranen

Dynamin ist eine GTPase, die an der Abschnürung der Clathrin coated pits zu coated Vesikeln beteiligt ist (Herskovits et al., 1993). Eine Interaktion dieses Proteins mit dem ebenfalls an der Endocytose beteiligten AnnexinVI konnte von Turpin nachgewiesen werden (Turpin et al., 1998). Da das AnnexinVI eine stimulatorische Aktivität bei der Bildung von den Clathrin-coated-Vesikeln zu besitzen scheint, sollte untersucht werden, ob die Deletionsmutante AnnexinVI$_{1-175}$ einen Einfluss auf das Bindungsverhalten des an dem Abschnürungsvorgang beteiligten Dynamins hat. Dabei sollte außerdem analysiert werden, ob eine Calcium-Regulation vorherrscht.

Das Dynamin der GST-AnnexinVI beinhaltenden Proben bindet wie erwartet an CHO-Wildtypmembranen. Dabei ist eine Calcium-Regulation zu beobachten. Die Zugabe von EGTA bewirkt ein Ausbleiben der Membranbindung (Lane V) und führt zu einem Anstieg des cytosolischen (ungebunden) Dynamin (Lane VI). Unter Anwesenheit von Calcium beobachtet man dagegen eine intensive Membranbindung (Lane VII).
Die Deletionsmutante scheint das Bindungsverhalten des Dynamins an Membranen zu beeinflussen. Die Proben mit GST-AnnexinVI$_{1-175}$ zeigen im Gegensatz zu denen mit GST-AnnexinVI eine Membranbindung unter calciumfreien Bedingungen (Lane I).

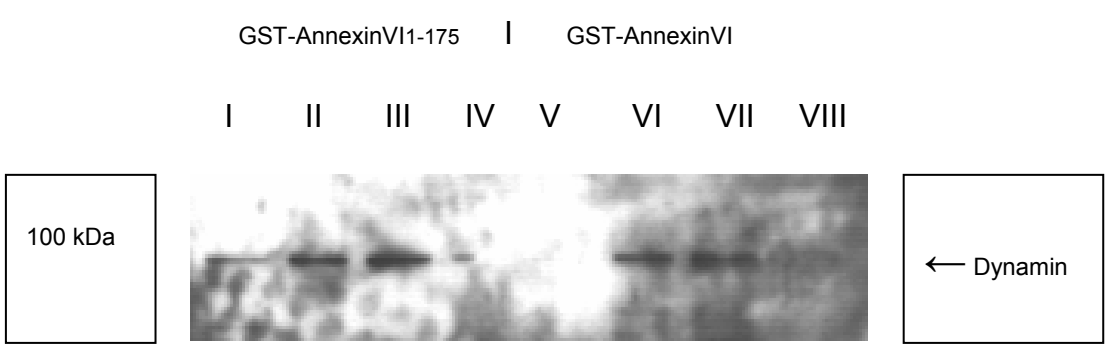


Abb.14: Nachweis der Calcium-regulierten Interaktion des Dynamins mit CHO-Wildtypmembranen. Zur Detektion des Dynamins wurde der monoklonale Antikörper α-Dynamin 1: 1000 eingesetzt. Als 2. Antikörper wurde α-Maus 1:1000 verwendet.

Lane I: Membrangebundenes Dynamin + EGTA
Lane II: Ungebundenes Dynamin + EGTA
Lane III: Membrangebundenes Dynamin + $CaCl_2$
Lane IV: Ungebundenes Dynamin + $CaCl_2$
Lane V: Membrangebundenes Dynamin + EGTA
Lane VI: Ungebundenes Dynamin + EGTA
Lane VII: Membrangebundenes Dynamin + $CaCl_2$
Lane VIII: Ungebundenes Dynamin + $CaCl_2$

6. Bindung von GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an Membranen von AnnexinVI-überexprimierender CHO-Zellen

Analog der Versuchsreihe 5 sollte in den folgenden Experimenten das Bindungsverhalten von AnnexinVI in AnnexinVI-überexprimierenden CHO-Zellen untersucht werden. Dabei stand die Bindung des endogenen AnnexinVI an Membranen im Vordergrund. Durch zusätzliche Inkubation mit GST-AnnexinVI bzw. GST-AnnexinVI$_{1-175}$ sollte eine potentielle Konkurrenz zwischen den GST-Fusionsproteinen und dem endogenen AnnexinVI bei der Bindung an Membranen erforscht werden. Des weiteren sollten auch andere mögliche Interaktionsarten zwischen den genannten Proteinen aufgedeckt werden.

6.1. Darstellung der Membranbindung des endogenen AnnexinVI in AnnexinVI-überexprimierenden CHO-Zellen bei Zugabe steigender Calcium- Konzentrationen

Um die Bindung des endogenen AnnexinVI in AnnexinVI-überexprimierenden CHO-Zellen an Membranen bei steigenden Calcium-Konzentrationen zu untersuchen, wurden 20 µl PNS (post nuclear supernatant) aus AnnexinVI-überexprimierenden CHO-Zellen mit EGTA bzw. aufsteigenden $CaCl_2$-Konzentrationen inkubiert.

Die Abbildung 15 veranschaulicht, dass das endogene AnnexinVI einer Calcium-Regulation unterliegt. Die Bindung an Membranen nimmt mit steigender Calcium-Konzentration zu (Lane II, III, IV A und B), wogegen der Einsatz von EGTA die Bindung an Membranen verhindert (Lane I A).
Eine Gegenüberstellung mit dem endogenen AnnexinII zeigt, dass das endogene AnnexinII ebenfalls einer Calcuim-Regulation unterliegt, wobei es aber auch die Fähigkeit besitzt unter Calcium-Entzug schwach an Membranen zu binden (Lane I B).

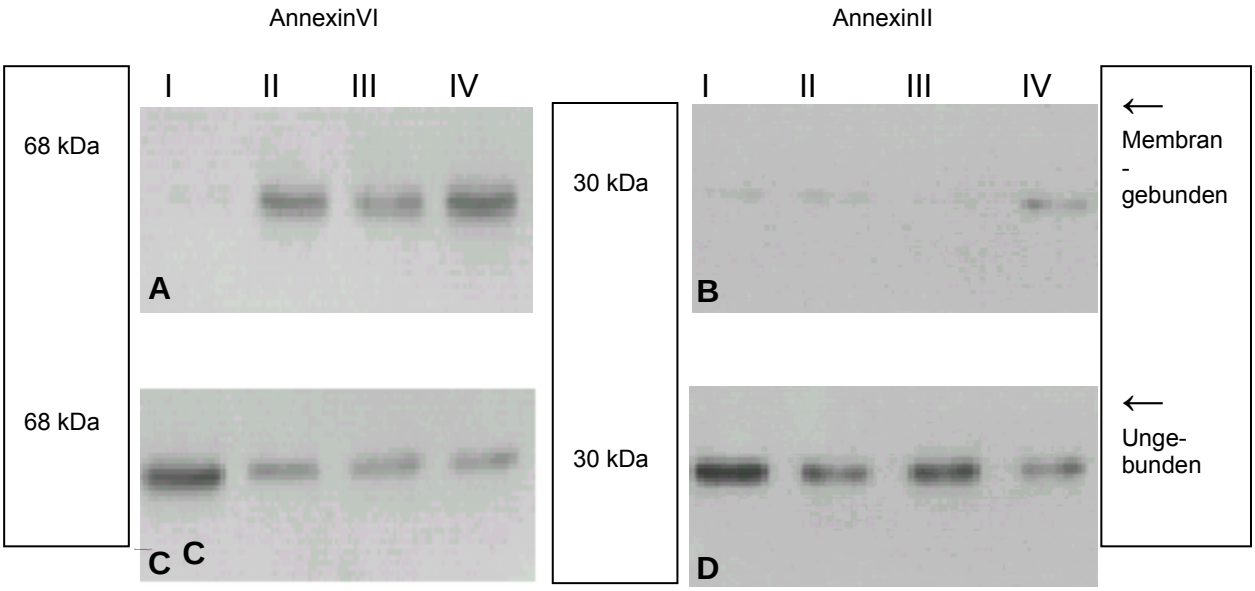
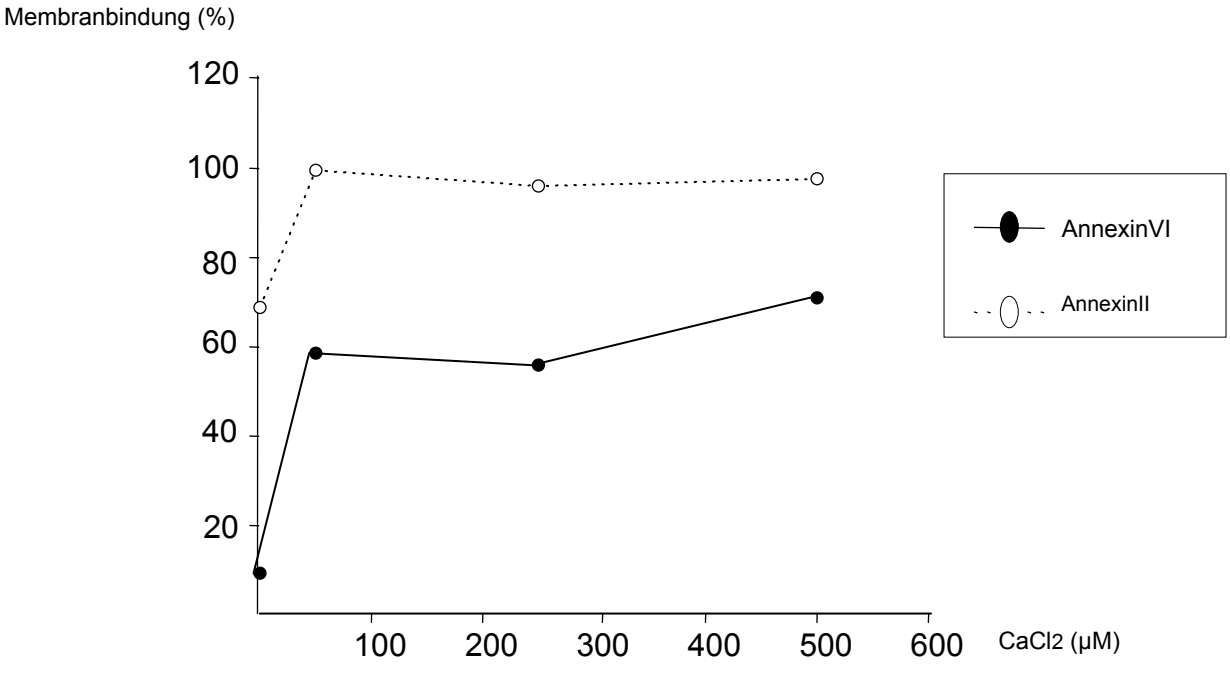


Abb.15: Vergleich des endogenen AnnexinVI mit dem endogenen AnnexinII bei der Bindung an Membranen von AnnexinVI-überexprimierenden CHO-Zellen.
Zum Detektieren des endogenen AnnexinVI wurde der polyklonale 1. Antikörper α-AnnexinVI 1:50 eingesetzt. Als 2. Antikörper wurde α-Schaf 1:1000 eingesetzt. AnnexinII wurde mit dem monklonalen Antikörper α-AnnexinII H7 1:250 und dem 2. Antikörper α-Maus 1:1000 nachgewiesen.

Lane I A, B, C, D: 5mM EGTA
Lane II A, B, C, D: 50µM $CaCl_2$
Lane III A, B, C, D: 250µM $CaCl_2$
Lane IV A, B, C, D: 500µM $CaCl_2$

Abb. 16: Graphische Gegenüberstellung des Bindungsverhaltnes vom endogene AnnexinVI und AnnexinII an Membranen von AnnexinVI-überexprimierenden CHO-Zellen.



6.2. Bindung von GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an Membranen AnnexinVI-überexprimierender CHO-Zellen bei steigenden Membranangebot

Um das Bindungspotential des GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ zu untersuchen, wurde ein Experiment mit steigenden Membrankonzentrationen durchgeführt. 4 µg GST-AnnexinVI bzw. GST-AnnexinVI$_{1-175}$ wurden mit 10 µl, 25 µl, 50 µl und 100 µl CHO- AnnexinVI-Membranen inkubiert.

Die Western Blot-Analyse zeigt, dass steigende Membrankonzentrationen das Bindungspotential des endogenen AnnexinVI erhöhen. Im Gegensatz dazu nimmt die Bindungsaffinität des zugeführten GST-AnnexinVI an Membranen lediglich leicht zu. Somit scheint das endogene AnnexinVI eine höhere Bindungsaffinität zu den CHO-AnnexinVI-Membranen zu besitzen als das GST-AnnexinVI (Lane I - IV A).
Die Bindung des GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an Membranen ist sehr schwach und weist trotz des steigenden Membranangebots keine Änderung auf (Lane I - IV B).

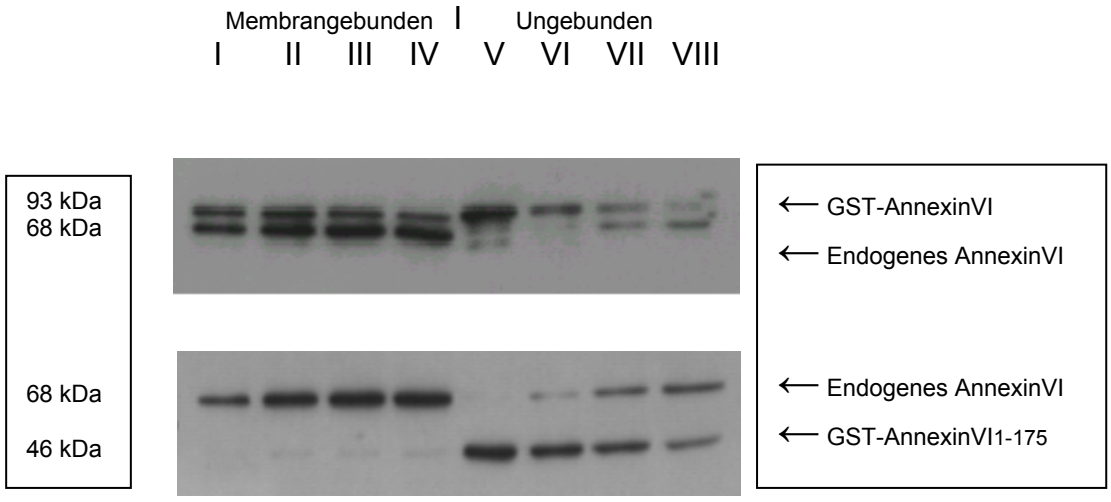


Abb.17: Nachweis des stärkeren Bindungspotentials des endogenen AnnexinVI als des zugeführten GST-AnnexinVI bzw. GST-AnnexinVI$_{1-175}$. Das endogene AnnexinVI wurde durch den 1. Antikörper α-AnnexinVI 1:50 und den 2. Antikörper α-Schaf 1:1000 visualisiert. Der Nachweis des GST-AnnexinVI bzw. des GST-AnnexinVI$_{1-175}$ erfolgte durch den Einsatz des 1. Antikörpers α-GST-AnnexinVI 1:250 und des 2. Antikörpers α-Hase 1:1000.

Lane I A, B: 10 µl CHO-AnnexinVI-Membranen
Lane II A, B: 25 µl CHO-AnnexinVI-Membranen
Lane III A, B: 50 µl CHO-AnnexinVI-Membranen
Lane IV A, B: 100 µl CHO-AnnexinVI-Membranen
Lane V A, B: 10 µl CHO-AnnexinVI-Membranen
Lane VI A, B: 25 µl CHO-AnnexinVI-Membranen
Lane VII A, B: 50 µl CHO-AnnexinVI-Membranen
Lane VIII A, B: 100 µl CHO-AnnexinVI-Membranen

6.3. Bindung des GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an Membranen von AnnexinVI-überexprimierenden CHO-Zellen bei steigenden Proteinkonzentrationen

Für die Analyse des Bindungsverhaltens von GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an Membranen von AnnexinVI-überexprimierenden CHO-Zellen wurden 10 µl PNS (post nuclear supernatant) mit 4 µg, 8 µg, 12 µg und 20 µg GST-AnnexinVI bzw. GST-AnnexinVI$_{1-175}$ inkubiert. Zugefügt wurde außerdem 50 µM $CaCl_2$. Im Vordergrund stand die Fragestellung, ob steigende GST-AnnexinVI-Konzentrationen die Bindungsstellen an den Membranen der Zellen soweit besetzen können, dass das endogene AnnexinVI an diese nicht mehr binden kann.

Nachgewiesen werden konnte, dass steigende GST-AnnexinVI-Konzentrationen zu einer zunehmenden Membranbindung von GST-AnnexinVI führten (Lane I - IV A). Da das Bindungspotential des endogenen AnnexinVI unter diesen Bedingungen ebenfalls zunahm (Lane I - IV), kann darauf geschlossen werden, dass die eingesetzten Proteinkonzentrationen nicht zu einer Absättigung der Bindungsstellen führten.

Bei der Titration von GST-AnnexinVI$_{1-175}$ konnte keine deutlich sichtbare Zunahme der Bindung von GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an Membranen gezeigt werden. Auch das endogene AnnexinVI steigerte seine Bindung an Membranen nicht (Lane I - IV B).

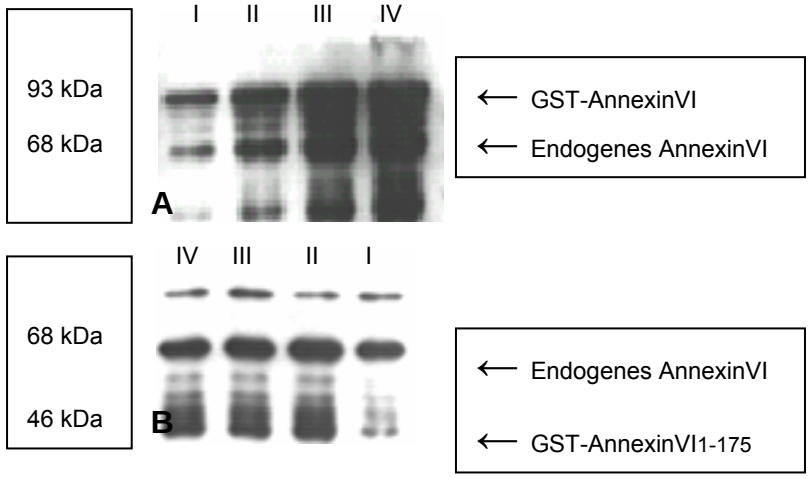


Abb.18: Bindungsverhalten des endogenen AnnexinVI bei Tritraton von GST-AnnexinVI bzw. GST-AnnexinVI1-175. Der Nachweis des endogenen AnnexinVI erfolgte mit dem 1. Antikörper α-AnnexinVI 1:50 und dem 2. Antikörper α-Schaf 1:1000. GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI1-175 wurden durch den 1. Antikörper α-GST-AnnexinVI 1:250 und den 2. Antikörper α-Hase 1:1000 visualisiert.

Lane I A: 4 µg GST-AnnexinVI
Lane II A: 8 µg GST-AnnexinVI
Lane III A: 12 µg GST-AnnexinVI
Lane IV A: 20 µg GST-AnnexinVI

Lane I B: 4 µg GST-AnnexinVI1-175
Lane II B: 8 µg GST-AnnexinVI1-175
Lane III B: 12 µg GST-AnnexinVI1-175
Lane IV B: 20 µg GST-AnnexinVI1-175

7. Bindungsstudien mit GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an Endosomen

7.1. Bindung des GST-AnnexinVI und des GST-AnnexinVI$_{1-175}$ bei Calcium-Zugabe

AnnexinVI konnte bereits in vielen zellulären Strukturen nachgewiesen werden, wie z. B. dem endosomalen Kompartiment. Jäckle und Mitarbeiter konnten 1994 Ergebnisse über die Interaktion von AnnexinVI mit diesem aus frühen, späten und Recycling Endosomen bestehenden Kompartiment liefern (Jäckle et al., 1994).

Um mögliche Unterschiede in der Interaktion von GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ mit den Endosomen zu studieren, wurden diese mit aufgereinigten Endosomen, die aus CHO-Wildtyp-PNS (post nuclear supernatant) präpariert wurden, inkubiert. Jeweils 100 µl zuvor gepoolter Fraktionen (11 Fraktionen wurden zu 3 gepoolt: schwere Membranen (1+2), frühe Endosomen (4+5+6) und späte Endosomen (7+8+9+10; 11 wurde verworfen) wurden mit 5 µg GST-AnnexinVI bzw. GST-AnnexinVI$_{1-175}$ inkubiert. Da AnnexinVI in seiner Bindung an Membranen einer Calcium-Abhängigkeit unterliegt (Lu et al., 1995), wurde 25 µl $CaCl_2$ und 5 mM EGTA hinzugefügt und 1 Stunde bei 4°C gerollt. Es folgte eine Dichtezentrifugation bei 50000 rpm für 1 Stunde, nach der das Pellet dann in 100 µl HB-Puffer resuspendiert wurde.

Die Abbildung 17 verdeutlicht, dass GST-AnnexinVI (Lane I, II und III A) im Gegensatz zu GST-AnnexinVI$_{1-175}$ (Lane I, II und III B) bei Zugabe von Calcium an alle drei endosomalen Fraktionen bindet. Besonders auffällig ist das Bindungsverhalten des GST-AnnexinVI an die späten Endosomen. In Anwesenheit von Calcium kommt es zu einer starken Bindungzunahme von GST-AnnexinVI an die späten Endosomen (Lane III C), während EGTA die Bindungsaffinität so stark zu senken scheint, dass diese in der Western Blot-Analyse nicht mehr darstellbar ist (Lane III A). Auffällig ist, dass die Zugabe von Calcium die Bindung von GST-AnnexinVI an die späten Endosomen bis zu dem Grad steigert, dass sie sogar intensiver wird als an die frühen Endosomen (Lane II und III C).
Das Bindungspotential des GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an die frühen Endosomen und die schweren Membranen nimmt in Anwesenheit von Calcium zu (Lane I und II B, D), während die beim GST-AnnexinVI beobachtete Bindung an die späten Endosomen ausbleibt (Lane III B, D).

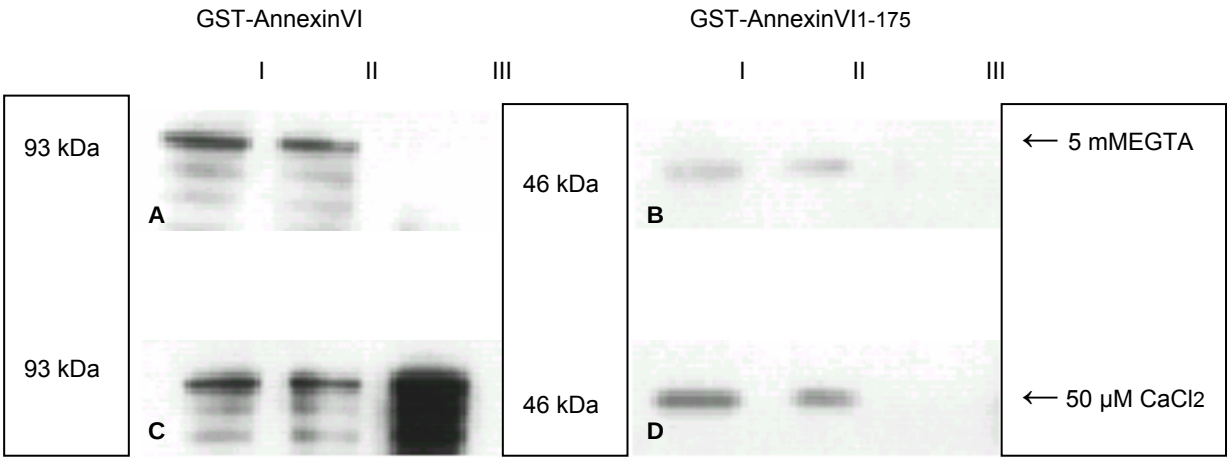


Abb.19: Zunahme des Bindungspotentials von GST-AnnexinVI an späte Endosomen bei Calcium-Zugabe. Nach SDS-Page wurden die 12,5 % Gele in der Western Blot-Analyse mit dem polyklonalen 1. Antikörper α-AnnexinVI 1:50 inkubiert und mit dem 2. Antikörper α-Schaf 1:1000 detektiert.

Lane I A, B, C, D: schwere Membranen
Lane II A, B, C, D: frühe Endosomen
Lane III A, B, C, D: späte Endosomen

7.2. Identifizierung der frühen Endosomen mittels Rab 5

Nach Analyse des Bindungsverhaltens von GST-AnnexinVI und GST-AnnexinVI$_{1-175}$ an die drei endosomalen Fraktionen (Exp. 7.1) wurde zur Identifizierung der Fraktionen das Markerprotein Rab 5 detektiert.
Rab 5 ist ein 28 kDa schweres, an frühen Endosomen lokalisiertes Protein, das als subzellulärer Marker für diese Fraktion eingesetzt werden kann (Chavrier et al., 1990).

Gezeigt werden konnte, dass die Fraktion III (späte Endosomen) negativ für Rab 5 ist, während in Fraktion II (frühe Endosomen) Rab 5 nachgewiesen werden konnte. Besonders deutlich kristallisiert sich in diesem Experiment die Calcium-Abhängigkeit des Rab 5 bei der Bindung an die frühen Endosomen heraus.

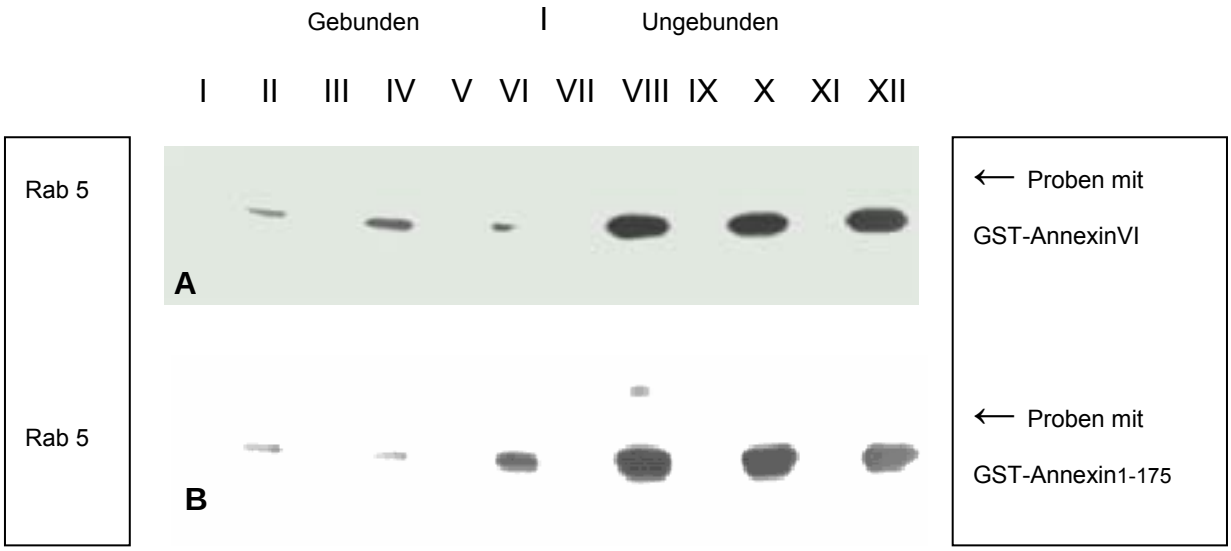


Abb. 20: Identifizierung der frühen Endosomen. durch den Einsatz des monoklonalen 1. Antikörper α-Rab 5 1:1000. Zur Visualisierung wurde der 2. Antikörper α-Maus 1:1000 verwendet.

Lane I A, B: späte Endosomen + 5 mM EGTA
Lane II A, B: frühe Endosomen + 5 mM EGTA
Lane III A, B: späte Endosomen
Lane IV A, B: frühe Endosomen
Lane V A, B: späte Endosomen + 50 µl $CaCl_2$
Lane VI A, B: frühe Endosomen + 50 µl$CaCl_2$
Lane VII A, B: späte Endosomen + 5 mM EGTA
Lane VIII A, B: frühe Endosomen + 5 mM EGTA
Lane IX A, B: späte Endosomen
Lane X A, B: frühe Endosomen
Lane XIA, B: späte Endosomen + 50 µl $CaCl_2$
Lane XIIA, B: frühe Endosomen + 50 µl $CaCl_2$

7.3. Darstellung der Lipidkomposition der frühen und der späten Endosomen sowie der schweren Membranen

Die Calcium-abhängige Bindungszunahme von GST-AnnexinVI an die Fraktion der späten Endosomen (Exp. 7.2), führte zu der Analyse der Lipidkomposition der Endosomen. Besondere Aufmerksamkeit galt dabei den Phospholipiden, an welche die Annexine bevorzugt binden. Sie dominieren in den späten Endosomen und den schweren Membranen gegenüber dem Cholesterin. Dieses ist stark präsent in den frühen Endosomen.

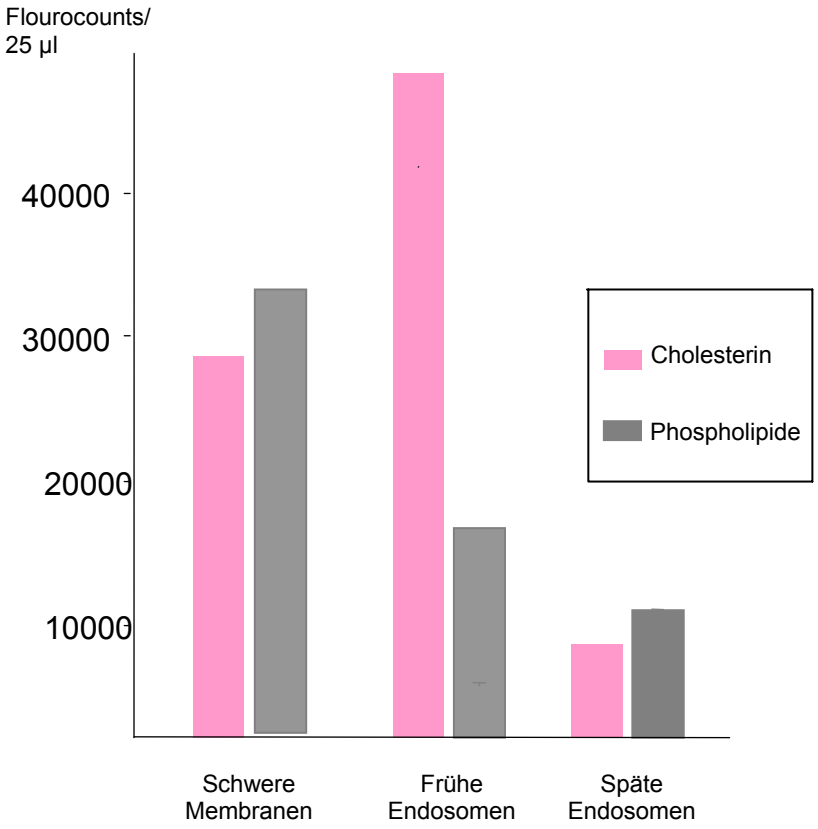


Abb. 21: Lipidkomposition der schweren Membranen, der frühen und der späten Endosomen.

8. Identifikation weiterer Interaktionspartner von GST-Annexin VI

Aufgrund der Calcium-abhängigen Zunahme des Bindungspotentials von GST-Annexin VI an die späten Endosomen wurde eine Beteiligung weiterer Interaktionspartner des GST-Annexin VI angenommen und versucht diese zu identifizieren. Dafür wurde ein Ligand Blot durchgeführt. Die drei Endosomenfraktionen wurden dabei mit 5 µg/ml GST-Annexin VI inkubiert. Anschließend wurde die Western Blot-Analyse durchgeführt.

Der Nachweis weiterer Interaktionspartner konnte in dieser Versuchsreihe nicht dargestellt werden.
Die Bindung der mit dem GST-Annexin VI interagierenden Proteine ist nur durch schwache Banden auf komplett geschwärztem Film darstellbar. Desweiteren sind diese Banden nicht näher zu charakterisieren sind. Aufgrund dieses Ergebnisses müsste das Experiment weiteren Modifikationen unterworfen werden. So könnten beispielsweise höhere Konzentrationen von GST-Annexin VI zugeführt werden.

IV. Diskussion

1. Herstellung der stabilen Zelllinie Annexin VI$_{1-175}$

Die Annexinfamilie ist seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Zahlreiche Publikationen zur Charakterisierung der Mitglieder dieser Proteinfamilie erweiterten den Wissensstand in Hinblick auf Struktur, Lokalisation und Funktion. Trotz bisheriger Erkenntnisse ist es jedoch nicht gelungen, eine einheitliche Vorstellung über die Funktion und Bedeutung dieser Proteine zu erlangen. Die vielen Spekulationen und Widersprüche verdeutlichen das Ausmaß der ungeklärten Aspekte und könnten sogar bedeuten, dass wesentliche Funktionen der Annexine noch immer nicht aufgedeckt sind.

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, die Mutante Annexin VI$_{1-175,}$ welche ein Deletionsprodukt des Annexin VI ist, zu charakterisieren. Im Vordergrund stand die Bestimmung der Lokalisation und des Bindungsverhaltens an Membranen. Ein Vergleich mit Annexin VI sollte die Unterschiede verdeutlichen und einen Rückschluss auf seine Funktionen liefern. Zu diesem Zweck wurde als erstes versucht, eine stabile, Annexin VI$_{1-175}$ exprimierende Zelllinie, herzustellen.
Für die Herstellung der stabilen Zelllinie wurden die mit Annexin VI$_{1-175}$ - DNA transfizierten CHO-Wildtypzellen durch Zugabe des Makrolidantibiotikums G-418, das zu einem Zellsterben der nicht transfizierten CHO-Wildtypzellen führte, selektiert. Der Nachweis einer Annexin VI$_{1-175}$-Expression ließ sich in der Western Blot-Analyse jedoch nicht erbringen. Mögliche Erklärungen dafür könnten auf genetischer Ebene oder in der veränderten Proteinstruktur liegen. So könnte beispielsweise eine Geninaktivierung der transfizierten DNA für die ausbleibende Exprimierung des Annexin VI$_{1-175}$ verantwortlich sein. Andererseits ist es aber auch vorstellbar, dass die Struktur des Annexin VI$_{1-175}$ eine zelltoxische Wirkung besitzt und zum Schutz von den Zellen eliminiert wird. Das nach der Deletion der Annexin repeats 3 - 8 entstehende Annexin VI$_{1-175}$ weist eine andere Konformität, als das Annexin VI-Molekül auf. Diese strukturelle Änderung könnte einen Abbau in Gang gesetzt haben.
Der Abbau von Proteinen wird in den eukaryotischen Zellen von einem 8,5 kDa Protein, dem sogenannten Ubiquitin, gesteuert. Es wird an seinem C-terminalen Glycin unter

ATP-Verbrauch kovalent an Proteine, die für den Abbau bestimmt sind, gebunden. Ein für die Zerstörung markiertes Protein trägt meistens mehrere Ubiquitinmoleküle. Verantwortlich für die Bindung von Ubiquitin an Proteine sind die aminoterminalen Reste. Arginin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin sowie chemisch modifizierte Reste, wie Asparagin, Aspartat, Glutamin und Glutamat wirken destabilisierend und führen zu einer schnelleren Ubiqutinierung als stabilisierende Reste wie, Methionin, Alanin, Cystein, Glycin, Serin, Threonin, Valin und Prolin. Gemäß dieses Modells könnte die Struktur des Annexin VI$_{1\text{-}175}$ destabilisierende Reste aufgewiesen haben, die nach Markierung zur Zerstörung des Proteins führten.

2. Interaktion des Annexin VI mit Dynamin

Die Rolle des Annexin VI in der Endocytose wurde durch Lin und Mitarbeitern (Lin et al., 1992) beschrieben. Sie beobachteten eine Beteiligung des Annexin VI in der Abschnürung der Clathrin coated pits, der sogenannten „budding-Aktivität“, die unter Annexin VI-freien Bedingungen zum Stillstand kam. Die Teilnahme des Annexin VI an endocytotischen Prozessen wurde ebenfalls von Turpin und Mitarbeitern (Turpin et al., 1998) untersucht. Sie konnten zeigen, dass Annexin VI und Annexin II mit Clathrin coated Vesikeln (boviner adrenocortikaler Gewebe) assoziiert sind. Die Assoziation des Annexin VI und des Annexin II mit den Clathrin coated Vesikeln bestätigt die Theorien über deren Beteiligung an vesikulären Transportprozessen. Beide Annexine konnten in unterschiedlicher Verteilung in drei isolierten Vesikelpopulationen, den LCV (large coated vesicles), MCV (medium coated vesicles) und den SCV (small coated vesicles) nachgewiesen werden. Annexin VI wurde in Assoziation mit Vesikelmembranen gefunden, während Annexin II zwischen Vesikelmembranen und coat verteilt war. Die Autoren postulieren, dass die Annexine Mikrodomänen für spezifische Protein-Lipid-Interaktionen darstellen, die für die Funktionen der verschiedenen CCVs von Bedeutung sein könnten.

In den LCVs (Transferrin positiv) wurde Annexin VI mit einem CCV-Protein, dass als Dynamin identifiziert wurde, assoziiert aufgefunden. Sie postulieren, dass Annexin VI ein Faktor sein könnte, der bei der Stabilisation der Dynamin-Membran-Interaktion beteiligt sein könnte (Turpin et al., 1998).

Dynamin, ein Mitglied der GTPase Superfamilie, ist ein Calcium-sensitives Protein, das an Phospholipide bindet (Liu et al., 1994). Seine Funktion wird in der Konstriktion der Clathrin-coated-pits und deren Ablösung von der Plasmamembran gesehen (J.E. Hinshaw und S.L.Schmid, 1995).
Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Theorie, dass Annexin VI mit Dynamin interagiert. In GST-pulldown-Versuchen konnte eine Interaktion zwischen GST-Annexin VI und dem Dynamin nachgewiesen werden. Das am C-Terminus deletierte GST-Annexin VI_{1-175} zeigte keine Interaktion mit Dynamin, was zu der Annahme führt, dass die Bindungsstellen für das Dynamin in der C-terminalen Region liegen.
Ein weiterer Hinweis auf eine Interaktion des GST-Annexin VI mit Dynamin ist die in Bindungsstudien nachgewiesene Kolokalisation beider Proteine an Membranen.

In den Bindungsstudien konnte außerdem die Calcium-Abhängigkeit des Annexin VI und des Dynamins beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der sowohl für Annexin VI, als auch für das Dynamin postulierten Calcium-Abhängigkeit bei der Bindung an Phospholipide. (Plager und Nelestuen, 1994; Liu et al., 1994). Turpin konnte dagegen eine Calcium-unabhängige Annexin-Membranbindung zeigen (Turpin et al., 1998). Ein Erklärungsmodell ist, dass einer transienten Bindung der Annexine an Phospholipide unter Anwesenheit von Calcium-Ionen, eine Stabilisation durch eine Calcium-unabhängig Bindung an andere Membrankomponenten folgt. Das bedeutet, dass der erste Schritt einer Calcium-Abhängigkeit unterliegt. Diese Vermutung kann mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. In Experimenten, bei denen Calcium-freie Bedingungen geschaffen wurden, war entweder keine oder eine schwache Bindung des Annexin VI und des Dynamins an Membranen zu beobachten.
Die fehlende Bindung des Annexin VI an Membranen könnte nach dem Modell von Turpin also damit erklärt werden, dass die transiente Calcium-abhängige Bindung, die dem Schritt der Stabilisierung vorausgeht, aufgrund der Abwesenheit von Calcium nicht zustande kommen konnte. Ein Widerspruch zu dieser Auslegung des zwei Stufenmodells liegt in der beobachteten schwachen Bindung des GST-Annexin VI an Membranen. Wenn die transiente Bindung jedoch nicht eine Bedingung für die spätere Stabilisation darstellt, schließen die Ergebnisse einander nicht aus.

3. Interaktion des GST-Annexin VI mit anderen Proteinen

In der Literatur finden sich Hinweise auf weitere Interaktionspartner des Annexin VI. Es wird eine Assoziation mit P120 GAP, die durch Interaktion mit Annexin VI zu einer Inaktivierung des Onkogenprodukts P21 RAS führt, vermutet. Diese Vermutung kann mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. In GST-pulldown-Versuchen konnte keine interagierende Aktivität zwischen den Proteinen nachgewiesen werden. Für einen Ausschluss dieser Theorie sind die vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht ausreichend, weil für die Interaktion möglicherweise andere Versuchsbedingungen geschaffen werden müssten oder wichtige Parameter nicht berücksichtigt wurden.

Eine anderer Interaktionspartner des Annexin VI könnte Caveolin, das 22 kDa Strukturprotein der Caveolae, sein. Caveolae sind Invaginationen der Plasmamembran, die einen Clathrin-coated-pit-unabhängigen Endocytosemechanismus darstellen (Rothberg et al., 1990; 1992). Aufgrund der Lokalisation des Annexin VI an Membranen könnte eine Interaktion mit dem transmembranösen Protein der Caveolae, dem Caveolin, vermutet werden. In GST-pulldown-Versuchen konnte eine Interaktion von GST-Annexin VI jedoch nicht beobachtet werden. Dieses Ergebnis bestätigt die unveröffentlichte Vermutungen von Enrich und Mitarbeitern, die eine Assoziation des Annexin VI mit Caveolae ausschließen.

Eine Interaktion der Deletionsmutante GST-Annexin VI_{1-175} mit P120 GAP oder dem Onkogenprodukt P21 RAS sowie mit dem Caveolin konnte ebenfalls nicht beobachtet werden.

4. Unterschiedliches Bindungsverhalten von GST-Annexin VI und GST- Annexin VI_{1-175} an Membranen

Annexine sind Proteine, die über ihre Struktur und ihre Eigenschaft Calcium- abhängig an Membranen zu binden, definiert werden. Annexin VI konnte in den vergangenen Jahren an Membranen unterschiedlicher Gewebe lokalisiert werden. Die Bindung an Membranen erfordert neben dem Calcium zusätzliche Faktoren wie ATP. Mittlerweile werden aber auch Calcium-unabhängige Bindungen an Membranen diskutiert (siehe

oben). Die Lokalisation des Annexin VI an Membranen verdeutlicht dessen Beteiligung am Membranverkehr.

Die Annexine sind aus einer core-Domäne, bestehend aus 4 - 8 sich wiederholenden repeats und aus einer variablen N-terminalen Domäne, aufgebaut. Während der N-terminalen Bereich die funktionelle Vielfalt auszumachen scheint, ist die C-terminale Region für die Bindung an Membranen verantwortlich. Daraus lässt sich schließen, dass die am C-Terminus deletierte Mutante Annexin VI_{1-175} eine beeinträchtigte Bindungsaktivität aufweisen müsste. Um diese Vermutung und die sich daraus ergebenden Konsequenzen zu untersuchen, wurden Bindungsstudien durchgeführt. Dabei kam heraus, dass die Deletionsmutante wie erwartet schwächer an Membranen bindet als Annexin VI. Die schwache Bindung könnte mit der Abnahme der Bindungsstellen aufgrund der Deletion zusammenhängen. Ein anderer Aspekt ist, dass das AnnexinVI durch seine 8 repeats zwei Formen annehmen kann. In der kristallinen und vermutlich in der gelösten Form liegen die beiden Hälften des Moleküls in einem Winkel von 90° zueinander, während die membrangebundene Form eine coplanare Anordnung zur Membran hat. Die Fähigkeit zur Einnahme und Änderung der Konformität muss in der besonderen Struktur des Annexin VI liegen. Es ist möglich, dass das Annexin VI für die Bindung an Membranen diese spezifische Form einnehmen muss. Die Deletiosmutante ist wahrscheinlich nicht mehr in der Lage eine solche Form einzunehmen, weil die dafür benötigten Abschnitte deletiert wurden.

Neben der Auffälligkeit in der Intensität der Membranbindung ist auch eine Calcium-Unabhängigkeit bei diesem Prozess beobachtet worden. Eine Überlegung ist, dass sowohl das zugeführte GST-Annexin VI als auch das GST-Annexin VI_{1-175} mit dem endogenen Annexin VI um die Bindungsstellen an den Membranen konkurrieren, wobei sich das GST-AnnexinVI vergleichsweise besser durchsetzten kann als das GST-Annexin VI_{1-175}. Bei Betrachtung des GST-Annexin VI könnte diese Vermutung zutreffen. Es konnte in Experimenten mit dem PNS (post nuclear supernatant) einer Annexin VI überexprimierenden Zelllinie gezeigt werden, dass ein Überangebot an GST-Annexin VI zu einer Zunahme seiner Membranbindungsaffinität führte. Ein Überangebot an GST-Annexin VI_{1-175} bewirkte diesen Effekt nicht.
Es ist aber auch denkbar, dass die schwache Bindung des GST-Annexin VI_{1-175} nicht durch das Annexin VI_{1-175}, sondern durch das GST hervorgerufen wurde. Es könnte

sein, dass das GST eine Bindung mit Membranstrukturen eingeht, während die Deletionsmutante aufgrund oben erwähnter Aspekte jegliche Bindungsaktivität verloren hat. Diese Vermutung wird durch Experimente, in denen lediglich das Bindungsverhalten des GST-Anteils untersucht worden ist, unterstützt. Das GST zeigt eine deutliche Bindung an Membranen, deren Affinität nur in geringem Maße durch eine Calcium-Titration gesteigert werden kann. Somit wäre auch die Theorie, dass Annexin VI_{1-175} Calcium-unreguliert an Membranen bindet, entkräftet, da dies ja eine Membranbindung seitens des Annexin VI_{1-175} voraussetzten würde.

5. Hohe Calcium-abhängige Bindungsaffinität von GST-Annexin VI an späte Endosomen

Die Lokalisation von Annexin VI beschränkt sich nicht nur auf die Plasmamembran. Es ist gezeigt worden, dass Annexin VI mit Strukturen des endocytotischen Kompartiments (Ortega et al., 1998; Seemann et al., 1996; Massey-Harroche et al.,1998) assoziiert ist. Jäckle und Mitarbeitern ist es gelungen, Annexin VI als eine bedeutende Komponente von Ratten Endosomen zu identifizieren. Sie konnten zeigen, dass Annexin VI hochspezifisch in drei isolierten Kompartimenten lokalisiert ist: in frühen, späten und Recycling-Endosomen. Die Kolokalisation des Annexin VI mit prelysosomalen und lysosomalen Markern (Pons et al., 2000) lässt eine Beteiligung bis in die späten Prozesse der Endocytose vermuten. In vorausgegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe von Grewal konnte eine starke Anreicherung des Annexin VI, speziell in den frühen Endosomen, gezeigt werden. Die Identifizierung des frühen endocytotischen Kompartiments erfolgte über einen für dieses Kompartiment spezifischen Marker: Rab 5. Aufgrund der Assoziation des Annexin VI, insbesondere mit den frühen endocytotischen Kompartimenten, scheint es eine regulierende Eigenschaft in dem Transport der internalisierten Liganden durch die endocytotischen Kompartimente zu haben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten wiederholt eine Anreicherung des Annexin VI in den frühen Endosomen zeigen. Bei Zugabe von Calcium ist jedoch ein deutlicher Anstieg des Annexin VI in den späten Endosomen zu beobachten. Unter diesen Bedingungen war die Bindung des Annexin VI an die späten Endosomen wesentlich

stärker als an die frühen Endosomen. Eine Analyse der Lipid-Zusammensetzung ergab, dass die frühen Endosomen sowohl mehr Cholesterin, als auch mehr Phosholipide enthielten. Bei Betrachtung des Verhältnisses beider Fraktionen zueinander wurde deutlich, dass in den frühen Endosomen folgendes Verhältnis von Cholesterin zu Phospholipid bestand: 3:1. In den späten Endosomen konnte gezeigt werden, dass der Phosholipidanteil leicht überwog. Diese Lipidkomposition könnte der Grund für die verstärkte Bindung des Annexin VI an die späten Endosomen sein. Die späten Endosomen bieten ein im Verhältnis zu dem Cholesterin höheren Anteil an Phospholipiden. Da Annexin VI die Eigenschaft besitzt in Calcium-abhängiger Weise an Phospholipide zu binden, könnte die Zugabe von Calcium die Bindung an den Phospholipid-Anteil der späten Endosomen fördern. Dagegen spricht jedoch, dass AnnexinVI in der Lage ist, unter Calcium-freien Bedingungen an den Phospholipidanteil der frühen Endosomen zu binden. Es wäre jedoch möglich, dass unterschiedliche Phospolipide in den beiden Kompartimenten zu finden sind. Die Bindungsaffinität an Membranen der Annexine unterscheidet sich je nach Phospholipid. Denkbar wäre es, dass die frühen Endosomen Phospholipide besitzen, an die Annexin VI Calcium-unabhängig binden kann, während die späten Endosomen Phospholipide aufweisen, an deren Bindung eine Calcium-Präsenz gekoppelt ist.

Für die Bindung an die frühen Endosomen könnte jedoch auch das Cholesterin verantwortlich sein. Es ist für das Annexin II beschrieben worden, dass eine Calcium-unabhängige Membranbindung in Assoziation mit dem Cholesterin der Membranen steht (Alaya-Sanmartin, 2001). Gemäß dieser für das Annexin II aufgestellten Theorie könnte der wesentlich höhere Cholesterinanteil der frühen Endosomen auch für die Calcium-unabhängige Bindung des AnnexinVI an dieses Kompartiment verantwortlich sein. Die Zugabe von Calcium könnte in den späten Endosomen die Calcium-abhängige Bindung in Gang gesetzt haben und den Calcium-unabhängigen Mechanismus, der in den frühen Endosomen beobachtet wurde, übertreffen. Im Widerspruch dazu steht jedoch das Bindungsverhalten des Annexin II. Dieses zeigt keine Bindung an die späten Endosomen bei Calcium-Zugabe.

Eine andere Schlussfolgerung ist, dass für die Bindung des Annexin VI an die späten Endosomen weitere Faktoren beteiligt sein müssen. Dies könnten Proteine sein, die bei der Zugabe von Calcium die Bindung des Annexin VI fördern. Zur Identifizierung

möglicher Interaktionspartner wurde ein Liganden-Blot durchgeführt. Das Ergebnis dieses Versuchs war aufgrund einer Vielzahl schwacher Banden nicht zufriedenstellend. Es könnte sein, dass die eingesetzten Konzentrationen an GST-Annexin VI zu gering waren oder andere Faktoren nicht berücksichtigt wurden.

6. Perspektiven

Die vorliegend Arbeit bietet viele offene Fragen, wie die nach der Anwesenheit eines bisher unbekannten Interaktionspartners des Annexin VI bei der Bindung an die späten Endosomen. Zur Klärung müssten die Versuchsbedingungen des Ligandenblots optimiert und höhere Konzentrationen an GST-Annexin VI eingesetzt werden. Außerdem müsste die Interaktion des Annexin VI mit Phospholipiden und Cholesterin untersucht werden.

Ein weiterer Punkt ist die Überwindung der Probleme bei der Herstellung einer stabilen Zelllinie. Mit der Herstellung einer stabilen Zelllinie wäre die Möglichkeit geschaffen, die Auswirkungen eines endogen exprimierten Annexin $VI_{1\text{-}175}$ zu studieren und mit dem endogenen Annexin VI des Wildtyps zu vergleichen. Auf diese Weise könnte die Lokalisation und potentielle Veränderungen der Funktion analysiert werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Annexine gehören einer Proteinfamilie mit charakteristischen Eigenschaften an. Zu diesen zählen in erster Linie die Fähigkeit Calcium-abhängig an Membranen zu binden und der Aufbau der Polypeptidkette. Ein Vertreter der Annexinfamilie ist das Annexin VI, dem eine Vielzahl von Funktionen nachgesagt wird. Seine Beteiligung an der Endocytose scheint gesichert zu sein. Dafür sprechen auch die Lokalisation dieses Proteins entlang der Plasmamembran und an den endosomalen Kompartimenten. In der vorliegenden Arbeit sollte über die Charakterisation des Deletionsprodukts Annexin VI_{1-175} die Funktion des Annexin VI untersucht werden. Dabei standen die membranbindenden Eigenschaften und die zelluläre Lokalisation des Annexin VI und des Annexin VI_{1-175} im Vordergrund. Unterschiede im Bindungsverhalten sowie in der Lokalisation sollten dokumentiert und analysiert werden. Zu diesem Zwecke sind unterschiedliche Methoden, wie die Immunfloureszenz zur Darstellung der zellulären Verteilung, Membranbindungsversuche mit Extrakten aus unterschiedlichen CHO-Zelllinien sowie Bindungsstudien an Endosomen durchgeführt worden. Der Versuch eine stabile Annexin VI_{1-175}-exprimierenden Zelllinie herzustellen ist gescheitert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutliche Abweichungen im Bindungsverhalten von Annexin VI_{1-175} gegenüber dem Annexin VI. Annexin VI_{1-175} bindet sehr viel schwächer und wahrscheinlich Calcium-unreguliert an Membranen. Gezeigt werden konnte außerdem, dass AnnexinVI_{1-175} im Gegensatz zu Annexin VI nicht mit Dyanmin interagiert. Die Bindungsstudien mit Annexin VI und Annexin VI_{1-175} an die endosomalen Kompartimente verdeutlichten, dass Annexin VI unter Calcium-freien Bedingungen bevorzugt an die frühen Endosomen bindet, während die Calcium-Zugabe eine starke Bindung an die späten Endosomen hervorruft. Annexin VI_{1-175} bindet sowohl in Calcium-abhängiger, als auch Calcium-unabhängier Weise an die frühen Endosomen, wobei die Bindung sehr viel schwächer ist. Eine Bindung an die späten Endosomen konnte nicht gezeigt werden.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit ergaben sich neue Fragen. Insbesondere die Bindungsstudien an die endosomalen Kompartimente, führten zu der Überlegung, dass noch weitere, bisher nicht berücksichtigte, Interaktionspartner des Annexin VI exisistieren müssten.

VIII. Literaturverzeichnis

Aarsman, A. J., G. Mynbeek, H. Van Den Bosch. Lipocortin inhibition of extracellular and intrcellular phospholipase A2 is substrate concentration dependent. FEBS Lett 219:176-180, 1987

Aggeler, J., Z. Werb. Initial events during phagocytosis macrophages viewed from outside and inside the cell: membrane particle interactions and clathrin. J. Cell Biol. 94: 613-623, 1982

Ahle, S., A. Mann, U. Eichelsbacher, E. Ungewickell. Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane. EMBO J. 7: 919-929, 1988

Ahle, S., E. Ungewickell. Identification of a clathrin binding subunit in the HA2 adaptor protein complex. J. Biol. Chem. 264: 20089-20093, 1989

Anderson, R. G. W., J. L. Goldstein, M. S. Brown. Localisation of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 2434-2438, 1976

Anderson, R. G.W., M. S. Brown, J. L. Goldstein. Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density ipoprotein in human fibroblasts. Cell 10: 351-364, 1977

Anderson, R. G. W., M. S. Brown, U. Beisiegel, J. L. Goldstein. Surface distribution and recycling of the low density lipoprotein receptor as visualized with antireceptor antibodies. J. Cell Biol. 93: 523-531, 1982

Anderson, R. G. W. Potocytosis of small molecules and ions by caveolae. Trends Cell Biol. 3, 69-72, 1993

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

Bazzi, M. D. and G. L. Nelsestuen. Importance of phosphatidyletholamin for association of Protein Kinase C and related Proteins to membranes. Biochemistry 30: 7970-7977, 1991a

Bazzi, M. B., A. Youakim, G. L. Nelsestuen. Interaction of annexinVI with membranes: highly restricted dissipation of clustered phospholipids in membranes containing phosphatidylethanolamine. Biochemistry 31: 1125-1134 , 1992

Braell, W. A., D. M. Schlossman, S. L. Schmid, J. E. Rothman. Dissociation of clathrin coats coupled to the hydrolysis of ATP: role of an uncoating ATPase. J. Cell Biol. 99: 734-741, 1984

Brown, M. S., J. L. Goldstein.Receptor-mediated endocytosis: insightsfrom the lipoprotein receptor system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3330-3337, 1979

Brown, M. S., J. L. Goldstein. Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. J. Lipid Res. 21, 505-517, 1980

Brown, M. S., J. L. Goldstein. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 232: 34-47, 1986

Cao, H., F. Garcia, M. A. Mc Niven. Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. Mol. Biol. Cell 9: 2595-2609, 1998

Chen, M. S., R. A. Obar, C. C. Schroeder, T. W. Austin, C. A. Poodry et al. Multiple fprms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis. Nature 351: 583-586, 1991

Cook, T., K. Mesa, R. Urrutia. Three dynamin-encoding genes are differentially expressed in developing rat brain. J. Neurochem. 67: 927-931, 1996

Cook, T. A., R. Urrutia, M. A. Mc Niven. Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 644-648, 1994

Clark, D. M., S. E. Moss, N. A. Wright, M. J. Crumpton. 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, 1991

Coméra, C., B. Rothhut, F. Russo-Marie : Identification and characterisation of phospholipase A2 inhibitory proteins in human mononuclear cells. Eur J. Biochem. 188: 139-46, 1990

Creutz, C. E., C. J. Pazoles, H. B. Pollard. Identification and purification of an Adrenal Medullary Protein (Synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. J. Biol. Chem. 253: 2858-2866, 1978

Creutz, C. E. The Annexins and exocytosis. Science 258: 924-931, 1992

Crompton, M. R, S. E. Moss, M. J. Crumpton. Diversity in the lipocortin/ calpactin family. Cell 55: 1-3, 1988

Croptom, M. R., R. J. Owens, N. F. Totty, S. E. Moss, M. D. Waterfield, M. J. Crumpton. Primary structure of the human, membrane-associated Ca^{2+}-binding protein p68: a novel member of a protein family. EMBO J. 7: 21-27, 1988

Damke, H., T. Baba, D. E. Warnock, S. L. Schmid. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. J. Cell Biol. 127: 915-934, 1994

Damke, H., T. Baba, A. M. van der Blieck, S. L. Schmid. Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensetive mutant of dynamin. J. Cell Biol. 131: 69-80, 1995

Davidson, F. F., E. A. Dennis, M. Powell, J. R. Glenny. Inhibition of phospholipase A2 by lipocortins and calpactins. An effect of binding to substrate phospholipids. J. Biol. Chem. 262, 1698-705, 1987

De Duve, C. Lysosomes. In : Ciba Foundation Symposium, edited by A. V. S. de Reuck and M. P. Cameron. London: Churchill, 411-412, 1963

Dejardins, M. Biogenesis of phagolysosomes: the “kiss and run hypothesis”. Trends Cell Biol. 5: 183-186, 1995

Desjardins, M., L. A. Huber, R. G. Parton, G. Griffiths. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. J. Cell Biol. 124: 677-688, 1994

Dell’ Angelica, E. C., C. Mullins, J. S. Bonifacino. AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. J. Biol. Chem. 274: 7278-7285, 1999

Diaz-Munoz, M., S. L. Hamilton, M. A. Kaetzel, P. Hazarika, J. R. Dedman. Modulation of calcium release channel activity from sarcoplasmic reticulum by annexinVI (57 kDa Calcimedin). J. Biol. Chem. 265: 15894-15899, 1990

Donelly, S. R., S. E. Moss. Annexins in the secretory pathway. Cell. Mol. Life sci. 53: 533-538, 1997

Driessen, H. P. C., R. H. Newman, P. S. Freemont, M. J. Crumpton. A model of the structure of human annexinVI bound to lipid monolayers. FEBS Lett. 306: 75-79, 1992

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

Dubois, T., A. Bisagni-Faure, J. Coste, E. Mavoungou, C.-J. Menkes, F. Russo-Marie, B. Rothhut. High levels of Antibodies to Annexins VI in Patients with rheumatoid arthritis. The journal of rheumatology 22(7): 1230-1234, 1995

Dunn, W. A., A. L. Hubbard. Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by hepatocytes in the perfused rat liver: ligand and receptor dynamics. J. Cell Biol. 98: 2148-2159, 1984

Dunn, K. W., T. E. Mc Graw, F. R. Maxfield. Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. J. Cell Biol. 109: 3303-3314, 1989

Emans, N., J. P. Gorvel, C. Walter, V. Gerke, G. Griffiths, J. Gruenberg. Annexin II is a major component of fusiogenic endosomal vesicles. J. Cell Biol.120: 1357-1370, 1993

Evans, T. C., and G. L. Nelsestuen. Calcium and membrane-binding properties of monomeric and multimeric Annexin II. Biochemistry 33: 13231-13238, 1994

Falkow, S., R. R. Isberg, D. A. Portnoy. The interaction of bacteria with mammalian cells. Annu. Rev. Cell Biol. 8: 333-363, 1992

Fiedler, K., R. G. Parton, R. Kellner, T. Etzold , K. Simons. VIP36, a novel component of glycolipid rafts and exocytic carrier vesicles in epithelial cells. EMBO J. 13: 1729-1740, 1994

Francia, G., S. D. Mitchell, S. E. Moss, A. M. Hanby, J. F. Marshall, I. R. Hart. Identificaton by differential display of annexin VI, a gene differentially expressed during melanoma progression. Cancer Res. 56: 3855-3858

Futter, C. E., S. Felder, J. Schleeinger, A. Ulrich, C. R. Hopkins. Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor. J. Cell Biol. 120: 77-83, 1993

Gerke, V., K. Weber. Identity of p 36 K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush broders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin. EMBO J.3: 227 – 233,1984

Gerke, V., K. Weber. Calcium-dependent conformational changes in the 36 kDa subunit of intestinal Protein I related to the cellular 36 kDa target of Rous Sarcoma Virus Tyrosine Kinase. J. Biol. Chem. 260: 1688-1695,1985

Gerke, V. and S. E. Moss. Annexins and membran dynamics. Biochem. Biophys. Acta 1357: 129-154, 1997

Geuze, H. J., J. W. Slot, G. J. A. M. Strous, H. F. Lodish, A. L. Schwartz. Intracellular site of asiaglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis. Cell 32, 277-287,1983

Gloud, K. L., C. M. Woodgett, C. M. Isacke, T. Hunter. The Protein-Tyrosine Kinase substrate p36 is also a substrate for Protein Kinase in vitro and in vivo. Mol. Cell. Biol. 6: 2738-2744, 1986

Goldberg, R. I., R. M. Smith, L. Jarett. Insulin and α2-macroglobulin-methylamine undergo endocytosis by different mechanisms in rat adipocytes. I. Comparsion of cell surface events. J. Cell Physiol. 133: 203-212, 1987

Gosh, R. N., W. W. Webb. Evidence for intra-membranous constraints to cell surface low density lipoprotein receptor motion. Biophys. J. 57: 286a, 1990

Goldman, R. Lectin-mediated attachment and ingestion of yeast cells and erythrocytes by hamster fibroblasts. Exp. Cell Res.104: 325-334, 1977

Griffin, F. M. J., J. A. Griffin, J. E. Leider, S. C. Silverstein. Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. J. Exp. Med. 142: 1263-1282, 1975

Griffin, F. M. J., J. A. Griffin, S. C. Silverstein. Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow-derived lymphocytes. J. Exp. Med. 144: 788-809, 1976

Gruenberg, J. and N. Emans. Annexins in membrane traffic. Trends Cell Biol. 3: 224-227, 1993

Grewal, T., J. Heeren, D. Mewawala, T. Schnitgerhans, D. Wendt, G. Salomon, C. Enrich, U. Beisiegel, S. Jäckle. Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of low density lipoprotein to the prelysosomal compartment. J. Biol. Chem 275 (43): 33806-13, 2000

Gruenberg, J., G. Griffiths, K. E. Howell. 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, 1989

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

Hanover, J. A., R. B. Dickinson. Transferrin-receptor-mediated endocytosis and iron delivery. In: I. H. Pastan, M. C. Willingham (eds) Endocytois. Plenum Press, New York, 131-161, 1985

Harder, T., V. Gerke. The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin II2p11(2) complex. J. Cell Biol. 123: 1119-1132, 1993

Hinshaw, J. E., S. L. Schmid. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. Nature 374: 190-192, 1995

Hirst, J., N. A. Bright, B. Rous, M. S. Robinson. Characterisation of a growth adaptor-related protein complex. Mol. Biol. Cell 10: 2787 - 2802, 1999

Holtzman, E. Lysosomes. New York: Plenum, 1989

Hosoya, H., R. Kobayashi, S. Tsukita, F. Matsumura. Ca^{2+}-regulated actin and phospholipid binding protein (68 kD-protein) from bovine liver: Identification as a homologue for annexin VI and intracellular localization. Cell Motil. Cytoskel. 22: 200-210, 1992

Huet, C., J. F. Ash, S. J. Singer. The antibody-induced clustering and endocytosis of HLA antigens on cultured human fibroblasts. Cell 21: 429-438, 1980

Jäckle, S., E. Runquist, S. Brady, R.L. Hamilton, R. J. Havel. Isolation and characerisation of three endosomal fractons from the liver of normal rats after lipoprotein loading. J. Lipid Res. 32: 485-498, 1991

Jäckle, S., F. Rinninger, U. Beisiegel, A. Block, W. Tauscher, M. Biermer, H. Greten, E. Windler. Annexins in endocytosis. 34 Suppl 3: 81-82, 1996

Johnsson, N., G. Marriott, K. Weber. P 36, the major cytoplasmic substrate of src Tyrosine Protein Kinase binds to its p 11 regulatory subunit via a short amino-terminal amphiphatic helix. EMBO J. 7: 2435-3442, 1988

Jones, P. G., G. J. Moore, D. M. Waismann. A nonapeptide to the putative F-actin binding site of Annexin II tetramer inhibits its calcium-dependent activation of actin filament bundling. J. Biol. Chem. 267: 13993-13997,1992

Kamal, A., Y.-S. Ying, R. G. W. Anderson. Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to Lysosomes. The Journal of Cell Biology 142: 937-947, 1998

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

Kirchhausen, T. Coated pits and coated vesicles-sorting it all out. Curr. Opin. Struct. Biol. 3: 182-188, 1993

König, J., V. Gerke. Modes of annexin-membrane interactions analyzed by employing chimeric annexin proteins. Biochimica et Biophysica Acta 1498: 174-180, 2000

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

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

Kosaka, T., K. Ikeda. Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of Drosophila melanogaster, shibirets 1. J. Cell Biol. 97: 499-507, 1983b

Kretsinger, R. H., C. E. Creutz. Cell Biology. Consensus in exocytosis. Nature 320: 573, 1986

Lavialle, F., D. Rainteau, D. Massey-Harroche, F. Metz. Establishment of plasma membrane polarity in mammary epithelial cells correlates with changes in prolactin trafficking and in annexin VI recruitment to membranes. Biochim. Biophys. Acta 1464: 83-94, 2000

Liemann, S. and R. Huber. Three-dimensional structure of annexins. CMLS 53: 516-521, 1997

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

Liu, J. P., K. A. Powell, T. C. Südhof, P. J. Robnison. Dynamin I is a Ca^{2+}-sensitive phospholipid-binding with very high affinity for proteinkinase. C. J. Biol. Chem. 269: 21043-21050, 1994.

Lu,Y., M. D. Bazzi, G. L. Nelsestuen. Kinetics of AnnexinVI, calcium, and phospholipid association and dissociation. Biochemistry 34: 10777-10785, 1995

Lupas, A., M. van Dyke, J. Stock. Predicting coiled coils from protein sequences. Science 252: 1162-1164, 1991

Marsh, E. W., P. L. Leopold, N. L. Jones, F. R. Maxfield. Oligomerized transferrin receptors are selectively retained by a luminal sorting signal in a long-lived endocytic recycling compartment. J. Cell Biol. 129: 1509-1522, 1995

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

Mayor, S., K. G. Rothberg, F. R. Maxfield. Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking. Science 264: 1948-1951, 1994

Mc Graw, T. E., K. W. Dunn, F. R. Maxfield. Phorbol ester tratment increases the exocytic rate of the transferrin receptor recycling pathway independent of serine-24 phosphorylation. J. Cell Biol. 106: 1061-1066, 1988

Miettinen, H. M., K. Matter, W. Hunziker, J. K. Rose, I. Mellman. Fc receptor endocytosis is controlled by a cytoplasmic domain determinant that actively prevents coated pit localization. J. Cell Biol. 116: 875-888, 1992

Montesano, R., J. Roth, A. Robert, L. Orci. Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. Nature 296: 651-653, 1982

Morton, P. A., D. A. Owensby, B. E. Sobel, A. L. Schwartz. Catabolism of tissue-type plasminogen activator by the human hepatoma cell lina Hep G2. Modulation by plasminogen activator inhibitor type I. J. Biol. Chem. 264: 7228-7235, 1989

Moss, S. E., M. J. Crumpton. Alternative splicing gives rise to two forms of the p68 Ca^{2+}-binding protein. FEBS Letters 261: 299-302, 1990

Muhlberg, A. B., D. E. Warnock, S. L. Schmid. Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. EMBO J. 16: 6676-6683, 1997

Mukherjee, S., R. N. Ghosh, F. R. Maxfield. Endocytosis. Physiological Reviews 77(3): 759-803,1997

Nakata, T., R. Takemura, N. Hirokawa. A novel member of the dynamin family of GTP-binding proteins is expressed specifically in the testis. J. Cell Sci. 105: 1-5, 1993

Nicoziani P., F. Vilhardt, A. Llorente, L. Hilout, P. J. Courtoy, et al. Role for dynamin in late endosome dynamics and trafficking of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. Mol. Biol. Cell 11: 481-495, 2000

Noda, Y., T. Nakata, N. Hirokowa. Localization of dynamin: widespread distribution in mature neurons and association with membranous organelles. Neuroscience 55: 133-127, 1993

Okamoto, P. M., B. Tripet, J. Litowski, R. S. Hodges, R. B. Vallee. Multiple distinct coiled-coils are involved in dynamin self-assembly. J. Biol. Chem. 274: 10277-10286, 1999b

Orci, L., J.-L. Carprentier, A. Perrelet, R. G. W. Anderson, J. L. Goldstein, M. S. Brown. Complexes of tissue-type plasminogen activator and its serpin inhibitor plasminogen-activator inhibitor type 1 are internalized by means of the low density lipoprotein receptor-related protein/ α2-macroglobulin receptor. Exp. Cell Res. 113: 1-13, 1978

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

Parton, R. G., B. Joggerst, K. Simons. Regulated internalization of caveolae. J. Cell Biol. 127: 1199-1215, 1994

Paschal, B. M., H. S. Shpetner, R. B. Vallee. MAP 1C is a microtuble-activated ATPase which translocates microtubles in vitro and has dynein-like properties. J. Cell Biol. 105: 1273-1282, 1987

Pearse, B. M. F. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. J. Mol. Biol. 97: 93-98, 1975

Pitt, A., L. S. Mayogra, A. L. Schwartz, P. D. Stahl. Transport of phagosomal components to an endosomal compartment. J. Biol. Chem. 267: 126-132, 1992

Plager, D. A., G. L. Nelsestuen. Direct enthalpy measurements of the calcium-dependent interaction of annxin V and annexin VI with phospholipid vesicle. Biochemistry 33: 13239-13249, 1994

Pons, M., G. Ihrke, S. Koch, M. Biermer, A. Pol, T. Grewal, S. Jäckle, C. Enrich. Late endocytic compartments are major sites of annexinsVI localisation in NRK Fibroblasts and polarized WIF-B Hepatoma cells. Experimental Cell Research 256: 000-000, 2000

Powell, K. A., P. J. Robinson. Dephosphin / dynamin is a neuronal phosphoprotein concentrated in nerve teerminals: evidence from rat cerebellum. Neuroscience 64: 821-833, 1995

Rabinovitch, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. Trends Cell Biol. 5: 85-88, 1995

Radke, K., T. Gilmore, G. S. Martin. Transformation by Rous Sarcoma Virus: a cellular substrate for transformation-specific protein phosphorylation contains phosphotyrosine. Cell 21: 821-828, 1980

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

Robinson, M. S., B. M. Pearse. Immunoflourescent localization of 100 kDa coated vesicle proteins. J. Cell Biol. 102: 48 - 54, 1986

Robinson, P. J., J. P. Liu, K. A. Powell, E. M. Fyske, T. C. Südhof. Phosphorylation of dynamin I and synaptic-vesicle recycling. Trends Neurosci. 17: 348-353, 1994

Roth, T. F., K. R. Porter. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito Aedes aegyptil. J. Cell Biol. 20: 313-332, 1964

Rothberg, K. G., Y. S. Ying, B. A. Kamen, R. G. W. Anderson. Cholesterol controls the clustering of the glycophospholipidanchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. J. Cell Biol. 111: 2931-2938, 1990

Salim, K., M. J. Bottomley, E. Querfurth, M. J. Zvelebil, I. Gout, et al. Distinct specifity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton`s tyrosine kinase. EMBO J. 15: 6241-6250, 1996

Sandvig, K., B. van Deurs. Endocytosis without clathrin. Cell Biol. Int. Rep. 15: 3-8, 1991

Scaife R., R. L. Margolis. Biochemical and immunochemical analysis of rat brain dynamin interaction with microtubules and organelles in vivo and in vitro. J. Cell Biol. 111: 3023-3033, 1990

Schmid, S. L., L. L. Carter. ATP is required for receptor-mediated endocytosis in intact cells. J. Cell Biol. 111: 2307-2318, 1990

Seemann, J., K. Weber, M. Osborn, R. G. Parton, V. Gerke. The association of annexinI with early endosomes is regulated by Ca^{2+} and requires an intact N-terminal domain. Mol. Biol. Cell 7: 1359-1374, 1996

Severs, N. J. Caveolae: static inpocketings of the plasmamembrane, dynamic vesicles or plain arttifact? J. Cell Sci. 90: 341-348, 1988

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

Sever, S., A. B. Muhlberg, S. L. Schmid. Impairment of dynamin`s GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. Nature 398: 481-486, 1999

Simpson, F., N. K. Hussain, B. Qualmann, R. B. Kelly, B. K. Kay, et al. SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. Nat. Cell Biol. 1: 119-124, 1999

Smirnova, E., D. L. Shurland, E. D. Newman-Smith, B. Pishvaee, A. M. van der Bliek. A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains. J. Biol. Chem. 274: 14942-14947, 1999

Smith, P., A. Davies, M. J. Crumpton, S. E. Moss. Structure of the annexinVI gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2713-2717, 1993

Sontag, J. M., E. M. Fyske, Y. Ushkaryov, J. P. Liu, P. J. Robinson, T. C. Südhof. Differential expression and regulation of multiple dynamins. J. Biol. Chem. 269: 4547-4554, 1994

Südhof, T. C., C. A. Slaughter, I. Leznicki, P. Barjon, G. A. Raynolds. Human 67 kDa calelectrin contains a duplication of four repeats found in 35 kDa lipocortins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 664-668, 1988

Swanson, J. A., S. C. Baer. Phagocytosis by zippers and triggers. Trneds Cell Biol. 5: 89-93, 1995

Takei K., P. S. Mc Pherson, S. L. Schmid, P. De Camilli. Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. Nature 374: 186-190, 1995

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

Theobald, J., P. Smith, S. M. Jacob, S. E. Moss. Expression of annexin VI in A431 carcinoma cells supresses proliferation: a possible role for annexin VI in cell growth regulation. Biochimica et Biophysica Acta 1223: 383-390, 1994

Theobald, J., A. Hanby, K. Patel, S. E. Moss. Annexin VI has tumor-supressor activity in human A 431 squamous epithelial carcinoma cells. Br. J. Cancer 71: 786-788, 1995

Tressler, R. J., T. Yeatman, G. L. Nicolson. Extracellular annexin VI expression is associated with divalent cation-dependent endothelial cell adhesion of metastatic RAW177 large-cell lymphoma cells. Exp. Cell Res. 215: 395-400, 1994

Tressler, R. J., T. V. Yeatman, G. L. Nicolson. Extracellular annexin II is associated with divalent cation-dependent tumour cell-endothelial cell adhesion of metastatic RAW 117 large-cell lymphoma cells. J. Cell. Biochem. 53: 265-276, 1993

Tsuruhara T., J, H. Koenig, K. Ikeda. Synchronized endocytosis studied in the oocyte of a temperature-sensitive mutant of Drosophila melanogaster. Cell Tissue Res. 259: 199-207, 1990

Tuma P. L., C. A. Collins. Activation of dynamin GTPase is a result of positive cooperativity. J. Biol. Chem. 269: 30842-30847, 1994

Turpin, E., F. Russo-Marie, T. Dubois, C. de Paillerets, A. Alfsen, M. Bomsel. In adrenocortical tissue, annexins II and VI are attached to clathrin coated vesicles in a calcium-independent manner. Biochim. Biophys. Acta 1402: 115-130, 1998

Van der Bliek, A. M., E. M. Meyerowitz. Dynamin-like protein encoded by the Drosophila shibire gene associated with vesicular traffic. Nature 351: 411-414, 1991

Van der Bliek, A. M. Functional diversity in the dynamin family. Trends Cell Biol. 9: 96-102, 1999

Van Deurs, B., K. Nilausen. Pinocytosis in mouse L-fibroblasts: ultrastructural evidence for a direct membrane shuttle between the plasma membrane and the lysosomal compartment. J. Cell Biol. 94: 279-286, 1982

Van Deurs, B., O. W. Petersen, S. Olsnes, K. Sandvig. The ways of endocytosis. Int. Rev. Cytol. 117: 131-177, 1989

Van Deurs, B., P. K. Holm, K. Sandvig, S. H. Hansen. Are caveolae involved in clathrin-independent endocytosis? Trends Cell Biol. 3: 249-251, 1993

Warnock, D. E., L. J. Terlecky, S. L. Schmid. Dynamin GTPase is stimulated by crosslinking through the C-terminal proline-rich domain. EMBO J. 14: 1322-1328, 1995

Warnock, D. E., S. L. Schmid. Dynamin GTPase, a force-generating molecular switch. BioEssays 18: 885-893, 1996

Weinman, J. S., J. M. Feinberg, D. P. Rainteau, B. Della Gaspera, S. J. Weinman. Annexins in rat enterocyte and hepatocyte: An immunogold electronmicroscope study. Cell Tissue Res. 278: 389-397, 1994

Yamashiro, D. J., L. A. Borden, F. R. Maxfield. Kinetics of α2-macroglobulin endocytosis and degradation in mutant and wild-type Chinese hamster ovary cells. J. Cell Physiol. 139: 377-382, 1989

Zaks, W. J., C. E. Creutz. Evalution of the annexins as potential mediators of membrane fusion in exocytosis. J. Bioener. Biomembr. 22: 97-120, 1990a

Zaks, W. J., C. E. Creutz. Annexin-chromaffin granule membrane interactions: a comparative study of synexin, p32 and p67. Biochim. Biophys. Acta 1029: 149-160, 1990b

Zaks, W. J., C. E. Creutz. Ca(2+)-dependent annexin self-association on membrane surfaces. Biochemistry 30: 9607-9615, 1991

VII. DANKSAGUNG

Ich möchte Frau Prof. Beisiegel für die Vergabe des Themas und Ihre Unterstützung bei der Durchführung dieser Dissertation sowie für Ihr Verständnis und Ihre Geduld danken.

Besonders danke ich auch Herrn Dr. Thomas Grewal und Herrn Walter Tauscher für die exzellente Anleitung und Betreuung.

Ich danke ebenfalls den Mitarbeitern in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Beisiegel für die herzliche Aufnahme und deren Hilfe bei Fragen.

Danken möchte ich Petra Seumenicht für die Hilfe bei der Korrekturlesung.

Aus tiefstem Herzen danke ich Dir für die Kraft und die Liebe, die Du mir täglich gibst Vasilios Papadopoulos.

Herzlich danken möchte ich meinen lieben Eltern, die mich während dieser Zeit in jeder Hinsicht unterstützt und mir so die Arbeit an der Dissertation erst ermöglicht haben sowie meinem lieben Bruder, der mir immer mit Rat und Tat allen anderen und viel Geduld zur Seite stand.

VIII. Lebenslauf

Name: Carolina Barbara Drys

Geburtsort: Stettin

Geboren am: 22.10.1976

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Vater: Andrzej Drys

Mutter: Barbara Drys

Schulbesuch in Hamburg mit dem Erreichen des Abiturs: 1983 -1996

- Katholische Grundschule: 1983 -1987
- Gymnasium Klosterschule: 1987 - 1996

Studium der Medizin an der Universität Hamburg: 1996 - 2003

- Physikum: 03/1999
- Erstes Staatsexamen: 03/2000
- Zweites Staatsexamen: 11/2002
- Drittes Staatsexamen: 12/2003

Doktorarbeit: 11/2000 - 6/2001 bei Fr. Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h. c. U. Beisiegel am Institut für Biochemie und Molekularbiologie am UKE in Hamburg.
Thema: Charakterisierung der Deletionsmutante Annexin VI_{1-175}

Seit Februar 2004 ÄIP auf der Inneren Medizin im Diakoniekrankenhaus Alten Eichen in Hamburg.

IX. ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, lediglich die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittels benutzt sowie die aus der Literatur entnommenen Passagen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite kenntlich gemacht habe und die Arbeit bislang keinem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.