

Bedeutung des Annexin 2 bei der Organisation von Membrandomänen

Von dem Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biochem. Nicole Zobiack

geboren am 05.11.1972 in Gifhorn

2002

Referent: Prof. Dr. Walter Müller

Korreferent: Prof. Dr. Volker Gerke

Tag der Promotion: 12.12.2002

Abstract

Interaktionen zwischen zellulären Membranen und dem darunterliegenden Zytoskelett spielen eine zentrale Rolle bei der Stabilisierung der Zellform, bei der Zellbewegung sowie beim intrazellulären Transport. Der Kontakt zwischen Membran und Zytoskelett wird dabei von Proteinen bzw. Proteinkomplexen vermittelt, die sowohl an Membranen als auch an Zytoskelettelemente binden. Unter den Proteinen, die diese Voraussetzungen erfüllen, befindet sich Annexin 2, ein Mitglied der Annexin-Familie Ca^{2+} - und Phospholipid-bindender Proteine.

Annexin 2 besteht aus einer hochkonservierten C-terminalen Domäne mit mehreren Ca^{2+} /Lipid- und einer Aktin-Bindungsstelle sowie einer variablen N-terminalen Domäne, die die Bindungsstelle des zellulären Liganden S100A10 und eine Ca^{2+} -unabhängige Membranbindungsstelle trägt. In der Zelle liegt Annexin 2 sowohl als Monomer als auch im heterotetrameren Komplex mit S100A10 vor. Dabei ist die Lokalisation des Komplexes abhängig vom Annexin 2 und der zytosolische, zelluläre Ligand S100A10 wird erst durch Komplexbildung an die Membran rekrutiert, wie es in dieser Arbeit mit fluoreszierenden Fusionsproteinen in lebenden Zellen gezeigt werden konnte. Verschiedene Stimuli rufen eine dynamische Umverteilung des membranassoziierten Aktinzytoskeletts hervor. Dazu gehören enteropathogene *E. coli* (EPEC) sowie die Erhöhung des Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat-Gehaltes ($\text{PI}(4,5)\text{P}_2$) in der Zelle.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß Annexin 2 an die zytosolische Membranseite unterhalb extrazellulär adhärierender EPEC rekrutiert wird. Diese Rekrutierung ist Ca^{2+} -abhängig, jedoch unabhängig von der Translokation des bakteriellen Tir-Proteins, dessen Phosphorylierung massive Aktinumlagerungen hervorruft. Desweiteren konnten charakteristische Bestandteile bestimmter Membrandomänen (Rafts), wie GPI-verankerte Proteine, Cholesterin und $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ zusammen mit Annexin 2 an den EPEC-Kontaktstellen nachgewiesen werden.

Die Erhöhung des $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -Gehaltes steigert die Makropinozytose und löst in den Zellen die Bildung von Aktinschweiften hinter makropinozytotischen Vesikeln aus. Annexin 2 colokalisiert nach Stimulation sowohl mit diesen Aktinschweiften als auch mit den makropinozytotischen, $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -positiven Vesikeln. All diese Befunde sprechen für eine Beteiligung des Annexin 2 bei der Stabilisierung bzw. Zytoskelettverankerung von aktinreichen Membrandomänen. Zahlreiche Daten weisen dem Annexin 2, insbesondere der N-terminalen Domäne, darüber hinaus eine Bedeutung bei der Endozytose zu. So konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, daß Annexin 2 in dynamischer Weise mit frühen Endosomen und dem Recyclingkompartiment colokalisiert. Nach Überexpression der N-terminalen Domäne bzw. nach spezifischer Verringerung des Annexin 2-Gehaltes mittels kleiner interferierender RNA-Duplexe konnten jeweils gegensätzliche Veränderungen in der Morphologie des endosomalen Recyclingkompartiments und der Rate des Recyclings von internalisiertem Transferrin festgestellt werden. Die Aufnahme von Transferrin sowie der Transport anderer Liganden zum spät-endosomalen Kompartiment waren dabei nicht betroffen. Die Expression der N-terminalen Domäne des Proteins in Zellen mit vermindertem Annexin 2-Gehalt führte zu einer Revertierung des nach Annexin 2-Verlust erhaltenen Phänotyps. In der Summe zeigen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse, daß Annexin 2 möglicherweise auf Grund der hier dokumentierten Zytoskelett-verknüpfenden Eigenschaft eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Transportes von internalisiertem Transferrin spielt.

Interactions between cellular membranes and the underlying cytoskeleton play a central role in stabilising cell shape, cell motility and intracellular transport. The contact of membrane and cytoskeleton is established by proteins or protein complexes, which mutually bind membranes and cytoskeleton elements. Annexin 2, a member of the annexin super family of Ca^{2+} / phospholipid binding proteins, belongs to this group of proteins.

Annexin 2 consists of a high conserved C-terminal domain harbouring several Ca^{2+} -binding sites and one actin binding domain, and a variable N-terminal domain, which comprises the binding site of the cellular ligand S100A10 and a Ca^{2+} -independent membrane binding domain.

Intracellular annexin 2 exists as a monomer or in a heterotetrameric complex with S100A10. The localisation of the complex depends solely on annexin 2, since the cytosolic ligand S100A10 is recruited to the plasma membrane upon complex formation, as shown in this study with fluorescence labeled fusion proteins in living cells.

Dynamic rearrangements of membrane associated actin cytoskeleton are caused by various stimuli like enteropathogenic *E. coli* (EPEC) as well as increasing concentration of intracellular phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ($\text{PI}(4,5)\text{P}_2$). For the first time it was shown, that annexin 2 is recruited underneath adhering EPEC. This recruitment is Ca^{2+} -dependent, but independent of the translocation of the bacterial protein tir.

In addition typical components of specialized microdomains (rafts) like GPI-anchored proteins, cholesterol and $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ together with annexin 2 have been shown to be recruited and concentrate at EPEC attachment sites.

Elevated intracellular concentration of $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ increases macropinocytosis and triggers formation of actin tails at macropinocytic vesicles. Upon stimulation annexin 2 colocalizes both with actin tails and macropinocytic $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ positive vesicles. These results indicate an involvement of annexin 2 in stabilizing and anchoring actin rich membrane domains.

Moreover, numerous data implicate a role of annexin 2, particularly of the N-terminal domain, in endocytosis. In this study a dynamic colocalization of annexin 2 with early endosomes and the recycling compartment is demonstrated. Overexpression of the N-terminal domain and specific down regulation of the annexin 2 protein by small interfering RNA-duplexes (siRNA), respectively, revealed opposing changes in the morphology of the endosomal recycling compartment and in the recycling rate of internalized transferrin, while transferrin uptake as well as transport of different other ligands to the late endosomal compartment was not altered. Overexpression of the N-terminal domain in annexin 2 downregulated cells reversed the siRNA-phenotype. In sum, the obtained results demonstrate that annexin 2 plays an important role in regulating the transport of internalized transferrin on account of the documented property to link membranes to the cytoskeleton.

Schlagworte: Annexin 2; Endozytose; Membrandynamic

Keywords: annexin 2; endocytosis, membrane dynamics

Inhaltsverzeichnis

ABSTRACT	I
<i>Keywords: annexin 2; endocytosis, membrane dynamics</i>	<i>II</i>
INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
I EINLEITUNG	1
1 ENDOZYTÖSE	1
1.1 <i>Clathrin-abhängige Rezeptor-vermittelte Endozytose</i>	1
1.2 <i>Clathrin-unabhängige Endozytose</i>	2
1.2.1 Potozytose.....	3
1.2.2 Makropinozytose	3
1.3 <i>Membrantransport im endosomalen Weg</i>	4
1.4 <i>Vesikelfusion</i>	6
1.5 <i>Bedeutung des Aktinzytoskeletts</i>	8
2 DIE ANNEXIN-FAMILIE.....	10
2.1 <i>Molekulare Struktur und Eigenschaften</i>	10
2.2 <i>Annexine im Membrantransport und Organisation</i>	15
3 ZIELSETZUNG	18
II MATERIAL UND METHODEN	19
1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	19
1.1 <i>Kultivierung von Bakterien</i>	19
1.2 <i>Transformation von E. coli</i>	19
1.2.1 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i>	19
1.2.2 Transformation durch Elektroporation.....	20
1.3 <i>Konzentrationsbestimmung von DNA</i>	20
1.4 <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	20
1.5 <i>Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen</i>	21
1.6 <i>Isopronanol-Fällung der DNA</i>	21
1.7 <i>Klonierungsmethoden</i>	21
1.7.1 Restriktionsverdau	21
1.7.2 Ligation.....	21
1.7.3 Phenol/Chloroform-Extraktion	22
1.8 <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	22
1.9 <i>Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli</i>	23
1.9.1 Analytische Plasmidisolierung.....	23
1.9.2 Präparative Plasmidisolierung.....	23

1.10	<i>Sequenzierung der DNA</i>	23
1.11	<i>Klonierung der Expressionsvektoren</i>	24
1.11.1	Generierung des YFP-S100A10 Fusionsproteins.....	24
1.11.2	Generierung des pECFPmod-N1 Vektors.....	24
1.11.3	Generierung des Anx2-CFP Fusion Proteins.....	24
2	PROTEINCHEMISCHE METHODEN.....	25
2.1	<i>Konzentrationsbestimmung von Proteinen</i>	25
2.2	<i>Konzentrationsbestimmung von Peptiden</i>	25
2.3	<i>Proteinfällung mit TCA</i>	25
2.4	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	26
2.4.1	Probenvorbereitung.....	26
2.5	<i>Westernblot</i>	26
2.6	<i>Endosomenfusion</i>	27
2.6.1	Herstellung biotinylierter HRP.....	27
2.6.2	Zytosolpräparation.....	28
2.6.3	Markierung und Isolierung endozytotischer Vesikel.....	29
2.6.4	Bestimmung der Peroxidaseaktivität.....	30
2.6.5	Latenzmessung.....	30
2.6.6	Fusionsassay.....	30
2.6.7	Immunopräzipitation des Biotin-Avidin-Komplexes.....	31
2.6.8	Zytosoldepletion.....	32
2.6.9	Affinitätsreinigung monoklonaler Antikörper.....	32
3	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	33
3.1	<i>Zellkultur</i>	33
3.1.1	Auftauen von Zellen.....	33
3.1.2	Kultivierung von Zelllinien.....	33
3.1.3	Einfrieren von Zellen.....	33
3.2	<i>Infektion eukaryontischer Zellen mit Bakterien</i>	33
3.2.1	Kultivierung von Bakterien zur Infektion.....	33
3.2.2	Bestimmung des Bakterientiters.....	34
3.2.3	Infektion eukaryontischer Zellen mit Bakterien.....	34
3.3	<i>Transfektion von eukaryontischen Zellen</i>	35
3.3.1	Kalziumphosphat-Methode.....	35
3.3.2	Lipofektion.....	35
3.3.3	Transfektion mit Oligofectamin.....	35
3.4	<i>Immunfluoreszenz</i>	36
3.4.1	Aussaat der Zellen für die Immunfluoreszenz.....	36
3.4.2	Fixierung und Permeabilisierung.....	36
3.4.3	Immunfärbung.....	36
3.4.4	Filipin-Färbung.....	37
3.4.5	Phalloidin-Färbung.....	37
3.4.6	Lebende Zellen.....	37
3.4.7	Whole-mount-EM.....	37
3.5	<i>Immunopräzipitation</i>	39

3.6	<i>Methoden zur Untersuchung der Stoffaufnahme in Zellen</i>	39
3.6.1	Fluoreszenzmikroskopische Methoden.....	39
3.6.2	Biochemische Studien.....	41
4	BAKTERIENSTÄMME UND ZELLINIEN	43
4.1	<i>Bakterienstämme</i>	43
4.2	<i>Zelllinien</i>	43
5	VEKTOREN	44
6	OLIGONUKLEOTIDE	45
6.1	<i>siRNA Oligonucleotide</i>	45
6.2	<i>Oligonukleotide für die PCR</i>	45
7	ENZYME FÜR DIE MOLEKULARBIOLOGIE.....	45
8	ANTIKÖRPER	46
9	PEPTIDE.....	47
10	CHEMIKALIEN	47
11	MEDIEN.....	47
11.1	<i>Medienzusätze</i>	47
11.2	<i>Kulturmedien</i>	48
12	PUFFER UND LÖSUNGEN.....	48
13	DIVERSE MATERIALIEN.....	50
14	GERÄTE.....	50
III	ERGEBNISSE	51
1	PLASAMEMBRAN ASSOZIIERTES ANNEXIN 2.....	51
1.1	<i>Annexin 2 rekrutiert S100A10 an die Plasmamembran in HepG2-Zellen</i>	51
1.2	<i>Infektion durch enteropathogene E. coli führt zu einer Umverteilung von Annexin 2 an der Plasmamembran</i>	55
1.2.1	Annexin 2 wird in Ca ²⁺ -abhängiger Weise zu adhätierenden Mikrokolonien von EPEC rekrutiert ...	55
1.2.2	Die Rekrutierung des Annexin 2 an EPEC-Adhäsionspunkte ist Tir-unabhängig	63
1.2.3	Cholesterin, GPI-verankerte Proteine und PI(4,5)P ₂ akkumulieren zusammen mit Annexin 2 an den EPEC-Kontaktstellen.....	65
1.3	<i>Erhöhung des PI(4,5)P₂-Gehaltes und die damit auftretenden Auswirkungen in der Zelle</i>	69
2	ENDOSOMEN ASSOZIIERTES ANNEXIN 2	73
2.1	<i>Umverteilung des Annexin 2 während der Endocytose</i>	73
2.2	<i>Homotypische Fusion früher Endosomen</i>	75
2.3	<i>Einfluß der N-terminal Domäne des Annexin 2 auf endozytotische Prozesse</i>	80
2.4	<i>Selective Reduktion der Expression des endogenen Annexin 2 mittels kurzer doppelsträngiger RNA-Oligos (siRNA)</i>	86
IV	DISKUSSION	95
1	REKRUTIERUNG DES ANNEXIN 2 AN DIE PLASAMEMBRAN.....	95
1.1	<i>Der Annexin 2/S100A10₂-Komplex</i>	95
1.2	<i>Infektion mit enteropathogenen E. coli</i>	97

1.3	<i>Erhöhung des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-Gehaltes in der Zelle</i>	101
2	ANNEXIN 2 IN DER ENDOZYTÖSE	103
2.1	<i>Umverteilung während der Endozytose</i>	103
2.2	<i>Homotypische Fusion früher Endosomen</i>	104
2.3	<i>Einfluß des Annexin 2 auf die Endozytose</i>	107
2.4	<i>Modell zur Funktion des Annexin 2 beim Membrantransport</i>	112
V	LITERATURVERZEICHNIS	114
VI	ANHANG	127
1	SEQUENZEN	127
2	PUBLIKATIONEN	130
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	131
	DANKSAGUNG	132
	LEBENS LAUF	133

Abkürzungsverzeichnis

Zur Bezeichnung physikalischer Größen wurden SI-Einheiten verwendet. Aminosäuren und Nukleotide wurden mit den gängigen Abkürzungen bezeichnet. Darüber hinaus wurden folgende Abkürzungen benutzt:

% (w/v)	Gewichtsprozent
α	Anti-
Abb.	Abbildung
Anx 2	Annexin 2
Anx	Annexin
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BHK	Nierenzelllinie aus dem Hamster (baby hamster kidney)
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CCP	Clathrin coated pit
CCV	Clathrin coated vesicle
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECV	endosomal carrier vesicle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFP	verstärkt grünfluoreszierendes Protein (modifiziertes GFP)
EGTA	Ethylenglycol-bis-(-2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
GFP	grünfluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea victoria</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
Hepes	N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HRP	Meerrettichperoxidase
kDa	Kilodalton

KÜ	Kulturüberstand
LDL	Low density lipoprotein
MDCK	Nierenzelllinie des Hundes (Madin-Darby canine kidney)
min	Minuten
Ms	Maus
MVB	multi vesicular bodies
NSF	N-ethylmaleimid-sensitives Fusionsprotein
OD	optische Dichte
PDGF	Platelet derived growth factor
pers.	persönlich
PHD	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PI(4)P	Phosphatidylinositol-4-phosphat
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PNS	Zellhomogenat ohne Zellkerne (post nuclear supernatant)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNAP	lösliches NSF-Bindungsprotein
SNARE	löslicher SNAP-Rezeptor
TCA	Trichloressigsäure
TGN	Transgolgi-Netzwerk
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UZ	Ultrazentrifuge
wt	Wildtyp

I Einleitung

1 Endozytose

Säugerzellen haben eine Reihe von Mechanismen entwickelt, um kleine Moleküle, Makromoleküle und Partikel aufzunehmen und sie gerichtet zu spezifischen Kompartimenten zu transportieren. Alle diese Vorgänge werden unter dem Sammelbegriff Endozytose vereint (de Duve, 1963). Dazu gehören die Phagozytose, Pinozytose, Clathrin-abhängige rezeptorvermittelte Endozytose und die Clathrin-unabhängige Endozytose (Mukherjee et al., 1997).

Der überwiegende Anteil der sich abschürenden Vesikeln, die Fracht zwischen den Organellen und der Plasmamembran transportieren, besitzen zunächst eine Proteinhülle (coat). Diese Hüllen werden von multiplen Komplexen aus dem Zytosol gebildet (Kirchhausen, 2000). Zahlreiche Hüllproteinkomplexe sind identifiziert worden, die unterschiedliche Aufgaben in verschiedenen Organellen erfüllen. Clathrin vermittelt im Komplex mit dem Adaptorprotein AP-2 das Abschüren von endozytotischen Vesikeln an der Plasmamembran, im Komplex mit AP-1 werden Vesikel vom TGN abgeschnürt. COP I-Vesikel setzen sich aus einem Proteinkomplex, dem aus sieben Untereinheiten bestehenden Coatamer, und der GTPase Arf1 (ADP-ribosylation Factor 1) zusammen. Sie sind am Transport zwischen den Golgi-Zisternen und vom Golgi zum ER beteiligt. COP II-Vesikel dagegen vollziehen den Transport zwischen ER und Golgi. Sie bestehen aus dem sec23p/24p Proteinkomplex und der GTPase Sar1.

1.1 Clathrin-abhängige Rezeptor-vermittelte Endozytose

In der Clathrin-abhängigen Endozytose gelangt zytosolisches Clathrin nach einem Stimulus an die Plasmamembran und reichert sich lokal an, so daß „Clathrin coated pits“ (CCP) entstehen. Die zu internalisierenden Rezeptoren können dabei in den Clathrin coated pits angereichert werden. Die Membran stülpt sich ein und schnürt sich anschließend ab. Die so entstandenen Vesikel sind Clathrin umhüllt (CCV: clathrin coated vesicle).

Clathrin ist das wesentliche Strukturelement bei der rezeptorvermittelten Endozytose. Es besteht aus drei miteinander verknüpften schweren und leichten Ketten, die ein sogenanntes „Triskelion“ bilden (Ungewickell and Branton, 1981). Bei der

Oligomerisierung entsteht dabei ein Polyhedron aus hexagonale und pentagonale Strukturen, die eine gewölbte Hülle erzeugen.

Die Bildung der Clathrinhülle beginnt vermutlich mit der Bindung des Adaptorproteins AP-2 an die Membran. AP-2 besteht aus vier Untereinheiten (α , β 2, μ 2, σ 2), die Adaptine genannt werden. Die μ 2-Adaptin-Untereinheit bindet dabei an tyrosinhaltige (z. B. im Transferrinrezeptor und Low Density Lipoprotein-Rezeptor) oder dileucinhaltige (z. B. invariant chain-MHC II) Internalisierungsmotive verschiedener Rezeptoren und Proteine (Boll et al., 1996; Hofmann et al., 1999). Es konnte außerdem eine Bindungsstelle für PI(4,5)P₂ identifiziert werden (Rohde et al., 2002). Nach Bindung von AP-2 an die Plasmamembran werden Clathrin und das Protein AP-180 rekrutiert. Mit Hilfe weiterer accessorischer Proteine entsteht eine Clathrin-umhüllte Invagination. Die endgültige Abschnürung des Vesikel findet dann mit Hilfe der GTPase Dynamin statt. Dabei legt sich Dynamin wie ein Ring um den Hals der Invagination und unter Energieverbrauch schnürt sich ein CCV ab (Hinshaw, 2000). Viele der Proteine, die zur Bildung eines CCV benötigt werden, können auch Phosphoinositide über bestimmte Proteindomänen binden (z. B. Dynamin: PH-Domäne, siehe unten).

Unmittelbar nach der Entstehung des CCV wird die Clathrinhülle mit Hilfe des Hitzeschockproteins Hsp70 und Auxilin unter ATP-Verbrauch entfernt. Das enthüllte Vesikel wird entlang des endozytotischen Weges transportiert und kann dort mit anderen Membransystemem fusionieren.

1.2 Clathrin-unabhängige Endozytose

Auch nach selektivem Blockieren der Clathrin-abhängigen Endozytose sind Zellen noch in der Lage, Stoffe aufzunehmen (Damke et al., 1995). Der Gesamtanteil dieses Endozytoseweges kann dabei bis zu 50 % betragen (McKinley and Wiley, 1988). Aufnahmemöglichkeiten stellen die Potozytose (über Caveolae), die Makropinozytose oder eine konstitutive Clathrin-unabhängige Endozytose dar. Diese Clathrin-unabhängigen Wege spielen eine wichtige Rolle vor allem beim Membrantransport und Membranrecycling. Allen gemeinsam ist, daß die verschiedenen Markerproteine für diese Endozytosewege nur in bestimmten Membranbereichen (z. B. Rafts) gefunden werden und dort konzentriert sind.

Rafts sind dynamische, Detergenz (z. B. Triton-X-100) unlösliche Regionen der Plasmamembran, in denen Cholesterin, Sphingolipide und Phosphatidylinositol-(4,5)-

bisphosphat (PI(4,5)P₂) angereichert sind. Ebenso findet man dort eine Konzentration von GPI-verankerten Proteinen und bestimmten Membranproteinen (Simons and Ikonen, 1997; Anderson, 1998; Brown and London, 1998; Galbiati et al., 2001).

1.2.1 Potozytose

Die gezielte Anreicherung und Internalisierung bestimmter Moleküle über Caveolae wird auch als Potozytose bezeichnet (Mineo and Anderson, 2001). Caveolae sind ca. 50-70 nm große omega-(Ω)-geformte Invaginationen der Plasmamembran, die auch als eine besondere Form der Rafts angesehen werden können. Neben Cholesterin und verschiedenen Signalmoleküle (z.B. src-Kinase, Insulinrezeptor) enthalten sie das Cholesterin-bindende Protein Caveolin-1, das ihnen die auch charakteristische Form gibt. Bei der Abschnürung der Caveolae von der Membran ist ebenso wie bei der Clathrin-vermittelten Endozytose vor allem die GTPase Dynamin beteiligt (Henley et al., 1998; Oh et al., 1998). Caveolae dienen als Signaltransduktionsplattformen und regulieren den Cholesterintransport und die Cholesterinhomeostase (Verkade et al., 2000). Über Caveolae werden Cholera toxin und GPI-verankerte Proteine (Kurzchalia and Parton, 1999), der SV 40 Virus (Pelkmans et al., 2001) sowie bestimmte *E. coli*-Stämme aufgenommen (Shin et al., 2000). In den Cavaeolae wurden zudem sämtliche Proteine (siehe unten) identifiziert, die für Abschnürung, Transport und Fusion von Vesikeln notwendig sind.

1.2.2 Makropinozytose

Als Makropinozytose bezeichnet man die Bildung großer, bis zu 5 µm im Durchmesser, unregelmäßig geformter endozytotischer Vesikel, die überwiegend durch das Schließen von Lamellipodien an sich aufwölbenden Membrandomänen (ruffles) entstehen (Swanson and Watts, 1995; Johannes and Lamaze, 2002). Das Recycling der hierdurch internalisierten Membranen zwischen den endosomalen Kompartimenten und der Plasmamembran wird sehr wahrscheinlich von der GTPase Arf6 (ADP-ribosylation Factor) reguliert (Radhakrishna and Donaldson, 1997; D'Souza-Schorey et al., 1998; Franco et al., 1999). Arf6 konnte sowohl an der Plasmamembran als auch auf endozytotischen bzw. makropinozytotischen Vesikeln lokalisiert werden. In der GTP-gebundenen Form ist Arf6 vorwiegend an der Plasmamembran lokalisiert, während es im GDP-Zustand auf endosomalen Membranen nachgewiesen wurde (Peters et al., 1995). Die Überexpression einer in der GTP-Form fixierten Arf6-Mutante (Q67L) führt zu einer erhöhten Ausbildung von Membranruffles und Makropinosomen (Peters et al., 1995;

D'Souza-Schorey et al., 1998). Diese Strukturen sind Aktin und Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat positiv (Brown et al., 2001). Arf6 kann zusätzlich die PI(4)P-5-Kinase direkt stimulieren, was zu einer erhöhten PI(4,5)P₂-Synthese führt (Honda et al., 1999). Viele Aktin-regulierende Proteine binden an PI(4,5)P₂, so daß durch den erhöhten PI(4,5)P₂-Gehalt das Aktinzytoskelett beeinflußt werden kann und dynamische Aktinumlagerungen entstehen, die wahrscheinlich für die Makropinozytose essentiell sind (Sechi and Wehland, 2000; Caroni, 2001; McLaughlin et al., 2002).

Die über Makropinozytose entstandenen endosomalen Strukturen enthalten Membranproteine wie z. B. MHC I, Tac (IL-2 Rezeptor α Untereinheit) (Radhakrishna and Donaldson, 1997; Brown et al., 2001) und MHC II in professionell Antigen-präsentierenden Zellen (Sallusto et al., 1995; Swanson and Watts, 1995). Ein spezifisches Frachtmolekül für Makropinosomen wurde bislang jedoch noch nicht identifiziert. Dieser endosomale Recyclingweg, an dem Arf6 beteiligt zu sein scheint, kann partiell mit dem Recyclingkompartiment der Clathrin-abhängigen Endozytose überlappen, denn eine Arf6-Mutante (T27N) konnte zusammen mit dem Transferrinrezeptor und Cellubrevin, die Markerproteine für das Recyclingkompartiment darstellen, immunopräzipitiert werden (Peters et al., 2001; Caplan et al., 2002). Diese Daten werden jedoch von verschiedenen Arbeitsgruppen kontrovers diskutiert (Radhakrishna and Donaldson, 1997; Brown et al., 2001).

1.3 Membrantransport im endosomalen Weg

Nach dem Abschnüren der Vesikel von der Plasmamembran, werden die Hüllproteine entfernt. Die nun freien Vesikel werden weiter in das Zellinnere transportiert und fusionieren mit frühen Endosomen. Entlang des endozytotischen Weges wird der pH-Wert durch die Aktivität einer vakuoläre ATPase (v-ATPase) in den einzelnen Membrankompartimenten erniedrigt. Dabei kann der pH-Wert von ca. pH 6,2 in den frühen Endosomen bis auf pH 4,5 in den Lysosomen sinken ((Dautry-Varsat et al., 1983; Maxfield and Yamashiro, 1987; Van Dyke and Belcher, 1994). In den frühen Endosomen werden die meisten Liganden und Rezeptoren durch den erniedrigten pH-Wert voneinander getrennt. Dieses Kompartiment wird deshalb auch als CURL (Compartiment for Uncoupling Receptor and Ligand) bezeichnet (Geuze et al., 1983). Die freien Liganden oder zur Degradation bestimmte Rezeptoren (z. B. EGF-Rezeptor) sammeln sich in großen vesikulären Strukturen (300-400 nm Durchmesser), die sich durch Membraneinfaltungen

und interne Vesikel auszeichnen und auch als „Multi Vesicular Bodies“ (MVB) bezeichnet werden. Diese multivesikulären Endosomen reifen zu späten Endosomen und Lysosomen oder werden gemäß eines anderen Modells als endosomale Transportvesikel (ECV: Endosomal Carrier Vesicle) entlang von Mikrotubuli zu den späten Endosomen transportiert, um mit diesen zu fusionieren (Gruenberg and Howell, 1989; Aniento et al., 1993). Schließlich werden die Liganden in den Lysosomen degradiert.

Andere Rezeptoren, wie der Transferrinrezeptor oder der LDL-Rezeptor, werden im frühen Endosom in dünne, tubuläre Strukturen (60 nm Durchmesser) sortiert, von denen sie entweder direkt zur Plasmamembran (schneller Weg) oder weiter in das sogenannte Recyclingkompartiment transportiert werden (langsamer Weg) (Sheff et al., 1999). Das Recyclingkompartiment befindet sich überwiegend in der Nähe des Mikrotubuli organisierenden Zentrums (MTOC). Von hier werden die Rezeptoren zurück zur Plasmamembran transportiert. Dabei hängt der Transport entlang des Recyclingweges nicht mehr von den Mikrotubuli ab, sondern von Aktin und unkonventionellen Myosinen (Huber et al., 2000; Apodaca, 2001). Eine Verbindung zwischen Transport, Aktinverteilung und Signalvermittlung könnte von der GTPase Arf6 vermittelt werden (D'Souza-Schorey et al., 1995; Radhakrishna et al., 1999; Peters et al., 2001). Es ist jedoch auch denkbar, daß andere Proteine, die in der Lage sind Membranen und das Aktinzytoskelett gleichzeitig zu binden, wie z. B. die Annexine, beteiligt sind.

Die einzelnen endozytotischen Kompartimente können anhand charakteristischer Proteine und Lipide beschrieben werden. Als gut untersuchte Markerproteine sind dabei die rab-Proteine zu nennen. Rab-Proteine sind kleine, zur ras-Superfamilie gehörende GTPasen. Sie werden überwiegend mit der Kontrolle von Vesikelanlagerung und Fusion in Verbindung gebracht, in dem sie im GTP-gebundenen Zustand an die Zielmembran binden und Effektorproteine rekrutieren. Rab4 und rab5 sind auf frühen Endosomen lokalisiert, während rab11 mit Recyclingendosomen assoziiert ist (Ullrich et al., 1996; Trischler et al., 1999). Rab7 dagegen ist beim Transport von den frühen zu den späten Endosomen beteiligt (Chavrier et al., 1990; Gorvel et al., 1991; Meresse et al., 1995). Rab4 und rab5 sowie rab4 und rab11 zeigen eine gewisse Überschneidung in der Lokalisation (Sonnichsen et al., 2000). Vermutlich befindet sich rab5 überwiegend im vesikulären Teil der frühen Endosomen und ist dort bei der homotypischen Fusion früher Endosomen beteiligt (Gorvel et al., 1991), während sich rab4 in den tubulären Extensionen befindet, und dort Sortieraufgaben beim schnellen Recyclingweg übernimmt (van der Sluijs et al., 1992; Daro

et al., 1996; Mohrmann et al., 2002)). Ein Teil der Fracht wird von dort auch zum rab11-positiven Recyclingkompartiment transportiert.

Auf den Recyclingendosomen konnten Proteine der SNARE-Familie wie z. B. Cellubrevin (Galli et al., 1994; Daro et al., 1996) und Syntaxin13 (Prekeris et al., 1998) nachgewiesen werden. Außerdem wurden Clathrin-positive Bereiche identifiziert, die jedoch keine Adaptor-Komplexe wie AP-2 enthielten (Stoorvogel et al., 1996). Es wird vermutete, daß ein Teil des Transferrinrezeptors von den Recyclingendosomen mittels Clathrin-umhüllten Vesikel zur Plasmamembran transportiert wird. An diesen Prozeß ist wiederum die GTPase Dynamin beteiligt (van Dam and Stoorvogel, 2002).

Desweiteren zeigen die einzelnen Kompartimente eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung. An der Plasmamembran ist PI(4,5)P₂ bei der Bildung der clathrin coated pits, der Caveolae und der makropinozytotischen Vesikel beteiligt. Die Caveolae zeichnen sich außerdem durch einen hohen Anteil von Cholesterin und Sphingolipiden aus. Ca. 80 % des gesamten zellulären Cholesterin befindet sich an der Plasmamembran.

An PI(4,5)P₂ können Proteine mit einer sogenannten Pleckstrin-Homologie-Domäne (PHD) binden. Dazu gehören Proteine, die bei der Bildung und Abschnürung von Vesikeln beteiligt sind, wie AP-2, AP180, Synaptotagmin und Dynamin (Takei and Haucke, 2001). Nach dem Entfernen der Clathrin-Hülle enthalten diese Vesikel überwiegend PI(4)P, das vermutlich durch Dephosphorylierung durch die Phosphatase Synaptojanin aus PI(4,5)P₂ entsteht (Cremona et al., 1999). Frühe Endosomen besitzen dagegen einen hohen Anteil an PI(3)P (Wurmser et al., 1999). PI(3)P wird von Proteinen mit einer FYVE-Domäne gebunden. Dazu gehört z. B. EEA-1 (early endosome antigen), welches wiederum rab5 bindet und so auch als klassischer Marker für frühe Endosomen gilt. Die inneren Membranen der MVBs sind ebenfalls reich an PI(3)P. Eine Besonderheit zeigen späte Endosomen, denn sie enthalten bis zu 15 % LBPA (Lysobisphosphatidic acid) (Kobayashi et al., 1998; Kobayashi et al., 1999). Das Recyclingkompartiment besitzt unter anderem eine hohen Cholesterin-Gehalt, wodurch sich neben dem Recycling von Rezeptoren auch eine Aufgabe in der Homeostase von Cholesterin ergibt.

1.4 Vesikelfusion

Für den Membrantransport innerhalb der Zelle sind einzelne Schritte wie Abschnüren, Zielfindung und Fusion erforderlich. Dabei entstehen als Intermediate zwischen den Kompartimenten meist Vesikel. Ein Grundmodell für die Vesikelfusion leitet sich aus der

SNARE-Hypothese ab, die in ihrer ursprünglichen Form von Rothmann und Mitarbeitern formuliert wurde (Sollner et al., 1993). SNARE-Proteine (soluble NSF attachment protein (SNAP) receptor) spielen dabei eine zentrale Rolle.

SNAREs gehören zu einer großen Familie membranverankerter Proteine, die sich entweder auf der Zielmembran (t-SNARE) oder auf der Vesikelmembran (v-SNARE) befinden. Eine Klassifizierung unabhängig von der Lokalisation erfolgte in R-SNAREs (R für Arginin) und Q-SNAREs (Q für Glutamin). Bekannte R-SNAREs sind z.B. Cellubrevin (VAMP3) (auf frühen Endosomen und auch auf Recyclingendosomen nachgewiesen) und VAMP8 (frühe Endosomen). Syntaxine gehören dagegen zu den Q-SNAREs, z. B. befindet sich Syntaxin13 auf frühen Endosomen. Die einzelnen Mitglieder der SNARE-Familie sind jeweils auf bestimmte Zellkompartimente beschränkt. Dabei wird die Spezifität der Fusion durch die Interaktion der SNAREs miteinander vermittelt. Jeweils zwei t-SNAREs auf der einen Membran und ein v-SNARE auf der anderen Membran bilden zusammen mit SNAP einen sehr stabilen, den sogenannten Kernkomplex (Poirier et al., 1998; Parlati et al., 2000), der aus vier Helixbündeln besteht. Prinzipiell können sich dabei R-SNAREs mit Q-SNAREs paaren (McNew et al., 2000). Es kann so eine Struktur gebildet werden, die die Membranen miteinander fusionieren läßt (Snarepin), wie es bei Viren ähnlich beschrieben ist (viral hairpin) (Weber et al., 1998). Die zur Dissoziation des Komplexes notwendige Energie in Form von ATP wird vermutlich von den zytosolischen Adaptorproteinen SNAP und der ATPase NSF (N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein) zur Verfügung gestellt. Dabei treibt NSF nicht wie früher vermutet direkt die Fusion an, sondern dient dazu, die SNAREs nach dem Fusionsdurchgang zu reaktivieren und zugänglich zu machen .

Vor der Bildung des Kernkomplexes muß zunächst ein Kontakt zwischen den Membranen hergestellt werden (tethering). Obwohl die an der Bildung des Kontaktes beteiligten Moleküle zwischen den verschiedenen Transportwegen nicht konserviert sind, ergibt sich doch eine Gemeinsamkeit in der Beteiligung von rab-Proteinen. Neben der wohl am besten charakterisierten Vesikelfusion synaptischer Membranen ist die homotypische Fusion früher Endosomen ein gut untersuchtes Fusionssystem. An diesem Prozeß sind die GTPase rab5 (Gorvel et al., 1991) und das t-SNARE Syntaxin13 (McBride et al., 1999) beteiligt. Das entsprechende v-SNARE konnte bislang jedoch noch nicht identifiziert werden.

McBride et al. 1999 haben aufgrund ihrer Daten einen Mechanismus mit der Beteiligung von rab5 bei der Vesikelfusion postuliert. Dabei wird rab5 im GTP-gebundenen Zustand durch Adaptorproteine (Rabaptin-5/rabex-5) und NSF stabilisiert (Horiuchi et al., 1997). Es rekrutiert das Protein EEA1 an die Membran, wo dieses über PI(3)P-Bindung stabil mit

der Membran verknüpft werden kann. Der Komplex aus NSF/EEA1/rabaptin/rabex führt zu der Bildung einer Membranplattform, welche ankommende Vesikel in räumliche Nähe zur Zielmembran bringen kann. Durch Anwesenheit von NSF werden die SNAREs so beeinflusst, daß die Ausbildung des Kernkomplexes stattfinden kann. Auch hier zeigt sich, daß NSF eher ein Helferprotein ist als direkt an der Fusion beteiligt zu sein. EEA1 kann zusätzlich direkt mit Syntaxin13 interagieren und ein Fusionspore bilden.

Neben den hier beschriebenen Proteinen sind noch eine Reihe weiterer Proteine und Faktoren bekannt, die zur Fusion beitragen. Dazu gehören unter anderem auch Clathrin, Phospholipase C und D (Blumenthal et al., 1983; Luk et al., 1993; Blackwood et al., 1997). Neben der ATP-abhängigen Fusion, ist auch eine ATP-unabhängige Fusion bei hohen Calciumkonzentrationen beschrieben (Blackwood and Ernst, 1990; Mayorga et al., 1994). Diese Fusion kann selektiv durch die Zugabe von Annexin 2 und Anti-Annexin 2-Antikörpern inhibiert werden.

1.5 Bedeutung des Aktinzytoskeletts

Das Aktin-Zytoskelett spielt eine wichtige Rolle in zahlreichen zellulären Funktionen. Dazu gehören die Stabilisierung der Zellform, die Bildung von fokalen Adhäsionsstellen, die Zellbewegung, Membranaufwölbungen (ruffles) und die Endozytose.

Für all diese Funktionen ist eine dynamische Struktur des Aktins erforderlich. Polymerisation und Depolymerisation werden dabei von verschiedenen Proteinen kontrolliert. Die Aktinpolymerisation *in vivo* hängt von freien Enden ab. Ein Trimer aus G-Aktinmolekülen wird für eine spontane Nukleation benötigt. Neue Aktinverzweigungen können von bereits bestehenden Filamenten durch Nukleation mittels des Arp2/3-Komplexes gebildet werden (Condeelis, 2001; Higgs and Pollard, 2001). Dieser Komplex selbst besteht aus sieben Polypeptiden, von denen zwei Aktin-verwandte Proteine sind. Erst nach Aktivierung durch Wiskott-Aldrich-Syndrom-Proteine (WASP) ist der Arp2/3-Komplex in der Lage, eine Nukleation herbeizuführen. Zur WASP-Familie gehören das nur in hämatopoetischen Zellen exprimierte Protein Wasp und das ubiquitär-vorkommende Protein N-Wasp. N-Wasp besitzt Bindungsstellen für zahlreiche Proteine. Mit verschiedenen Domänen im C-terminalen Bereich bindet N-Wasp sowohl an Arp2/3 als auch G-Aktin und bringt diese in räumliche Nähe. Zuvor jedoch muß N-Wasp selbst aktiviert werden. Als Aktivatoren können die GTPase cdc42 und PI(4,5)P₂ dienen (Rohatgi et al., 2000). Ebenso interagieren Adaptorproteine wie Nck und Grb2 über ihre Src-

Homologie-3-Domäne (SH3), die an Prolin-reiche Domänen (PRD) bindet, mit N-Wasp (Rohatgi et al., 2001; Scaplehorn et al., 2002). Eine weitere Bindungsdomäne (WH1) für das Wasp-interacting-Protein (WIP) befindet sich im N-terminalen Bereich (Martinez-Quiles et al., 2001). In Anwesenheit von bestimmten Phosphoinositiden kann außerdem Profilin als Aktivator dienen (Chaudhary et al., 1998; Yang et al., 2000).

Den zur Aktinnukleation führenden Mechanismus machen sich viele pathogene Erreger zu nutze, um sich in der Wirtszelle fortzubewegen oder Podeste (Pedestals) auszubilden, auf denen sie aufliegen. Dazu gehören z. B. Listerien, Shigellen, Vaccinia Viren und enteropathogene *E. coli*. In vielen Fällen ersetzt ein Erregerprotein eines der aktivierenden Proteine oder interagiert sogar direkt mit N-Wasp (Frischknecht and Way, 2001; Gruenheid et al., 2001) und verursacht Aktinumlagerungen in der Nähe der Erreger.

Neben vielen anderen, hier nicht näher erörterten Funktionen übernimmt das Aktinzytoskelett auch Aufgaben bei der Endozytose. Es ist wahrscheinlich daran beteiligt, die Invagination der Plasmamembran und die Abschnürung der Vesikel zu unterstützen sowie intrazelluläre Vesikel fortzubewegen (Sechi and Wehland, 2000; Jeng and Welch, 2001). Sowohl bei der Clathrin-vermittelten Endozytose als auch der Makropinozytose konnte Aktin an sich ausbildenden bzw. sich bewegenden Vesikeln nachgewiesen werden (Swanson and Watts, 1995; Qualmann et al., 2000).

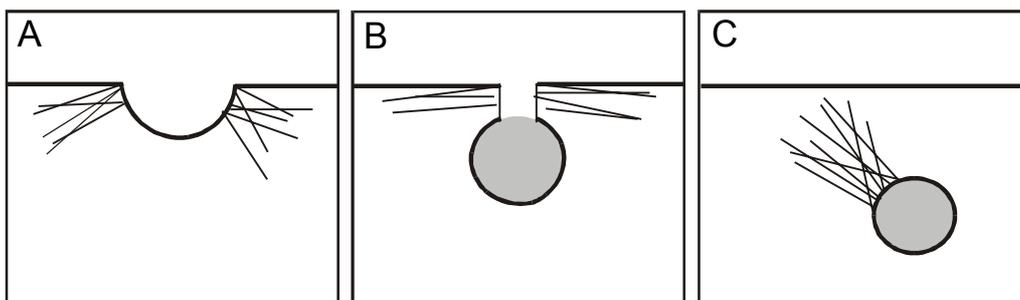


Abb. 1 Einfluß des Aktinzytoskeletts bei der Endozytose. A) Invagination des Plasmamembran. B) Abschnürung endozytotischer Vesikel. C) Transport intrazellulärer Vesikel. Zeichnung angelehnt an Jeng und Welch (2001)

Endozytotische Vesikel können sich mit Hilfe des Aktins fortbewegen und bilden dabei Aktinschwänze aus (Merrifield et al., 1999; Taunton et al., 2000; Merrifield et al., 2001), wie es auch bei Listerien beobachtet werden konnte.

Die Ausbildung von Membranruffles sowie eine Erhöhung der Makropinozytose gehen einher mit einer verstärkten Aktinpolymerisation, die durch die Erhöhung des PI(4,5)P₂-

Gehaltes ausgelöst werden kann (Rozelle et al., 2000; Brown et al., 2001). Dabei sind neben PI(4,5)P₂ auch Nck und Grb2 daran beteiligt, N-Wasp und schließlich den Arp2/3-Komplex zu aktivieren (Benesch et al., 2002). Eine mögliche Funktion bei der Verknüpfung von Plasmamembranstrukturen sowie endosomalen Membranen mit dem Aktinzytoskelett übernehmen Proteine der Annexin-Familie, die im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen.

2 Die Annexin-Familie

Annexine bilden eine Familie Ca²⁺- und Phospholipid-bindender Proteinen (Gerke and Moss, 2002). Der Name „Annexin“ leitet sich aus dem Griechischen *annex* ab und bedeutet soviel wie „zusammenbringen/halten“. Per Definition hat ein Annexin zwei Kriterien zu erfüllen: es muß zum einen in Ca²⁺-abhängiger Weise an Lipide binden können und zum anderen muß es eine konservierte Struktur von ca. 70 Aminosäuren aufweisen, das sogenannte Annexin-repeat. Vor der Festlegung einer einheitlichen Nomenklatur wurden verschiedene Mitglieder der Familie aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionen auch als Synexine, Chromobindine, Lipocortine und Calpactine bezeichnet (Raynal and Pollard, 1994). Annexine konnten in unterschiedlichen Organismen wie Vertebraten, Invertebraten, Pflanzen, Pilzen und Protisten nachgewiesen werden. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind 13 Annexine in Vertebraten identifiziert worden.

2.1 Molekulare Struktur und Eigenschaften

Alle Annexine weisen eine ähnliche, charakteristische Molekülstruktur auf, die zur Definition der Familie beiträgt. Sie bestehen aus zwei Bereichen, einer N-terminalen hochvariablen Domäne und aus einer konservierten C-terminalen Domäne auch Annexin-Core genannt, in der sich die Ca²⁺- und die Phospholipidbindungsstellen befinden. Der Annexin-Core besteht aus vier hintereinander angeordneten homologen Segmenten, den sogenannten „Annexin repeats“ (Ausnahme Annexin 6: 8 Segmente), die jeweils 70-80 Aminosäuren umfassen. Untereinander zeigen die Segmente eine Homologie von 25-35 % (Haigler et al., 1989), während innerhalb der Familie die Sequenz bis zu 45-55 % konserviert ist (Smith and Moss, 1994; Morgan and Fernandez, 1995). Jeder Repeat enthält

außerdem einen Bereich von 17 Aminosäuren (Endonexin-Fold), der besonders konserviert ist (Geisow et al., 1986).

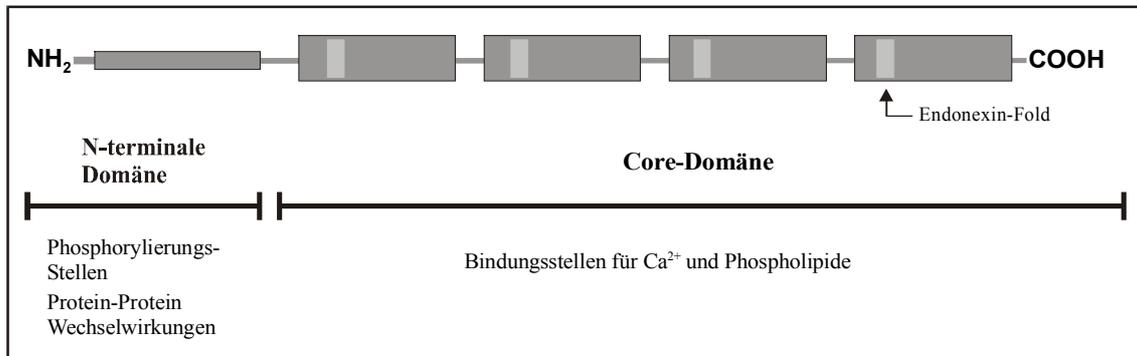


Abb. 2: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Annexinmoleküls. Ein Annexin setzt sich aus einer hochvariablen N-terminalen Domäne und einer innerhalb der Familie konservierten C-terminalen Core-Domäne zusammen. Die Core-Domäne besteht aus vier sogenannten Annexin-Repeats, die eine hohe intra- und inter-molekulare Sequenzhomologie aufweisen. Einen besonders stark konservierten Bereich innerhalb jedes Repeats stellt eine als Endonexin-Fold bezeichnete Region dar. Die Core-Domäne des Moleküls vermittelt die für Annexine typische Ca²⁺-abhängige Phospholipidbindung. Die N-terminale Domäne ist Angriffsort für verschiedene posttranslationale Modifikationen und vermittelt die Bindung an unterschiedliche zelluläre Interaktionspartner der Annexine (aus König 2000).

Als erstes Mitglied der Annexin-Familie wurde Annexin 5 in seiner dreidimensionalen Struktur charakterisiert (Huber et al., 1990; Huber et al., 1992). Mittlerweile sind auch Kristallstrukturen von Annexin 3 (Favier-Perron et al., 1996), Annexin 6 (Benz et al., 1996), Annexin 12 (Luecke et al., 1995) Annexin 1 (Weng et al., 1993; Rosengarth et al., 2001) und Annexin 2 (Burger et al., 1996; Tran et al., 2002) bekannt, sowie die eines N-terminal verkürzten Annexin 7 (Liemann et al., 1997). Im gefalteten Protein wird jedes der vier Repeats durch eine Subdomäne (I-IV) repräsentiert. Jede Domäne besteht aus fünf α -Helices (A-E), die sich zu einer rechtsgängigen Superhelix anordnen und über kurze Schleifen miteinander verbunden sind. In ihrer Tertiärstruktur bilden die vier Segmente einen leicht gewölbten Diskus aus, der in der Mitte eine hydrophile Pore einschließt. Auf der konvexen Seite befinden sich dabei die Calciumbindungsstellen. Zwei verschiedene Typen von Bindungsstellen konnten in Annexin-Kristallen identifiziert werden. Sie wurden als Typ II (Huber et al., 1992) und Typ III (Weng et al., 1993) bezeichnet, um sie von den EF-Hand-Calciumbindungsstellen (Typ I) zu unterscheiden, die zuerst in Parvalbumin beschrieben wurden (Moews and Kretsinger, 1975). In der Typ II-Bindungsstelle ist das Calciumion hepta-koordiniert von drei Carbonyl-Sauerstoff-Atomen der Peptidbindung in der Schleife zwischen Helix A und B und zwei Carboxyl-

Sauerstoffatomen eines Aspartat- oder Glutamatrestes (Kappenstruktur) in der Schleife die Helix D und E verbindet. In den Typ III-Calciumbindungsstellen werden nur drei der möglichen sieben Koordinationsstellen zum Protein ausgebildet. Zwei Carbonylsauerstoffatome aus der Schleife zwischen Helix D und E und eine Carboxylgruppe einer nahegelegenen sauren Aminosäure aus Helix E übernehmen die Komplexierung. Zur weiteren Koordination werden Solventmoleküle eingestetzt. Im Annexin 2 befinden sich drei Typ II-Bindungsstellen in den Repeats 2, 3 und 4 und zwei Typ III-Bindungsstellen im ersten Repeat. Im Vergleich zum Typ II besitzt die Typ III-Bindungsstelle eine deutlich niedrigere Ca^{2+} -Affinität und ist wahrscheinlich im intrazellulären Milieu nie belegt (Jost et al., 1994).

Die Ca^{2+} -abhängige Bindung an Membranen ist ein Charakteristikum der Annexin-Familie, welche oft von der Fähigkeit der Vesikelaggregation begleitet wird. Jedoch variieren die zur halbmaximalen Membranbindung und Vesikelaggregation benötigten Calciumkonzentrationen innerhalb der Familie. Für Annexin 1 und Annexin 2 liegen sie im submikromolaren Bereich, während sie für Annexin 5 10-100 μM betragen (Raynal and Pollard, 1994).

Auf der konkaven Seite des gefalteten Moleküls befindet sich wahrscheinlich die N-terminale Domäne (auch als Kopf oder Schwanz bezeichnet), durch die die spezifischen Eigenschaften der verschiedenen Annexine vermittelt werden. In der Sequenz und in der Länge (von 11 (Anx 3) bis zu über 100 Aminosäurereste (Anx 7 und Anx 11)) ist die N-terminale Domäne innerhalb der Annexin-Familie hochvariable. Sie ist empfindlich gegenüber proteolytischem Abbau und enthält Bereiche für posttranslationale Modifikationen, die vermutlich eine regulatorische Rolle spielen. Außerdem befinden sich dort Bindungsstellen für spezifische Interaktionspartner.

Es sind verschiedene Proteinliganden identifiziert worden, die jeweils spezifisch nur ein bestimmtes Annexin binden. Dazu gehören auch EF-Hand-Proteine aus der S100-Familie (Kawasaki et al., 1998). Drei dieser nur ca. 10 kDa großen Proteine (S100A6, S100A10, S100A11) bilden einen Komplex mit Annexinen (Anx 11, Anx 2, Anx 1). Der bestcharakterisierte ist der heterotetramere Annexin 2₂/S100A10₂-Komplex, in dem ein S100A10-Dimer zwei Annexin 2-Moleküle miteinander verknüpft. Interessanterweise ist das S100A10-Protein durch Mutationen in der EF-Hand jedoch nicht mehr in der Lage, Calcium zu binden (Gerke and Weber, 1985), sondern ist konformativ vermutlich im aktiven Zustand fixiert (Johnsson and Weber, 1990). Die S100A10-Bindungsstelle umfaßt die Aminosäuren 1-14 der N-terminalen Domäne. Annexin 1 bildet ebenso wie sein

nächster Verwandter Annexin 2 einen Komplex mit einem S100-Protein, in diesem Fall dem S100A11. Die genaue Zusammensetzung dieses Komplexes ist jedoch noch nicht bekannt.

Durch das Vorhandensein von Phosphorylierungsstellen wird die regulatorische Bedeutung der N-terminalen Domänen weiter gestärkt. So wurden Annexin 1 und Annexin 2 zunächst als zelluläre Substrate der EGF-Rezeptortyrosinkinase (Fava and Cohen, 1984; Pepinsky and Sinclair, 1986) bzw. der Tyrosinkinase des Rous-Sarcoma-Virus (pp60^{v-src}) (Erikson and Erikson, 1980; Radke et al., 1980; Gerke and Weber, 1984) isoliert. Annexin 1 wird an Position Tyr20 phosphoryliert, während Annexin 2 an Position Tyr23 phosphoryliert wird. Desweiteren konnten auch Modifikationen durch die Proteinkinase C nachgewiesen werden. Annexin 2 wird an Position Ser 11 und Ser25 phosphoryliert (Johnsson et al., 1986; Jost and Gerke, 1996), während im Annexin 1 Serin- und Threoninreste in Position Thr24, Ser27 und Ser28 modifiziert werden können (Schlaepfer and Haigler, 1988; Varticovski et al., 1988).

Für Annexin 2 konnte gezeigt werden, daß durch die Phosphorylierungen die Eigenschaften des Monomers und des Komplexes verändert werden. Die Phosphorylierung am Tyr23 erniedrigt die Affinität des Proteins bei der Bindung an Phospholipiden (Hubaishy et al., 1995) und eine höhere Calciumkonzentration ist für die Vesikelaggregation des Komplexes notwendig (Powell and Glenney, 1987; Johnstone et al., 1992). Die Modifikation an Ser25 hat keinen Effekt auf die Lipidbindung, aber sie ist essentiell für die Beteiligung des Komplexes an der Ca²⁺-regulierte Exozytose in Chromaffinzellen (Sarafian et al., 1991). Die Komplexbildung selbst kann durch die Phosphorylierung an Ser11 reguliert werden. An Position Ser11 phosphoryliertes Annexin 2 ist nicht mehr in der Lage, S100A10 zu binden (Jost and Gerke, 1996). Die Modifikation Ser11 kann aber auch durch eine Calmodulin- oder cAMP-abhängige Kinase erfolgen (Johnsson et al., 1986). Darüberhinaus sind Annexin 1 und Annexin 2 *in vivo* und *in vitro* Substrate der Insulinrezeptorkinase (Karasik et al., 1988). Für Annexin 2 konnte eine direkte Phosphorylierung durch die Insulinrezeptorkinase nachgewiesen werden, und eine Beteiligung bei der Internalisierung und der Sortierung des Rezeptors wird vermutet (Biener et al., 1996).

Kürzlich konnten auch im Annexin 7 und Annexin 11 phosphorylierte Tyrosinreste nach Stimulation von vaskulären Glattenmuskelzellen mit PDGF nachgewiesen werden. Desweiteren sind eine Transglutaminase-Verknüpfung zweier Annexin 1-Proteine (Pepinsky and Sinclair, 1986; Ando et al., 1991) und der inhibitorische Einfluß der

Sylfhydrylierung durch NEM auf die Vesikelaggregation durch den Annexin 2₂/S100A10₂-Komplexes beschrieben worden (Singh and Liu, 2000).

Weitere Modifikationen können eine Acetylierung beinhalten, wie sie in Annexin 1 und Annexin 2 vorkommen. Dabei ist die Acetylierung des Annexin 2 entscheidend für die Affinität und Bildung des heterotetrameren Komplexes mit S100A10 (Johnsson et al., 1988; Becker et al., 1990). In Studien mit synthetischen Peptiden konnte nur ein acetyliertes Peptid der N-terminalen Annexin 2-Sequenz eine Dissoziation des Komplexes herbeiführen, indem es vermutlich mit dem endogenen Annexin 2 um die Bindungsstellen kompetiert (König et al., 1998)). Annexin 13a und die N-terminale Splice-Variante Annexin 13b sind die einzigen Annexine, bei denen eine Myristoylierung in der N-terminalen Domäne nachgewiesen wurde. Durch sie kann eine Ca²⁺-unabhängige Membranassoziation vermittelt werden (Wice and Gordon, 1992; Fiedler et al., 1995; Lafont et al., 1998).

Neben S100-Proteinen sind noch andere Bindungspartner bekannt. Annexin 1, Annexin 2 und Annexin 6 binden Ca²⁺-reguliert an F-Aktin und sind in der Lage Aktinfilamente zu bündeln (Gerke and Weber, 1984; Glenney et al., 1987; Jones et al., 1992). Diese Eigenschaft wurde am besten beim Annexin 2 untersucht. Die Aktin-Bündelungsstelle befindet sich dort im dritten Segment und umfaßt eine neun Aminosäure lange Sequenz (Jones et al., 1992). Es konnte aber ebenso ein Einfluß der C-terminalen neun Aminosäuren des Annexin 2 auf die Bindung des Komplexes an Aktin nachgewiesen werden (Filipenko and Waisman, 2001). Schon bei mikromolaren Calciumkonzentrationen ist der Komplexes in der Lage, Aktin zu bündeln. Diese Eigenschaft wird durch Phosphorylierung des Tyr23 durch pp60^{src}-Kinase negativ reguliert (Hubaishy et al., 1995). Als weitere mögliche Funktion der Annexine wird die Beteiligung an anti-inflammatorischen Prozessen für Annexin 1 (Perretti, 1997; Pitzalis et al., 2002) sowie die Regulation von Ionenkanälen für Annexin 2, Annexin 4 und Annexin 6 diskutiert (Diaz-Munoz et al., 1990; Kaetzel et al., 1994; Nilius et al., 1996).

2.2 Annexine im Membrantransport und Organisation

Annexine sind wahrscheinlich an der Membranorganisation und der Regulation des Membrantransports zwischen intrazellulären Kompartimenten beteiligt. Durch ihre Struktur sind sie in der Lage, Membranen miteinander oder auch Membranen mit dem darunterliegenden Zytoskelett zu verknüpfen. Imweiteren wird nur auf einige Annexine näher eingegangen, für die es zahlreiche Hinweise für eine Beteiligung an derartigen Prozessen gibt.

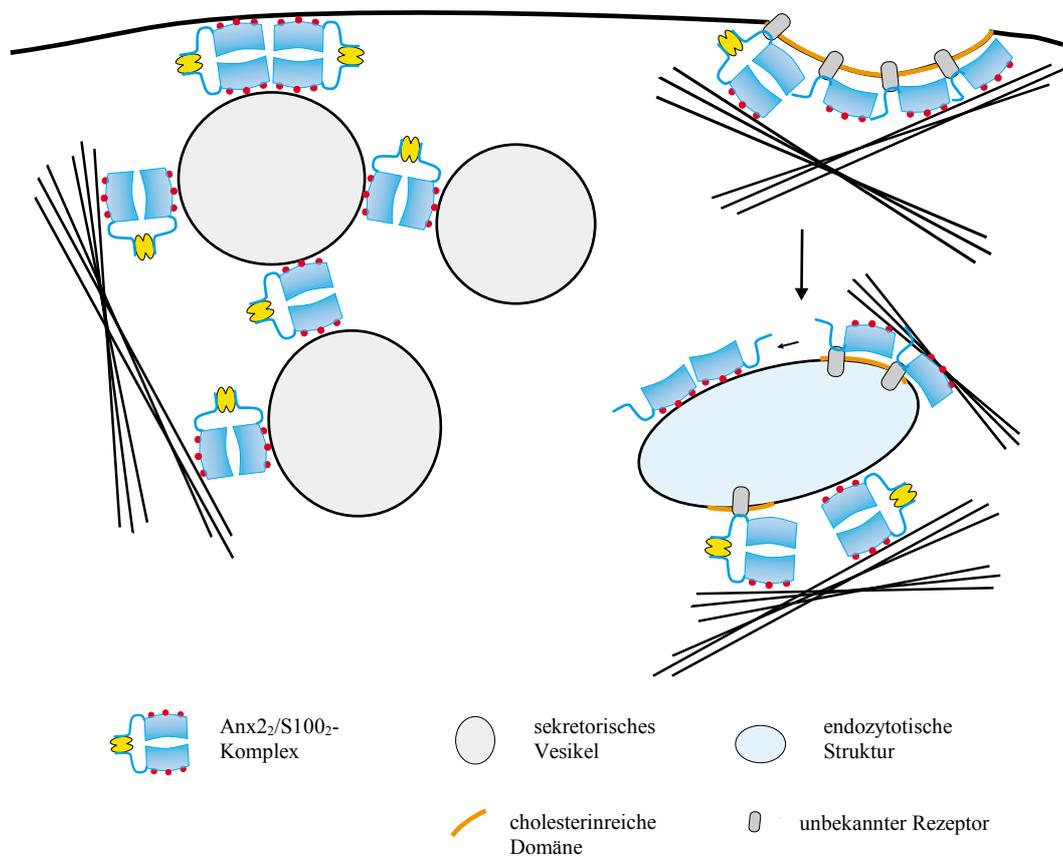


Abb. 3: Modell möglicher Funktionen des monomeren Annexin 2 bzw. des Annexin 2/S100A10-Komplexes im vesikulären Membrantransport. Der Komplex kann Ca^{2+} -abhängig an Membranen und das Aktinzytoskelett binden. Monomeres Annexin 2 bindet ebenfalls Ca^{2+} -abhängig an Membranen und Aktin. Darüber hinaus ist Annexin 2 in der Lage über die N-terminale Domäne mit cholesterinreichen Membrandomänen zu assoziieren. (aus König 2000).

Annexin 1 und Annexin 2 können auch bei submikromolaren Calciumkonzentrationen *in vitro* mit Membranen assoziieren. Daneben gibt es auch zahlreiche Daten, daß zumindest im Falle des Annexin 2 und Annexin 13 eine Ca^{2+} -unabhängige Bindung an Membranen existiert (Fiedler et al., 1995; Jost et al., 1997).

Gebundenes Annexin 1 konnte an der Plasmamembran und auf endosomalen und phagozytotischen Membranen detektiert werden (Seemann et al., 1996; Diakonova et al., 1997; Rescher et al., 2000). Nach EGF-Stimulierung wird Annexin 1 in den MVBs (multi vesicular bodies) vom EGF-Rezeptor phosphoryliert (Futter et al., 1993) und ist damit vermutlich bei der Sortierung des Rezeptors beteiligt. Für die spezifische endosomale Lokalisation des Annexin 1 sind dabei intakte Calciumbindungsstellen notwendig (Rescher et al., 2000).

Eine ähnliche zelluläre Verteilung ergibt sich für Annexin 2. Es ist ebenfalls an der Plasmamembran und auf endosomalen Strukturen lokalisiert (Emans et al., 1993; Harder and Gerke, 1993; Jost et al., 1997). Es gibt zahlreiche Hinweise, daß Annexin 2 an endozytotischen Prozessen beteiligt ist. In einem homotypischen Fusionsassay früher Endosomen gehört Annexin 2 zu den wenigen Proteinen, die von einer Donor- zu der Akzeptormembran transferiert werden (Emans et al., 1993). Anti-Annexin 2-Antikörper inhibierten die Ca^{2+} -abhängige Endosomenfusion (Mayorga et al., 1994). In MDCK-Zellen führt die Expression einer trans-dominanten Annexin 2-Mutante (XM-Mutante), die eine Aggregation von endogenem Annexin 2 und S100A10 bewirkt, zu einer Umverteilung frühen Endosomen zu den Aggregaten hin (Harder and Gerke, 1993). Interessanterweise ist jedoch die Bindung an Endosomen Ca^{2+} -unabhängig und wird vermutlich über die Aminosäuren 15-24 in der N-terminalen Domäne vermittelt (Jost et al., 1997; König and Gerke, 2000). Letzteres läßt die Vermutung zu, daß es einen Rezeptor (Protein oder Lipid) auf den Endosomen geben könnte, der mit Annexin 2 interagiert. In CCV-Präparationen interagiert Annexin 2 mit einem noch nicht identifizierten 200 kDa Protein (Turpin et al., 1998), während ein 97 kDa großes Protein identifiziert wurde, das an die N-terminale Domäne bindet (König, 2000). Annexin 2 assoziiert mit cholesterinreichen Membrandomänen (Harder et al., 1997; König and Gerke, 2000; Zeuschner et al., 2001) und wurde auch in Caveolae nachgewiesen (Schnitzer et al., 1995). In diesen Membranstrukturen ist Annexin 2 Cholesterin-abhängig mit dem Hyaluronrezeptor CD44 assoziiert. Die Konzentrierung des Transmembranproteins CD44 in bestimmten Arealen der Plasmamembran mittels Antikörper führt auch zu einer Rekrutierung von Annexin 2 in die gleichen Strukturen. Hinzu kommt, daß Aktin ebenfalls verstärkt in diesen Strukturen zu detektieren ist (Oliferenko et al., 1999).

Annexin 2 ist nicht gleichmäßig über das endosomale Kompartiment verteilt, sondern konnte auf tubulären, endosomalen Strukturen nachgewiesen werden (Harder and Gerke, 1993; Harder et al., 1997; Zeuschner et al., 2001). In verschiedenen Ansätzen wurde

Annexin 2 nach Isolierung bestimmter Membranfraktionen mit dem Transferrinrezeptor, rab4 und rab11 copräzipitiert, jedoch nicht mit EEA-1 oder rab5-positiven Strukturen (Trischler et al., 1999; Zeuschner et al., 2001). Entscheidend für die Membranbindung ist zudem der Anteil an Cholesterin. Dabei wird vermutlich durch das Cholesterin die Bindung des Cores an die Membran verstärkt (Ayala-Sanmartin, 2001). Annexin 2 kann Ca^{2+} -abhängig und in Anwesenheit von Cholesterin auch Ca^{2+} -unabhängig an Recyclingendosomen binden (Zeuschner et al., 2001). Mit Hilfe von Cholesterin-lösenden bzw. sequestrierenden Agenzien kann der Ca^{2+} -unabhängig gebundene Anteil des Annexin 2 zusammen mit anderen Proteinen des kortikalen Zytoskelettes aus der Membran herausgelöst werden (Harder et al., 1997). Hierin zeigt sich noch einmal die Eigenschaft des Annexin 2, möglicherweise gleichzeitig an Membranen und das Zytoskelett zu binden. An makropinozytotischen Vesikeln, die sich mit Hilfe von Aktin in der Zelle bewegen, konnte Annexin 2 an der Spitze des Aktinschweifes unterhalb des Vesikel lokalisiert werden (Merrifield et al., 2001).

Annexin 6 ist das einzige Protein in der Familie, das aus acht Repeats besteht. Es ist an der Plasmamembran und im speziellen auch an Rafts, sowie Clathrin-umhüllten Vesikeln lokalisiert (Lin et al., 1992; Turpin et al., 1998). Eine mögliche Beteiligung des Annexin 6 bei der LDL-Aufnahme bzw. beim endosomalen LDL-Transport (Kamal et al., 1998; Grewal et al., 2000), sowie der Einfluß von Cholesterin auf die intrazelluläre Verteilung und die Membranbindung des Annexin 6 konnten in Zellkulturmodellen gezeigt werden (de Diego et al., 2002).

Annexin 13 wurde als Komponente apikaler Transportvesikel von polarisierten MDCK-Zellen isoliert. Die Membranassoziation erfolgt Ca^{2+} -unabhängig. Der Myristoylrest ist hierfür von essentieller Bedeutung und verankert das Protein in cholesterinreichen Membrandomänen, die von TGN stammen. Annexin 13 ist direkt am apikalen Transport vom TGN zur Plasmamembran beteiligt. Experimente mit Anti-Annexin 13-Antikörpern zeigten eine inhibitorische Wirkung, während die Überexpression von Annexin 13-Mutanten stimulierend auf die Abschürung von Vesikeln wirkte (Lafont et al., 1998).

3 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Beteiligung des Annexin 2 an der Organisation bestimmter Domänen an der Plasmamembran bzw. des endosomalen Kompartiments untersucht werden. Es war geplant, mit Stimulanzien, ektopisch exprimierten Proteinen oder nicht-invasiven *E-coli* Prozesse auszulösen, die eine lokale Umorganisation des Aktinzytoskelettes bewirken. Anschließend sollte die Funktion des Annexin 2 bei diesen Prozessen ermittelt werden.

Es gibt zahlreiche Hinweise, daß Annexin 2 auch an der Endozytose beteiligt ist. In einem *in vitro* Ansatz sollte deshalb der Einfluß des Annexin 2 auf die Fusion früher Endosomen untersucht werden. Mit Hilfe von verschiedenen Peptiden sollte hier der Einfluß der N-terminalen Domäne näher charakterisiert werden. Schließlich sollten fluoreszierende Fusionsproteine generiert und zur Lokalisation des Annexin 2 im endosomalen Kompartiment lebender Zellen nachgewiesen werden. Neben dem Gesamtprotein sollten in diesen Experimenten auch GFP fusionierte Annexin 2-Mutantenproteine eingesetzt und bezüglich ihres Einflusses auf die Endozytose untersucht werden. Durch Einsatz kurzer doppelsträngiger RNA-Oligonukleotide (small interfering RNAs; (Elbashir et al., 2001)) sollten darüber hinaus der zelluläre Gehalt an Annexin 2 verringert werden, und die Auswirkungen dieser Manipulation auf die Endozytose ermittelt werden.

II Material und Methoden

1 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden, die in der Arbeit angewendet wurden, waren in der Arbeitsgruppe etabliert und folgten Protokollen aus „Molecular Cloning“ und „Current Protocols“ (Sambrook J., 1989; Ausubel F.M., 1995).

1.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte in LB-Flüssigmedium, dem gegebenenfalls Antibiotika zugesetzt wurden (Sambrook J., 1989).

LB-Medium: 1 % Trypton
 0,5 % Hefe Extrakt
 0,5 % NaCl
 ad 1 l dest. Wasser

Zur Herstellung von Selektionsnährböden wurde dem Medium jeweils 1,5 % (w/v) Bacto-Agar zugesetzt. Die Zugabe von Antibiotika fand nach Abkühlung des Mediums unter 50 °C statt.

Zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterien wurden Glycerin-Kulturen mit 15 % Glycerin angelegt und bei -80 °C gelagert.

1.2 Transformation von *E. coli*

1.2.1 Herstellung elektrokompenter *E. coli*

Um DNA in *E. coli* einzubringen, müssen die Bakterienzellen für das verwendete Transformationsverfahren speziell vorbereitet werden. Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli*, d. h. von Bakterien, die durch Elektroporation transformiert werden können, wurden 5 – 8 ml einer über Nacht in 100 ml LB (1 % Trypton; 1 % NaCl; 0,5 % Hefe Extrakt; pH 7,0) gewachsenen Kultur benutzt, um 500 ml LB anzupflanzen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,5 (nach 3 - 4 h) wurden die Zellen für 10 min auf Eis abgekühlt und

anschließend bei 2800 g (4 °C, 20 min) pelletiert. Das Zellpellet wurde auf Eis in 10 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und auf 400 ml mit Wasser aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen erneut pelletiert (3100 g, 4 °C, 20 min) und der Waschschrift nochmals wiederholt. Das so gewaschene Zellpellet wurde in 30 ml eiskaltem, 10 %igem Glycerin resuspendiert und bei 2600 g (4 °C, 15 min) abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in einem dem Pellet entsprechenden Volumen 10 %igem, eiskaltem Glycerin aufgenommen und in 50 µl Aliquots auf Ethanol/Trockeneis eingefroren. Die Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

1.2.2 Transformation durch Elektroporation

Die Elektroporation ist ein sehr effektives Transformationsverfahren für *E. coli*. Hierzu wurden 50 µl elektrokompente *E. coli* mit maximal 10 ng DNA (Plasmid-DNA oder Ligationsansatz) in einer speziellen Elektroporationsküvette (1 mm Spaltbreite) auf Eis vermischt. Anschließend wurde die Küvette in einem Elektroporator (Gene Pulser II, Biorad, Deutschland) mit 100 Ω, 1.800 V und 50 µF behandelt. Die Zellen wurden sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen und 30 - 60 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Selektionsnährböden ausplattiert.

1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Eine Abschätzung der DNA-Konzentrationen erfolgte durch Vergleich mit dem eingesetzten Molekulargewichtstandard, während eine genauere Konzentrationsbestimmung durch Messen der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm erfolgte.

1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Trennung, Reinigung und Identifizierung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 0,1 bis 25 kb genutzt (Sambrook J., 1989).

Zur Analyse und Präparation von DNA-Molekülen wurden Flachbettgele mit 1% (w/v) Agarose in TAE-Puffer hergestellt. Dazu wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer gelöst und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 60 - 120V in 1x TAE. Anschließend wurde die DNA auf einem Transilluminator im UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302 nm sichtbar gemacht, und die Banden mit Hilfe einer CCD-Kamera dokumentiert.

1.5 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Durch präparative Agarose-Gelelektrophorese wurden Vektoren und DNA-Fragmente von noch vorhandenen, unerwünschten Restriktionsfragmenten getrennt. Nach Auftrennung der DNA im Agarose-Gel wurden die benötigten DNA-Banden im UV-Licht bei 302 nm ausgeschnitten und anschließend mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) aus dem Gel eluiert (QIAquick Spin Handbook, Juli 1997). Dazu wird das jeweils ausgeschnittene Gelstück in Puffer durch Erwärmen aufgelöst. Danach wird die Pufferlösung mit Isopropanol versetzt und über ein Silika-Säulchen gegeben. Die DNA bindet an das Silika-Gel und kann nach mehrmaligem Waschen von der Säule mit Wasser oder 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 eluiert werden. Der Erfolg der Isolierung wurde im Agarose-Gel überprüft.

1.6 Isopropanol-Fällung der DNA

Plasmid-DNA wurde in einem größeren Volumen dest. Wasser verdünnt, 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,5 hinzugegeben und mit 0,7-fachen Volumen Isopropanol versetzt. Nach Zentrifugation in der Tischzentrifuge (16.000g, 15 min, 4 °C) wird der Überstand abgenommen und das Pellet mit 70 %igem, kaltem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (16.000g, 15 min, 4 °C). Das Pellet wurde getrocknet und in dest. Wasser aufgenommen.

1.7 Klonierungsmethoden

1.7.1 Restriktionsverdau

Die Spaltung von DNA zur Vorbereitung für die Klonierung und zur Analyse von Vektoren erfolgte mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II unter den vom Vertreiber angegebenen Bedingungen. Der Erfolg der Verdaureaktion wurde durch analytische Agarose-Gelelektrophorese (s. 1.4) überprüft. Die Enzyme wurden nach beendeter Reaktion hitzeinaktiviert und mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese entfernt.

1.7.2 Ligation

Mittels PCR und Restriktionsverdau hergestellte DNA-Fragmente wurden in einer Ligase-Reaktion kovalent mit dem entsprechend geschnittenen Vektor verknüpft. Die Reaktion wurde in Gegenwart von 2 U T4-DNA-Ligase in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer

in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Es wurden 600 ng Vektor pro Reaktion und eine dreifach molare Menge des jeweiligen Inserts eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei 16 °C über Nacht oder bei RT für 2 Stunden. 1 µl des Reaktionsansatzes wurde direkt zur Elektroporation (s. 1.2.2) von *E. coli* eingesetzt oder die enthaltende DNA mit Phenol/Chloroform (s. 1.7.3) extrahiert und anschließend ebenfalls 1 µl zur Elektroporation eingesetzt.

1.7.3 Phenol/Chloroform-Extraktion

Gelöste DNA kann z. B. im Ligationsansatz, durch Phenol/Chloroform-Extraktion von Enzymen und Proteinverunreinigungen getrennt werden. Hierzu wurde ein Volumenteil eines 1:1 Gemisches aus Phenol (Tris-gesättigt; pH 7,5) und Chloroform zur DNA-Lösung gegeben, gut gemischt und kurz bei RT in der Tischzentrifuge zur Phasentrennung zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumenteil Chloroform/Isoamylalkohol (1:24), wie oben beschrieben, extrahiert. Anschließend wurde die wäßrige Phase durch Zugabe von 0,1 Volumenteil 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2 Volumenteilen Ethanol auf Eis gefällt. Nach Pelletierung in der Tischzentrifuge (16000 g, 4 °C, 30 min) und anschließendem Waschen in eiskaltem, 70 %igen Ethanol wurde die Probe getrocknet und in Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR: Polymerase chain reaction (Saiki et al., 1988) dient der Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente. Über synthetische Oligonukleotidprimer wurden zusätzlich Restriktionsschnittstellen eingeführt, welche die weitere Klonierung der amplifizierten Fragmente erleichtern. Im Reaktionspuffer befanden sich 10 - 50 ng Vektor (als Templat), 0,8 µM Sense- und Antisense-Primer und 200 µM dNTP-Mix (enthält alle dNTPs zu gleichen Teilen) in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 min bei 95 °C inkubiert. Dann wurden 2,5 U Pfu-Polymerase zugegeben. Es schlossen sich 25 Zyklen (1 min, 94 °C; 1 min, 52 °C; 3 min, 72 °C) an, gefolgt von 10 min bei 72 °C. Die PCR-Reaktionsprodukte wurden mittels QIAquick Kit (Qiagen, Deutschland) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt.

1.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

1.9.1 Analytische Plasmidisolierung

E. coli-Bakterien wurden nach der Transformation auf Antibiotikum-haltigen Agarplatten ausgestrichen, um die Klone zu vereinzeln und auf Antibiotikaresistenz zu selektieren. Zur Isolierung und Analyse der transformierten Plasmide wurden je 3 ml Antibiotikum enthaltendes LB-Medium mit je einer Bakterienkolonie angeimpft und der Klon über Nacht angezogen. Das Bakterienpellet aus 1,5 ml Kultur wurde in 300 µl Puffer P1 (50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/ml Rnase A; pH 8,0; RT) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS, RT) wurde 5 min bei RT inkubiert, anschließend wurde 300 µl Puffer P3 (3 M KAc; pH 5,5; 4 °C) dazu gegeben und 15 min bei 16.000g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 630 µl Isopropanol versetzt. Nach 15 min Zentrifugation bei 16.000g wird das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut bei 16.000g für 10 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird kurz getrocknet und anschließend in 30 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 aufgenommen.

1.9.2 Präparative Plasmidisolierung

Zur Gewinnung von größeren Mengen Plasmid-DNA wurde das „JETstar Plasmid Maxi Kit“ (Genomed, Bad Oeynhausen, Deutschland) verwendet. Aus 100 ml einer Übernachtskultur wurde die Plasmid-DNA isoliert. Hierzu wurden die Bakterien mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen und die DNA anschließend über eine Anionenaustauschersäule nach Angaben des Herstellers („JETstar Protocol“) gereinigt.

1.10 Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung der generierten Konstrukte wurde von der Firma SEQLAB (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die Überprüfung der Sequenzen auf ihre Richtigkeit erfolgte mit der in Datenbanken hinterlegten Sequenzen mittels „Blast Search“ über den NCBI-Server.

1.11 Klonierung der Expressionsvektoren

Zur Expression von chimären Proteinen in Säugerzellen wurden verschiedene Expressionsvektoren hergestellt.

1.11.1 Generierung des YFP-S100A10 Fusionsproteins

Der Vektor pEYFP-C1 (BD Clontech, Deutschland) ermöglicht die Konstruktion von Fusionsproteinen mit einer gelb-fluoreszierenden Variante (Absorption 514 nm) des GFP-Protein aus *Aequorea victoria*. Dabei befindet sich das fluoreszierende Protein N-terminal im Fusionsprotein.

Die für humanes S100A10-kodierende Sequenz lag bereits in einen Vektor vor. Dieser Vektor und der Vektor pEYFP-C1 wurden in einem Restriktionsverdau (s. 1.7.1) mittels XhoI geschnitten und die Fragmente in einer präparativen Gelelektrophorese (s. 1.4) isoliert. Anschließend wurden die entsprechenden Fragmente miteinander ligiert (s. 1.7.2).

1.11.2 Generierung des pECFPmod-N1 Vektors

Aus dem Vektor pEGFP-N3 (BD Clontech) wurde mittels BamHI und NotI der für EGFP kodierende Bereich herausgeschnitten. Aus dem Vektor pEGFR-ECFP wurde die Sequenz für ECFP (blau (cyan) fluoreszierende (436 nm) Variante des GFP-Protein) mit Hilfe der gleichen Restriktionsenzyme herausgeschnitten. In einer präparativen Gelelektrophorese wurden die gewünschten Fragmente isoliert und aufgereinigt. Anschließend wurde die für ECFP-kodierende Sequenz mit dem geschnittenen pEGFP-N3-Vektor ligiert, wodurch der neue Vektor pECFPmod-N1 entstand. Dieser Vektor ermöglichte es, Fusionsproteine zu generieren, die C-terminal das blau-fluoreszierende Protein (CFP) besitzen.

1.11.3 Generierung des Anx2-CFP Fusion Proteins

Mittels PCR (s. 1.8) wurde in die Sequenz des humanen Annexin 2 Restriktionsschnittstellen für EcoRI am 5'Ende und SalI am 3'Ende eingefügt. Gleichzeitig wurde dabei das Stopcodon entfernt, um eine Expression des Fusionsproteins zu ermöglichen.

Das aufgereinigte PCR-Produkt und der Vektor pECFPmod-N1 wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SalI verdaut und die entsprechenden Fragmente in einer präparativen Gelelektrophorese isoliert und aufgereinigt. Anschließend wurden das Annexin 2-Fragment und der geschnittene Vektor ligiert.

Der Erfolg der Klonierung wurde durch Expression der Fusionsproteine in Säugerzellen sowie durch Sequenzierung (s. 1.10) der Konstrukte überprüft.

2 Proteinchemische Methoden

2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Hierzu wurden 500 µl verdünnte Proteinprobe mit 500 µl Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Perbio Science, Bonn, Deutschland) versetzt. Nach 5 - 15 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion der Lösung bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde durch Vergleich mit einer Eichgeraden, die im Bereich von 0 - 16 µg Protein mit BSA erstellt wurde, ermittelt.

2.2 Konzentrationsbestimmung von Peptiden

Die Konzentrationsbestimmung von Peptiden erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 205 nm für die Peptide A2 Ac1-14, A2 N1-14 und bei 280 nm für das Peptid A2 PM1-27. Bei 205 nm wurde die Absorption der Peptidbindung und bei 280 nm die Adsorption des in A2 PM1-27 vorhandenen Tyrosinrestes bestimmt und zur Konzentrationsbestimmung verwendet.

$$\begin{aligned} \text{OD}_{205} &= \epsilon_{205}(\text{Peptidbindung}) \times d \times c & \epsilon_{205}(\text{Peptidbindung}) &= 31 \frac{\text{mg}}{\text{ml} \times \text{cm}} \\ \text{OD}_{280} &= \epsilon_{280}(\text{Tyrosin}) \times d \times c & \epsilon_{280}(\text{Tyrosin}) &= 1400 \frac{1}{\text{mol} \times \text{cm}} \end{aligned}$$

2.3 Proteinfällung mit TCA

Zur Aufkonzentrierung von Proteinen vor der SDS-PAGE (s. 2.4.) wurden diese gefällt und anschließend direkt in SDS-Probenpuffer (Ausubel F.M., 1995) aufgenommen.

Die wässrige Proteinprobe wurde mit einer Stammlösung von 50 % TCA in Wasser auf 7 % TCA eingestellt und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die gefällten Proteine in der Tischzentrifuge bei 16.000g für 20 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Proteinpellet wurde anschließend zur Neutralisierung der TCA mit 2 % (w/v) Natriumacetat in Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet.

2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte nach (Laemmli, 1970). Die Methode ist außerdem in "Current Protocols" (Ausubel F.M., 1995) ausführlich beschrieben. Es wurden Mini-Gele mit 12,5 % Acrylamidgehalt (Acrylamid:Bisacrylamid = 30:0,8) verwendet. Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag auf das Gel 5 min bei 95 °C zur Denaturierung erhitzt. Zur Abschätzung des Molekulargewichtes der Proteine wurden verschiedene Größenstandards mit auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 10 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel. Nach beendetem Lauf wurden die Gele entweder geblottet (s. 2.5) oder für 20 min mit Coomassie Färbelösung behandelt und anschließend mit Entfärbelösung entfärbt.

2.4.1 Probenvorbereitung

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden pelletierte Zellen direkt in 2×SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C erhitzt.

Zuweilen ist es von Vorteil, Proben zu verwenden, die keine großen Mengen DNA enthalten. Dazu wurden die Zellen von den Zellkulturschalen mittels Trypsin abgelöst, pelletiert (2 min, 900g), in einem kleinen Volumen IP-Puffer aufgenommen, homogenisiert und 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 10.000g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Überstand wurde mit 6×SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend in der Gelelektrophorese eingesetzt.

Mittels TCA gefällte Proteine (s. 2.3) wurden nach dem Trocknen in 2× SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C erhitzt.

2.5 Westernblot

Nach der Auftrennung durch SDS-PAGE können Proteine elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen und immobilisiert werden, um sie z. B. mit einem Antikörper nachzuweisen (Towbin et al., 1979). Dazu wurde das jeweilige Gel und eine nach Angaben des Herstellers vorbehandelte Membran in eine Tankblotkammer mit Transferpuffer überführt. In dieser Anordnung wurden die Proteine unter Eiskühlung entweder bei einer Spannung von 100 V für 1 h oder bei 30 V über Nacht auf die Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde nach dem Transfer entsprechend den Herstellerangaben für 30 min

bei 37 °C getrocknet und neu aktiviert. Die Überprüfung des Proteintransfers auf die Membran erfolgte durch Färbung für 5 min in Ponceau-S-Färbelösung. Anschließend wurde die Membran zunächst mit dest. Wasser und dann mit TBS-T (Waschpuffer) wieder entfärbt. Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde die Blotmembran in TBS-T/3% (w/v) BSA bzw. TBS-T/5% (w/v) Magermilchpulver für 30 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde für 30 - 60 min bei RT mit dem ersten Antikörper inkubiert gefolgt von dreimaligem Waschen in TBS-T. Die Membran wurde für 30 - 60 min bei RT mit dem Peroxidase-gekoppelten zweiten Antikörper inkubiert und anschließend erneut dreimal in TBS-T gewaschen. Die jeweiligen Antikörper wurden verdünnt in TBS-T/3% BSA eingesetzt. Die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase wurde mit der ECL™-Reaktion nach Angaben des Herstellers (Western Blotting Protocols, Amersham Life Science, Buckinghamshire, England) nachgewiesen. Die Methode der „Enhanced Chemoluminescence (ECL)“ basiert auf einem enzymatischen Substratumsatz der Peroxidase, bei dem Lichtquanten emittiert werden, die durch einen Röntgenfilm detektiert werden können.

2.6 Endosomenfusion

Die biochemische Untersuchung der Endosomeninteraktion und deren Regulation erfolgte mittels eines von Gorvel et al. (1991) beschriebenen homotypischen *in-vitro*-Fusionsassays, der sich die hohe Affinität und Komplexbildung von Avidin und Biotin zunutze macht. Avidin-markierte und mit biotinylierter Merrettichperoxidase (bHRP) markierte Endosomen wurden als fusogene Komponenten in dem Assay eingesetzt. Um die homotypische Fusion früher Endosomen (EE) zu messen, wurden zunächst zwei unterschiedlich markierte Populationen von Endosomen (bHRP und Avidin) über einen Saccharosegradienten isoliert. Unter Zugabe von Zytosol, einem ATP-generierenden System und Salzen kann eine Fusion stattfinden. Die bei der Fusion gebildeten HRP-Biotin-Avidin-Komplexe wurden mittels einer Immunpräzipitation an anti-Avidin gekoppelten Magnetpartikeln isoliert. Das Maß der Fusion wurde anhand der HRP-Aktivität bestimmt.

2.6.1 Herstellung biotinylierter HRP

500 mg HRP (Typ II, Sigma) wurden in 237,5 ml 0,1 M Natriumcarbonatpuffer, pH 9,0 gelöst. Tropfenweise unter leichtem Schütteln wurden 250 mg biotin-NHS in 6,25 ml DMF

hinzugegeben, so daß ein Verhältnis von 1:50 HRP zu Biotin entstand. Es wurde 1 h unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 12,5 ml 0,2 M Glyzin, pH 8,0 hinzugegeben und weitere 15 min inkubiert. Danach erfolgte eine Dialyse gegen PBS über Nacht und anschließend für mehrere Stunden gegen IM-Medium ohne BSA. Zur Volumenverringering wurde die Proteinlösung mit einem Ausschlußvolumen von 30 kDa ultrafiltriert.

2.6.2 Zytosolpräparation

Fünf konfluente Zellkulturplatten (500 cm²) BHK-P3 wurden auf Eis dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Gummizellschaber vom Plattenboden gelöst und in Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 130 g (4 °C; 5 min) wurden die Zellen in zwei Röhrchen vereint und vorsichtig in je 5 ml HB-Puffer aufgenommen und erneut pelletiert (130 g; 4 °C; 10 min). Der Puffer enthielt bei der Zytosolpräparation Proteaseinhibitoren (4 µg/ml Aprotinin; 0,5 µg/ml Leupeptin; 1 µg/ml Pepstatin; 0,5 µg/ml TPCK; 1 mM PMSF). Die Zellpellets wurden mit einer abgeschnittenen 1 ml Pipettenspitze vorsichtig in je 1 ml HB-Puffer resuspendiert und mit Hilfe einer 22G-Kanüle aufgeschlossen. Hierzu wurden sie 3 – 4x langsam durch die Kanüle in die Spritze aufgezogen und schnell ausgelassen. Der Aufschluß wurde nach jedem Schritt im Lichtmikroskop überprüft. Idealerweise sollten hierbei die Zellkerne intakt bleiben und möglichst viele Zellen (ca. $\frac{2}{3}$) aufgeschlossen werden. Um die Kerne und verbliebene intakte Zellen von den Zytoplasma-Bestandteilen und zellulären Membranen abzutrennen, wurde das Homogenisat bei 1.300g (20 min, 4 °C) zentrifugiert. Der entstandene Überstand (PNS = post nuclear supernatant) wurde vorsichtig mit einer abgeschnittenen 1 ml Pipettenspitze abgenommen. Die Zellpellets wurden erneut in 600 µl HB resuspendiert und zentrifugiert (1.300g, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen, mit dem vorherigen Überstand vereint und in ein Ultrazentrifugationsröhrchen (2,0 ml) überführt. Um Membranbestandteile vom Zytoplasma abzutrennen, erfolgte eine Ultrazentrifugation in einem Ausschwingrotor (TLS 55, 30 min, 260.000g, 4 °C). Der so erhaltene Überstand (Zytosol) wurde abgenommen und die Proteinkonzentration mittels Bradford (s. 2.1) bestimmt. Die Konzentration des Zytosols sollte zwischen 8 - 12 mg/ml liegen.

2.6.3 Markierung und Isolierung endozytotischer Vesikel

Je zwei konfluente Schalen (500 cm²) BHK-P3 wurden einmal mit IM-Medium gewaschen. Die Aufnahme von entweder biotinylierter Meerrettichperoxidase (Horse radish peroxidase = bHRP) (1,17 mg/ml in IM, 2 mg/ml BSA) oder Avidin (0,5 mg/ml in IM, 2 mg/ml BSA) erfolgte für 5 min im Wasserbad bei 37 °C. Um die Internalisierung zu stoppen und um unspezifisch gebundene Peroxidase oder Avidin zu entfernen, wurden die Schalen anschließend auf Eis überführt und zweimal mit IM sowie dreimal mit PBS gewaschen.

Nach der Markierung der Zellen wurden sie mit einem Gummizellschaber vom Schalenboden gelöst und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Wie unter 2.6.2 beschrieben wurde ein PNS hergestellt.

Der erhaltene Überstand (PNS) wurde vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze abgenommen und in ein Ultrazentrifugations (UZ)-Röhrchen überführt. Ein Aliquot von 30 µl PNS wurde für die Latenzbestimmung, die Proteinbestimmung und die SDS-PAGE abgenommen. Der Rest wurde mit 62 %iger Saccharose in HB-Puffer auf 40,6 % Saccharose eingestellt. Die Saccharosekonzentration wurde mit einem Refraktometer (Zeiss, Deutschland) überprüft. Das Volumen der PNS-Fraktion betrug nach der Saccharosezugabe ca. 1 - 1,5 ml. Die Fraktion wurde nacheinander überschichtet mit 1,5 ml 35 %iger Saccharose in HB, 1 ml 25 %iger Saccharose in HB und HB-Puffer (ca. 1,5 ml) bis zum Rand des UZ-Röhrchens. Es folgte die Zentrifugation des Stufengradienten im Ausschwingrotor SW60Ti bei 165.000g für 1 h 15 min bei 4 °C. Nach der Zentrifugation waren drei opaleszierende Banden an den Schichtgrenzen zu erkennen. Diese wurden im Kühlraum mit Hilfe einer Peristaltikpumpe von oben abgenommen. Die drei Fraktionen werden aufgrund der Anreicherung von organell-spezifischen Proteinen bzw. aufgrund ihres Flotationsverhaltens im Gradienten wie folgt bezeichnet: schwere Membranen (Heavy Membranes: HM) = Fraktion zwischen 40,6 % und 35 % Saccharose; frühe Endosomen (Early Endosomes: EE) = Fraktion zwischen 35 % und 25 %; späte Endosomen (Late Endosomes: LE) = Fraktion zwischen 25 % und HB-Puffer. Die quantitative Verteilung der Proteine in den isolierten Fraktionen wurde bereits beschrieben (Jost et al., 1997; Zeuschner et al., 2001). Um die Anreicherung der Peroxidase in der frühen endosomalen Fraktion zu überprüfen, wurden Volumen, Proteinkonzentration (s. 2.1) und Peroxidaseaktivität (s. 2.6.4) in den einzelnen Fraktionen gemessen.

2.6.4 Bestimmung der Peroxidaseaktivität

Zur Bestimmung der Peroxidaseaktivität wurden 100 µl wäßrige Probe mit 200 µl TMB-Substrat (ImmunoPure® TMB Substrate Kit; Perbio Science, Deutschland) gemischt. Nach 10 - 20 min Inkubation bei RT wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 700 µl 0,5 M H₂SO₄ gestoppt und die relative Peroxidase-Konzentration durch Bestimmung der Absorption bei 450 nm ermittelt.

2.6.5 Latenzmessung

Um zu überprüfen, in welchem Ausmaß die Endosomen durch den Aufschluß der Zellen (s. 2.6.3) beschädigt wurden, erfolgte eine Latenzbestimmung (Bomse et al., 1990). Hierzu wurden 10 µl PNS vorsichtig mit 800 µl HB-Puffer gemischt und die Membranen pelletiert (150.000g, 4 °C, 15 min). Anschließend wurde die Peroxidaseaktivität im Pellet und im Überstand bestimmt. Aus der Aktivität im Pellet und der Gesamtaktivität läßt sich der prozentuale Anteil der Peroxidaseaktivität im Pellet bestimmen (= Latenz). Die Latenz zeigt das Verhältnis zwischen intakten, pelletierten Endosomen und zerstörten Endosomen (Peroxidaseaktivität im Überstand) an. Idealerweise sollte die Latenz $\geq 70\%$ betragen.

2.6.6 Fusionsassay

In einem Reaktionsansatz von 200 µl-Gesamtvolumen wurden auf Eis und unter Einhaltung der angegebenen Reihenfolge 4 µl 50 x Salze, 10 µl Kaliumacetat (1 M), HB-Puffer ad 200 µl, 10 µl Biotin-Insulin (1 mg/ml), 10 µl eines ATP-generierenden bzw. ATP-depletierenden Systems, Zytosol (2,5 mg/ml Endkonzentration), je 14-20 µg Avidin-markierte Endosomen und bHRP-markierte Endosomen sowie weitere Agenzien hinzugefügt, vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Um den Einfluss unterschiedlicher Peptide oder Antikörper auf die Fusionsrate zu testen, wurden beide Endosomenpopulationen 30 min mit dem entsprechenden Agens vorinkubiert, und erst dann zu den anderen Komponenten dazugeben. Die Lösung wurde erneut vorsichtig gemischt und 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 5 min auf Eis gekühlt und 20 µl Biotin-Insulin (2 mg/ml) hinzugegeben, bevor durch Zugabe von 20 µl 20 % Triton-X-100 sämtliche Membranen permeabilisiert und noch freies Avidin durch Biotin-Insulin komplexiert wurde. Nach Inkubation von 30 min auf Eis wurde der Reaktionsansatz 10 min bei 10.000g zentrifugiert und der Überstand zu mit anti-Avidin-Antikörpern gekoppeltem Magnetpartikeln hinzugegeben und über Nacht im Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert.

50 x Salze :	0,625 M	Hepes
	50 mM	DTT
	75 mM	Magnesiumacetat
	pH 7,4	mit KOH eingestellt

ATP-generierendes System:

Gleiche Volumina folgender Lösungen wurden gemischt:

- 100 mM ATP in Aqua dest.
- 800 mM Creatinphosphat in Aqua dest.
- 4 mg/ml Creatinphosphatkinase in Glycerin

ATP-depletierendes System:

- 2 μ l Apyrase (1200 U/ml) (Sigma)
- 8 μ l HB

2.6.7 Immunopräzipitation des Biotin-Avidin-Komplexes

2.6.7.1 Kopplung der Magnetpartikel mit Anti-Avidin-Antikörpern

Für 10 Ansätze wurden 200 μ l Protein G Magnetpartikel (Beads) (Dynal) verwendet. Die Partikel wurden je zweimal in Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) und in PBS/0,05% Triton-X-100 gewaschen. 10 μ l Anti-Avidin-Antikörper in 700 μ l PBS/0,05% Triton-X-100 wurden mit den Beads für 1 h bei RT im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Magnetpartikel dreimal mit PBS/0,05% Triton-X-100 gewaschen.

2.6.7.2 Immunopräzipitation

Je 20 μ l Anti-Avidin-gekoppelte Magnetpartikel wurden mit einem Ansatz aus dem Fusionsassay über Nacht bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Partikel dreimal mit PBS/0,05 %Triton-X-100 gewaschen und in 150 μ l PBS/0,05 %Triton-X-100 aufgenommen. 100 μ l des Ansatzes wurden zur Messung der Peroxidase-Aktivität (s. 2.6.4) verwendet.

2.6.8 Zytosoldepletion

Eine Verringerung des Annexin 2-Gehaltes im Zytosol erfolgte durch Immunopräzipitation mit Anti-Annexin 2-Antikörpern (HH7). Als Negativkontrolle wurden unspezifische Maus IgGs verwendet.

Dynabeads® M-450 waren bereits mit Schaf-anti-Maus Antikörpern kovalent gekoppelt. Für fünf Fusionsansätze wurden je 300 µl Dynabeads (ca. $1,3 \cdot 10^7$ Beads) dreimal in PBS/0,1 % BSA gewaschen. In einem Endvolumen von 900 µl wurden 18 µg unspezifische Maus IgG bzw. 200 µl Anti-Annexin 2-Antikörper (HH7) mit den Magnetpartikeln für 1 h bei RT im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Partikel dreimal mit PBS/0,1 % BSA gewaschen.

Je ein Drittel der Beads wurde mit Zytosol (2 - 3 mg, ausreichend für 5 Ansätze) für 1 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Das Zytosol wurde abgenommen und der Überstand erneut mit einem weiteren Drittel der Beads für 1 h behandelt. Nach Beendigung der dritten Inkubation wurde das so depletierte Zytosol direkt in den Fusionsassay eingesetzt.

2.6.9 Affinitätsreinigung monoklonaler Antikörper

Zur Aufreinigung größerer Mengen Antikörper wurde eine Säule mit Protein G Sepharose-Matrix verwendet. Alle Arbeiten fanden bei 4 °C statt.

850 µl Säulenmaterial wurde zunächst mit 5 ml dest. Wasser gefolgt von 5 ml Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) gewaschen. Zum Äquilibrieren wurde die Sepharose mit dem doppeltem Volumen Natriumphosphatpuffer versetzt. Der Antikörper-Kulturüberstand (3 ml) wurde im gleichen Volumen Natriumphosphatpuffer verdünnt und über Nacht mit der Säulenmatrix auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die so behandelte Sepharose wurde anschließend in eine Säule (Ø: 0,3 cm) gefüllt und dreimal mit Natriumphosphatpuffer gewaschen. Die Elution der gebundenen IgG-Moleküle von der Säulenmatrix erfolgte mittels 850 µl 0,1 M Glycin (pH 2,7). Das Eluat wurde direkt mit 1 M Tris neutralisiert. Nach einem weiteren Elutionsschritt wurde die Sepharose mit Natriumphosphatpuffer dreimal gewaschen und reäquilibriert.

3 Zellbiologische Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden unverzüglich aufgetaut, in kaltes Kulturmedium überführt und zentrifugiert (130 g, 5 min, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und in einer 58 cm² Schale ausgesät.

3.1.2 Kultivierung von Zelllinien

HeLa-, BHK-P3- und CHO-Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) in Zellkulturschalen kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in wassergesättigter Atmosphäre im Brutschrank bei 37 °C und 7 % CO₂. HepG2 Zellen wurden in RPMI-Medium bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Zur Passagierung wurden die Zellen mit 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA abgelöst (trypsiniert), abzentrifugiert (130 g, 5 min, 4 °C) und neu ausgesät. BHK-P3-Zellen wurden beim Passagieren 1:30 - 1:80 verdünnt, während HeLa 1:5 - 1:10, CHO 1:5-1:10 und HepG2 1:3 - 1:4 passagiert wurden.

3.1.3 Einfrieren von Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff (-196 °C) aufbewahrt. Hierzu wurden jeweils Zellen einer 90 % konfluenten 58 cm²-Schale abgelöst und in 1 ml kaltem Einfriermedium (FCS mit 10 % DMSO) aufgenommen. Die Zellen wurden in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt und mindestens 12 h bei -70 °C eingefroren, bevor sie zur dauerhaften Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

3.2 Infektion eukaryontischer Zellen mit Bakterien

3.2.1 Kultivierung von Bakterien zur Infektion

Übernachtskulturen der verschiedene *E. coli* Mutanten wurden direkt aus Stammkulturen unter sterilen Bedingungen in Standard I-Medium angeimpft und statisch bei 37 °C inkubiert.

3.2.2 Bestimmung des Bakterientiters

Zur genauen Bestimmung des Bakterientiters wurden Verdünnungen (1:50 in PBS) mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (0,02 mm Tiefe, 0,0025 mm² Fläche des Kleinstquadrates) unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Bakterienmenge von 16 Gruppenquadraten wurde bestimmt und die Bakterienzahl pro ml nach folgender Formel berechnet (Verdünnungsfaktor: 50; Kammerfaktor: 1,25×10⁶):

$$\frac{\text{Bakterienzahl} \times 50 \times 1,25 \cdot 10^6}{16 \cdot \text{Gruppenquadrate}} = \text{Bakterien/ml}$$

3.2.3 Infektion eukaryontischer Zellen mit Bakterien

Vor Versuchsbeginn wurden Zellen auf Deckgläschen in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Mindestens 24 Stunden vor einer Infektion mit Bakterien wurden die Zellen mit entsprechenden Konstrukten transfiziert und kultiviert.

Für eine Infektion der eukaryontischen Zellen wurden Bakteriensuspensionen mit 5 x 10⁶ Bakterien/ml in Infektionsmedium aus statischen Übernachtskulturen hergestellt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, bevor sie mit 0,5 ml Bakteriensuspension entsprechend einem Bakterien : Zellen-Verhältnis von 50-100 : 1 für je eine Vertiefung einer 24-Lochplatte für 3 h bei 37 °C in 10 % CO₂-Atmosphäre infiziert wurden.

Nicht-adhärente Bakterien wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die infizierten Zellen entsprechend der verschiedenen Versuchsansätze weiterbehandelt.

Infektionsmedium: DMEM
 2 % (v/v) FCS
 1 mM Glutamin
 10 mM HEPES
 1 % (w/v) Methyl- α -D-mannose

3.3 Transfektion von eukaryontischen Zellen

3.3.1 Kalziumphosphat-Methode

Zur Transfektion von BHK-P3 mit eukaryontischen Expressionsvektoren wurde die Methode von Chen und Okayama angewendet (Chen and Okayama, 1987). 10 µg Expressionsplasmid wurden mit Isopropanol gefällt (s. 1.6), in 150 µl H₂O resuspendiert und mit 16,6 µl einer 2,5 M CaCl₂-Lösung versetzt. Zur Mischung wurden anschließend tropfenweise unter ständigem Vortexen 166 µl 2xBBS-Puffer zugegeben. Dabei bilden sich Präzipitate aus Kalziumphosphat und DNA. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde das Gemisch tropfenweise zu BHK-P3 gegeben, die zu 30 - 40 % konfluent in einer 21 cm²-Schale in 10 ml DMEM vorlagen. Es folgte eine Übernacht-Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 3 % CO₂. Danach wurden die Präzipitate durch folgende Waschschriffe möglichst quantitativ entfernt: 1xPBS, 1xPBS/1 mM EGTA, 1xDMEM. Anschließend wurden die Zellen unter Standardbedingungen weiter kultiviert. Die Expression des jeweiligen exogenen Proteins wurde mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Mit dieser Methode konnte in BHK-P3 eine Transfektionsrate von bis zu 30 - 40 % erreicht werden.

3.3.2 Lipofektion

Zur Transfektion von HeLa-, CHO- und HepG2-Zellen wurde Effectene© (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Transfektion erfolgte gemäß Herstellerangaben mit einem Verhältnis der DNA zu Effectene-Reagenz von 1:10. Es wurden Transfektionsraten für HeLa-Zellen von 60 - 80% und für CHO-Zellen von 50 % erreicht, während sich HepG2-Zellen nur zu 20 - 30% transfizieren ließen.

3.3.3 Transfektion mit Oligofectamin

Zur Transfektion von HeLa-Zellen mit synthetischen RNA-Oligomeren (siRNA) wurde Oligofectamin© (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Dazu wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion ausgesät. Zur Transfektion wurden der siRNA-Duplex in einer Endkonzentration von 100 nM verwendet. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, um Antibiotikareste zu entfernen, und pro Vertiefung einer 24-Lochplatte mit 200 µl Transfektionsmedium überschichtet. Je Ansatz wurden zunächst 1,25 µl siRNA-Duplex (20 µM) in 40 µl Transfektionsmedium verdünnt. 2 µl Oligofectamin und 5,5 µl Transfektionsmedium wurden gemischt und für 5 - 10 min bei RT inkubiert bevor sie zu den Oligomeren hinzugegeben und zusammen für 20 min bei RT inkubiert wurden.

Anschließend wurde der Transfektionsansatz vorsichtig auf den Zellrasen gegeben und bei 37 °C und 7% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach 4 h erfolgte die Zugabe von 175 µl Kulturmedium, und die Zellen wurden mindestens 48 h weiterkultiviert.

Für 8,7 cm²-Schalen wurden 4 µl Oligofectamin in 11 µl Transfektionsmedium und 5 µl siRNA-Duplex in 175 µl Transfektionsmedium inkubiert. Es wurde ein Transfektionsvolumen von 800 µl verwendet. Nach 4 h wurde 1 ml Kulturmedium hinzugegeben und es erfolgte ein Weiterkultivierung für 48 h.

Transfektionsmedium: DMEM-Grundmedium
 1:100 NEA
 2 mM Glutamin
 10% (v/v) FCS

3.4 Immunfluoreszenz

3.4.1 Aussaat der Zellen für die Immunfluoreszenz

Zellen, die mittels Immunfluoreszenz untersucht wurden, lagen adhärent auf Glasdeckgläsern (Ø 12 mm) vor. Eine Beschichtung der Deckgläschen war nicht erforderlich.

3.4.2 Fixierung und Permeabilisierung

Vor der Anfärbung mit Antikörpern wurden die Zellen fixiert und eventuell permeabilisiert. Zur Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA) wurden die Zellen 10 min mit PBS/4 % PFA bei RT behaldelt. Die anschließende Permeabilisierung erfolgte in PBS/0,2 % Triton-X-100 für 2 min bei RT.

Um den Einfluß von Calcium zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst 5 min auf Eis mit 0,2% Triton-X-100 in PBS⁺⁺ permeabilisiert und anschließend 10 min in 4% PFA/PBS⁺⁺ bei RT fixiert.

Nach der Fixierung mit PFA wurden die Zellen 5 min in PBS, 5 min in 50 mM NH₄Cl zur Inaktivierung freier Aldehydgruppen, und wieder 5 min in PBS gewaschen.

3.4.3 Immunfärbung

Die auf einem Deckglas fixierten und permeabilisierten Zellen wurden 45 min in einer feuchten Kammer mit 20 µl des jeweiligen in PBS/2 % BSA verdünnten Primärantikörpers inkubiert. Danach wurden sie dreimal für 5 min in PBS gewaschen und 45 min mit 20 µl

des jeweiligen in PBS/2 % BSA verdünnten Sekundärantikörpers im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in PBS wurde das Deckglas kurz in dest. Wasser gespült, abgetropft und in Mowiol[®] eingebettet.

3.4.4 Filipin-Färbung

Filipin ist ein Cholesterin-bindendes pentaenes Antibiotikum, welches auch in der Lage ist, Cholesterin aus Membranen herauszulösen.

Die fixierten und gewaschenen Zellen wurden im Dunkeln mit 50 µg/ml Filipin III (Sigma) in PBS/2 % BSA inkubiert, anschließend in PBS gewaschen und in Mowiol eingebettet.

3.4.5 Phalloidin-Färbung

Das toxische bizyklische Peptid Phalloidin aus dem Pilz *Aminata phalloides* bindet spezifisch nur an F-Aktin. Es verschiebt das Gleichgewicht zwischen monomerem und polymerem Aktin zu Gunsten des polymeren und bewirkt gleichzeitig durch Inhibition der Depolymerisation eine Stabilisierung des F-Aktins.

Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden im Dunkeln mit Phalloidin in PBS/2 % BSA inkubiert. Dabei kann die Inkubation gleichzeitig mit einem fluorochromierten Sekundärantikörper erfolgen.

Nicht-permeabilisierte Zellen wurden mit Phalloidin gefärbt indem Phalloidin gleichzeitig mit Filipin III appliziert wurde.

3.4.6 Lebende Zellen

Zellen, die mit fluoreszierenden Fusionsproteinen transfiziert waren, konnten ohne Fixierung analysiert werden. Dazu wurden die Zellen auf dem Deckgläschen direkt in Mowiol gebettet und unverzüglich mikroskopiert.

3.4.7 Whole-mount-EM

Die Whole-mount-Technik bietet die Möglichkeit das endosomale Kompartiment einer Zelle in seiner Gesamtheit auf ultrastruktureller Ebene darzustellen und mit Hilfe von Immunogoldfärbungen zu charakterisieren.

3.4.7.1 Anziehen von Zellen auf Trägernetzen

Bereits mit Formvar (1 % Formvar in Chloroform) befilmte goldene Trägernetze (grids) wurden in Gewebekulturschalen gelegt und 10 Sekunden in der Mikrowelle sterilisiert und

über Nacht mit Medium im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde vorsichtig abgenommen, und auf die Trägernetze wurde eine Zellsuspension getropft. Für optimale Ausgangsbedingungen sollten ca. 100 Zellen auf einem Netz gewachsen sein.

3.4.7.2 HRP-Tf und HRP-Internalisierung mit DAB-Substratumsatz

Die grids wurden in neue Schalen überführt und dreimal in IM bei 37 °C gewaschen und 30 min bei 37 °C im Wasserbad in IM inkubiert. Anschließend wurde mit 25 µg/ml HRP-Tf in IM/FCS (IM + 1 %FCS) 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dreimal auf Eis mit IM gewaschen und erneut 25 min im Wasserbad mit 5 mg/ml HRP in IM/FCS inkubiert. Das Stoppen der Internalisierung erfolgte durch zweimaliges schnelles Waschen in IM(-) (= IM ohne BSA) auf Eis. Danach wurden die Zellen zunächst einmal mit DAB-Puffer (1,5 mg/ml DAB; 70 mM NaCl; 50 mM Ascorbinsäure; 20 mM Hepes; pH 7,2; auf 290 mOsm eingestellt; Zugabe von 0,02 % H₂O₂ direkt vor Benutzung) gewaschen. Die Trägernetze wurden in neue Kulturschalen mit DAB-Puffer überführt und 30 min auf Eis gestellt.

3.4.7.3 Permeabilisierung und Fixierung

Die Zellen wurden sechsmal in PBS mit erneutem Wechsel der Kulturschalen auf Eis gewaschen und im Anschluß daran für 30 min in PBS, 1 mg/ml Saponin; 10 mM EGTA; 8,3 mM CaCl₂; 5 mM Ascorbinsäure; 0,5 mM MgCl₂; pH 7,2 auf Eis permeabilisiert. Danach wurde einmal in PBS, 10 mM EGTA; 8,3 mM CaCl₂; 0,5 mM MgCl₂; pH 7,2 gewaschen. Die Zellen wurden einmal in Fixierlösung (2 % PFA; 0,2 % Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumphosphatpuffer; pH 7,2) gewaschen und anschließend in der gleichen Lösung für 1 h auf Eis fixiert. Das Fixativ wurde abgenommen, dreimal mit PBS gewaschen, und freie Aldehydgruppen wurden in 50 mM NH₄Cl für 30 min bei RT inaktiviert. Die grids wurden in Blockierlösung (PBS; 1 mg/ml Saponin; 20 mM Glycin; 0,1 % Kaltwasserfischgelatine; 0,02 % NaN₃) überführt und konnte in diesem Puffer für längere Zeit bei 4 °C aufbewahrt werden.

Die anschließende Immunogoldfärbung und weitere Aufarbeitung der Trägernetze wurden von Dr. D. Zeuschner in Utrecht (Niederlande) durchgeführt, die ebenfalls die Aufnahmen am Elektronenmikroskop tätigte.

3.5 Immunopräzipitation

Pro Präzipitationsansatz wurden 50 µl Magnetpartikel (Dynabeads M-450, Dynal Biotech, Deutschland) verwendet. Die Beads wurden dreimal in PBS/0,1 % BSA gewaschen. Entsprechende Antikörper wurden in einem Endvolumen von 700 µl PBS/0,1 % BSA mit den Beads für 2 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Magnetpartikel dreimal mit PBS/0,1 % BSA gewaschen.

Zellen einer konfluenten Schale (58 cm²) wurden zweimal mit PBS bei RT gewaschen, in 2 ml IP-Puffer (ohne SDS) mit Proteaseinhibitoren (4 µg/ml Aprotinin; 0,5 µg/ml Leupeptin; 1 µg/ml Pepstatin; 0,5 µg/ml TPCK; 1 mM PMSF; 20 µM E64) bei 4 °C für 30 min unter leichter Agitation inkubiert, von der Schale abgeschabt und mit einer 22G-Nadel homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 10.000g für 10 min wurde der Überstand zu ungekoppelten Beads gegeben und 2 h bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Bindungspartner des Zellysates an die Beads zu entfernen. Anschließend wurde das so behandelte Zellysat über Nacht bei 4 °C im Überkopfschüttler mit 50 µl Antikörpergekoppelten Magnetpartikeln rotiert. Die Partikel wurden zweimal mit PBS/0,1 % BSA und einmal in PBS gewaschen. Danach wurden sie in 35 µl 2xSDS-Probenpuffer aufgenommen und für die SDS-Gelelektrophorese (s. 2.4) vorbereitet.

3.6 Methoden zur Untersuchung der Stoffaufnahme in Zellen

3.6.1 Fluoreszenzmikroskopische Methoden

3.6.1.1 Internalisierung von fluorochromiertem Transferrin

Zur Untersuchung der rezeptorvermittelten Endozytose wurden die Zellen zunächst für 30 min in Serum-freiem Internalisierungsmedium (IM) gehalten und anschließend für verschiedene Zeiten mit 25 - 50 µg/ml Texas-Red[®]-gekoppeltem Transferrin in IM bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal für 5 min in eiskaltem PBS gewaschen, mit Paraformaldehyd fixiert (s. 3.4.2), gegebenenfalls permeabilisiert und mit Antikörpern inkubiert.

Eisengesättigtes Transferrin bindet an den Transferrinrezeptor und wird internalisiert. Das Eisen verbleibt in der Zelle, während Apotransferrin zusammen mit dem Rezeptor zur Plasmamembran zurücktransportiert wird, wo es vom Rezeptor dissoziiert, so daß der Rezeptor neu beladen werden kann.

Um eine Modulation der Aufnahme zu erzeugen, kann die Transferrinaufnahme bei Temperaturen unter 20 °C durchgeführt werden. Der entsprechende Marker wird zwar in die frühen/Sortierendosomen aufgenommen, jedoch findet ein Weitertransport zu den Recyclingendosomen oder den späten Endosomen nicht statt (Goldenberg et al., 1991; Sipe et al., 1991).

3.6.1.2 Internalisierung von fluorochromiertem LDL

LDL (**L**ow**D**ensity**L**ipoprotein) wird ebenso wie Transferrin durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen. Im Gegensatz zum Transferrin wird LDL jedoch nicht zurücktransportiert, sondern dissoziiert nach der Internalisierung vom Rezeptor ab und wird den Lysosomen zugeführt. Um die Route dieses Transportwegs zu untersuchen, wurden die Zellen für verschiedene Zeiten mit 50 µg/ml DiI[®]-konjugiertem LDL (Molecular Probes, Niederlande) in IM bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal für 5 min in eiskaltem PBS gewaschen, mit Paraformaldehyd fixiert (s. 3.4.2), gegebenenfalls permeabilisiert und mit Antikörpern (s. 3.4.3) inkubiert.

3.6.1.3 Internalisierung von Dextran

Eine weitere Möglichkeit wie Stoffe in die Zelle aufgenommen werden, stellt die Flüssigphasenaufnahme dar. Dabei werden die aufgenommenen Substrate den Lysosomen zur Degradation zugeführt.

Um diesen Transportweg zu untersuchen, wurden die Zellen für verschiedene Zeiten mit 0,5 mg/ml TMR-Dextran (10kDa) (Molecular Probes, Niederlande) in IM bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal für 5 min in eiskaltem PBS gewaschen, mit Paraformaldehyd fixiert (s. 3.4.2).

3.6.1.4 Internalisierung von DQRed-BSA

Um Lysosomen zu markieren, wurden die Zellen für 1 h mit 100 µg/ml DQ Red-BSA (Molecular Probes) bei 37 °C inkubiert, in PBS gewaschen und anschließend über Nacht im Brutschrank weiter inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern behandelt.

DQ Red-BSA enthält einen selbstquencheden Farbstoff, der nach Abbau in den Lysosomen ein helles Fluoreszenzsignal emittiert. Somit können spezifisch nur die Lysosomen sichtbar gemacht werden.

3.6.2 Biochemische Studien

3.6.2.1 Transferrin-Recycling

Zur Messung der Recyclingrate in HeLa-Zellen wurde HRP-konjugiertes Transferrin (HRP-Tf) verwendet. Der Anteil des zurücktransportierten und des in den Zellen verbleibenden Transferrins wurde durch Messung der HRP-Aktivität im Überstand und Zellysat bestimmt und in Verhältnis zu der Gesamtaktivität gesetzt.

Die Zellen wurden auf Gewebekulturschalen (8,7 cm²) ausgesät. Zunächst wurden die Zellen dreimal mit Medium 1 (IM, 50 µM Desferal (Deferroxamin Mesylat)) gewaschen und anschließend in Medium 2 (IM, 1% FCS, 50 µM Desferal) für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Jede Schale wurde 5 min bei 37 °C im Wasserbad mit 2 ml 2,5 µg/ml HRP-Tf ± 200µg/ml unmarkiertem Transferrin inkubiert. Im Anschluß wurde mit Medium 1 dreimal schnell und zweimal 5 min auf Eis gewaschen. Um Plasmamembranständiges Transferrin zu entfernen, folgte ein schnelles und ein zehnmütiges Waschen auf Eis mit 20 mM MES; pH 5,0; 130 mM NaCl; 2 mM CaCl₂ und 50 µM Desferal. Danach wurde mit Medium 1 einmal schnell und einmal über 10 min auf Eis neutralisiert. Das Recycling wurde durch Zugabe von 3 ml Medium 2 pro Schale im Wasserbad bei 37 °C gestartet. Dabei ist auf die Einhaltung der Zeit sowie eine möglichst geringe Evaporation bei der Probenentnahme zu achten. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden 200 µl Überstand (= Probe) aus den Schalen entnommen und in ein Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Am Ende wurde das verbleibende Medium (= Rest) abgenommen und die Zellen einmal mit 2 ml Medium 1 gewaschen. Die Waschlösung (= Wasch) wurde ebenfalls gesammelt. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, 2 min bei 900g (Tischzentrifuge) zentrifugiert und das Pellet in 200 µl IP-Puffer aufgenommen. Nach Homogenisierung folgte ein Inkubation für 30 min auf Eis. Anschließend wurde 10 min bei 10.000g, 4 °C zentrifugiert und der Überstand (= Lysat) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die HRP-Aktivität in „Probe, Rest; Wasch und Lysat“ wurde mittels TMB-Substrat-Umsatz (s. 2.6.4) bestimmt. Anschließend wurde der Anteil der HRP-Aktivität in den einzelnen Fraktionen im Vergleich zur Gesamtaktivität berechnet.

3.6.2.2 Rezeptorvermittelte Aufnahme

Die Zellen wurden auf 24-Loch Gewebekulturschalen (1,75 cm² je Loch) ausgesät. Zunächst wurden die Zellen einmal mit Medium 1 (IM, 50 µM Desferal (Deferroxamin Mesylat)) gewaschen und anschließend in Medium 1 für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Je Loch wurden 250 µl HRP-Tf (6 µg/ml) in Medium 1 hinzugegeben und für

verschiedene Zeiten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluß wurde mit Medium 1 dreimal auf Eis gewaschen. Um Plasmamembran ständiges Transferrin zu entfernen, folgte ein schnelles und ein zehnminütiges Waschen auf Eis mit 20 mM MES; pH 5,0; 130 mM NaCl; 2 mM CaCl₂ und 50 µM Desferal. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst, 2 min bei 900g (Tischzentrifuge) zentrifugiert und das Pellet in 50 µl IP-Puffer aufgenommen. Nach Homogenisierung wurden die Ansätze 30 min auf Eis gehalten. Anschließend wurde 10 min bei 10.000g, 4 °C zentrifugiert und der Überstand (=Lysat) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration im Lysat wurde ermittelt (s. 2.1) und HRP-Aktivität im Lysat bestimmt (s. 2.6.4). Anhand des Verhältnisses von HRP-Aktivität zu Proteinmenge läßt sich der Anteil des aufgenommenen HRP-Tf bestimmen.

3.6.2.3 Flüssigphasenaufnahme

Die Zellen wurden auf 24-Loch Gewebekulturschalen (1,75 cm² je Loch) ausgesät. Zunächst wurden die Zellen zweimal mit IM gewaschen. Je Loch wurden 250 µl HRP (1 mg/ml) in IM hinzugegeben und für verschiedene Zeiten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluß wurde zweimal mit IM und zweimal mit PBS auf Eis gewaschen. Um Plasmamembran-ständiges HRP zu entfernen, folgte eine Inkubation mit 0,1 mg/ml Pronase in PBS auf Eis. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst, 2 min bei 900g (Tischzentrifuge) zentrifugiert und das Pellet in 200 µl IP-Puffer aufgenommen. Nach Homogenisierung wurden die Zellen 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 10.000g, 4 °C zentrifugiert und der Überstand (= Lysat) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration im Lysat wurde im Bradford-Test (s. 2.1) ermittelt und HRP-Aktivität in Lysat mittels TMB-Substrat-Umsatz (s. 2.6.4) bestimmt. Anhand des Verhältnisses von HRP-Aktivität zu Proteinmenge läßt sich der Anteil des aufgenommenen HRP-TF bestimmen.

4 Bakterienstämme und Zelllinien

4.1 Bakterienstämme

TOP10F' von *E. coli* K12 abgeleiteter Bakterienstamm (Invitrogen, San Diego, USA)
 Genotyp: F' {lacI^q, TN10(Tet^R)} mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80
 lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139Δ(ara-leu)7679 galU galK
 rpsL(Str^R) endA1 nupG

Verwendete *E. coli* Isolate zur Infektion von eukaryontischen Zellen

Stamm	Serotyp /Beschreibung	Referenz
EPEC 2348/69	Wildtyp EPEC O127:H6	(Levine et al., 1978)
SE896	EPEC 2348/69 <i>tir</i> (C-term. Verkürztes Tir-Protein, nicht phosphorylierbar)	(Elliott et al., 1999)
CVD452	EPEC 2348/69 <i>escN</i> (Typ III-Sekretionsmutante)	(Jarvis et al., 1995)

Tab. 1: *E. coli* Isolate

4.2 Zelllinien

BHK-P3 fibroblastenähnliche Zelllinie aus der Goldhamsteriere, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Jean Gruenberg (Universität Genf, Schweiz)

CHO-K1 fibroblastenähnliche Zelllinie aus Hamster (chinese hamster ovarie), DSMZ (ACC 110)

HeLa humane Adenokarzinom-Zelllinie, DSMZ (ACC CCL2)

HepG2 humane Hepatokarzinom-Zelllinie, DSMZ (ACC 180)

5 Vektoren

pEGFP-N3	BD Clontech (PaloAlto, USA)
pEYFP-C1	BD Clontech (PaloAlto, USA)
pECFP-Mod-N1	die CFP-codierende Sequenz wurde über BamH I-Not I in pEGFP-N3 kloniert
YFP-p11	humanes S100A10, über XhoI kloniert, enthält GC-vor dem Startcodon
Anx2-GFP	humanes Annexin 2 fusioniert mit GFP, die Sequenz enthält einen Aminosäureaustausch A65E, diese ermöglicht zusätzlich die spezifisch Detektion des ektopische exprimierten Proteins durch den monoklonalen Antikörper H28.
Anx2-CFP	humanes Annexin 2 fusioniert mit CFP, die Sequenz enthält ebenfalls den Aminosäureaustausch A65E.
Anx2-Core-GFP	Die N-terminale Domäne wurde entfernt (Δ 1-31). Die Sequenz enthält zusätzlich einen Aminosäureaustausch A65E.
Anx2-PM-GFP	Durch die Aminosäureaustausche I6E, L7E ist die S100A10-Bindungsstelle deletiert (p11-minus). Die Sequenz enthält zusätzlich einen Aminosäureaustausch A65E.
Anx2-CM-GFP	Durch Aminosäureaustausche D161A, E246A und D321A sind die ist die Typ II-Ca ²⁺ -Bindungsstellen mutiert (Calcium-minus). Die Sequenz enthält zusätzlich den Aminosäureaustausch A65E.
Anx2-PMCM-GFP	Durch Aminosäureaustausche I6E, L7E, D161A, E246A und D321A sind sowohl die S100A10- als auch die Ca ²⁺ -Bindungsstellen deletiert (p11-minus, Calcium-minus). Die Sequenz enthält zusätzlich den Aminosäureaustausch A65E.
Nanx2-GFP	AS 1-27 der humanen Annexin 2-Sequenz mit den Mutationen: Ile6Glu, Leu7Glu. Die S100A10-Bindungsstelle ist deletiert.
PHD-YFP	Basen 95-648 von NM_006225 über EcoR I und Sal I in pEYFP-N1 (Clontech) eingefügt
GPI-GFP	Zur Verfügung gestellt von Dr. Satyajit Mayor, Bangalore, Indien
PI(4)P5K-myc	Zur Verfügung gestellt von Dr. Laura M. Machesky, Birmingham, UK

GFP-Aktin Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Martin Bähler, Münster,
Deutschland

6 Oligonukleotide

6.1 siRNA Oligonucleotide

Oligo ha2.3 (Basen 94-113 aus der humanen Annexin 2-Sequenz, bei ATG=1 Base)

hin

5' CUUUGAUGCUGAGCGGGAU dTdT 3'

her

5' AUCCCGCUCAGCAUCAAAG dTdT 3'

6.2 Oligonukleotide für die PCR

Anx2hum_for (BglII)

5' GATC-AGATCT-ATG TCT ACT GTT CAC GAA ATC CTG TGC AAG C 3'

Anx2hum_rev (Sall)

5' GATC-GTCGAC-GCG TCA TCT CCA CCA CAC AGG TAC AGC AGC GC 3'

7 Enzyme für die Molekularbiologie

Sämtliche Enzyme stammen von der Firma MBI Fermentas, Deutschland

BamH1 10U/μl, Puffer EcoRI/Not-Puffer

NotI 10U/μl, Puffer EcoRI/Not-Puffer

EcoRI 10U/μl, Puffer O⁺

Sall 50U/μl high concentration, Puffer O⁺

XhoI 10U/μl, Puffer R⁺

8 Antikörper

Antikörper	Verdünnung		Herkunft
	Immunfluoreszenz	Western Blot	
Ms α Anx2 (HH7)	1:100	1:5000	Mary Osborn ¹⁾
Ms α Anx2 (H28)	KÜ	1:5000	Mary Osborn ²⁾
Ms α Avidin	-	-	Sigma
Ms α S100A10 (H21)	1:100	1:1000	Mary Osborn ¹⁾
Ms α clathrin	EM:	-	Ernst Ungewickell
Ms α hTfR (H68.1)	1:100	1:1000	Zymed
Rb α Anx1 (r656)	-	1:1000	Joachim Seemann ³⁾
Rb α Anx2 (msa 419)	1:50	1:500	MPI-Göttingen
Rb α rab11	1:50	-	Zymed
Rb α Livingcolor	-	1:100	Clontech (Palo Alto, USA)
Rb α Myc (9E10)	1:1000		
Cy2 TM α Ms	1:200	-	Jackson Immunoresearch Laboratories
RedX D α Ms	1:200	-	Jackson Immunoresearch Laboratories
Amca G α Ms	1:30	-	Jackson Immunoresearch Laboratories
POX α Ms	-	1:3000	Dianova
Cy2 TM α Rb	1:200	-	Jackson Immunoresearch Laboratories
TRITC α Rb	1:100	-	Jackson Immunoresearch Laboratories
Amca α Rb	1:50	-	Jackson Immunoresearch Laboratories
POX α Rb	-	1:2000	Dianova
TxRed-Phalloidin	1:200	-	Molecular Probes
FITC-Phalloidin	1:2000	-	Sigma

Tab. 2: Antikörperliste

1) (Thiel et al., 1992)

2) (Thiel et al., 1991)

3) (Seemann et al., 1996)

9 Peptide

A2 Ac1-14: Ac-STVHEILCKLSLEG-OH

A2 N1-14: N- STVHEILCKLSLEG-OH

AS 1-14 der humanen Annexin 2-Sequenz mit bzw. ohne N-terminale Acetylierung

A2 PM1-27: Ac-STVHEEESKLSLEGDHSTPPSAYGSVKC-OH

AS 1-27 der humanen Annexin 2-Sequenz mit den Mutationen: I6E, L7E, C8S; die p11-Bindungsstelle ist mehr nicht funktional
zusätzlich: C-terminales Cystein

Peptid A2 PM1-27 wurde von der Firma Interactiva (Ulm) bezogen, alle anderen Peptide wurden im Max-Planck-Institut für Biophysik, Göttingen hergestellt.

10 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien hatten p.A.-Qualität und wurden bezogen von Roth, Merck und Sigma-Aldrich, wenn nicht anders vermerkt. Eingesetzte Lösungsmittel hatten p.A.-Qualität und wurden von Applichem und Roth bezogen.

11 Medien

11.1 Medienzusätze

DMEM Grundmedium	4,5 g/l Glucose, 3,7 g/l NaHCO ₃ , BioWhittaker Europe, Belgien
RPMI 1640 Grundmedium	2 g/l Glucose, 2 g/l NaHCO ₃ , BioWhittaker Europe, Belgien
10×MEM	Life Technologies (Rockville, USA)
FCS (Fötale Kälberserum)	Herkunft: Südamerika, Life Technologies (Rockville, USA)
Hepes	1 M Stammlösung, Seromed (Berlin)
L-Glutamin	200 mM Stammlösung, BioWhittaker Europe, Belgien
NEA	100×Stammlösung, Seromed (Berlin)
Penicillin/Streptomycin	10000 U/10000 µg/ml, Seromed (Berlin)
Trypsin/EDTA	0,05% Trypsin/0,02% EDTA, Seromed (Berlin)

11.2 Kulturmedien

DMEM	DMEM Grundmedium 10 % FCS 1× NEA 100 U/100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin
RPMI	RPMI 1640 Grundmedium 10 % FCS 1× NEA 100 U/100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin
IM	1× MEM 20 mM Hepes 0,8 mg/ml NaHCO ₃ 1mg/ml BSA (Böhringer) pH 7,2

12 Puffer und Lösungen

2xBBS	50 mM BES 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 280 mM NaCl pH 6,95 mit NaOH bei RT
Coomassie-Färbelösung	0,5 % Coomassie Brilliant Blue R250 45 % Methanol 18,5 % Essigsäure
Entfärbelösung	10 % Essigsäure 12,5 % Isopropanol
IP-Puffer	20 mM Hepes, pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5 % Triton-X-100 0,1 % SDS
HB	3 mM Imidazol, pH 7,4 mit HCl 250 mM Saccharose, ultrapure (USB, Cleveland, USA)
Laufpuffer	25 mM Tris 0,1 % SDS 192 mM Glycin

PBS	137 mM NaCl 2,68 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄
PBS ⁺⁺	Dulbecco`s PBS/Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (BioConcept, Umkirch)
Ponceau S-Färbelösung	2,5g Ponceau S (Serva, Heidelberg) 40 % Methanol 15% Essigsäure ad 1l
4xTris/SDS-Puffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 0,4% SDS
2xSDS-Probenpuffer	2,5 ml 4xTris/SDS, pH 6,8 0,4 g SDS 0,2 ml Mercaptoethanol ca. 0,1 mg Bromphenolblau 2 ml Glyzerin ad 10 ml dest. Wasser
6xSDS-Probenpuffer	7 ml 4xTris/SDS 1 g SDS 0,93 g DTT ca. 1 mg Bromphenolblau 3 ml Glyzerin ad 10 ml dest. Wasser
SDS-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 4% SDS
SDS-Trenngelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4% SDS
50xTAE	2 M Tris 100 mM EDTA pH 8,0 mit 96 %iger Essigsäure (10 - 20 ml)
TBS-T	20 mM Tris 150 mM NaCl 0,2 % (w/v) Tween 20 pH 7,5 mit HCl
TE	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0 mit HCl

Transferpuffer 25 mM Tris
 192 mM Glyzin
 10 % (v/v) Methanol

13 Diverse Materialien

Agarose	Biomol (Hamburg)
BSA zur Proteinbestimmung	Pierce (Rockford, USA)
BSA, Fraktion V, zum Blockieren	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Immobilon-P, PVDF-Membran	Millipore (Bedford, USA)
Microsep™, Ultrafiltrationsröhrchen	Filtron Technology (Northborough, USA)
Mowiol® 4-88	Calbiochem (La Jolla, USA)
Phenol, Tris-gesättigt	Biomol (Hamburg)
Protran®, Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell (Dassel)
SDS-PAGE Molekulargewichtstandards	peqGold Prestained Protein MW Marker Peqlab (Erlangen) MW122-20 kDa
Sulfo-NHS-Biotin	Pierce (Rockford, USA)

14 Geräte

Elektroporationsküvetten	Peqlab (Erlangen)
Gene Pulser II, Elektroporator	Bio-Rad (München)
Kühlzentrifugen, Ultrazentrifugen	Beckman (München)
Optima™ TL Ultracentrifuge	
Optima™ L-70k Ultracentrifuge	
Tischzentrifugen	Kendro Heraeus (Hanau)
PCR: Trio Thermoblock™	Biometra (Göttingen)
Refraktometer	Zeiss (Jena)
Überkopfschüttler	GFL (Deutschland)
Brutschränke	Kendro Heraeus (Hanau)
<u>Fluoreszenzmikroskopie:</u>	
DM RXA Mikroskop	Leica (Wetzlar)
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Leica (Wetzlar)
CCD-Kamera: MicroMax	Princeton Instruments (Trenton, USA)
MetaMorph-Software	Universal Imaging (West Chester, USA)

III Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die unterschiedlichen Funktionen des Annexin 2 sowohl an der Plasmamembran als auch auf endosomalen Membranen näher charakterisiert. Durch die ektopische Expression von fluoreszierenden Fusionsproteinen und die Möglichkeit auch lebende Zellen zu untersuchen, was bis zu diesem Zeitpunkt nicht möglich war, ergaben sich neue Einsichten zur Funktion des Annexin 2. Durch Verwendung der sogenannten siRNA-Technik konnten weitere Details ermittelt werden.

1 Plasmamembran assoziiertes Annexin 2

1.1 Annexin 2 rekrutiert S100A10 an die Plasmamembran in HepG2-Zellen

Annexin 2 bildet mit seinem intrazellulären Liganden S100A10 einen heterotetrameren Komplex. Es liegen jedoch kontroverse Daten darüber vor, welche der beiden Untereinheiten die Lokalisation des Komplexes in der Zelle bestimmt. In zur Sekretion stimulierten Chromaffinzellen wird zytosolisches Annexin 2 von verankertem S100A10 an die Plasmamembran dirigiert (Chasserot-Golaz et al., 1996), während in F9-Zellen, die kein Annexin 2 exprimieren, S100A10 eine ausschließlich zytosolische Verteilung zeigt (Harder et al., 1993).

Um die Lokalisation der Einzelkomponenten als auch die des Komplexes zu analysieren, wurden HepG2-Zellen verwendet, die nur sehr geringe Mengen endogenes Annexin 2 und S100A10 exprimieren sollten (Puisieux et al., 1996). In diesen Zellen sollte es möglich sein, durch ektopisch exprimierte Proteine darzustellen, welche der beiden Untereinheiten die Lokalisation des Komplexes in der Zelle bestimmt. Um die ektopisch exprimierten Proteinen in lebenden Zellen verfolgen zu können, wurde Annexin 2 C-terminal mit CFP-fusioniert, so daß die zur Komplexbildung notwendige N-terminale Domäne unbeeinflusst blieb (Johnsson et al., 1988; Becker et al., 1990). S100A10 wurde N-terminal mit YFP fusioniert, da in der C-terminalen Region Aminosäurereste identifiziert wurden, die für die Komplexbildung essentiell sind (Kube et al., 1992).

In einem biochemischen Ansatz wurde zunächst überprüft, ob die ektopisch exprimierten Fusionsproteine auch die Fähigkeit besitzen, den Annexin₂/S100A10₂-Komplex zu bilden. Dazu wurden HepG2-Zellen mit Annexin 2-CFP und YFP-S100A10 transient

cotransfiziert. Die entsprechenden Fusionsproteine wurden aus dem Zelllysate mit Antikörpern gegen Annexin 2 (H28, der endogenes humanes Annexin 2 nicht erkennt) oder S100A10 (H21) immunopräzipitiert und anschließend im Immunoblot mit Antikörpern, die sämtliche GFP-Varianten erkennen, detektiert (Abb. 4). Sowohl bei der Immunopräzipitation mit H21 (Abb. 4, Spur 1) als auch bei der mit H28 (Abb. 4, Spur 2) sind je zwei Hauptbanden bei ca. 35kDa und 70kDa zu erkennen. Diese Banden entsprechen den Molekulargewichten der jeweiligen Fusionsproteine. Es konnte somit gezeigt werden, daß die beiden Fusionsproteine co-immunopräzipitiert werden können, d. h. die Fähigkeit zur Komplexbildung besitzen. Wie die unterschiedliche Intensität der Banden verdeutlicht, liegen die präzipitierten Proteine jedoch nicht im gleichen Verhältnis vor.

Wird der Antikörper HH7 zur Präzipitation in Anx2-CFP transfizierten Zellen eingesetzt, so wurden ebenfalls zwei Banden detektiert. Die 70 kDa-Bande entspricht dem Molekulargewicht des Fusionsproteins, während die 36 kDa-Bande hier allerdings endogenes Annexin 2 darstellt. Mit dem hier verwendeten Antikörper HH7 konnte endogenes Annexin 2 nachgewiesen werden. Damit steht diese Aussage im Gegensatz zu den Ergebnissen von Puisieux et al. (1996), die keine signifikanten Mengen an Annexin 2 in diesen Hepatomzellen ermitteln konnten. HH7 erkennt ein N-terminales Epitop im Annexin 2 (Thiel et al., 1992). Da die Bindungsstelle für S100A10 ebenfalls in dieser N-terminalen Sequenz lokalisiert ist, ist HH7 wahrscheinlich nicht zur effizienten Präzipitation des Komplexes befähigt.

Um nun die Lokalisation der einzelnen Komplex-Untereinheiten zu untersuchen, wurden HepG2-Zellen zunächst mit Annexin 2-CFP transfiziert. In der Immunfluoreszenz ist in lebenden Zellen neben einer gleichmäßigen, zytosolischen Verteilung des Annexin2-CFP auch eine Färbung der Plasmamembran zu erkennen (Abb. 5A). Der Zellkern ist nicht gefärbt. Dieses Verteilungsmuster entspricht der typischen endogenen Verteilung von Annexin 2, wie sie in anderen Zelllinien (z.B. BHK, HeLa (siehe unten)) beobachtet wird. Untersucht man dagegen die Lokalisation des ektopisch exprimiertem YFP-S100A10 in lebenden HepG2-Zellen, so zeigt sich eine einheitliche Zytoplasma- und Kernfärbung (Abb. 5B).

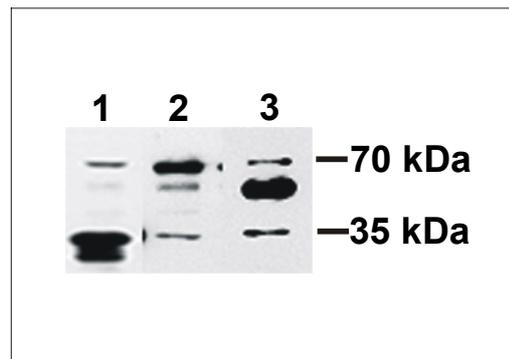


Abb. 4: Immunopräzipitation von Annexin 2-CFP und YFP-S100A10 aus HepG2-Zellysaten. HepG2-Zellen wurden mit Annexin 2-CFP und YFP-S100A10 cotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde mit dem Zellysate entweder eine Immunopräzipitation mit dem monoklonalen Anti-S100A10-Antikörper H21 (Spur 1) oder mit dem monoklonalen Anti-Annexin 2-Antikörper (H28) (Spur 2) durchgeführt. Die präzipitierten Proteine wurden im Immunoblot mit polyklonalen Antikörpern (Livingcolor), die alle Varianten des GFP-Proteins erkennen, nachgewiesen. In beiden Spuren sind zwei Hauptbanden von 70 kDa und 35 kDa zu erkennen. Die 70 kDa-Bande entspricht dem Annexin 2-CFP, während die 35 kDa-Bande das YFP-S100A10 darstellt. Mit den beiden verwendeten monoklonalen Antikörpern kann der entsprechende Bindungspartner co-präzipitiert werden. Die ektopisch exprimierten Fusionsproteine besitzen somit die Eigenschaft zur Komplexbildung. In Spur 3 wurde Zellysate aus Annexin 2-CFP transfizierten Zellen mit HH7 immunopräzipitiert und die präzipitierten Proteine ebenfalls mit HH7 nachgewiesen. Neben dem Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 70 kDa wurde eine Bande bei 36 kDa detektiert, die endogenem Annexin 2 entspricht.

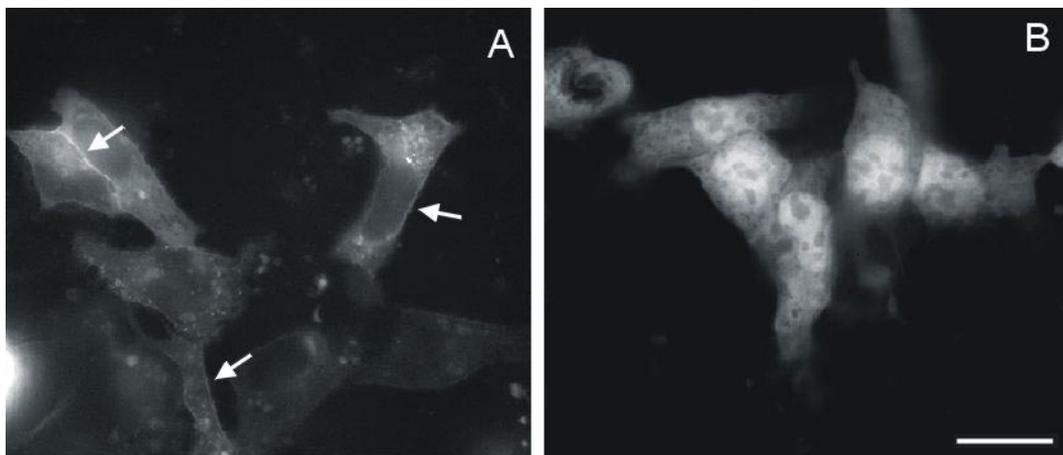


Abb. 5: Intrazelluläre Lokalisation von Annexin 2-CFP oder YFP-S100A10 in lebenden HepG2-Zellen. HepG2-Zellen wurden entweder mit Annexin 2-CFP (A) oder mit YFP-S100A10 (B) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde die Lokalisation der einzelnen Fusionsproteine in lebenden Zellen untersucht. Annexin 2-CFP exprimierende Zellen zeigen eine zytoplasmatische und Plasmamembranfärbung. Die Zellkerne sind nicht gefärbt (A). Pfeile weisen auf die Plasmamembranfärbung hin. Die Expression von YFP-S100A10 führt zu einer gleichmäßigen, zytosolischen Färbung. Die Zellkerne sind ebenfalls gefärbt (B).

Um in lebenden Zellen die Lokalisation des Komplexes darstellen zu können, wurden HepG2-Zellen mit Annexin 2-CFP und YFP-S100A10 cotransfiziert (Abb. 6). Die anschließende Immunfluoreszenzanalyse zeigt eine ähnliche Verteilung des Annexin 2-CFP wie in der Einzeltransfektion. Neben der zytosolischen Färbung ist wiederum eine Lokalisation an der Plasmamembran sichtbar (Abb. 6A). Im Gegensatz dazu hat sich die Verteilung des YFP-S100A10 in der Zelle verändert. Neben der zytosolischen Färbung tritt nun auch eine Plasmamembranfärbung deutlich hervor (Abb. 6B), die mit dem Annexin 2-CFP colokalisiert ist. Die Bildung des Annexin 2₂/S100A10₂-Komplexes in HepG2-Zellen führt zu einer Umverteilung des S100A10 an die Plasmamembran, während sich die Lokalisation des Annexin 2 im Komplex kaum von der des Monomeres unterscheidet. Die Lokalisation des Komplexes in der Zelle wird somit durch die Assoziation des Annexin 2 mit der Plasmamembran bestimmt. Erst durch Anwesenheit von Annexin 2 wird S100A10 an die Plasmamembran rekrutiert.

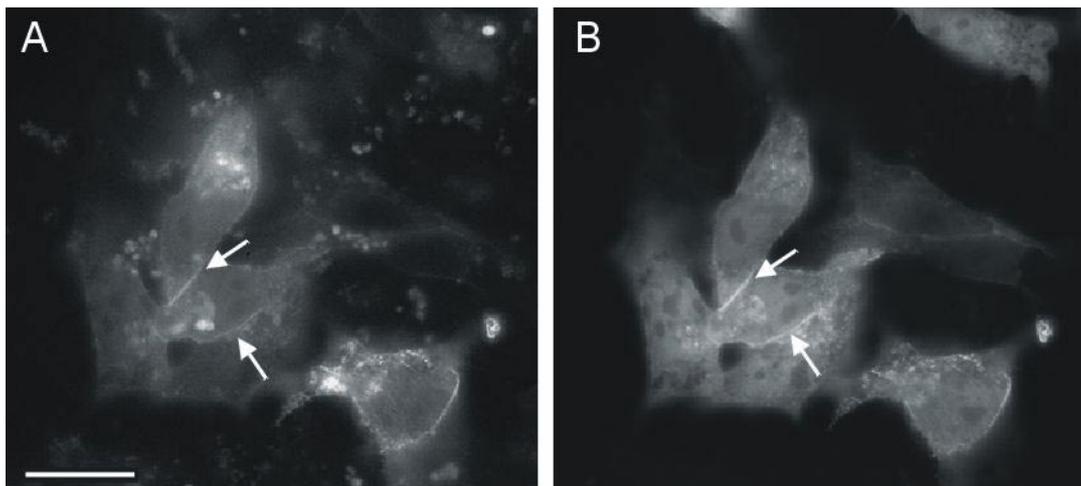


Abb. 6: Intrazelluläre Verteilung von Annexin 2-CFP und YFP-S100A10 in lebenden HepG2-Zellen. HepG2-Zellen wurden mit Annexin 2-CFP (A) und YFP-S100A10 (B) cotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde die intrazelluläre Verteilung beider Fusionsproteine in lebenden Zellen analysiert. Beide Proteine sind an der Plasmamembran colokalisiert (Pfeile).

1.2 Infektion durch enteropathogene *E. coli* führt zu einer Umverteilung von Annexin 2 an der Plasmamembran

Um zu untersuchen, ob Annexin 2 gezielt zu bestimmten Regionen der Plasmamembran rekrutiert werden kann, die mit dynamischen Umverteilungen des membranassoziierten Zytoskelett in Verbindung stehen, wurden enteropathogene *E. coli* (EPEC) als Modellsystem gewählt.

EPEC sind einer der Hauptursachen von infantiler Diarrhö. Nach Infektion besiedeln die EPEC den Darm und bilden kleine Mikrokolonien auf der Oberfläche der epithelialen Zellen. Nach einem drei-Stufen-Modell findet die erste Anheftung durch plasmidcodierte Pili (bundel forming pili: Bfp) statt. Es werden dann Proteine, die von der LEE-Pathogenitätsinsel codiert werden, über einen Typ III-Sekretionsweg in die Wirtszelle transportiert. Mit Hilfe des bakteriellen, extrazellulären Adhäsins Intimin und einem zuvor durch das Typ III-Sekretionssystem in die Wirtszelle geschleusten Rezeptor Tir (translocated intimin receptor) kommt es zu einem festen Kontakt zwischen Erreger und Wirtszelle. Die adhärierenden EPEC verursachen außerdem eine Umorganisation des Aktin-Zytoskelettes in der Wirtszelle unterhalb der Bakterien, so daß sich dort becherförmige Ausstülpungen („pedestals“) der Plasmamembran bilden. Diese Pedestals bilden dabei auch eine Signaltransduktionsplattform in der Wirtszelle an der unterschiedlichste Proteinklassen (z.B. Kinasen, Lipasen, Aktin-regulierende Proteine) zu lokalisiert sind (DeVinney et al., 1999). Der Gesamtvorgang einer EPEC-Infektion führt zur Destruktion der Mikrovilli des Darmepithels und wird auch als Bildung von „attachment and effacing (A/E) lesions“ bezeichnet.

1.2.1 Annexin 2 wird in Ca²⁺-abhängiger Weise zu adhärierenden Mikrokolonien von EPEC rekrutiert

Drei Stunden nach Infektion mit EPEC 2348/69 zeigen HeLa-Zellen die charakteristische Umorganisation des Aktin-Zytoskelettes unterhalb adhärierender Bakterien (Abb. 7). Die infizierten Zellen wurden fixiert und permeabilisiert. Endogenes Annexin 2 wurde mit Antikörpern gegen Annexin 2 (HH7) (Abb. 7A) detektiert, während F-Aktin mit TexasRed-konjugiertem Phalloidin (Abb. 7B) angefärbt wurde. Wie in Abb. 7C zu sehen, akkumuliert Annexin 2 in den Regionen, in denen sich auch eine deutliche Umorganisation des F-Aktins zeigt. Dabei ist das Annexin 2 wabenförmig um das Aktin-Zytoskelett herum

angeordnet. Werden die infizierten Zellen dagegen in Anwesenheit von 1 mM EDTA erst permeabilisiert und dann fixiert, so zeigt sich in Abbildung 7D eine deutliche Reduktion des Annexin 2-Signals, während das Aktin-Signal vergleichbar mit dem in Anwesenheit von Calcium bleibt (Abb 7E).

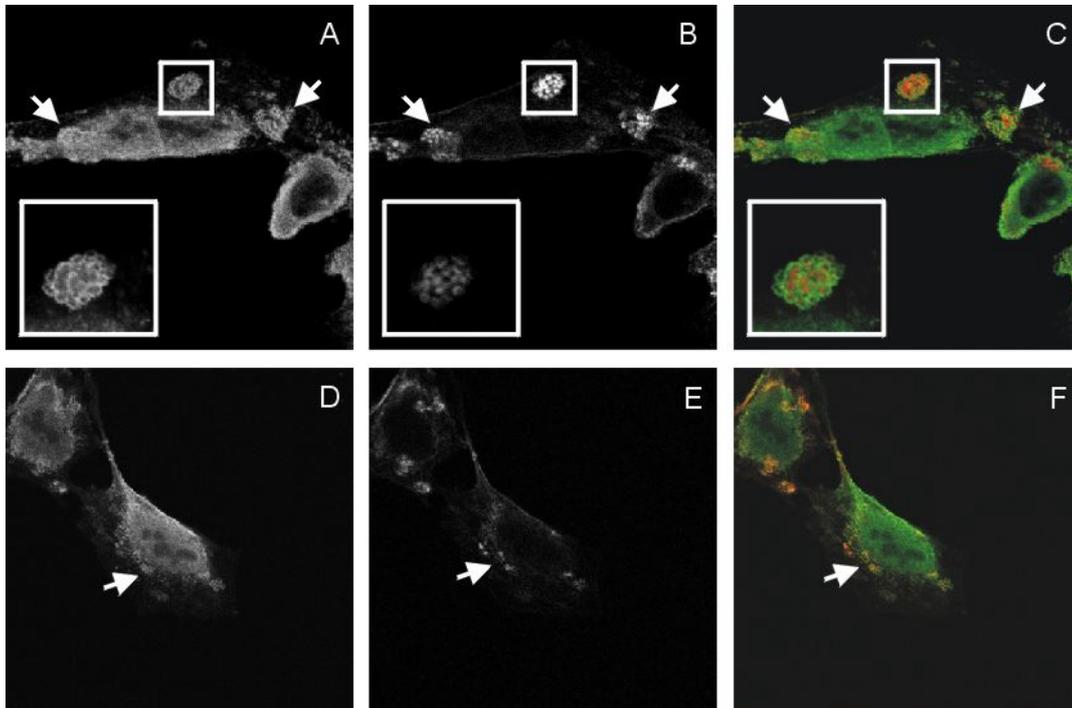


Abb. 7: Annexin 2 akkumuliert unterhalb adhätierender Bakterien. HeLa-Zellen wurde 3 h mit EPEC 2348/69 infiziert, anschließend permeabilisiert und mit 4% PFA fixiert. Endogenes Annexin 2 wurde mit dem monoklonalen Antikörper HH7 und einem Cy2-konjugierten Sekundärantikörper detektiert (A, C:grün). F-Aktin wurde mit TexasRed-konjugiertem Phalloidin gefärbt (B). Die infizierten Zellen zeigen ein starkes Annexin 2-Signal und eine Akkumulation des F-Aktins unterhalb der adhätierenden Bakterien. Die überlagerten Einzelbilder (C), insbesondere die zweifach vergrößerten Ausschnitte, zeigen, daß sich Annexin 2 (grün) becherförmig um das umorganisierte Aktin (rot) legt. Bei Zugabe von 1 mM EDTA im Permeabilisierungspuffer wird das Annexin 2-Signal (D) deutlich schwächer. Das Aktin-Signal dagegen bleibt von gleicher Intensität (E).

Um dem Problem einer eventuellen Mislokalisierung des endogenen Annexin 2 durch veränderliche Ca^{2+} -Konzentrationen im Permeabilisierungspuffer auszuweichen, wurde ein grünfluoreszierendes Fusionsprotein (Annexin 2-GFP) verwendet, so daß eine Permeabilisierung und eine sich daran anschließende Antikörperfärbung der Zellen nicht mehr erforderlich war.

24 h nach der Transfektion mit Annexin 2-GFP wurden HeLa-Zellen für 3 h mit EPEC 2348/69 infiziert und anschließend fixiert. F-Aktin wurde mit TexasRed-Phalloidin sichtbar gemacht. Wie in Abbildung 8 zu sehen, ist auch das ektopisch exprimierte Fusionsprotein Annexin 2-GFP (Abb. 8A) unterhalb adhätierender Bakterien konzentriert. Im Phasenkontrastbild (Abb. 8G) sind deutlich Mikrokolonien der Bakterien zu erkennen,

unterhalb derer das Aktin-Zytoskelett (Abb. 8C) umarrangiert wird. Annexin 2-GFP schließt sich auch hier becherförmig um das Aktin (Abb. 8E). Die Lokalisation des ektopisch exprimierten Annexin 2-GFP unterscheidet sich hier nicht von der des endogenen Proteins. In den weiteren Studien wurde deshalb das grünfluoreszierende Fusionsprotein Annexin 2-GFP eingesetzt.

Annexin 2 kommt zum einen als Monomer in der Zelle vor, hauptsächlich liegt es jedoch im Komplex mit S100A10 vor (Erikson et al., 1984; Zokas and Glenney, 1987). Um zu untersuchen, ob S100A10 ebenfalls zu den EPEC-Adhäsionsstellen transportiert wird, wurden HeLa-Zellen vor der Infektion mit EPEC 2348/69 mit YFP-S100A10 transfiziert. Wie in Abbildung 8 (linke Spalte) zu sehen, akkumuliert YFP-S100A10 (Abb. 8B) zusammen mit dem Aktin-Signal (Abb. 8D) unterhalb der Bakterienmikrokolonien (Abb. 8H). S100A10 befindet sich ebenso wie Annexin 2 unterhalb der adhärenenden Bakterien. Man kann deshalb davon ausgehen, daß ein Großteil des unterhalb der Bakterien akkumulierenden Annexin 2 im Komplex mit S100A10 vorliegt.

Ein Charakteristikum von Proteinen der Annexin-Familie ist es, in Ca^{2+} -abhängiger Weise an Membranen zu binden. Um eine mögliche unspezifische Akkumulation von Annexinen im allgemeinen ausschließen zu können, wurden Zellen infiziert, die mit Annexin 1-GFP oder Annexin 3-GFP transient transfiziert waren (Abb 9). Weder Annexin 1 (Abb. 9A) noch Annexin 3 (Abb. 9D) wurden an den durch Aktin-Akkumulation charakterisierten bakteriellen Adhäsionspunkten nachgewiesen (Abb. 9C, F).

Es konnte somit demonstriert werden, daß eine Ca^{2+} -abhängige Rekrutierung unterhalb adhärenender *E. coli* spezifisch für Annexin 2 ist. Obwohl andere Vertreter der Annexin-Familie ebenfalls in Ca^{2+} -abhängiger Weise mit Membranen assoziieren können, sind sie dort nicht detektierbar.

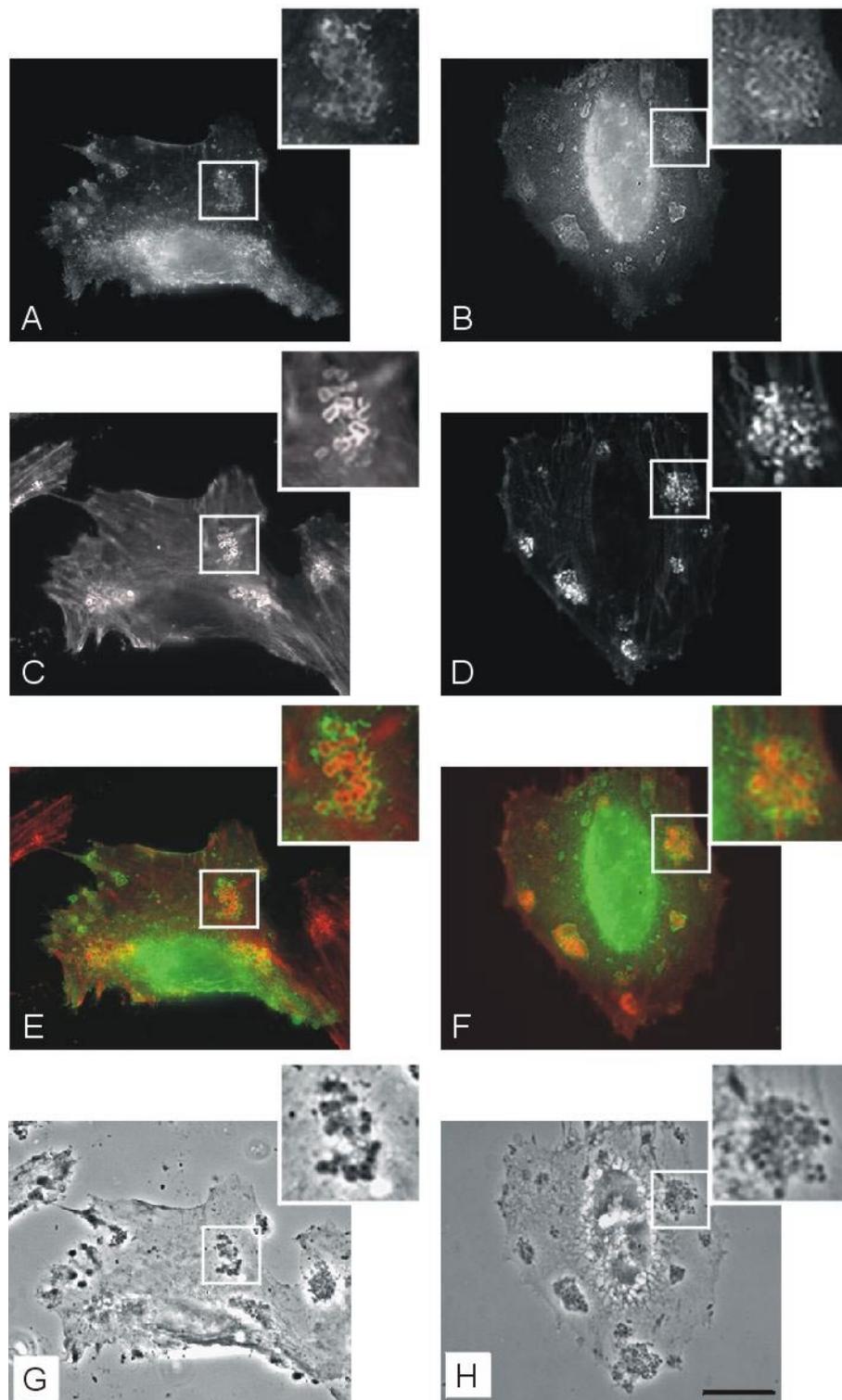


Abb. 8: Anreicherung von Annexin 2-GFP und YFP-S100A10 an den Kontaktstellen der EPEC. HeLa-Zellen, die entweder ektopisch Annexin 2-GFP (linke Spalte) oder YFP-S100A10 (rechte Spalte) exprimierten, wurden 3 h mit EPEC 2348/69 infiziert. Anschließend wurden sie fixiert und mit TexasRed-Phalloidin (C, D) behandelt. Die überlagerten Bilder sind in E und F zu sehen, während die Phasenkontrastbilder (G, H) die adhären den Bakterienkolonien zeigen. Die Lokalisation von Annexin 2-GFP (A) um polymerisiertes F-Aktin (C) unterhalb der adhären den Bakterien (G) ist nicht von der des endogenen Proteins unterscheidbar. YFP-S100A10 (B) ist ebenfalls an F-Aktin positiven Strukturen (D) unterhalb der Mikrokolonien (H) zu finden. Die eingerahmten Ausschnitte sind 2,5-fach vergrößert nochmals dargestellt. Balken 10 μ m.

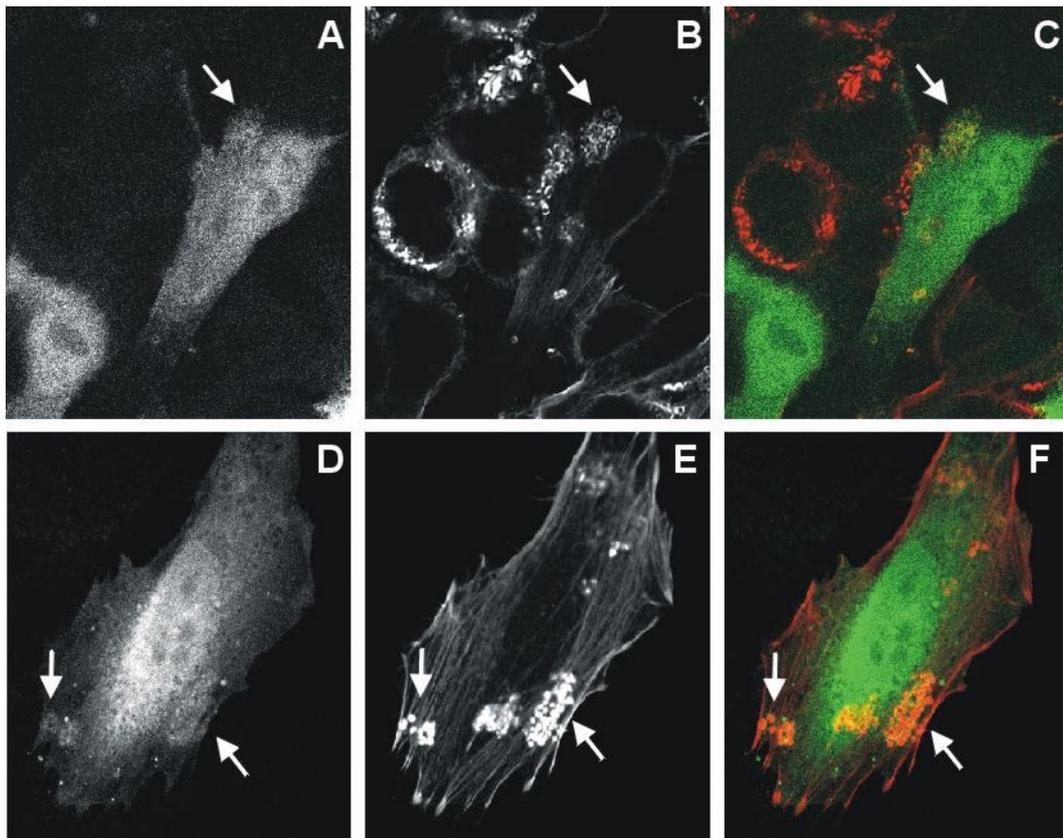


Abb. 9: Annexin 1 und Annexin 3 akkumulieren nicht unterhalb adhärrender EPEC. HeLa-Zellen wurden mit Annexin 1-GFP (A-C) oder Annexin 3-GFP (D-F) transfiziert. Nach 3 h Infektion mit EPEC 2348/69 wurden die Zellen fixiert, und F-Aktin wurde mit TexasRed-Phalloidin (B, E) angefärbt. Annexin 1 (A) und Annexin 3 (D) zeigen eine gleichmäßige zytosolische Verteilung. F-Aktin (B, E) wurde unterhalb der Bakterien massiv umarrangiert. In den überlagerten Einzelbildern (C, F) zeigt sich keine Kolo-kalisation des GFP-Signals mit F-Aktin.

Als nächstes sollte untersucht werden, welche Bindungseigenschaften von Annexin 2 für die Rekrutierung unterhalb der Bakterien hauptsächlich verantwortlich ist. Dazu wurden verschiedene Annexin 2-Mutanten verwendet und deren Lokalisierung nach Bakterieninfektion untersucht.

Wie zuvor gezeigt befindet sich an den bakteriellen Kontaktstellen auch der intrazelluläre Annexin 2-Ligand, S100A10. Bei Auftreten beider Proteine sollte sich der Annexin 2₂/S100A10₂-Komplex bilden, der andere Eigenschaften als das monomere Annexin 2 zeigt. Um die Bildung des Komplexes zu verhindern und die Verteilung des monomeren Annexin 2 untersuchen zu können, wurde das Anx2-PM-GFP-Konstrukt eingesetzt. Es entspricht in der Länge dem gesamten Annexin 2, enthält davon abweichend jedoch eine mutierte und somit inaktive S100A10-Bindungsstelle (Thiel et al., 1992). Nach Infektion mit EPEC 2348/69 ist das Anx2-PM-GFP Fusionsprotein unterhalb der Bakterien zu erkennen (Abb. 10, rechte Spalte). Die Lokalisation des Fusionsproteins wird somit

allein durch die Eigenschaften des Annexin 2-Monomers vermittelt und ist unabhängig von der Bildung des Annexin 2₂/S100A10₂-Komplexes.

Die individuellen Eigenschaften und Funktionen der verschiedenen Annexine werden überwiegend durch die innerhalb der Familie hochvariablen N-terminalen Domänen vermittelt. Bei Verwendung eines N-terminal verkürzten Annexin 2 (Δ 1-31) Konstruktes (Anx2-Core-GFP), sollte dessen Lokalisierung in der Zelle demnach nur durch die Eigenschaften des Protein „Cores“ vermittelt werden, in denen sich auch die Calcium-Bindungsstellen befinden. Nach Infektion von Anx2-Core-GFP exprimierenden HeLa-Zellen mit EPEC 2348/69 erkennt man deutlich eine Anreicherung des Fusionsproteins unterhalb der adhärierenden Bakterien (Abb. 10, linke Spalte). Somit findet eine Rekrutierung an die Kontaktstellen unabhängig von der N-terminalen Domäne (Aminosäuren 1-31) statt.

Um die Bedeutung der Calciumbindungsstellen im Protein „Core“ bei der Rekrutierung zu untersuchen, wurde ein Konstrukt (Anx2-CM-GFP) mit mutierten und somit inaktiven Calciumbindungsstellen in HeLa-Zellen transfiziert. Nach Infektion mit EPEC 2348/69 akkumuliert auch hier das Fusionsprotein unterhalb der *E. coli* (Abb. 11, linke Spalte), obwohl die Rekrutierung nicht mehr Ca²⁺-abhängig vermittelt werden kann. Allerdings kann hier eine Anlagerung über die Bildung eines chimären Komplexes von Anx2-CM-GFP mit endogenem S100A10 und endogenem Annexin 2 erfolgt sein.

Um sowohl eine Bindung über die Calcium- als auch über die S100A10-Bindungsstellen ausschließen zu können, wurde letztendlich ein Anx2-GFP-Konstrukt verwendet, in dem sowohl die S100A10- als auch die Calciumbindungsstellen durch Mutation inaktiviert worden waren (Anx2-PMCM-GFP). In mit EPEC 2348/69 infizierten HeLa-Zellen ist das Anx2-PMCM-GFP-Signal nur sehr schwach unterhalb der adhärierende Bakterien zu erkennen (Abb. 11, rechte Spalte).

Es ergibt sich somit, daß die Rekrutierung des Annexin 2 an die Kontaktstellen der *E. coli* hauptsächlich Ca²⁺-abhängig stattfindet.

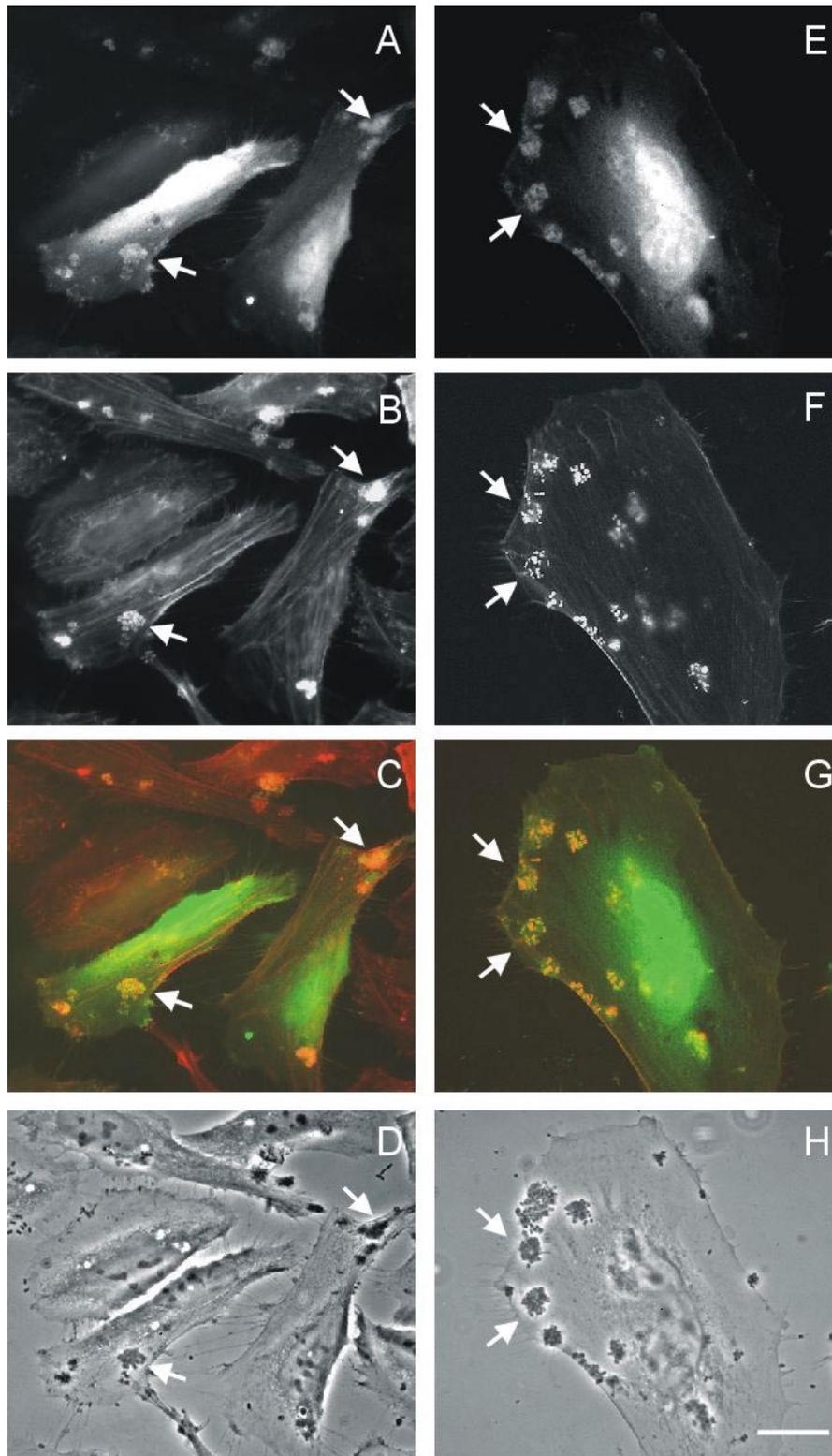


Abb. 10: Anx2-Core-GFP und Anx2-PM-GFP akkumulieren unterhalb adhärerender Mikrokolonien. HeLa-Zellen, die entweder ektopisch Anx2-Core-GFP (A-D) oder Anx2-PM-GFP (E-H) exprimierten, wurden 3 h mit EPEC 2348/69 infiziert, fixiert und mit TexasRed-Phalloidin behandelt. Die Phasenkontrastbilder (D, H) zeigen die adhärerenden Bakterienkolonien. Die Lokalisation von Anx2-Core-GFP (A) um polymerisiertes F-Aktin (B) unterhalb der adhärerenden Bakterien (D) ist deutlich zu erkennen. Anx2-PM-GFP (E) ist ebenfalls an F-Aktin positiven Strukturen (F) unterhalb der Mikrokolonien (H) zu finden. Die überlagerten Einzelbilder sind in C und G dargestellt. Balken 10 μm .

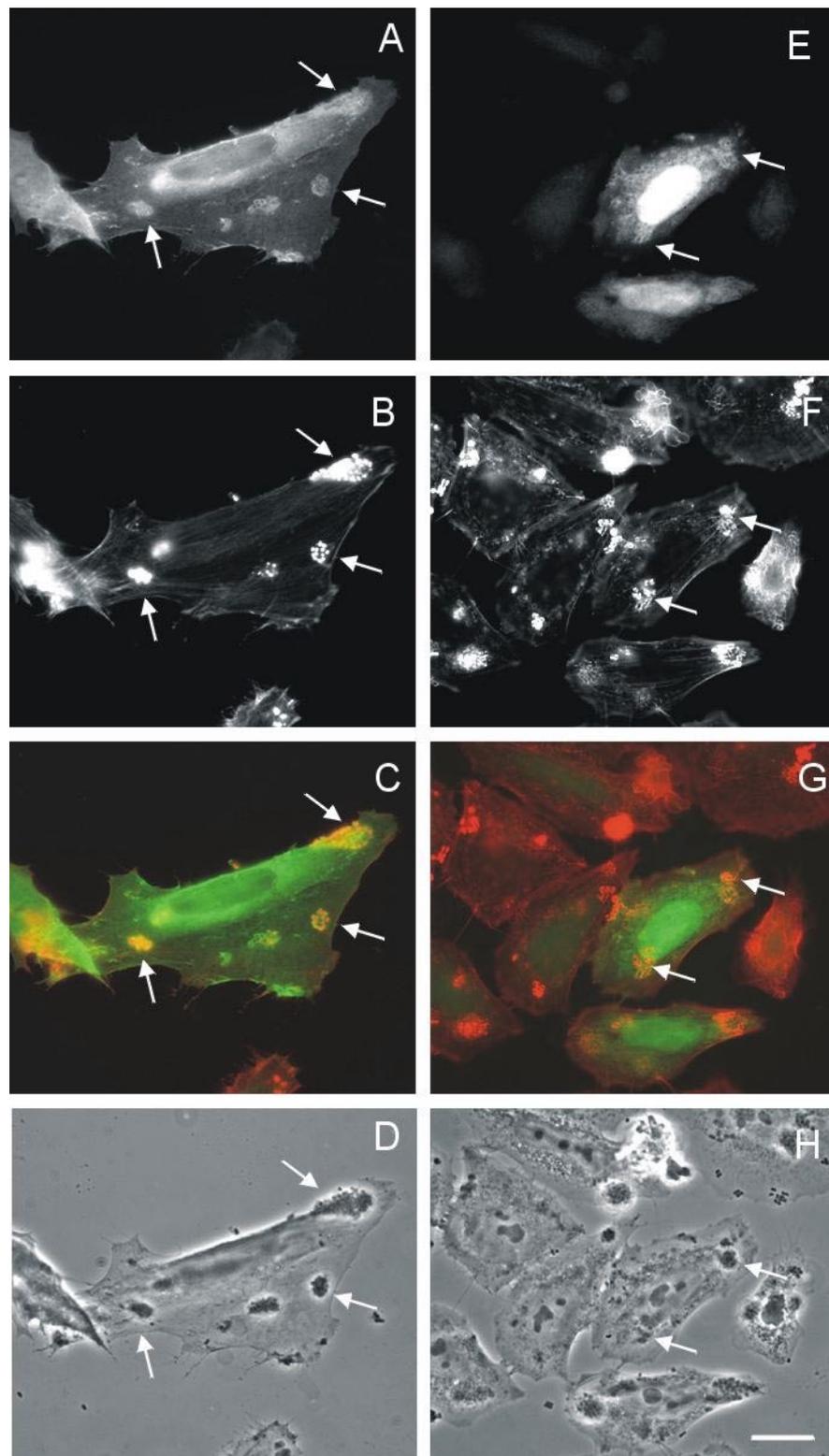


Abb. 11: Anx2-CM-GFP jedoch nicht Anx2-PMCM-GFP wird zu den Kontaktstellen rekrutiert. HeLa-Zellen, die entweder ektopisch Anx2-CM-GFP (A-D) oder Anx2-PMCM-GFP (E-H) exprimierten, wurden 3 h mit EPEC 2348/69 infiziert, fixiert und mit TexasRed-Phalloidin behandelt. Die Phasenkontrastbilder (D, H) zeigen die adhärenierenden Bakterienkolonien. Die Lokalisation von Anx2-CM-GFP (A) um polymerisiertes F-Aktin (B) unterhalb der adhärenierenden Bakterien (D) ist deutlich zu erkennen. Anx2-PMCM-GFP (E) ist jedoch in nur sehr geringen Maßen an F-Aktin positiven Strukturen (F) unterhalb der Mikrokolonien (H) zu finden. Die überlagerten Einzelbilder sind in C und G dargestellt. Balken 10 μm .

1.2.2 Die Rekrutierung des Annexin 2 an EPEC-Adhäsionspunkte ist Tir-unabhängig

Nach dem Anheften der EPEC werden zahlreiche bakterielle Virulenzfaktoren exprimiert, deren Gene auf einer einzelnen chromosomalen Pathogenitätsinsel (LEE: locus of enterocyte affacement) lokalisiert sind (Jarvis et al., 1995). Sie gelangen anschließend mittels eines Typ III-Sekretionssystem in die infizierte Gastzelle (Anderson and Schneewind, 1999; Galan and Collmer, 1999; Kenny, 2002). Eines dieser Proteine, Tir (Translocated Intimin Receptor), wird in die Plasmamembran der Wirtszelle insertiert (Rosenshine et al., 1992; Rosenshine et al., 1996; Kenny and Finlay, 1997; DeVinney et al., 1999) und rekrutiert dort Aktin-regulierende Proteine wie z.B. N-WASP und Arp2/3 (Kalman et al., 1999; Goosney et al., 2000a; Frischknecht and Way, 2001). Die Ausbildung der sogenannten Pedestals und damit verbunden die Umlagerung des Aktin-Zytoskelettes ist dabei abhängig von der Phosphorylierung des Tyrosins an Position 474 des Tir-Proteins (Kenny, 1999).

Um zu untersuchen, ob die Rekrutierung des Annexin 2 von dem Auftreten des Tir abhängig ist, wurde ein EPEC-Stamm (EPEC^{tir} (SE896)) verwendet, der nur ein C-terminal verkürztes Tir-Protein exprimiert, welches nicht mehr in der Lage ist, Pedestals zu induzieren. Annexin 2-GFP exprimierende HeLa-Zellen wurden mit EPEC^{tir} (SE896) infiziert, anschließend fixiert und mit TexasRed-Phalloidin gefärbt (Abb. 12, linke Spalte). Obwohl eine geringe, eher diffuse Aktinkonzentrierung an einigen Stellen in den mit EPEC^{tir} (SE896) infizierten Zellen auftritt, ist die Intensität des Aktin-Signals vernachlässigbar im Vergleich zum Wildtyp EPEC-Stamm (Abb. 12C). Dennoch erkennt man auch hier eine deutliche Akkumulation des Annexin 2-GFP unterhalb der Bakterien (Abb. 12A, G). Das Vorhandensein eines funktionellen Tir-Protein ist somit nicht notwendig, um Annexin 2 unterhalb adhärerender *E. coli* zu rekrutieren.

Neben dem Tir-Protein sind andere, ebenfalls sekretierte Proteine (Eps: *E. coli* secreted proteins) auf der LEE-Pathogenitätsinsel lokalisiert. Sie bilden u. a. das Typ III-Sekretionssystem. Mit Hilfe eines EPEC-Stamms (CVD452), bei dem die gesamte Pathogenitätsinsel deletiert war, sollte untersucht werden, welchen Einfluß das komplette Fehlen eines Typ III-Sekretionssystems auf die Rekrutierung des Annexin 2 unterhalb adhärerender *E. coli* besitzt.

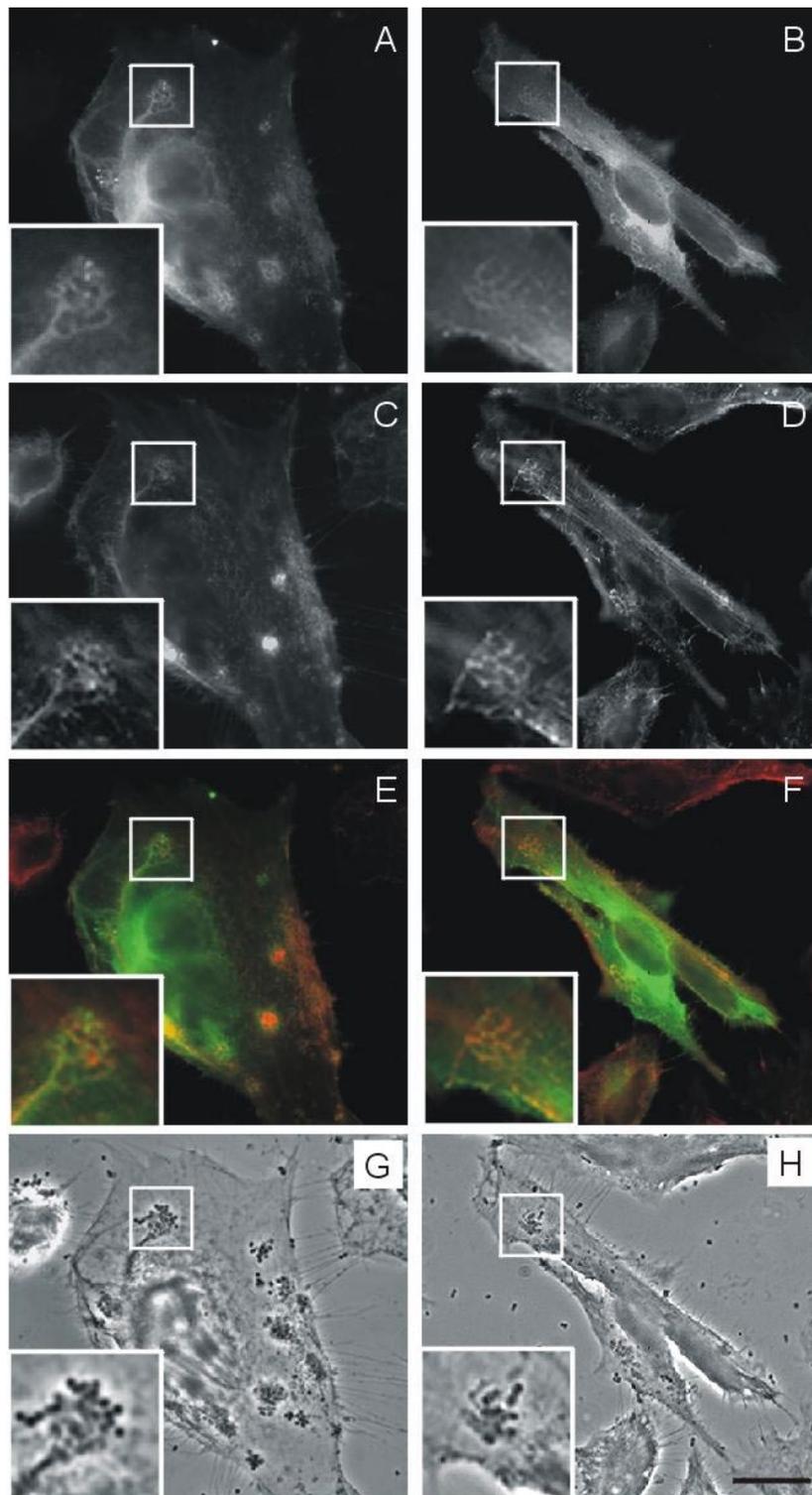


Abb. 12: Die Rekrutierung von Annexin 2 ist Tir unabhängig. Annexin 2-GFP exprimierende HeLa-Zellen wurden entweder mit EPECTir (SE896), die ein nicht-funktionelles, verkürztes Tir-Protein exprimierten (linke Seite), oder CVD452, die nicht in der Lage waren, ein Typ III-Sekretionssystem auszubilden (rechte Seite), infiziert. Die Annexin 2-GFP-Färbung (A, B) wurde mit der TexasRed-Phalloidin-Färbung (C, D) verglichen und in Überlagerung (Annexin 2:grün; Aktin: rot) dargestellt (E, F). Die Phasenkontrastbilder (G, H) zeigen die adhärenierenden Mikrokolonien auf den infizierten HeLa-Zellen. Annexin 2 akkumuliert erkennbar unterhalb EPECTir (SE896), während CVD452 nicht in der Lage sind, Annexin 2 deutlich zu rekrutieren. Balken 10 μm .

Obwohl nach Infektion von Annexin 2-GFP exprimierenden HeLa-Zellen mit CVD452 (Abb. 12, rechte Spalte) deutlich Mikrokolonien auf den Zellen zu erkennen sind (Abb. 12H), wird das Aktin-Zytoskelett unterhalb dieser Bakterien kaum umgelagert (Abb. 12D). Eine deutliche Rekrutierung vom Annexin 2 ist nicht zu erkennen (Abb. 12B). Annexin 2 wird demzufolge unabhängig von der Expression eines funktionellen Tir-Proteins zu den Bakterien rekrutiert, während jedoch adhätierende Bakterienmutanten ohne Typ III-Sekretionssystems keine Anreicherung des Annexin 2 mehr induzieren.

1.2.3 Cholesterin, GPI-verankerte Proteine und PI(4,5)P₂ akkumulieren zusammen mit Annexin 2 an den EPEC-Kontaktstellen

In verschiedene Arbeiten wird Annexin 2 sowohl mit dem membran-assoziierten Aktin-Zytoskelett als auch mit spezialisierten Membrandomänen in Verbindung gebracht (Harder et al., 1997; Oliferenko et al., 1999). Diese spezialisierten Membrandomänen (Rafts) sind durch den hohen Gehalt an Cholesterin und Spingholipiden sowie GPI-verankerten Proteinen charakterisiert (Anderson, 1998). Desweiteren wird vermutet, daß einige pathogene Erreger diese Membrandomänen nutzen, um in die Wirtszelle zu gelangen (Rosenberger et al., 2000; Shin et al., 2000). Um nun die Zusammensetzung der Membran direkt unterhalb der adhätierenden *E. coli* genauer zu charakterisieren, wurde zunächst die Cholesterin-Verteilung in infizierten HeLa-Zellen untersucht. Dazu wurde der EPEC-Stamm EPECtir (SE896) verwendet, bei dem nur gelegentlich diffuse Aktinumlagerungen auftreten, aber dennoch eine deutliche Annexin 2-Akkumulation stattfindet. Nach Infektion wurde die Verteilung des Annexin 2-GFP mit der Cholesterins verglichen, das mit dem Cholesterin-bindenden Antibiotikum Filipin III gefärbt wurde (Abb.13, linke Spalte). Ebenso wie Annexin 2 (Abb. 13A) ist Cholesterin (Abb. 13C) unterhalb der adhätierenden *E. coli* (Abb. 13E) konzentriert.

Danach wurde nun das Vorkommen von GPI-verankerten Proteinen in den Membrandomänen unterhalb der *E. coli* überprüft. Es konnte bereits gezeigt werden, daß die Verknüpfung solcher Proteine zu einer Aggregation prä-existierender „rafts“ führt, und sie demzufolge typische Rafts darstellen (Harder et al., 1998; Varma and Mayor, 1998; Kurzchalia and Parton, 1999). Die Verteilung der GPI-verankerten Proteine in der Zelle wurde durch ektopische Expression eines fluoreszierenden GPI-verankerten Proteins (GPI-GFP) dargestellt. HeLa-Zellen wurden 24 h vor der Infektion durch EPECtir (SE896) mit

GPI-GFP transient transfiziert (Abb. 13, rechte Spalte). Anschließend wurde sowohl die GPI-GFP- als auch die Cholesterinverteilung in den infizierten Zellen untersucht. Wie Abb 13B und 13D zeigen, akkumuliert GPI-GFP zusammen mit Cholesterin in Membranregionen unterhalb der adhärierenden *E. coli* (Abb. 13F). In nicht-infizierten Zellen zeigen Cholesterin (Abb. 13G) und GPI-GFP (Abb. 13H) neben einer Konzentrierung im Golgi eine gleichmäßig Verteilung in der Plasmamembran.

Hiermit konnte eindeutig gezeigt werden, daß bei Kontakt mit den EPEC eine massive Akkumulation von Cholesterin und GPI-verankerten Proteinen induziert wird, die mit einer Rekrutierung des Annexin 2 einhergeht.

Rafts enthalten neben Cholesterin und GPI-verankerten Proteinen (Harder and Simons, 1997; Brown and London, 1998) auch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂) (Liu et al., 1998; Galbiati et al., 2001). Die Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) der Phospholipase C δ bindet spezifisch an PI(4,5)P₂ (Varnai and Balla, 1998; Watt et al., 2002). Ein gelbfluoreszierende Fusionsprotein PH_(PLC δ)-YFP kann so als direkter Nachweis von PI(4,5)P₂ in der Zelle dienen. PI(4,5)P₂ wird in der Zelle durch Phosphorylierung von PI(4)P durch die PI(4)P-5-Kinase synthetisiert (Fruman et al., 1998). Um auch die PI(4)P-5-Kinase in der Zelle nachweisen zu können, wurde ein Konstrukt (PI(4)P5K-myc) verwendet, welches es ermöglicht, die ektopisch exprimierte PI(4)P-5-Kinase in den Zellen durch einen Anti-myc-Antikörper zu detektieren.

Um zu untersuchen, ob unterhalb der Bakterien noch weitere Raftkomponenten identifizierbar sind, wurden HeLa-Zellen entweder mit PH_(PLC δ)-YFP oder PI(4)P5K-myc transient transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit EPEC 2348/69 infiziert. Abb. 14 zeigt eine Anreicherung von PH_(PLC δ)-YFP (Abb. 14C und 14D) sowie PI(4)P5K-myc (Abb. 14A und 14B) unterhalb der Bakterien. PI(4,5)P₂ und die zur Synthese notwendige Kinase akkumulieren an den EPEC-Kontaktstellen.

Infiziert man PH_(PLC δ)-YFP transfizierte Zellen mit EPEC_{tir} (SE896), so ist die PH-Domäne ebenfalls an den Kontaktstellen angereichert (Abb. 14E und 14F). Werden PH_(PLC δ)-YFP transfizierte Zellen mit EPEC CVD452 infiziert, erkennt man auch hier eine Konzentration unterhalb der Bakterien, die jedoch deutlich schwächer ausfällt als bei EPEC 2348/69 und EPEC_{tir} (SE896) (Abb. 14G und 14H).

Nur die Adhärenz von EPEC-Stämmen mit intaktem Typ III-Sekretionssystem führten somit zu einer deutlichen Akkumulation von Raft-ständigen Protein- und Lipidkomponenten unterhalb der adhärierenden Bakterien

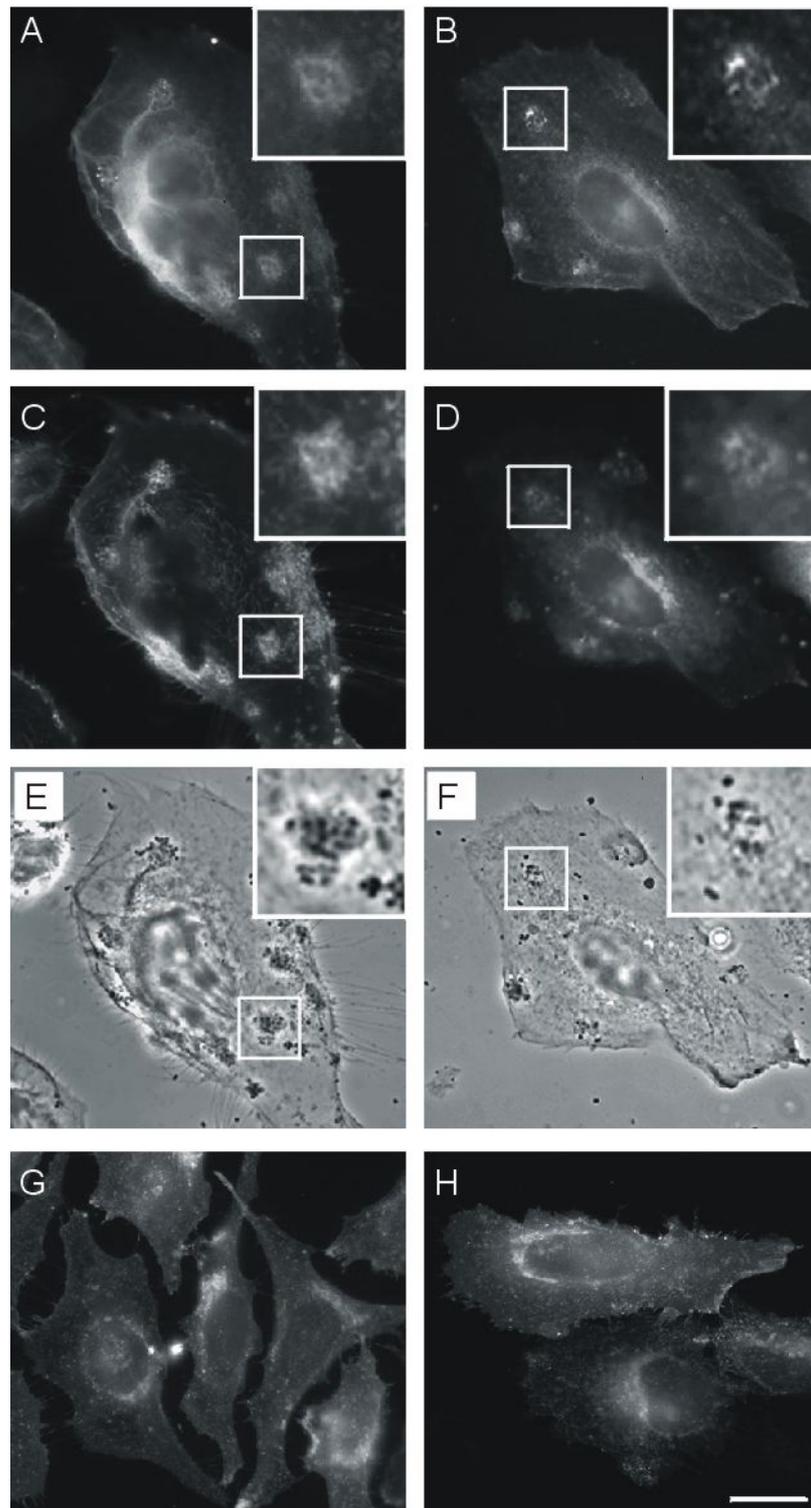


Abb. 13: Die Anheftung der EPECs induziert eine Anhäufung von raft-Komponenten. HeLa-Zellen wurden mit Annexin 2-GFP (A, C, E) und GPI-GFP (B, D, F) transfiziert. 3 h nach Infektion mit EPECtir (SE869) wurden die Zellen fixiert. Die Cholesterinverteilung (C, D) wurde mit Filipin III sichtbar gemacht. Die Phasenkontrastbilder (E, F) zeigen Bakterien-Mikrokolonien auf den Zellen. Sowohl Annexin 2-GFP als auch GPI-GFP akkumulieren unterhalb der adhärierenden *E. coli* zusammen mit Membrancholesterin. Bild G zeigt die Cholesterinverteilung und Bild H das GPI-GFP-Signal in nicht-infizierten Zellen. Die markierten Bereiche sind 2,5 x vergrößert nochmals dargestellt. Balken 10 μm .

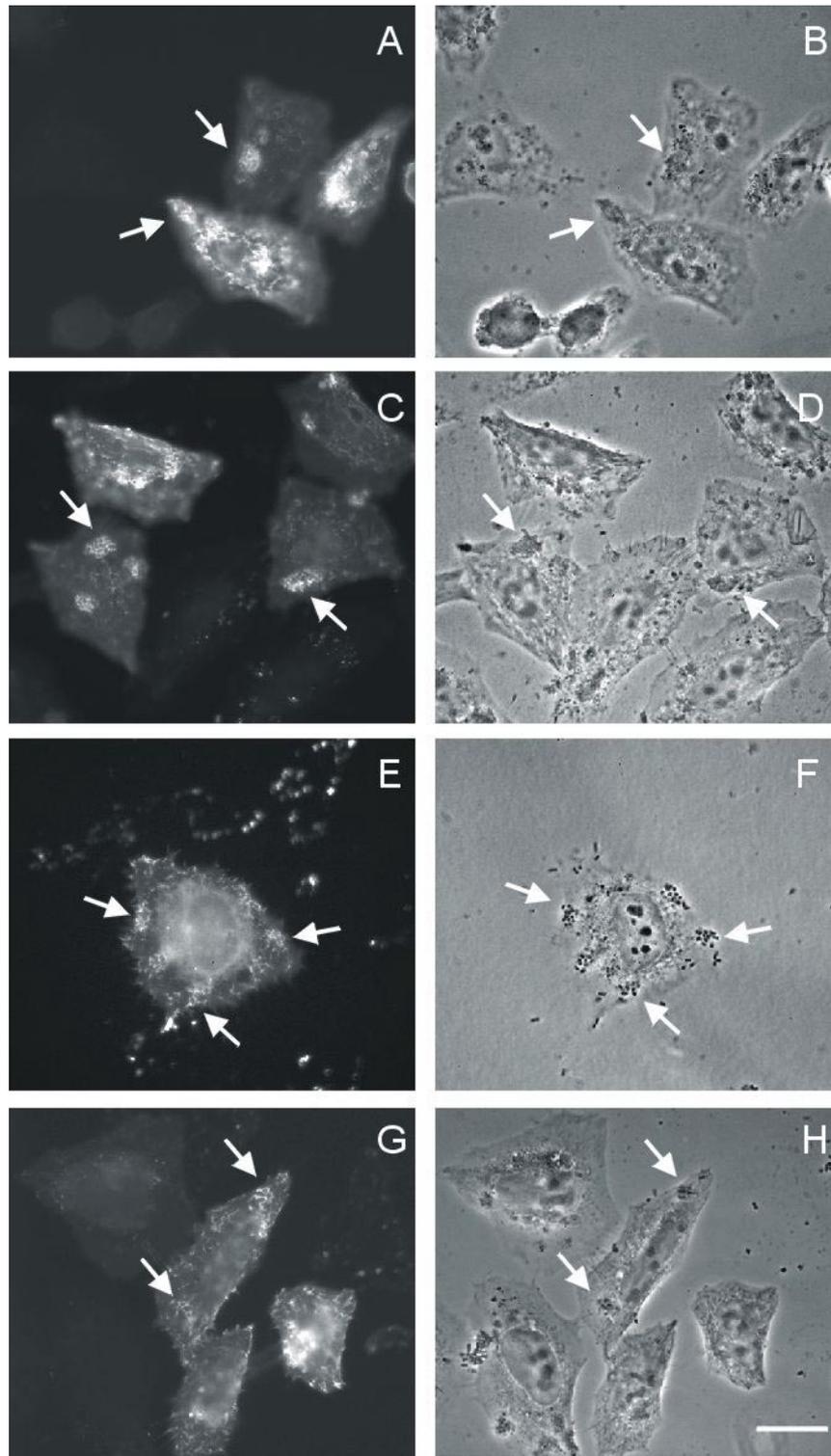


Abb. 14: PI(4,5)P₂ und PI(4)P-5-Kinase akkumulieren unterhalb adhärrierender *E. coli*. HeLa-Zellen wurden mit PI(4)P5K-myc (A, B) und PH_(PLCδ)-YFP (C-H) transfiziert. 3 h nach Infektion mit unterschiedlichen EPEC wurden die Zellen fixiert. Die PI(4)P5K-myc transfizierten Zellen wurden zusätzlich permeabilisiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen Myc (9E10) inkubiert, der mit einem Cy2-konjugierten Sekundärantikörper detektiert wurde. Die Phasenkontrastbilder (B, D, F, H) zeigen Bakterien-Mikrokolonien auf den Zellen. Unterhalb EPEC 2348/69 akkumuliert sowohl PI(4)P5K-myc (A) als auch PH_(PLCδ)-YFP (C). Infiziert man die Zellen mit EPECtir (SE896), so ist das PHD-Signal auch unterhalb dieses *E. coli*-Stammes konzentriert (E). Ebenso bewirkt EPEC CVD452 eine Akkumulation des Signals (G), das aber schwächer ist im Vergleich zu den anderen verwendeten *E. coli*-Stämmen. Balken 10 μm.

1.3 Erhöhung des PI(4,5)P₂-Gehaltes und die damit auftretenden Auswirkungen in der Zelle

Wie bereits beschrieben enthalten spezialisierte Lipiddomänen (Rafts) neben einem hohen Anteil an Cholesterin und GPI-verankerten Proteinen auch verstärkt PI(4,5)P₂. Neben der seit langen bekannten Funktion in der Signaltransduktion als Vorläufer von Diacylglycerol und IP₃ nach Aktivierung der Phospholipase C gibt es neuere Erkenntnisse, die zeigen, daß PI(4,5)P₂ selbst eine wichtige Rolle bei der Bindung und Aktivierung von Proteinen, die die Plasmamembran mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpfen, spielt (Czech, 2000). Aufgrund der bereits bekannten Membranbindungseigenschaften und des Vorhandenseins einer Aktinbindungsstelle im Protein „Core“ könnte Raft-assoziiertes Annexin 2 ein geeigneter Kandidat sein, der Membrane und das Aktin-Zytoskelett miteinander in Kontakt bringt.

Die Synthese von PI(4,5)P₂ durch die PI(4)P-5-Kinase kann in der Zelle durch verschiedene Effektoren stimuliert werden. Arf6 (ADP ribosylation Factor 6) ist einer dieser zahlreichen Effektoren, der die PI(4)P-5-Kinase aktiviert. Arf6 reguliert außerdem die Membranbewegung zwischen der Plasmamembran und Clathrin-unabhängig gebildeten endozytotischen Vesikeln (Radhakrishna et al., 1996; Radhakrishna and Donaldson, 1997). Durch Zugabe von Aluminiumfluorid kann wiederum Arf6 direkt beeinflusst werden, und es kommt in den Zellen zur Ausbildung von Membranwölbungen („ruffles“), die eine Verstärkung des kortikalen Aktinzytoskelettes aufweisen (Brown et al., 2001). Durch Transfektion der Zellen mit PH_(PLCδ)-YFP kann PI(4,5)P₂ in der Zelle sichtbar gemacht werden (siehe auch 1.2.3).

Im diesen Teil der Arbeit sollte untersucht werden, welche Veränderungen durch die Erhöhung PI(4,5)P₂-Gehaltes in den Zellen ausgelöst werden und welchen Einfluß diese auf die Lokalisation des Annexin 2 besitzen.

Dazu wurden zunächst die Auswirkungen näher betrachtet, die durch Aluminiumfluorid-Stimulierung hervorgerufen werden können. HeLa-Zellen wurden 3 h mit AIF (30 mM NaF, 50 µM AlCl₃) im Medium behandelt. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit FITC-Phalloidin und monoklonalen Antikörpern gegen Annexin 2 (HH7) inkubiert. Wie in Abbildung 15 zu sehen bilden sich in den Zellen Membranwölbungen („ruffles“), die durch eine verstärkte Polymerisation des Aktins charakterisiert sind (Abb. 15A). Annexin 2 befinden sich ebenfalls verstärkt in diesen Strukturen und

kolokalisiert dort mit dem Aktin (Abb. 15B). In PH_(PLC δ)-YFP transfizierten Zellen erkennt man nach AIF-Stimulierung eine Anreicherung der PH-Domäne in den „ruffles“ (Abb. 15C). Der Vergleich zur Annexin 2-Färbung zeigt auch dort eine Akkumulation in den gleichen Strukturen im Zellkortex (Abb. 15D).

Es konnte hiermit eindeutig gezeigt werden, daß Annexin 2 zusammen mit PI(4,5)P₂ und Aktin nach Stimulierung der Zellen mit AIF in den gleichen Strukturen konzentriert wird.

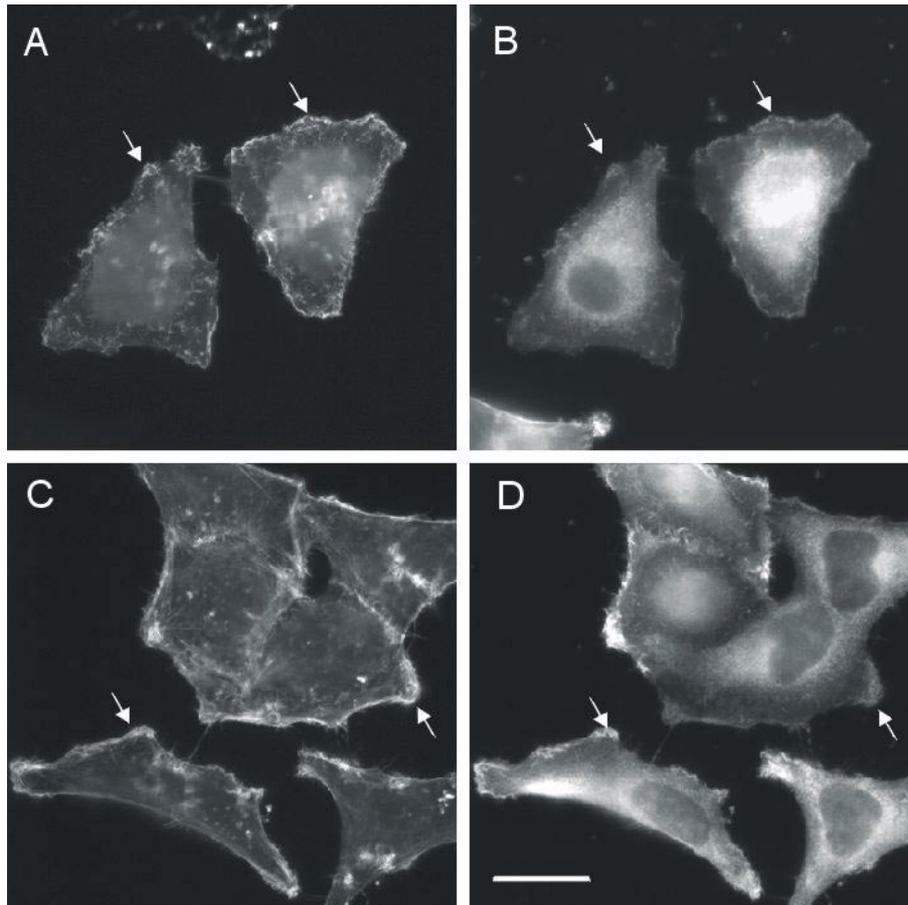


Abb. 15: Aluminiumfluorid induziert Membranruffles. Ein Ansatz der HeLa-Zellen wurde 24 h vor Versuchsbeginn mit PH_(PLC δ)-YFP transfiziert (C, D). Transfizierte und nicht-transfizierte HeLa-Zellen wurden 3 h mit AIF (30mM NaF und 50 μ M AlCl₃) inkubiert. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit dem monoklonalen Antikörper HH7 inkubiert. Der Sekundärantikörper war RedX konjugiert (B, D). Nicht-transfizierte Zellen wurden zusätzlich mit FITC-Phalloidin gefärbt (A). In den mit AIF-stimulierten Zellen sind deutlich Membranwölbungen erkennbar, die eine Verstärkung des Aktinzytoskelettes aufweisen (A). An diesen Stellen zeigt sich eine Kolokalisierung mit Annexin 2 (B). In mit PH_(PLC δ)-YFP transfizierten Zellen erkennt man ebenfalls Membranruffles, in denen die PH-Domäne akkumuliert (C). An diesen Stellen ist auch vermehrt Annexin 2 zu finden (D).

Die PI(4,5)P₂-Synthese kann neben der Aktivierung von Arf6 durch AIF auch direkt durch Überexpression der PI(4)P-5-Kinase gesteigert werden. Die Überexpression der Kinase führt in Swiss 3T3-Zellen zur Bildung von Aktinschweiften hinter Pinozytotischen Vesikeln (Rozelle et al., 2000) und zu einer massiven Anreicherung von PI(4,5)P₂-haltigen

endozytotischen Vesikeln in der Nähe des Zellkerns (Brown et al., 2001) Diese Effekte konnten in HeLa-Zellen reproduziert werden (Abb. 16).

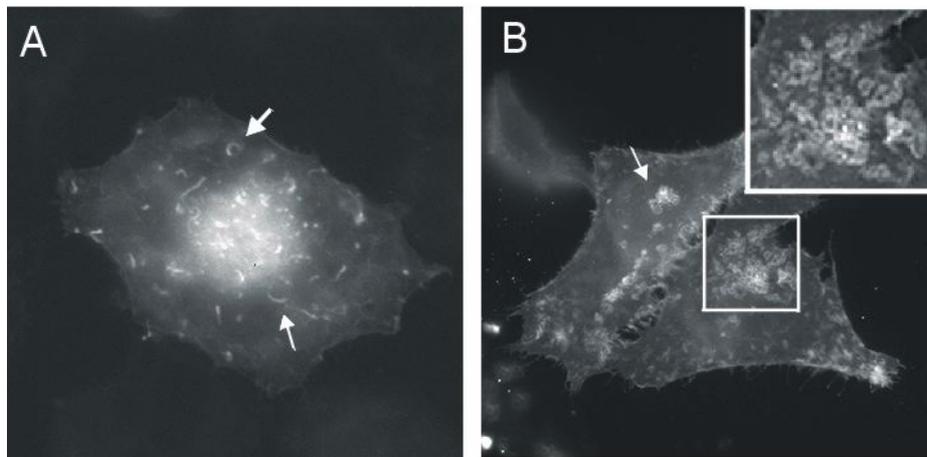


Abb. 16: Auswirkungen der Überexpression der PI(4)P-5-Kinase in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit PI(4)P5K-myc und GFP-Aktin (A) oder PI(4)P5K-myc und PH_(PLCδ)-YFP (B) cotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die lebenden Zellen untersucht. In den zusätzlich mit GFP-Aktin transfizierten Zellen sind deutlich Aktinschwänze zu erkennen (A), die sich in der gesamten Zellen ausbreiten. In den mit PH_(PLCδ)-YFP cotransfizierten Zellen ist neben charakteristischen Färbung der Plasmamembran eine Akkumulation PH_(PLCδ)-positiver Vesikel in der Nähe des Zellkerns sichtbar (B).

Um zu untersuchen, ob eine Beteiligung des Annexin 2 auch an diesen Strukturen vorliegt, wurden PI(4)P-5-Kinase überexprimierenden Zellen eingesetzt. Neben HeLa-Zellen wurden hier auch CHO-Zellen verwendet (Abb. 17), da in CHO-Zellen die gebildeten Aktinschwänze ausgeprägter und zahlreicher waren als in HeLa-Zellen. CHO-Zellen wurden mit PI(4)P-5-Kinase und Annexin 2-GFP cotransfiziert (Abb. 17A, B). Eine anschließende Färbung mit Phalloidin macht die Aktinschwänze in den Zellen sichtbar (Abb. 17A). Annexin 2 colokalisiert nur mit den Aktinschwänzen dicht unterhalb der Plasmamembran (Abb. 17B).

Bei einer Co-Transfektion von PI(4)P-5-Kinase und PH_(PLCδ)-YFP in HeLa-Zellen werden zahlreiche PH-Domäne positive Vesikel sichtbar (Abb. 17C). Eine Antikörperfärbung mit HH7 zeigt sowohl eine Colokalisierung des Annexin 2 mit der PH-Domäne an der Plasmamembran als auch mit den endozytotischen Vesikeln (Abb. 17D).

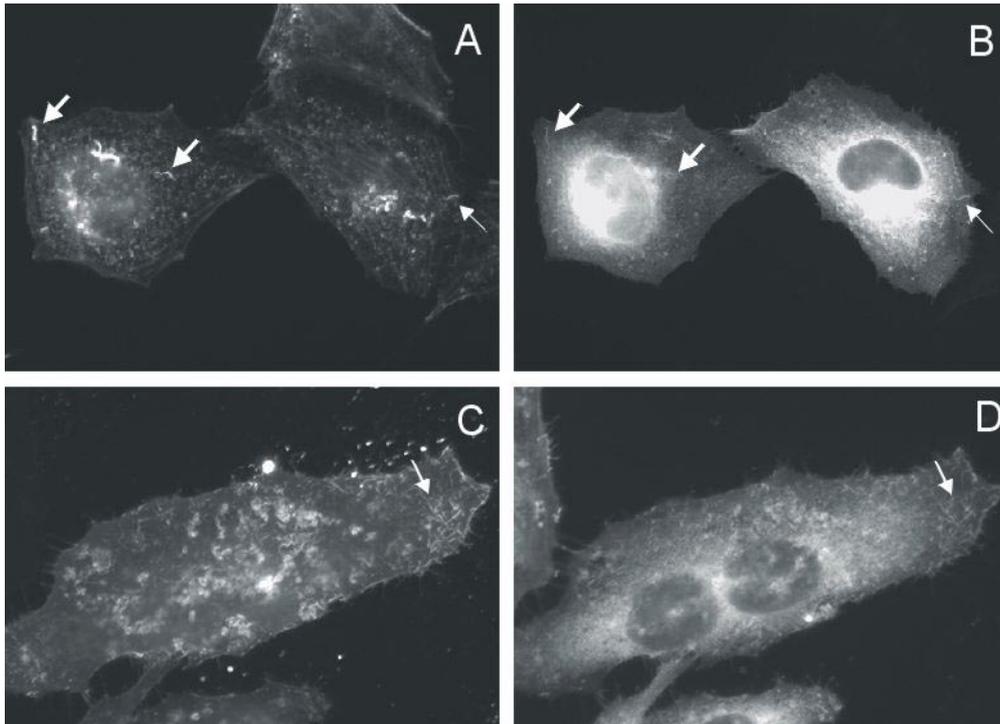


Abb. 17: Annexin 2 colokalisiert mit Aktinschwänzen und mit $\text{PH}_{(\text{PLC}\delta)}$ -positiven Vesikeln. CHO-Zellen wurden mit PI(4)P-5-Kinase und Annexin 2-GFP cotransfiziert (A,B). Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit TexasRed-Phalloidin inkubiert. Deutlich sind die Aktinschwänze in den Zellen zu erkennen (A). Neben der typischen Verteilung des Annexin 2 in der Zelle erkennt man eine Colokalisation mit den Aktinschwänzen (B). HeLa-Zellen wurden mit PI(4)P-5-Kinase und $\text{PH}_{(\text{PLC}\delta)}$ -YFP cotransfiziert (C, D). Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen Annexin 2 gerichtet ist (HH7), inkubiert. Der verwendete Sekundärantikörper war RedX konjugiert (D). Das Signal des $\text{PH}_{(\text{PLC}\delta)}$ -YFP ist an der Plasmamembran und ebenso an endozytotischen Vesikeln zu erkennen (C). Annexin 2 colokalisiert deutlich mit $\text{PH}_{(\text{PLC}\delta)}$ -YFP an der Plasmamembran und auch an den Vesikeln (D).

Die Erhöhung des $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -Gehaltes in der Zelle führt zur Bildung von Membranruffles, Aktinschwänzen und Clathrin-unabhängig generierten endozytotischen Vesikeln. Annexin 2 konnte in allen Fällen an diesen Strukturen nachgewiesen werden.

2 Endosomen assoziiertes Annexin 2

Es gibt zahlreiche Hinweise, daß Annexin 2 neben einer Assoziation mit der Plasmamembran auch an endozytotischen Prozessen beteiligt ist. So wurde Annexin 2 auf isolierten früh-endosomalen Membranen (Emans et al., 1993; Jost et al., 1997) sowie auf Recycling-Endosomen gefunden (Zeuschner et al., 2001). Es ist eines der wenigen Proteine, das in einem *in vitro* Fusionsassay für frühe Endosomen von der Donor- auf die Akzeptormembran übertragen wird (Emans et al., 1993).

2.1 Umverteilung des Annexin 2 während der Endocytose

In BHK-Zellen konnte endogenes Annexin 2 sowohl in subzellulären Membranfraktionen (Jost et al., 1997) als auch ultrastrukturell eindeutig in endosomalen Kompartimenten nachgewiesen werden (Zeuschner et al., 2001). Um auch in lebenden Zellen die mögliche Beteiligung von Annexin 2 in der Endozytose untersuchen zu können, wurden BHK-Zellen mit Annexin 2-GFP transfiziert. Als Endozytosemodell wurde hier die rezeptorvermittelte Aufnahme von Transferrin in die Zelle gewählt. Eisen-beladenes Transferrin bindet an seinen Rezeptor und wird Clathrin-abhängig in die Zellen aufgenommen. Gebundenes Eisen dissoziiert vom Transferrin ab, und Apo-Transferrin wird zusammen mit dem Rezeptor an die Plasmamembran zurücktransportiert, wo es erneut mit Eisen beladen werden kann.

Während des Transports erreicht das Transferrin unterschiedliche Kompartimente in der Zelle. Nach der Aufnahme über Clathrin-umhüllte Vesikel erreicht das Transferrin die frühen und die Sortierendosomen. Ein Teil des Apo-Transferrins kann bereits von dort direkt zurück zur Plasmamembran gelangen, während ein anderer Teil erst das Recycling-Kompartiment durchläuft und dann zurücktransportiert wird (Sheff et al., 2002).

24 Stunden nach der Transfektion mit Annexin 2-GFP wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Transferrin inkubiert und die Aufnahme des Transferrins in den lebenden Zellen verfolgt. Wie in Abbildung 18 zu sehen weist ektopisch exprimiertes Annexin 2-GFP in BHK-Zellen eine identische Verteilung wie das endogene Protein auf. Bereits nach 5 min Inkubationszeit erkennt man in der Zelle Transferrin-positive Vesikel (Abb. 18B), die sich in der Nähe der Plasmamembran befinden. Ein Vergleich mit dem Annexin 2-GFP-Signal (Abb. 18A) in der Zelle zeigt eine Colokalisierung mit früh-endosomalen Strukturen (Abb. 18C). Läßt man die Zellen 60 min kontinuierlich

Transferrin aufnehmen, so konzentriert sich das Transferrin perinukleär im Recycling-Kompartiment (Abb. 18E). Das Annexin 2-Signal ist unter den gegebenen Bedingungen in diesem Bereich ebenfalls deutlich angereichert (Abb. 18D). Während des Transports des Transferrins von der Plasmamembran in das Recycling-Kompartiment folgt Annexin 2 dem Transferrin. Mit Hilfe eines fluoreszierenden Fusionsproteins konnte in lebenden Zellen somit zum ersten Mal eine Umverteilung des Annexin 2 von der Peripherie zur perinukleären Region während des Transports eines Stoffes in der Zelle dokumentiert werden.

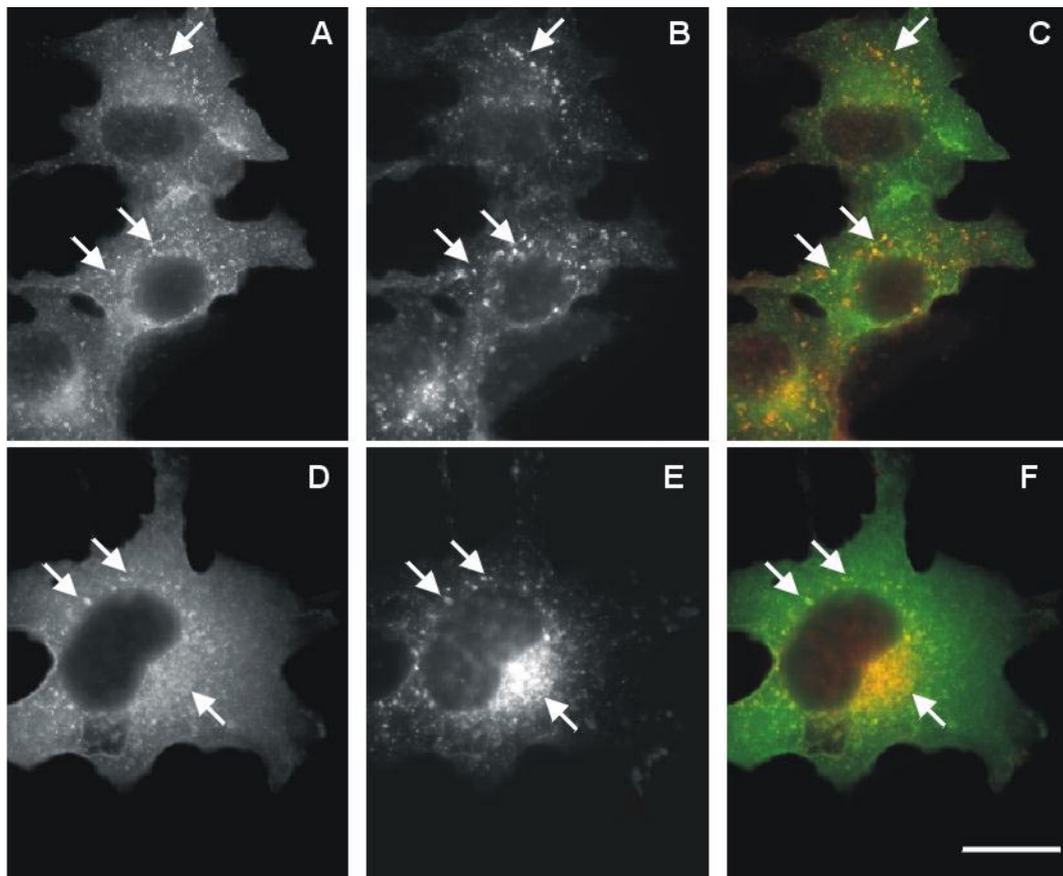


Abb. 18: Umverteilung des Annexin 2 während der Transferrin-Aufnahme. BHK-Zellen wurden mit dem Annexin 2-GFP-Konstrukt mittels Calciumphosphat-Methode transfiziert. Die Zellen wurden zunächst 30 min in IM-Medium inkubiert, anschließend für 5 min (A, B, C) oder 60 min (D, E, F) mit 50 µg/ml TexasRed-Transferrin bei 37°C inkubiert und schließlich lebend mikroskopiert. Die überlagerten Einzelbilder sind in C und F zu sehen. Neben der typischen Plasmamembranfärbung ist Annexin 2 auf vesikulären Strukturen zu erkennen (A), die mit Transferrin-positiven Vesikeln (B) nach 5 min Inkubation colocalisieren. Nach 60 min Inkubationszeit befindet sich der größte Anteil des Transferrins in der Nähe des Zellkerns im Recycling-Kompartiment (E). Annexin 2 konzentriert sich ebenfalls in die Nähe des Zellkerns (D) und ist auf den gleichen Strukturen wie das Transferrin zu finden (F). Balken 10 µm.

2.2 Homotypische Fusion früher Endosomen

Wie oben gezeigt, ist Annexin 2 in BHK-Zellen sowohl in den frühen als auch in den Recyclingendosomen partiell mit Transferrin assoziiert (siehe 2.1). Desweiteren ist Annexin 2 eines der wenigen Proteine, das in einem *in vitro* Fusionsassay früher Endosomen von der Donor- auf die Akzeptormembran übertragen wird (Emans et al., 1993). Ob Annexin 2 in beiden Fällen nur eine unterstützenden Funktion oder vielleicht sogar eine direkte Wirkung auf das Zusammenspiel der verschiedenen endosomalen Kompartimente haben könnte, wurde noch nicht geklärt. Deshalb ergab sich als nächste Fragestellung, ob durch Annexin 2 auch die homotypische Fusion früher Endosomen direkt beeinflußt werden kann.

Dazu wurden in einem *in vitro*-Fusionsassay nach Gorvel et al. (1991) zwei unterschiedlich markierte Populationen (Avidin und Biotin-HRP) früher Endosomen (EE) zur Fusion gebracht. Eine Fusion findet in Anwesenheit von Zytosol, Salzen und einem ATP-generierenden System statt. Als Negativkontrolle wurde ein ATP-degenerierendes System verwendet. Die Fusionsrate wurde durch Messung der HRP-Aktivität im immunpräzipitierten Avidin-Biotin-Komplex bestimmt und ist als Prozentangabe in Bezug auf den Kontrollwert (Avidin EE-bHRP EE = 100%) angegeben. Die im Assay eingesetzten, unterschiedlich markierten frühen Endosomen wurden über einen Saccharose-Gradienten angereichert und isoliert. Die Unversehrtheit der Vesikel wurde überprüft (Bomsel et al., 1990) und war stets höher als 70 %.

Es konnte bereits von Jost et al. (1997) gezeigt werden, daß für die Ca²⁺-unabhängige Bindung an Endosomen ein Bereich, der die Aminosäuren 15-24 der N-terminalen Domäne des Annexin 2 umfaßt, verantwortlich ist. Es sollte demzufolge untersucht werden, welchen Einfluß unterschiedliche Peptide, die der N-terminale Domäne des Annexin 2 entsprechen und die möglicherweise mit dem gesamten Protein um die Endosomenbindungsstelle kompetieren, auf die Fusionsrate haben.

Dazu wurde je eine isolierte Endosomenfraktion mit 20 µg Protein in den Fusionsassay eingesetzt. Wie in Abbildung 19 zu sehen wurde die Fusionsrate in Anwesenheit von ATP 100 % gesetzt (+ATP). In Abwesenheit von ATP ist eine Grundaktivität von 20 % messbar (-ATP). Bei Zugabe von ATP und 0,5 mg/ml des Peptids A2 PM1-27 ergibt sich eine Steigerung der Fusionsrate auf 120 % (+A2 PM1-27). Das verwendete Peptid A2 PM1-27 entspricht den Aminosäuren 1-27 der N-terminalen Domäne des Annexin 2, wobei die S100A10-Bindungsstelle durch zwei Punktmutationen deletiert ist.

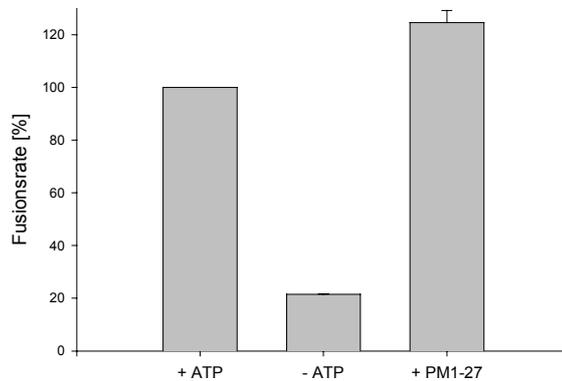


Abb. 19: A2 PM1-27 Peptid erhöht die EE-Fusion. Je 20 µg Protein isolierte Endosomenfraktion wurden in den Assays eingesetzt. Nach Inkubation für 45 min bei 37°C wurden die gebildeten Avidin-bHRP-Komplexe mittels Anti-Avidin gekoppelter Protein G-Magnetpartikel immunpräzipitiert und die HRP-Aktivität in den einzelnen Versuchsansätzen gemessen. Unter Zugabe von ATP findet eine homotypische Fusion der frühen Endosomen statt (100 %). In Abwesenheit von ATP beträgt die Fusionsrate nur 20 %. Bei Zugabe von ATP und dem Peptid A2 PM1-27 (0,5 mg/ml) erhöht sich die Rate auf 120 %.

Der Einfluß zweier weiterer Peptide, die aus der N-terminalen Domäne abgeleitet sind, wurde ebenfalls untersucht. A2 Ac1-14 entspricht den ersten 14 Aminosäuren des Annexin 2, die auch die S100A10-Bindungsstelle beinhalten. Das Peptid weist eine Acetylierung der ersten Aminosäure auf. A2 N1-14 besitzt die gleiche Aminosäuresequenz, ist jedoch nicht acetyliert. König et al. (1998) konnten zeigen, dass durch Zugabe des Peptids A2 Ac1-14 aber nicht durch A2 N1-14 der Annexin 2₂/S100A10₂-Komplex dissoziiert.

Setzt man diese beiden Peptide in den Fusionsassays ein, so ergibt sich in beiden Fällen eine deutliche Inhibition der Fusion (Abb. 20). Die Werte bei Zugabe eines ATP-generierenden oder ATP-degenerierenden Systems betragen 100 % bzw. 16 %. In Anwesenheit von 0,5 mg/ml A2 Ac1-14 sinkt die Fusionsrate auf 63 %. Das Peptid A2 N1-14 erniedrigt die Fusionsrate auf 56 % bei gleicher Konzentration.

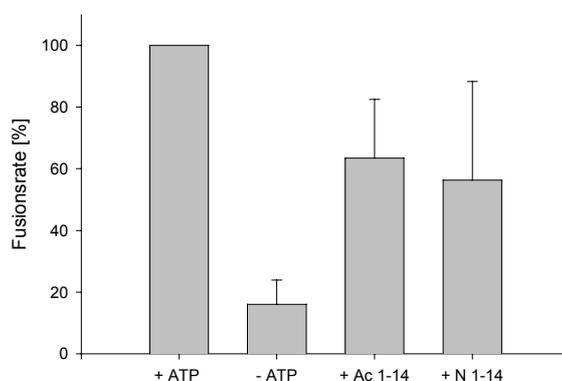


Abb. 20: A2-Peptide A2 Ac1-14 und A2N1-14 inhibieren die homotypische Fusion.

Je 20 µg Protein der isolierten Endosomenfraktion wurden in die Assays eingesetzt. Nach Inkubation für 45 min bei 37°C wurden die gebildeten Avidin-bHRP-Komplexe immunpräzipitiert und die HRP-Aktivität in den einzelnen Versuchsansätzen gemessen. Unter Zugabe von ATP findet eine homotypische Fusion der frühen Endosomen statt (100 %). In Abwesenheit von ATP beträgt die Fusionsrate nur 16 %. Bei Zugabe von ATP und 0,5 mg/ml der Peptide A2 Ac1-14 oder A2 N1-14 sinkt die Fusionsrate auf 63 % bzw. 56 %.

Spezifische Antikörper ermöglichen es gezielt Epitope zu blockieren und so mit bestimmten Funktionen von Proteinen zu interferieren. Ebenso können durch Bindung von Antikörpern Proteine präzipitiert werden, die dann nicht mehr zur Verfügung stehen.

Der Einfluß von interferierenden Antikörpern auf die Fusionrate wurde deshalb als nächstes in den Fusionsassays getestet. Um hohe Antikörper-Konzentrationen erreichen zu können, wurde zunächst der Anti-Annexin 2-Antikörper (HH7) über ein Protein G-Sepharose Säule aufgereinigt und ankonzentriert (Abb. 21).

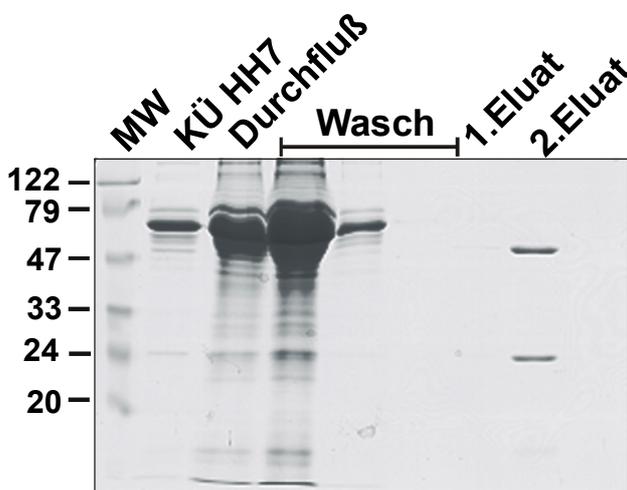


Abb. 21. Aufreinigung des Antikörpers HH7. Der monoklonale Maus-Antikörper HH7 wurde an die Protein G-Sepharose gebunden. Nach gründlichem Waschen konnte der Antikörper ohne Verunreinigung durch andere Proteine eluiert werden. Die gesamte Menge des an das Säulenmaterial gebundenen Antikörpers befindet sich im 2. Eluat. Von den Eluaten wurden 1/100 des Volumens zur Analyse im SDS-Gel aufgetragen, von allen anderen Fraktionen wurde 1/10 eingesetzt.

Es wurden ca. 300 µg Antikörper isoliert und in HB-Medium umgepuffert und aufkonzentriert (Endkonzentration 0,5 mg/ml). Unspezifische Maus-IgGs wurden ebenfalls in HB aufkonzentriert.

12 µg dieser aufgereinigten Antikörper (HH7) bzw. 12 µg Kontroll-IgGs wurden in den Fusionsassays eingesetzt (Abb. 22). Die Proteinmenge betrug dabei 14 µg Protein je Endosomenfraktionen. Die Fusionsrate in Anwesenheit von ATP wurde auf 100 % festgesetzt. In Abwesenheit von ATP wurde eine Rate von 40% gemessen. Durch Zugabe von HH7 wird die Fusionsrate deutlich auf 77 % verringert. Eingesetzte unspezifische Maus-IgGs bewirken eine Erniedrigung der Rate auf 56 %.

Die eingesetzten spezifischen Anti-Annexin 2-Antikörper scheinen einen Einfluß auf die Fusion früher Endosomen zu haben. Jedoch liegt im Ansatz mit Kontroll-IgGs die gemessene Fusionsrate noch unterhalb derjenigen in Anwesenheit von spezifischen

Antikörpern. Allein durch Zugabe von Immunglobulinen wurde die Fusion bereits inhibiert. Eine spezifische Wirkung durch interferierende Antikörper konnte hier nicht gezeigt werden.

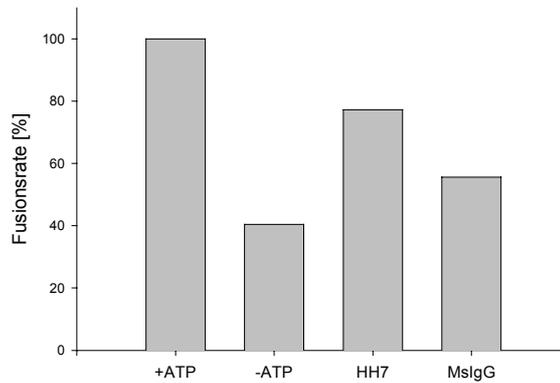


Abb. 22: Immunglobuline inhibieren unspezifisch die EE-Fusion. Je 14 µg Protein isolierte Endosomenfraktion wurden in die Assays eingesetzt. Nach Inkubation für 45 min bei 37°C wurden die gebildeten Avidin-bHRP-Komplexe immunopräzipitiert und die HRP-Aktivität in den einzelnen Versuchsansätzen gemessen. Unter Zugabe von ATP findet eine homotypische Fusion der frühen Endosomen statt (100 %). In Abwesenheit von ATP beträgt die Fusionsrate 40 %. Bei Zugabe von ATP und 12 µg HH7 oder Maus-IgGs sinkt die Fusionsrate auf 77 % bzw. 56 %.

Durch Abreicherung des Annexin 2-Gehaltes im Zytosol sollte die mögliche Funktion des endosomal-assoziierten Annexin 2 in einer homotypische Fusion früher Endosomen deutlich hervortreten, da weniger Annexin 2 zur Verfügung steht und somit eine mögliche Rekrutierung des zytosolischen Annexin 2-Pools an die Endosomen nur in geringem Umfang stattfinden sollte. Annexin 2 wurde deshalb mit HH7-gekoppelten Protein G-Magnetpartikeln aus dem Zytosol präzipitiert. Kontroll-Zytosol wurde auf die gleiche Art mit unspezifischen Maus-IgGs behandelt. Das jeweils so depletierte Zytosol wurde in die Fusionsassays mit 14 µg Protein je isolierter Endosomenpopulation eingesetzt. Zusätzlich wurden 12 µg Antikörper hinzugegeben, um mit gegebenenfalls noch vorhandenen Annexin 2 zu interferieren. Vergleicht man die Fusionsrate von depletiertem mit nicht-depletiertem Zytosol in Abwesenheit von Antikörpern, so ergibt sich nur ein geringer Unterschied in der Fusionsrate, der jedoch vernachlässigbar ist (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 23 beschreibt die Experimente mit depletiertem Zytosol in Gegenwart von Antikörpern. Die Fusionsrate in Anwesenheit von ATP wurde auf 100 % festgesetzt. In Abwesenheit von ATP dagegen beträgt die Fusionsrate in dieser Serie 41 %. Durch Zugabe von 12 µg HH7 oder Maus-IgGs zum depletierten Zytosol wird die Fusionsrate auf 54 % bzw. 43 % reduziert. Diese Werte sind nur geringfügig höher als die Fusionsrate in Abwesenheit von ATP, so daß eine Fusion in beiden Fällen kaum stattgefunden hat. Die

Inhibition ist jedoch nicht spezifisch durch die Abreicherung des Annexin 2 verursacht worden, da die eingesetzten Kontrollantikörper ähnliche Ergebnisse zeigen.

Durch Abreicherung von Annexin 2, welches sich im Zytosol befindet, und Zugabe interferierender Antikörper konnte nicht bestätigt werden, daß Annexin 2 die Fusion beeinflusst, da die durchgeführten Kontrollen eine ähnlich Inhibition zeigten.

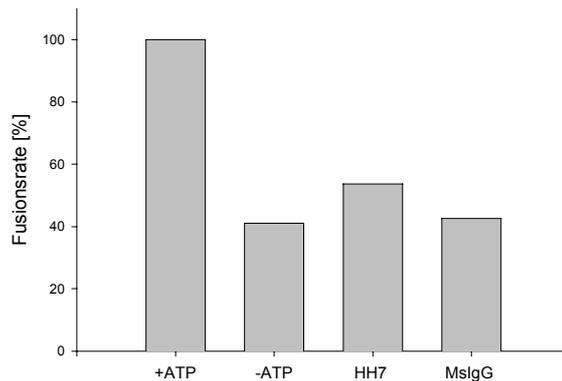


Abb. 23: Immunglobuline inhibieren die Fusion auch mit depletiertem Zytosol.

Zytosol wurde mit HH7 oder Maus-IgG depletiert. Je 14 μg isolierte Endosomenfraktion wurden für jeden Versuchsansatz verwendet. Nach 45 min Inkubation wurden die gebildeten Avidin-bHRP-Komplexe immunpräzipitiert und die HRP-Aktivität bestimmt. Unter Zugabe von ATP findet auch mit vorbehandeltem Zytosol eine homotypische Fusion der frühen Endosomen statt (100 %). In Abwesenheit von ATP beträgt die Fusionsrate 41 %. Bei Zugabe von 12 μg HH7 oder Maus-IgGs in Anwesenheit von ATP sinkt die Fusionsrate auf 54 % bzw. 43 %. Sie entspricht damit der Rate in Abwesenheit von ATP.

Im Anschluß an die Fusionsassays wurde das Maß der Annexin 2-Depletion im Zytosol sowie der Anteil des präzipitierten Annexin 2 an den Magnetpartikeln untersucht (Abb. 24). In der Westernblotanalyse des mit HH7-depletierten Zytosols zeigte sich nur eine geringe Abreicherung des Annexin 2-Gehaltes im Vergleich zum nicht behandelten Zytosol. Deutlich ist jedoch die Immunpräzipitation des Annexin 2 aus dem Zytosol an die Beads zu erkennen. Erstaunlicherweise zeigten die Gelspuren, in denen die präzipitierten Proteine der mit unspezifischen Maus IgGs gekoppelten Magnetpartikel eingetragen wurden, ebenso ein Annexin 2 Signal, d. h. Annexin 2 wurde auch von den unspezifischen Maus IgGs immunpräzipitiert.

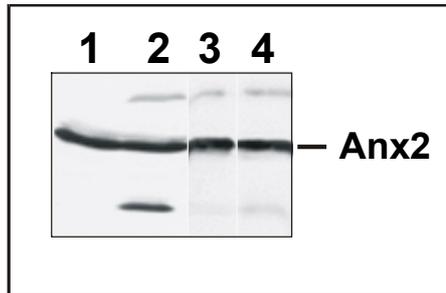


Abb. 24: Westernblotanalyse des depletierten Zytosols. Zytosol wurde dreimal mit HH7- oder mit unspezifischen Maus IgGs-gekoppelten Magnetpartikeln inkubiert und anschließend im Westernblot der Annexin 2-Gehalt in den verschiedenen Proben mit dem monoklonalen Antikörper HH7 detektiert. Der Vergleich von unbehandelten (Spur1) und mit HH7-behandelten Zytosol (Spur2) zeigt nur eine geringe Differenz im Annexin 2-Gehalt. Deutlich ist eine Anreicherung von Annexin 2 an den mit HH7-gekoppelte Magnetpartikel zu sehen (Spur3). Auch mit unspezifischen Maus-IgGs gekoppelte Magnetpartikel weisen ein Annexin 2-Signal auf (Spur4).

Der hier neu etablierte *in vitro*-Fusionsassay früher Endosomen wird bereits durch die Zugabe verschiedener Agenzien, wie z.B. Peptide und Antikörper, so gestört werden, daß die homotypische Fusion früher Endosomen unspezifisch inhibiert wird. Mit Ausnahme eines Peptids zeigen die anderen eingesetzten Peptide eine massive Inhibition der Fusionsrate. Durch das Peptid A2PM1-27 wird dagegen spezifisch die Fusion früher Endosomen gefördert (120 %).

2.3 Einfluß der N-terminal Domäne des Annexin 2 auf endozytische Prozesse

Wie Jost et al. (1997) zeigen konnten, findet die Assoziation von Annexin 2 mit endosomalen Strukturen Ca^{2+} -unabhängig statt. Die Membranassoziation an die Endosomen wird dabei von den Aminosäuren 15-24 in der N-terminalen Domäne vermittelt. Ebenso ist auch die Zusammensetzung der Lipide und der Anteil von Cholesterin in der Membran von entscheidender Bedeutung (König and Gerke, 2000; Zeuschner et al., 2001).

Das in den *in vitro*-Fusionassays verwendete Peptid A2PM1-27, das eine spezifische Erhöhung der Fusionsrate bewirkt, beinhaltet ebenfalls die Aminosäuren 15-24 der N-terminalen Domäne. Als logische Konsequenz ergab sich daraus, als nächstes den Einfluß der N-terminalen Domäne auf endozytische Prozesse in lebenden Zellen zu untersuchen. Um dieses zu ermöglichen, wurde ein Fusionsprotein (Nanx2-GFP) benutzt. In diesem Konstrukt war die N-terminale Domäne (Aminosäure 1-27) des humanen Annexin 2, die eine durch Mutation inaktivierte S100A10-Bindungsstelle enthielt, mit GFP fusioniert worden.

HeLa-Zellen wurden mit dem Nanx2-GFP-Konstrukt transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 50 µg/ml fluoreszenzmarkiertem Transferrin für 60 min inkubiert. Zur Kontrolle wurden HeLa-Zellen nur mit einem GFP-Konstrukt transfiziert und analog behandelt (Abb. 25).

Nicht-transfizierte Zellen zeigen eine perinukleäre Akkumulation des Transferrins im Recycling-Kompartiment, während Nanx2-GFP exprimierende Zellen (Abb. 25A) eine weitaus diffusere Verteilung des Transferrins ohne Konzentration in Kernnähe aufweisen (Abb. 25B). In den mit Kontrollvektor-transfizierten Zellen (Abb. 25C) erkennt man ebenso wie in den nicht-transfizierten Zellen eine perinucleär Akkumulation des Transferrins (Abb. 25D).

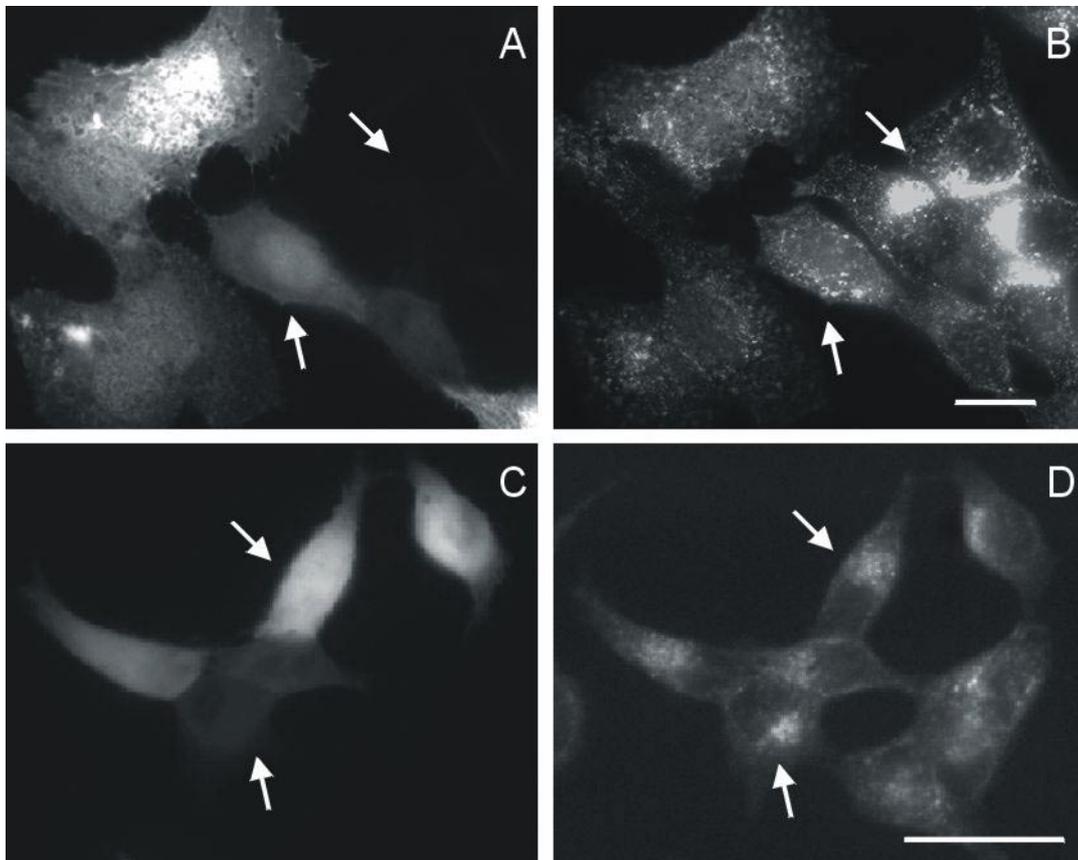


Abb. 25: Nanx2-transfizierte Zellen zeigen Veränderung in der Verteilung von aufgenommenem Transferrin. HeLa-Zellen wurden mit Nanx2-GFP- (A, B) oder GFP-Konstrukten (C, D) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen 30 min in IM inkubiert, bevor sie für 60 min mit 50 µg/ml TexasRed-Transferrin bei 37°C inkubiert wurden (B, D). Nanx2-GFP exprimierende Zellen (A) zeigen eine diffuse Transferrin-Verteilung (B), während GFP (C) exprimierende Zellen oder nicht-transfizierte Zellen (in A und C) eine Akkumulation des Transferrins im Recycling-Kompartiment in Kernnähe zeigen (B, D). Balken 10 µm.

Es konnte hier eindeutig gezeigt werden, daß durch Überexpression der N-terminalen Domäne von Annexin 2 in HeLa-Zellen die Verteilung des aufgenommenen Transferrins verändert wird. Als nächstes schloß sich somit die Untersuchung an, ob anderer Transportwege ebenfalls beeinflußt sind.

Neben der Wiederverwertung von Liganden, z.B. beim Transferrin, gibt es andere Clathrin-vermittelte Aufnahmemodelle, in denen die Liganden abgebaut werden. LDL (low density lipoprotein) wird über seinen Rezeptor in die Zelle aufgenommen. In den frühen Endosomen dissoziiert das LDL vom Rezeptor und wird zur Degradation den Lysosomen zugeführt, während der Rezeptor zurück zur Plasmamembran transportiert wird. Desweiteren können Stoffe auch ohne Bindung an Rezeptoren endozytiert werden. Solche Stoffe werden über die Flüssigphase aufgenommen und zur Degradation den Lysosomen zugeführt.

Als Modellsysteme wurden hier die LDL- und die Flüssigphasenaufnahme von Dextran gewählt. Nanx2-GFP exprimierende HeLa-Zellen wurden 45 min mit 50 µg/ml fluoreszenzmarkiertem LDL bei 37°C inkubiert und anschließend fixiert. Wie in Abbildung 26 zu sehen zeigen transfizierte und nicht-transfizierte Zellen (Abb. 26C) das gleiche LDL-Signal (Abb. 26D). LDL ist perinukleär in kleinen Vesikeln angeordnet. Es konnte somit gezeigt werden, daß eine Veränderung des LDL-Transportweg durch die Überexpression der N-terminalen Domäne des Annexin 2 nicht hervorgerufen wird.

Desweiteren wurde die Flüssigphasenaufnahme untersucht. Nanx2-GFP transfizierte HeLa-Zellen wurden 45 min bei 37°C mit 0,5 mg/ml fluoreszenzmarkiertem Dextran inkubiert und anschließend fixiert (Abb. 26A, B). In allen Zellen können punktförmige Strukturen des aufgenommenen Dextrans beobachtet werden (Abb. 26B). Dabei zeigen Nanx2-GFP überexprimierende Zellen und nicht-transfizierte Zellen eine identische Verteilung des Dextrans in der Zelle (Abb. 26A).

Interessanterweise wird somit durch die Überexpression der N-terminalen Domäne des Annexin 2 selektiv nur die Route des Transferrin in der Zelle beeinflußt. Transportwege, bei denen die über Rezeptoren oder über die Flüssigphase aufgenommenen Stoffe zu den Lysosomen gelangen, bleiben dagegen unverändert.

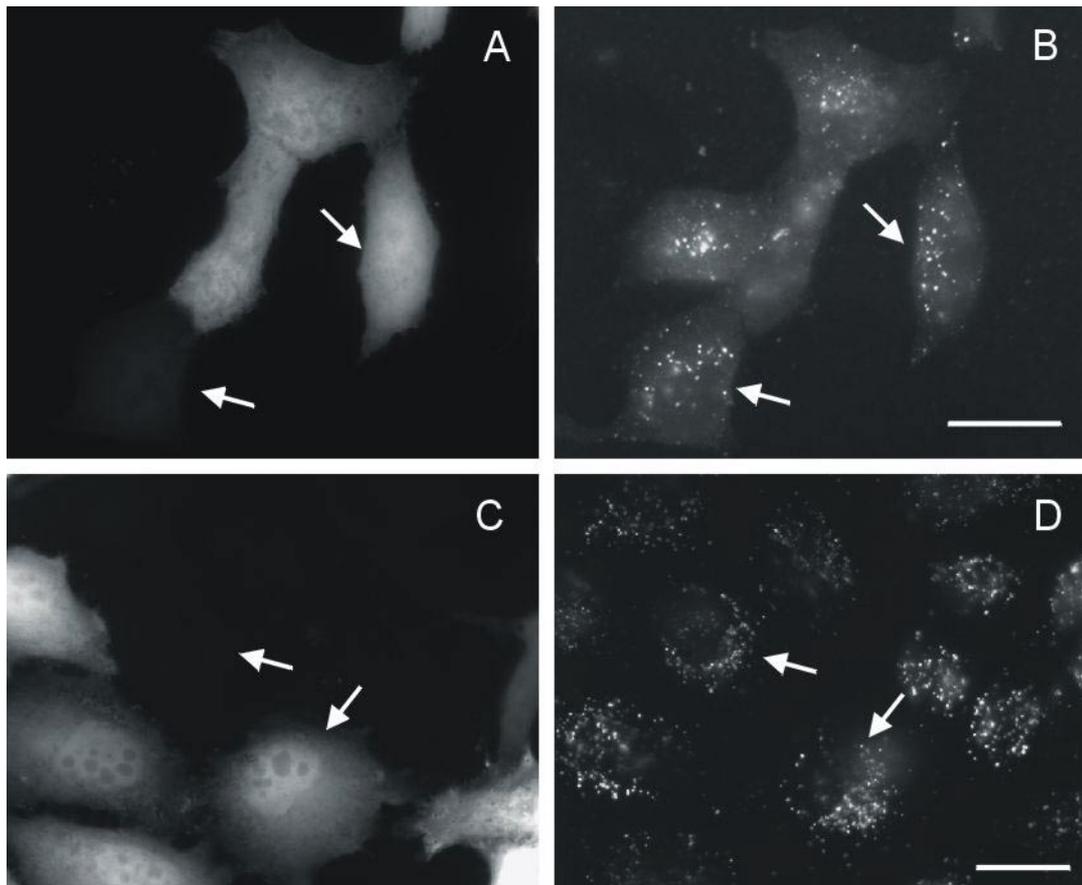


Abb. 26: Nanx2-GFP exprimierende Zellen zeigen weder eine Veränderung in der LDL- noch in der Dextran-Aufnahme. HeLa-Zellen wurden mit dem Nanx2-GFP-Konstrukt transfiziert (A-D). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen entweder mit 0,5 mg/ml TMR-Dextran (10 kDa) (A, B) oder 50 µg/ml DiI-LDL (C, D) für 45 min bei 37°C in IM-Medium inkubiert. Die transfizierten und nicht-transfizierten Zellen zeigen identische Muster in der Dextran-Aufnahme (A, B) und in der LDL-Aufnahme (C, D). Durch die Überexpression der N-terminalen Domäne werden keine Veränderungen in diesen beiden Transportwegen herbeigeführt. Balken 10 µm.

Die bisher nur morphologisch im Mikroskop festgestellten Veränderungen in der Verteilung des Transferrins konnten entweder durch eine insgesamt verringerte Aufnahme­rate, durch die Erhöhung des Rücktransportes an die Plasmamembran oder durch eine veränderte Morphologie des Recyclingkompartiments hervorgerufen worden sein. So wurde im weiteren durch Ermittlung der Aufnahme- und Recyclingrate der Einfluß der N-terminalen Domäne des Annexin 2 auf diese beiden Raten näher charakterisiert.

Zur Messung der Aufnahme­rate wurden HeLa-Zellen 24 h vor der Versuchsdurchführung mit Nanx2-GFP- oder GFP-Konstrukten transfiziert. Die Zellen wurden bis zu 60 min mit 6 µg/ml HRP-Transferrin inkubiert. Anschließend wurden Zellysate hergestellt und die Aktivität der Peroxidase in diesen bestimmt und in Verhältnis zur Proteinmenge gesetzt.

Für jeden Zeitpunkt wurden Dreifach-Werte aufgenommen. In Abbildung 27 wird die Aufnahme rate im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge (HRP/Protein) dargestellt.

Die Aufnahme rate in den Nanx2-GFP und GFP transfizierten Zellen unterscheidet sich nicht voneinander. Der Peroxidaseanteil steigt kontinuierlich in Abhängigkeit von der Zeit, bis nach etwa 30 min ein Plateau erreicht wird.

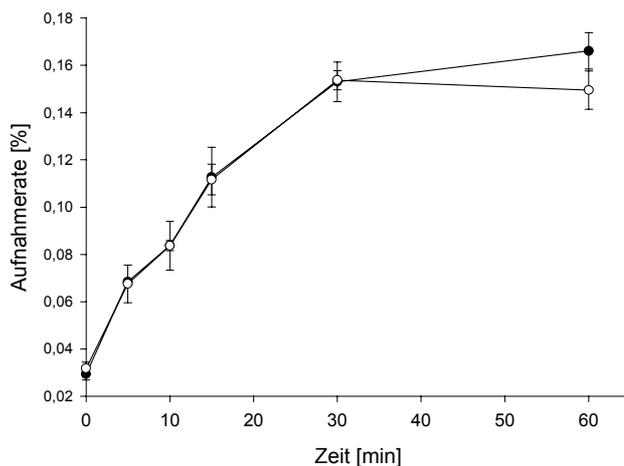


Abb. 27: HRP-Tf-Aufnahme in Nanx2-GFP und GFP exprimierenden HeLa-Zellen. Nanx2-GFP und GFP exprimierende Zellen wurden bis zu 60 min mit 6 µg/ml HRP-Tf inkubiert. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden die Zellen lysiert und als Maß für die Transferrin-Internalisierung die HRP-Aktivität im Lysat bestimmt. Die Aufnahme rate in Nanx2-GFP (●) und GFP(o) unterscheidet sich nicht.

Zur Messung der Recyclingrate wurden Nanx2-GFP und GFP transfizierte Zellen 5 min mit 2 µg/ml HRP-Tf inkubiert. Es wurden jeweils Dreifach-Werte aufgenommen. Um den Anteil von unspezifischer, nicht-rezeptorvermittelter Aufnahme messen zu können, wurde ein Ansatz mit einem 100-fachen Überschuß an nicht-markiertem Transferrin inkubiert. Nach gründlichem Waschen und Entfernung des an der Oberfläche gebundenen Transferrins wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben vom Überstand genommen. Schließlich wurde der Überstand vollständig abgenommen, die Zellen nochmals gewaschen und lysiert. Anschließend wurde die Peroxidase-Aktivität in den Proben, im Überstand, in den Waschschritten und im Zellysat gemessen. Die ermittelte Aktivität in den Proben wurde auf die Gesamtaktivität bezogen und graphisch als Recyclingrate dargestellt (Abb.28).

Nanx2-GFP exprimierende Zellen zeigen eine etwas höhere Recyclingrate als GFP-exprimierende Zellen. In den ersten Minuten sind beide Kurven nahezu identisch. Nach 20 min zeigt sich jedoch ein leichter Anstieg der Rate in Nanx2-GFP exprimierenden Zellen, der sich im weiteren Verlauf manifestiert.

Die mikroskopisch erhaltenen Daten konnten durch die durchgeführten biochemischen Analysen ergänzt werden. In Nanx2-GFP exprimierenden Zellen ist die Aufnahme von Transferrin nicht verändert, sie weisen jedoch eine geringe Erhöhung der Recyclingrate auf.

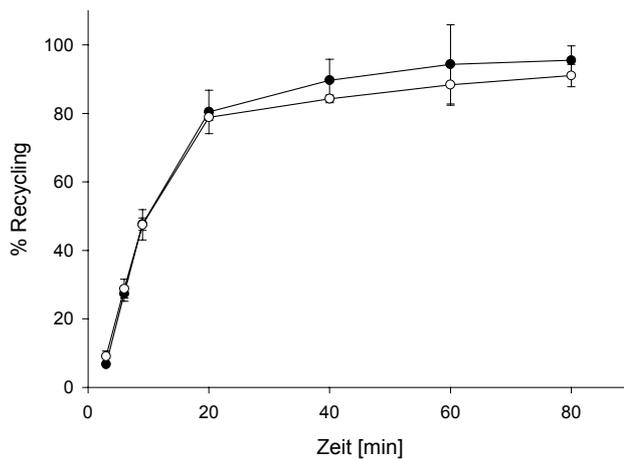


Abb. 28: Transferrin-Recycling in Nanx2-GFP oder GFP exprimierenden HeLa-Zellen. Nanx2-GFP und GFP exprimierende Zellen wurden bei 37°C 5 min mit 2 µg/ml HRP-Tf inkubiert. An der Oberfläche gebundenes HRP-Tf wurde entfernt und die Zellen erneut bei 37°C inkubiert. Proben vom Überstand wurden in bestimmten Zeitintervallen entnommen. Der prozentuale Anteil der HRP-Aktivität in den Proben wurde auf die Gesamtaktivität bezogen. GFP-transfizierte Zellen (○) zeigen nach 20 min eine geringere Recyclingrate als Nanx2-GFP exprimierende Zellen (●).

Aufgrund der durchgeführten Versuche konnte hier eindeutig gezeigt werden, daß die N-terminale Domäne des Annexin 2 eine Veränderung im Recyclingverhalten des Transferrins hervorruft. Die Aufnahme rate oder der Transport anderer Stoffe zu den Lysosomen bleiben dagegen unbeeinflusst. Annexin 2 scheint somit eine Rolle bei der Sortierung und Regulierung des Transferrintransports zu spielen.

2.4 Selektive Reduktion der Expression des endogenen Annexin 2 mittels kurzer doppelsträngiger RNA-Oligos (siRNA)

RNA-Interferenz (RNAi) ermöglicht es, in schneller und einfacher Weise die Menge einer spezifischen mRNA und somit die des codierenden Proteins zu verringern (Bass, 2000; Hannon, 2002). Kurze interferierende RNA-Duplexe (siRNA) werden durch Transfektion in die Zelle eingebracht. Die siRNAs fördern spezifisch den Abbau von mRNA, die homolog zu dieser Sequenz sind. Das von der mRNA codierte entsprechende Protein wird nicht mehr translatiert, was eine spezifische Expressionsverringerung des Zielproteins in der Zelle zur Folge hat. Elbashir et al. (2001) konnten zum ersten Mal zeigen, dass die siRNA-Technik auch in Säugerzellen anwendbar ist.

Mittels dieser neuen siRNA-Technik sollte zunächst untersucht werden, ob eine spezifische Expressionsverminderung auch für Annexin 2 erzielt werden kann. Dazu wurden HeLa-Zellen mit dem siRNA-Duplex ha2.3 transfiziert, und 48 h nach der Transfektion wurde die Expression des Annexin 2 in den Zellen untersucht.

In der Immunfluoreszenz erkennt man eine massive Verringerung des Annexin 2-Signals (Abb. 29), die deutlich in etwa 80% in den Zellen auftritt. Bei der Analyse der verbleibenden Annexin 2 Expression ist zudem der verwendete Antikörper von entscheidender Bedeutung. Interessanterweise zeigt der monoklonale Antikörper HH7 in den transfizierten Zellen kein Signal (Abb. 29A), während bei Färbung mit dem polyklonalen Antikörper msa419 auch in den expressionsverminderten Zellen deutlich ein Signal an der Plasmamembran hervortritt (Abb. 29B), welches auch 72 h oder 96 h nach der Transfektion noch detektiert werden kann (nicht gezeigt).

In der Westernblotanalyse ist die Verringerung des Annexin 2-Gehaltes in den Zellen ebenfalls deutlich zu sehen. Abbildung 29C zeigt in Spur 1 ein starkes Annexin 2-Signal der nicht-transfizierten HeLa-Zellen, während das Signal der ha2.3-transfizierten Zellen (Spur 2) wesentlich schwächer ist.

Um die Spezifität des RNA-Oligos ha2.3 zu überprüfen, wurde außerdem die Expression eines Proteins Annexin 1 untersucht, welches die größte Homologie zum Annexin 2 aufweist. Die Detektion von Annexin 1 mit dem polyklonalen Antikörper r656 in den gleichen SDS-Gelproben der nicht-transfizierten (Spur 3) und ha2.3-transfizierten Zellen (Spur 4) zeigt eine identische Signalstärke.

Demzufolge konnte durch Transfektion des RNA-Oligos ha2.3 eine spezifische und selektive Reduktion der Annexin 2-Expression erreicht werden.

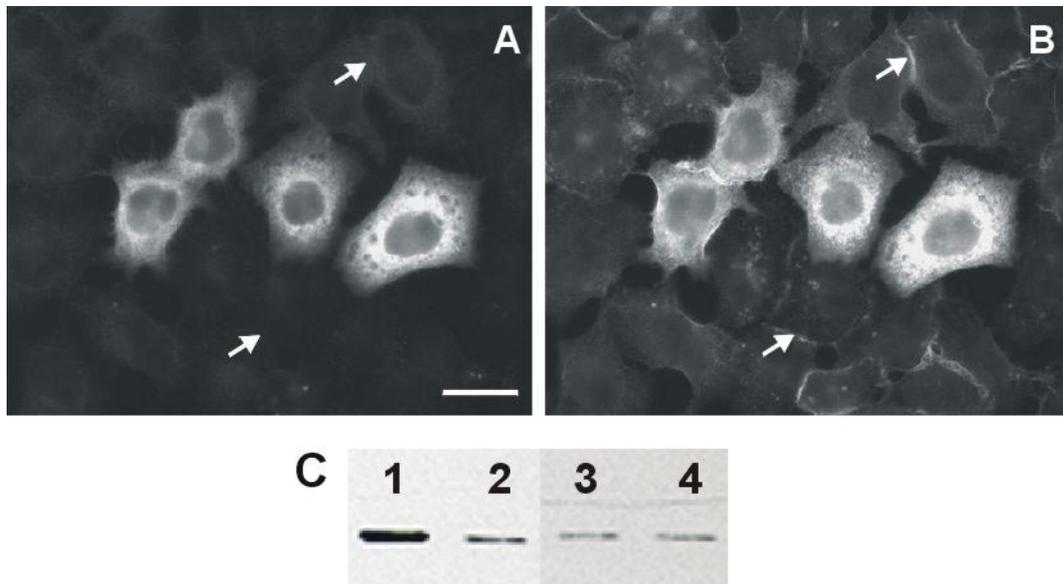


Abb. 29: Spezifische Reduktion des endogenen Annexin 2-Gehaltes. HeLa-Zellen wurden mit dem siRNA-Oligo ha2.3 transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mittels Immunfluoreszenz (A, B) und Westernblot (C) analysiert. Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit HH7 (A) und msa419 (B) coge-färbt. Nur wenige Zellen zeigen ein Annexin 2 Signal. In ca. 80% der Zellen ist die Expression von Annexin 2 verringert. (A). Auffällig ist jedoch die Plasmamembranfärbung in Annexin 2 reduzierten Zellen bei Inkubation mit msa419 (B), während zytosolisches Annexin 2 auch dort kaum detektiert werden kann. Im Westernblot wurde in Spur 1 und Spur 3 Lysat aus Wildtypzellen eingetragen und in Spur 2 und Spur 4 Lysat der ha2.3 transfizierten Zellen. Spur 1 und Spur 2 sind mit HH7 gefärbt. Deutlich ist die Abreicherung von Annexin 2 in Spur 2 zu sehen. Spur 3 und Spur 4 wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Annexin 1 (r656) gefärbt. Beide Spuren zeigen eine identische Signalstärke. Die Expression von Annexin 1 wird nicht durch ha2.3 beeinflusst.

Hieraus ergab sich die Möglichkeit, die Auswirkungen der reduzierten Annexin 2 Expression auf endozytotische Prozesse zu untersuchen. Dazu wurden HeLa-Zellen mit dem RNA-Oligo ha2.3 transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen nach Behandlung in Serum-freien Medium für 5 min mit fluoreszenzmarkiertem Transferrin inkubiert, gewaschen und für weitere 25 min in Transferrin-freiem Medium inkubiert. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit Antikörpern gegen rab11 und Annexin 2 (HH7) gefärbt (Abb. 30). In Abbildung 30C sind ha2.3 transfizierte Zellen neben Annexin 2 exprimierenden Zellen zu erkennen. In transfizierten Zellen befindet sich das Transferrin überwiegend in einer perinukleären Region massiv konzentriert, während in Annexin 2-exprimierenden Zellen dagegen nur wenig Transferrin in Zellkernnähe nachzuweisen ist (Abb. 30B). Die Inkubation mit rab11-Antikörpern, einem Marker für Recyclingendosomen (Ullrich et al., 1996; Trischler et al., 1999; Sonnichsen et al., 2000),

zeigt eine Färbung in der Nähe des Zellkerns (Abb 30B). Transferrin colokalisiert hier mit rab11-positiven Strukturen (Abb. 30D). In den Zellen mit reduzierter Annexin 2-Expression befindet sich Transferrin unter diesen Versuchsbedingungen in den rab11-positiven Recyclingendosomen, während Annexin 2 exprimierende Zellen keine derartig akkumulierte Strukturen aufweisen, sondern eher eine diffusere Verteilung des rab11 zeigen. Bei den gewählten Pulse/Chase-Zeiten ist Transferrin in diesen nicht behandelten Zellen bereits weitestgehend zur Plasmamembran zurückgeführt worden, d. h. es hat das Recyclingkompartiment verlassen.

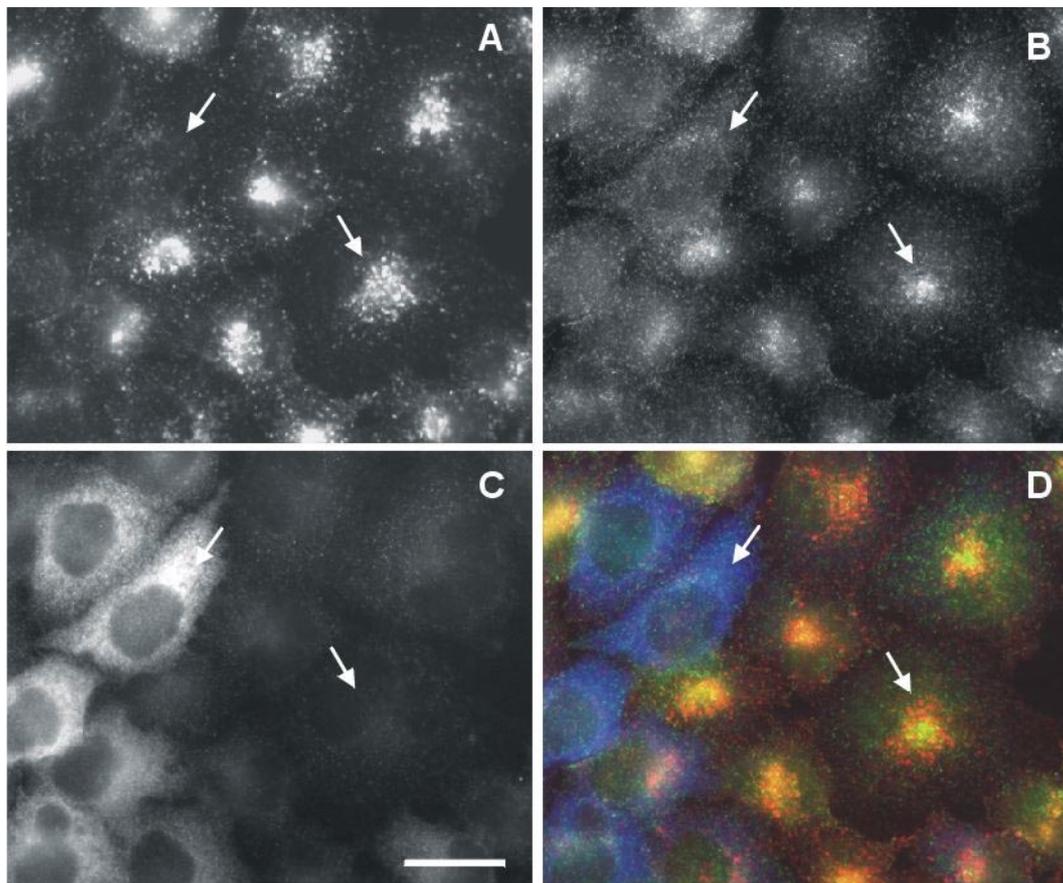


Abb. 30: Zellen mit verminderter Annexin 2 Expression zeigen eine Akkumulation des Transferrin in rab11-positiven Strukturen. 48 h nach der Transfektion mit ha2.3 wurden die Zellen 5 min mit 30 µg/ml TexasRed-Transferrin markiert und weitere 25 min in Transferrin-freiem Medium inkubiert (A). Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen Annexin 2 (HH7) (C) und einem polyklonalen Antikörper gegen rab11 (B) inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden G anti Ms AMCA und G anti Rb Cy2 eingesetzt. Deutlich ist eine Colokalisation des Transferrins mit rab11-positiven Strukturen in Zellen, mit verminderten Annexin 2-Gehalt zu erkennen. Annexin 2 exprimierende Zellen zeigen keine massive Konzentration des Transferrin in den Recyclingendosomen. Die Triplemarkierung verdeutlicht dieses zusätzlich (blau: Annexin 2; rot: Transferrin; grün: rab11) (D). Balken 10 µm.

Es konnte gezeigt werden, daß die Verringerung der Annexin 2-Expression zu einer massiven Akkumulation des Transferrins in den Recyclingendosomen führt. Um zu überprüfen, ob durch den verringerten Annexin 2-Gehalt in der Zelle die Aufnahme oder der Transport in die Recyclingendosomen verändert ist, schlossen sich nähere Charakterisierungen der beiden möglichen Ursachen an.

Zur Untersuchung der Aufnahme des Transferrins wurden ha2.3 transfizierte HeLa-Zellen mit 30 µg/ml fluoreszenzmarkiertem Transferrin kontinuierlich für 60 min bei 16°C inkubiert (Abb 31). Dabei erfolgt der Transport des Transferrins nur bis in die Sortierendosomen (Goldenberg et al., 1991; Ren et al., 1998). In Abbildung 31A sind Annexin 2 exprimierende und expressionsverminderte Zellen zu sehen, während in Abbildung 31B das dazugehörige Transferrinsignal gezeigt wird. Transferrin befindet sich in vesikulären Strukturen in der Peripherie der Zelle. Transfizierte und nicht-transfizierte Zellen zeigen identische Verteilungsmuster. Die Aufnahme und der Transport bis in die Sortierendosomen wird durch die Reduktion des Annexin 2-Gehalts nicht verändert.

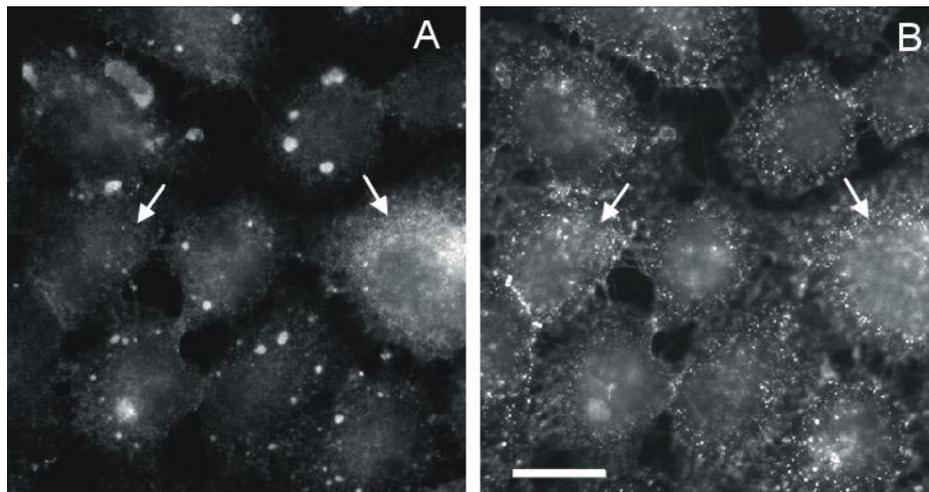


Abb. 31: Die Aufnahme von Transferrin bei 16°C ist auch bei Verringerung der Annexin 2 Expression nicht verändert. HeLa-Zellen wurden mit ha2.3 transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen 60 min mit 30 µg/ml TexasRed-Transferrin bei 16°C inkubiert (B), anschließend sorgfältig gewaschen, fixiert und permeabilisiert. Die Zellen wurden mit HH7 inkubiert und ein Cy2-konjugierter Sekundärantikörper wurde eingesetzt (A). Transferrin ist in einzelnen Vesikeln in der Zellperipherie lokalisiert. Die Verteilungsmuster in Wildtypzellen und Zellen mit verminderten Annexin 2-Gehalt sind identisch. Balken 10 µm.

Da die Aufnahme des Transferrins nicht beeinflusst ist, könnte die Akkumulation des Transferrins in ha2.3 transfizierten Zellen durch eine Veränderung im Recyclingverhalten hervorgerufen werden.

Zur Messung der Recyclingrate wurden ha2.3-transfizierte und Wildtyp-Zellen 5 min mit 2 µg/ml HRP-Tf inkubiert. Es wurden jeweils Dreifach-Werte aufgenommen. Um den Anteil von unspezifischer, nicht-rezeptorvermittelter Aufnahme messen zu können, wurde ein Ansatz mit einem 100-fachen Überschuß nicht-markierten Transferrins inkubiert. Nach gründlichem Waschen und Entfernung des Oberflächen-gebundenen Transferrins wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben vom Überstand entnommen. Die gemessene HRP-Aktivität in den Proben wurde auf die Gesamtaktivität bezogen und graphisch als Recyclingrate dargestellt (Abb. 32).

In den ha2.3 transfizierten Zellen wurde eine niedrigere Recyclingrate gemessen als in Wildtypzellen. Der Unterschied zwischen den beiden Raten beträgt etwa 4 %. Dieses unterstützt die Vermutung, daß die Verringerung des Annexin 2-Gehaltes in den Zellen zu einem verlangsamten Rücktransport des Transferrin führt. Dabei ist vermutlich der Transport von den Sortierendosomen zu den Recyclingendosomen und weiter zur Plasmamembran verzögert.

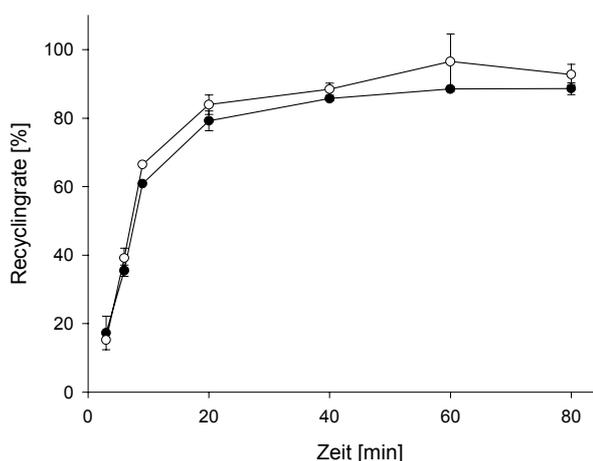


Abb. 32: Recyclingraten der ha2.3-transfizierten und Wildtypzellen. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen bei 37°C 5 min mit 2 µg/ml HRP-Tf inkubiert. An der Oberfläche gebundenes HRP-Tf wurde entfernt und die Zellen erneut bei 37°C inkubiert. Proben vom Überstand wurden in bestimmten Zeitintervallen entnommen. Der prozentuale Anteil der HRP-Aktivität in den Proben wurde auf die Gesamtaktivität bezogen. ha2.3-transfizierte Zellen zeigen eine geringere Recyclingrate (●). Sie liegt durchschnittlich etwa 4% unterhalb der Rate der Wildtypzellen (○).

Neben dem Transport in die Recyclingendosomen werden verschiedene Stoffe über den spät-endosomalen Weg in die Lysosomen zur Degradation geleitet. Dabei gelangen diese Stoffe zunächst auch in die sogenannten Sortierendosomen, von dem sie anschließend in die späten Endosomen überführt werden. Um zu untersuchen, ob in Zellen, die einen

verminderten Annexin 2-Gehalt zeigen, eine allgemeine Veränderung beim Austritt aus den Sortierendosomen hervorgerufen wird, schlossen sich hier Untersuchungen des spät-endosomalen Weges an.

Als Marker für den Transport in die Lysosomen wurden Fluoreszenz-konjugiertes LDL und DQRed BSA eingesetzt. Transfizierte und nicht-transfizierte Zellen wurden mit 50 µg/ml DiI-LDL oder 0,5 mg/ml DQRed BSA inkubiert (Abb. 33). In beiden Fällen unterschieden sich die Aufnahmemuster in den Zellen nicht. Die Reduktion des Annexin 2-Gehaltes in Zellen verändert nicht den Weg von den Sortierendosomen zum spät-endosomalen Kompartiment.

Daraus ergibt sich, daß durch eine Verringerung der Annexin 2-Expression spezifisch nur der Transport von den Sortierendosomen zum Recyclingkompartiment bzw. von dort zur Plasmamembran beeinflusst wird.

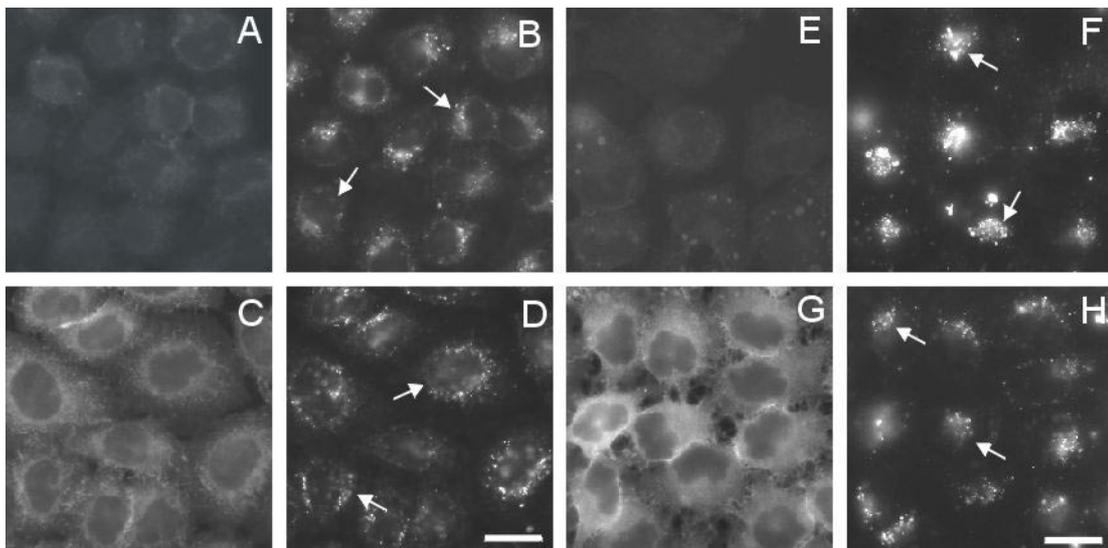


Abb. 33: ha2.3-transfizierte Zellen zeigen weder in der LDL- noch in der DQRed-BSA-Aufnahme eine Veränderung. HeLa-Zellen wurden mit ha2.3 transfiziert. 48 h nach der Transfektion zeigten transfizierte (A, B, E, F) und nicht-transfizierte Zellen (C, D, G, H) identische Muster in der LDL-Aufnahme (A-D) und in der DQRed-BSA-Aufnahme (E-H). Durch die Verminderung des Annexin 2-Gehaltes werden keine Veränderungen in diesen beiden Transportwegen herbeigeführt. Balken 10 µm.

Mögliche morphologische Veränderungen, die mit der Verringerung der Recyclingrate einhergehen können, sollten in Zellen mit verminderter Annexin 2-Expression ebenfalls zu beobachten sein. Dabei stößt die fluoreszenz-mikroskopische Auswertung jedoch schnell an ihre Grenzen. Deshalb wurden nähere Details der möglichen Veränderungen in den Zellen mittels ultrastruktureller Methoden sichtbar gemacht.

Die sogenannte „Wohle-mount“-Technik (Stoorvogel et al., 1996) bietet die Möglichkeit das endosomale Kompartiment einer Zelle in seiner Gesamtheit auf ultrastruktureller Ebene darzustellen und mit Hilfe von Immunogoldfärbungen zu charakterisieren.

Auf EM-Trägernetzen gewachsene ha2.3-transfizierte und nicht-transfizierte Zellen wurden mit 25 µg/ml HRP-Tf für 5 min markiert und weitere 20 min in Anwesenheit von 5 mg/ml HRP aber ohne HRP-Tf in IM-Medium inkubiert. Die Zellen wurden mit dem HRP-Substrat DAB behandelt, welches durch HRP-induzierte Polymerisierung die Struktur der endosomalen Kompartimente stabilisiert und erhält (Abb. 34). Transferrin-positive Strukturen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen den Transferrinrezeptor (H 68.4) und einem mit 5 nm Durchmesser Gold-markierten Sekundärantikörper detektiert. Elektronendichte, tubuläre und vesikuläre Strukturen sind in den Präparaten zu erkennen, die Transferrinrezeptor-positiv sind (Abb. 34A-D). Eine Co-Färbung mit dem polyklonalen Antikörper msa419 (10 nm Gold) zeigt eine deutliche Assoziation des Annexin 2 mit den TfR-positiven Strukturen in den Wildtypzellen (Abb. 34A). In ha2.3-transfizierten Zellen ist auch ultrastrukturell kein Annexin 2 zu detektieren (Abb. 34B).

Ebenso wurden die Zellen mit Antikörpern gegen den Transferrinrezeptor (5 nm Gold) und Clathrin (10 nm Gold) co-gefärbt. Clathrin ist nicht nur an der Plasmamembran zu finden, sondern umhüllt an einigen Stellen des Recyclingkompartiments sich gerade ablösende Vesikel, die zur Plasmamembran zurücktransportiert werden (Stoorvogel et al., 1996). In Abbildung XX ist zusehen, daß Clathrin mit dem Transferrinrezeptor auf vesikulären, sich abschnürenden Strukturen (buds) colokalisiert ist (Abb. 34C und 34D). Die ha2.3 transfizierten Zellen zeigen jedoch einen auffällig hohen Anteil dieser Clathrin-positiven buds (Abb. 34D). Mehr Vesikel scheinen sich dort zu bilden und werden zur Plasmamembran transportiert bzw. die Vesikel könnte nicht in der Lage sein sich abzulösen und akkumulieren deshalb dort.

Auch die ultrastrukturelle Analyse weist Veränderungen im Recyclingkompartiment auf, die offensichtlich durch die Reduktion des Annexin 2-Gehaltes hervorgerufen werden.

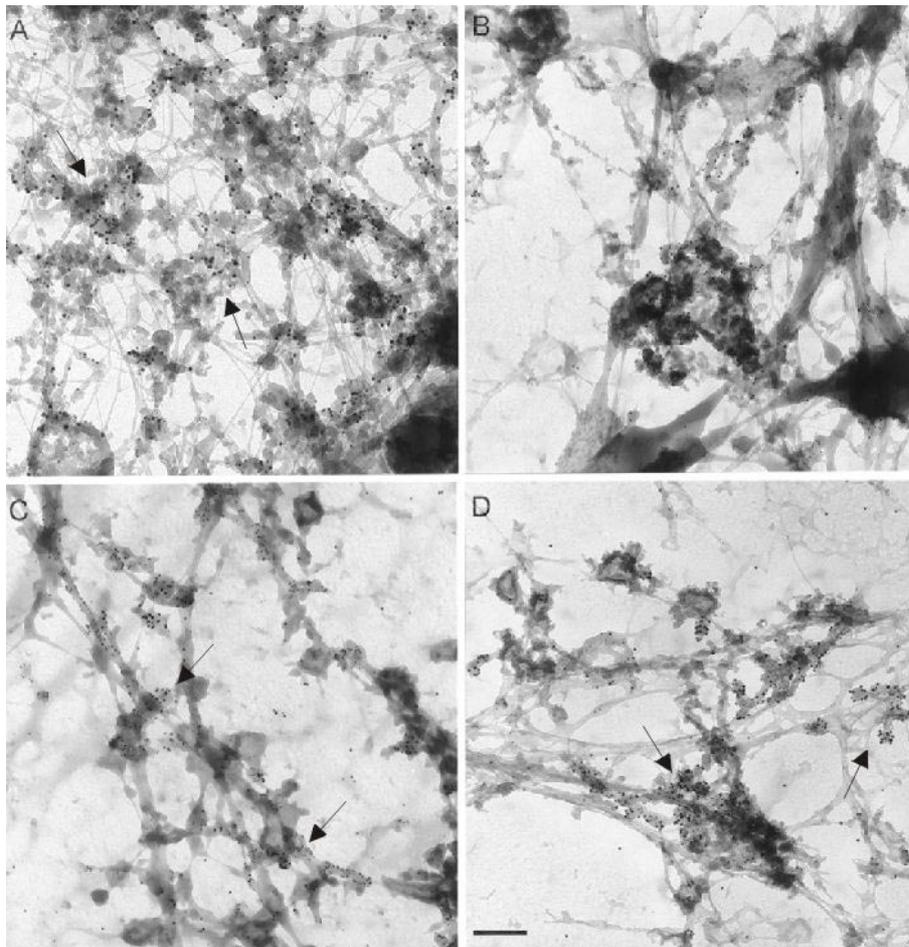


Abb. 34: Ultrastrukturelle Darstellung des endosomalen Kompartiments. Das endosomale Kompartiment wurde in nicht-transfizierten (A, C) und ha2.3-transfizierten (B, D) Zellen in der whole-mount-Technik sichtbar gemacht. Transferrin-positive Strukturen wurden mit dem Antikörper H68.4 in 5 nm Gold-Partikeln dargestellt. (A-D). Zusätzlich wurden die Präparate mit Antikörpern gegen Annexin 2 (msa419) (A, B) und Clathrin (C, D) co-gefärbt (jeweils 10 nm Goldpartikel). Balken 0,2 μ m.

Wie bereits in dieser Arbeit gezeigt wird durch Überexpression der N-terminalen Domäne des Annexin 2 der Verbleib des Transferrins in den Zellen verkürzt. Nanx2-GFP überexprimierende Zellen zeigen nach kontinuierlicher Aufnahme von Transferrin ein kaum erkennbares Recyclingkompartiment. Dagegen ist in Zellen, die eine verringerte Annexin 2 Expression aufweisen, eine starke Konzentration des Transferrins in einer perinukleären Struktur erkennbar. Wenn es sich bei den beschriebenen Veränderungen um entgegengesetzte Prozesse handelt, dann sollte es möglich sein durch Überexpression von Nanx2-GFP in ha2.3-transfizierten Zellen den Phänotyp zu revertieren.

HeLa-Zellen wurden zunächst mit ha2.3 und 24 Stunden später mit Nanx2-GFP transfiziert. Anschließend wurde die Transferrinaufnahme in diesen Zellen verfolgt

(Abb. 35). Nur ha2.3-transfizierte Zellen, d. h. Zellen, mit vermindertem Annexin 2-Gehalt, zeigen neben kleineren peripheren Vesikeln auch eine massive Konzentrierung des Transferrins im Recyclingkompartiment. In Zellen, die eine Reduktion des Annexin 2-Gehaltes aufweisen und zudem Nanx2-GFP überexprimieren, sind auch dort Transferrin-positive Vesikel in der Peripherie lokalisiert während eine Ansammlung des Transferrins in Kernnähe nicht zu detektieren ist.

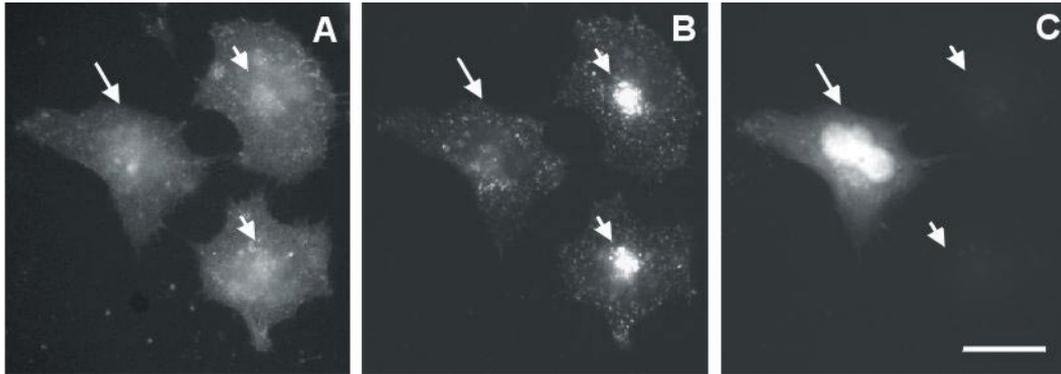


Abb. 35: Der Annexin 2-siRNA-Phänotyp lässt sich durch die Überexpression der N-terminalen Domäne des Proteins revertieren. HeLa-Zellen wurden mit ha2.3 transfiziert (A) und 24h später erneut mit Nanx2-GFP (C). 48h nach der ersten Transfektion wurde die Transferrinaufnahme mit TexasRed-Transferrin in diesen Zellen verfolgt (B). In den fixierten und permeabilisierten Zellen wurde Annexin 2 mit dem Antikörper HH7 nachgewiesen (A). Der Sekundärantikörper war AMCA-konjugiert. Zellen mit vermindertem Annexin 2-Gehalt, die gleichzeitig Nanx2-GFP überexprimieren, zeigen keine Konzentration des Transferrins im Recyclingkompartiment. Balken 10 μ m.

Durch die Überexpression der N-terminalen Domäne können die Veränderungen, die durch Reduktion der Annexin 2-Expression im Recyclingkompartiment hervorgerufen worden sind, wieder aufgehoben werden. Beide Manipulationen somit wirken vermutlich in entgegengesetzter Weise an gleichen Stellen im Transportweg des Transferrins. Annexin 2 fällt demnach eine wichtige Rolle bei der Regulation des Recyclingkompartiments zu.

IV Diskussion

Die zellulären Funktionen der Annexine sind trotz genauer biochemischer und struktureller Charakterisierung noch nicht eindeutig geklärt. Die Gemeinsamkeit aller Annexin liegt in der Fähigkeit an negative Phospholipide zu binden. Dagegen werden die individuellen Eigenschaften der einzelnen Familienmitglieder von der N-terminale Domäne vermittelt (Gerke and Moss, 2002).

Annexin 2 ist sowohl an der Plasmamembran als auch auf endosomalen Membranen lokalisiert und wird so mit Membrantransportprozessen in Verbindung gebracht. Über die C-terminale Domäne (Core) kann Annexin 2 sowohl an Phospholipidmembranen als auch an Zytoskelettelemente assoziieren. Membranen könnten so mit dem Zytoskelett verknüpft und stabilisiert werden. Die Anordnung der Annexin 2-Untereinheiten im heterotetrameren Komplex aus Annexin 2 und dem dimeren zellulären Liganden S100A10 (Annexin 2₂/S100A10₂) macht eine Beteiligung am Membrantransport wahrscheinlich, da über den Komplex Membranen miteinander in räumliche Nähe gebracht werden können. Durch die N-terminale Domäne werden die spezifischen Eigenschaften des Annexin 2 vermittelt. Es wird vermutet, daß eine Calcium-unabhängige Bindung an Endosomen durch die Aminosäuren 15-24 bedingt ist (Jost et al., 1997).

1 Rekrutierung des Annexin 2 an die Plasmamembran

1.1 Der Annexin 2₂/S100A10₂-Komplex

Der Annexin 2₂/S100A10₂-Komplex bildet eine funktionelle Einheit, die in ihren biochemischen Eigenschaften deutlich von denen der Einzelproteine abweicht. Im Komplex ist vermutlich Annexin 2 verantwortlich für die Auswahl spezifischer Zielmembranen in der Zelle. Um diese Frage eindeutig beantworten zu können, wurde ein Zellsystem gewählt, in dem Annexin 2 und S100A10 in vernachlässigbaren Mengen vorhanden ist. Es konnte in HepG2-Zellen gezeigt werden, daß sich die Lokalisation des einzeln exprimierten YFP-Fusionsproteine von S100A10 deutlich von der Lokalisation des Komplexes aus Annexin 2-CFP und YFP-S100A10 unterscheidet. Erst nach der Bildung des Annexin 2₂/S100A10₂-Komplexes konnte S100A10 an der Plasmamembran detektiert werden, während es als ungebundenes Protein ausschließlich zytosolisch vorlag. Die

Rekrutierung an die Plasmamembran wird dabei durch Annexin 2 vermittelt, da es auch nach Einzeltransfektion an der Plasmamembran lokalisiert war. Hierfür könnten neben der Ca^{2+} -regulierten Interaktion mit Membranphospholipiden die Anreicherung von Annexin 2 an cholesterinhaltigen Membranendomänen (Harder et al., 1997; Oliferenko et al., 1999) sowie die Fähigkeit, F-Aktin zu binden (Thiel et al., 1992), von Bedeutung sein. Die Membranassoziation scheint in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich reguliert zu sein, wobei der hier für HepG2-Zellen beschriebene Mechanismus vermutlich den allgemeineren repräsentiert, da auch in undifferenzierten F9-Zellen, die kein Annexin 2 exprimieren, S100A10 ein ausschließlich zytosolisches Protein ist (Harder et al., 1993). In hoch spezialisierten adrenergen Chromaffinzellen dagegen scheint S100A10 hauptsächlich als Membranverankerung zu dienen, da dort Annexin 2 erst nach Stimulierung an die Plasmamembran rekrutiert wird (Chasserot-Golaz et al., 1996).

Entgegen den Untersuchungen von Puisieux et al. (1996) konnten in dem hier verwendeten HepG2-Klon geringe Mengen endogenes Annexin 2 durch Immunopräzipitation mit dem monoklonalen Antikörper HH7 nachgewiesen werden. Dieser Antikörper erkennt ein Epitop im N-terminalen Bereich des Annexin 2, das vermutlich die S100A10-Bindungsstelle einschließt, so daß im Komplex vorliegendes Annexin 2 von dem Antikörper nicht präzipitiert wird. Die detektierte Bande bei 36 kDa kann somit nur endogenes monomeres Annexin 2 darstellen. Desweiteren konnte Annexin 2-mRNA mittels RT-PCR in den HepG2-Zellen nachgewiesen werden (U. Rescher, persönliche Kommunikation), wodurch das Vorkommen von endogenem Annexin 2 weiter verifiziert wurde. In Anwesenheit von Annexin 2 und durch Bildung des Komplexes wird die Halbwertszeit von S100A10 von 2 h auf 12 h erhöht, und es kommt so zu einer Anreicherung des endogenen Proteins in den Zellen (Puisieux et al., 1996). Der hier verwendete HepG2-Klon könnte somit neben geringen Mengen endogenem Annexin 2 auch endogenes S100A10 enthalten. In der Immunfluoreszenzanalyse konnten die endogenen Proteine jedoch nicht lokalisiert werden, da die Konzentration vermutlich zu gering ist. Ebenso scheint in YFP-S100A10 transfizierten Zellen die Konzentration des Komplexes aus endogenem Annexin 2 und YFP-S100A10 unterhalb der Nachweisgrenze zu liegen, so daß YFP-S100A10 nur als zytosolisches Protein detektiert werden konnte. Da die endogenen Proteine stets zu einem gewissen Anteil im Komplex mit den Fusionsproteinen vorliegen, könnte dieses auch erklären, warum die fluoreszenzmarkierten Untereinheiten des Komplexes nicht äquimolar co-immunopräzipitiert werden konnten.

1.2 Infektion mit enteropathogenen *E. coli*

Ein Teil des zellulären Annexin 2 und der heterotetramere Komplex mit S100A10 sind mit der Plasmamembran assoziiert. Eine Funktion von Annexin 2 besteht vermutlich in der Verknüpfung der Membran bzw. bestimmter Membranareale mit dem darunterliegenden Aktinzytoskelett. Es konnte gezeigt werden, daß Annexin 2 essentiell für die durch osmotischen Streß ausgelöste Makropinozytose ist (Merrifield et al., 2001). Bei diesem Prozeß schnüren sich Vesikel von der Plasmamembran ab und werden mit Hilfe des Aktinzytoskelettes innerhalb der Zelle transportiert. Dabei entstehen massive Aktinumlagerungen zu Aktinscheiben, an deren Spitze sich das Vesikel befindet.

Um Prozesse, bei denen dynamische Umorganisationen des Zytoskeletts stattfinden, gezielt zu untersuchen, wurden nicht invasive enteropathogene *E. coli* (EPEC) als Modellsystem eingesetzt. EPEC adhären mit Hilfe des bakteriellen, extrazellulären Adhäsins Intimin an die Wirtszelle, nach dem durch ein Typ III-Sekretionssystem zuvor der Rezeptor Tir (translocated intimin receptor) in die Wirtszelle geschleust wurde. Diese Bindung führt in der Zelle zu massiven Zytoskelettumlagerungen und zur Bildung von Aktin-reichen, sockelartigen Strukturen (Pedestals) unterhalb der adhärenen *E. coli*. (DeVinney et al., 1999; Goosney et al., 2000b).

Es konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, daß Annexin 2 bei diesen Prozessen verstärkt an die Plasmamembran unterhalb der Bakterien rekrutiert wurde. Im Vergleich zu anderen Mitgliedern der Annexin-Familie, die nicht unterhalb adhärenender Bakterien akkumulierten, zeigte sich, daß diese Anreicherung spezifisch für Annexin 2 ist. Da S100A10, der zelluläre Ligand des Annexin 2, ebenfalls dort angereichert war, kann zusätzlich angenommen werden, daß zumindest ein Teil des endogenen Annexin 2 im Komplex mit S100A10 vorliegt.

Die Rekrutierung an die Plasmamembran unterhalb der adhärenen *E. colis* ist unter anderem von der Calciumkonzentration abhängig, wie Experimente in Anwesenheit von EGTA oder die Lokalisation von Annexin 2-Mutantenproteinen mit mutierten Calciumbindungsstellen demonstrierten.

Durch Infektion der Zellen mit EPEC wird die intrazelluläre Calciumkonzentration lokal erhöht (Baldwin et al., 1991; Dytoc et al., 1994) und verschiedene Kinasen (z. B. Proteinkinase C (PKC) und Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK)) werden aktiviert (Manjarrez-Hernandez et al., 1996; Crane and Oh, 1997; Yuhan et al., 1997), die weitere Signalkaskaden auslösen können. Durch diesen lokalen Anstieg der Calciumkonzentration könnte Annexin 2 gezielt rekrutiert werden. Es gibt jedoch auch neuere Berichte, die einen

Anstieg des Calciumgehaltes durch Infektion nicht bestätigen können (Bain et al., 1998). Somit ist zur Zeit noch nicht abschließend geklärt werden, ob ein intrazellulärer Anstieg der Calciumkonzentration an der Rekrutierung des Annexin 2 an die Plasmamembran beteiligt ist.

Durch den Einsatz verschiedener Annexin 2-Mutanten konnte nicht nur die Calciumabhängigkeit der Rekrutierung bestätigt, sondern auch die Abhängigkeit vom intrazellulären Bindungspartner gezeigt werden. Das Signal der Anx2-Core- und der Anx2-PM-Mutante unterhalb der Bakterien sollte allein durch die Ca^{2+} -abhängige Bindung an Membranen vermittelt werden. In beiden Fällen liegt Annexin 2 als Monomer vor, da keines der beiden Mutantenproteine dazu in der Lage ist, den Annexin 2/S100A10-Komplex zu bilden. Das Anx2-CM-Konstrukt sollte aufgrund der mutierten Calciumbindungsstellen nicht mehr an die Plasmamembran unterhalb der Bakterien rekrutiert werden, wenn diese Akkumulation Ca^{2+} -abhängig reguliert ist. In den durchgeführten Experimenten zeigte sich jedoch eine Anreicherung des Anx2-CM-Proteins unterhalb der *E. coli*, wenn auch mit etwas schwächerer Intensität als bei der Anx2-PM-Mutante oder beim Wildtyp-Molekül. Da im Anx2-CM-Protein die S100A10-Bindungsstelle intakt ist, kann Anx2-CM einen Komplex mit endogenem S100A10 bilden. Durch endogenes Annexin 2, das sich an den EPEC-Kontaktstellen befindet, könnte die Anx2-CM-Mutante über einen derart heterologen Komplex mit endogenem S100A10 und endogenem Annexin 2 an die EPEC-Kontaktpunkte rekrutiert werden. Nur etwa ein Viertel der sich im Komplex befindlichen Proteine würde dann ein GFP-Signal zeigen, was auch das schwächere Signal erklären könnte. Im Anx2-PMCM-Konstrukt sind sowohl die Ca^{2+} - als auch die S100A10-Bindungsstellen inaktiviert. Es sollte deshalb auch keine Anreicherung unterhalb der Bakterien zu erwarten sein. Bei der Auswertung des Experiments zeigte sich jedoch ein sehr schwaches Anx2-PMCM-Signal unterhalb der Bakterien. Annexin 2 scheint somit noch weitere schwache Bindungen mit anderen an EPEC-Adhäsionspunkten angereicherten Komponenten ausbilden zu können, die bislang jedoch noch nicht näher charakterisiert wurden. Als mögliche Bindungspartner kämen hier Cholesterin, $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ oder auch Aktin in Frage.

Durch Vergleich der Lokalisation der einzelnen Annexin 2-Mutanten konnten darüberhinaus die Ergebnisse von Eberhard et al., (2001) bestätigt werden. Anx2-GFP und Anx2-CM-GFP sind in der Zelle nicht im Kern lokalisiert, während alle weiteren Anx2-Mutanten jedoch eine Kernfärbung zeigen. Hierfür verantwortlich ist eine Kernexportsequenz, die mit der S100A10-Bindungsstelle überlappt. Bei intakter S100A10-Bindungsstelle wird so

das Protein sehr schnell aus dem Kern heraustransportiert. Welche Funktion Annexin 2 im Zellkern übernehmen könnte, ist bislang jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt Hinweise das Annexin 2 mit kleinen Ribonucleoproteinpartikeln (sRNP) (Arrigo et al., 1983) assoziiert ist und deshalb vielleicht der Gehalt des Annexin 2 im Kern stark reguliert werden muß.

Die Rekrutierung des Annexin 2 ist unabhängig von dem Vorhandensein eines funktionell aktiven Tir-Proteins, wie Infektionen mit dem Stamm EPEC_{tir} (SE869), der nur ein C-terminal verkürztes Tir-Protein exprimiert, zeigten. Annexin 2 akkumulierte dort ebenso wie beim Wildtypstamm EPEC 2348/69 unterhalb der Kontaktstellen mit den Bakterien. Dagegen verhindert das Fehlen des gesamten Typ III-Sekretionssystems eine Anreicherung von Annexin 2, wie Experimente mit EPEC CVD452 darlegten. Vermutlich wird Annexin 2 bereits durch die Typ III-vermittelte Sekretion anderer Proteine (Esp A, B, D) in den EPEC-Adhäsionspunkten angereichert. Die Rekrutierung des Annexin 2 würde damit zeitlich vor der Bildung der Pedestals erfolgen und Annexin 2 könnte so vielleicht eine Funktion in früheren, EPEC-abhängigen Signalereignissen in der Zelle ausüben. Weitere Experimente mit EPEC-Mutanten, die jeweils nur eines dieser Proteine sekretieren, sollten endgültig darüber Auskunft geben, welches/welche der Proteine notwendig sind, um Annexin 2 zu rekrutieren, und zu welchem Zeitpunkt dieses geschieht.

Die vorhandene, aber bislang nicht diskutierte F-Aktin-Bindungsstelle des Annexin 2 ist bei der Rekrutierung vermutlich nicht von wesentlicher Bedeutung, da Infektion mit EPEC_{tir} (SE896) eine Akkumulation von Annexin 2 aber nur schwache und diffuse Aktinumlagerungen unterhalb der Bakterien hervorruft. Eine Beteiligung der Aktinbindungsstelle an der Rekrutierung weiterer Annexin 2-Moleküle nach Umlagerung des Aktins ist jedoch nicht auszuschließen.

Ebenso wie Annexin 2 konnten verschiedene Raft-Komponenten in HeLa-Zellen nachgewiesen werden, die unterhalb der Bakterien akkumulieren. Dazu gehören Cholesterin, GPI-verankerte Proteine und PI(4,5)P₂. Die PI(4)P-5-Kinase ist dort ebenfalls angereichert, vermutlich um direkt am Wirkungsort verstärkt PI(4,5)P₂ synthetisieren zu können. Die Bakterien könnten diese Mikrodomänen nutzen, um dort den ersten Kontakt zu den Wirtszellen herzustellen und dann über ein TypIII-Sekretionssystem Effektorproteine einzuschleusen und Signalkaskaden auszulösen. Es gibt eine Reihe von Hinweisen, daß einige pathogene Erreger (z. B. Mycobakterium, Simian Virus 40) oder deren Toxine (z. B. Aerolysin, Cholera toxin) diese Mikrodomänen nutzen, um in die Zelle

zu gelangen (Shin and Abraham, 2001). So wurde in Mastzellen CD48, ein GPI-verankertes Protein, als Rezeptor für FimH, ein Adhäsion auf der Oberfläche bestimmter Bakterien, identifiziert (Shin et al., 2000). In Makrophagen konnte zudem eine Akkumulation von PI(4,5)P₂ während der Phagozytose von EPEC gezeigt werden (Celli et al., 2001). Desweiteren werden Transmembranproteine wie z. B. CD44 ebenfalls Tir-unabhängig unterhalb der Bakterien angereichert (Goosney et al., 2001). Da Annexin 2 mit cholesterinhaltigen Domänen assoziiert (Harder 1997) und unter anderem mit CD44 in diesen Domänen colokalisiert (Oliferenko et al., 1999), sprechen alle diese Hinweise für eine Beteiligung des Annexin 2 bei der Organisation von Mikrodomänen. Annexin 2 könnte dabei Rafts stabilisieren und mit dem darunterliegenden Zytoskelett verknüpfen. Diese Assoziation an Mikrodomänen ist Ca²⁺-abhängig, wie durch Experimente mit den Anx2-Mutanten gezeigt werden konnte (siehe oben). Eine Ca²⁺-abhängige Assoziation an Mikrodomänen wurde außerdem bereits für Annexin 2 in anderen Zellsystemen beschrieben (Babiychuk and Draeger, 2000; Zeuschner et al., 2001).

Die Plecktrin-Homologie-Domäne (PHD) als indirekter Nachweis für PI(4,5)P₂ konnte in HeLa-Zellen unterhalb aller verwendeten *E. coli*-Stämme detektiert werden. Interessanterweise ist das PHD-Signal unterhalb der EPEC CVD452 in den Zellen jedoch schwächer als bei Infektion mit den beiden anderen *E. coli*-Stämmen. Bereits durch die Adhäsion der Bakterien über den Bakterien eigenen Pilus (BfP: Bundle forming Pilus) könnten einige Raftkomponenten rekrutiert werden, die dann bei Ausbildung der Translokationspore noch stärker akkumuliert werden könnten

Die schwache Ca²⁺-unabhängige Akkumulation der PMCM-Mutante unterhalb der Bakterien könnte durch eine geringe Wechselwirkung des Annexin 2 mit Raftkomponenten wie z.B. PI(4,5)P₂ hervorgerufen werden. Dabei könnten bislang noch nicht näher charakterisierte Bindungsdomänen im Annexin 2 von Bedeutung sein.

Die durch EPEC hervorgerufene Aktinpolymerisierung und Ausbildung der Pedestals ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Dazu gehören die Phosphorylierung des Tir-Proteins (Kenny, 1999) sowie die Rekrutierung von N-WASP und des Arp2/3-Komplexes (Kalman et al., 1999). An das phosphorylierte Tir-Protein kann Nck direkt binden (Gruenheid et al., 2001). Dieses Adaptorprotein, welches normalerweise tyrosinphosphorylierte Rezeptoren mit dem Aktinzytoskelett verknüpft, interagiert direkt und auch indirekt über WIP mit N-WASP, welches wiederum Arp2/3 binden kann und eine Polymerisierung des Aktin zu Pedestals bewirkt. Vergleicht man dieses mit

Vorgängen nach Infektion mit anderen pathogenen Erregern, so ergeben sich viele Übereinstimmungen. Eine bestimmte Form der Vaccinia-Viren kann sich nach Infektion mit Hilfe des Aktinzytoskelettes in der Wirtszelle bewegen, wobei sichtbare Aktinschweife entstehen. Auffällig ist ein nahezu identischer Ablauf der Aktinpolymerisierung bei Vaccinia-Viren verglichen mit der Pedestalbildung nach EPEC-Infektion. Bei Vaccinia-Infektionen ist dabei die Phosphorylierung des viralen Proteins A36R entscheidend für die Entstehung der Aktinumlagerung (Frischknecht et al., 1999a; Frischknecht et al., 1999b).

N-WASP kann außerdem über eine interne PH-Domäne im N-terminalen Bereich des Proteins an PI(4,5)P₂ binden. Da die Rekrutierung des Annexin 2 unabhängig von der Phosphorylierung des Tir-Proteins ist, könnte Annexin 2 ein Bindeglied zwischen der Rekrutierung von N-WASP und der nachfolgenden Aktinpolymerisierung darstellen, indem es die Membrankomponenten z. B. in räumliche Nähe bringt oder über Bindung von Cholesterin und PI(4,5)P₂ eine Stabilisierung der Mikrodomänen bewirkt.

1.3 Erhöhung des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-Gehaltes in der Zelle

Die Erhöhung des PI(4,5)P₂-Gehaltes in der Zelle kann durch Stimulation mit AIF oder durch Überexpression der PI(4)P-5-Kinase hervorgerufen werden. Durch Aluminiumfluorid (AIF) können im allgemeinen GTP-bindende Proteine aktiviert werden (Sternweis and Gilman, 1982). Dazu gehört auch die GTPase Arf6. Dieses Protein reguliert den Membrantransport und stimuliert Aktinumlagerungen an der Plasmamembran (Radhakrishna and Donaldson, 1997). In CHO-Zellen konnte Arf6 an der Plasmamembran und auf endozytotischen Vesikeln lokalisiert werden. In der GTP-gebundenen Form ist Arf6 vorwiegend an der Plasmamembran zu finden, während es im GDP-Zustand auf endosomalen Membranen lokalisiert ist (Peters et al., 1995). Über Makropinozytose entstandene endosomale Strukturen enthalten Membranmarker wie z. B. MHC I, die in Arf6-abhängiger Weise zurück zur Plasmamembran gelangen können (D'Souza-Schorey et al., 1995). Dieser endosomale Recyclingweg des Arf6 kann partiell mit dem Recyclingkompartiment der Clathrin-abhängigen Endozytose überlappen, denn eine Arf6-Mutante (T27N) konnte mit dem Transferrinrezeptor und Cellubrevin, die Markerproteine für das Recyclingkompartiment sind, co-immunopräzipitiert werden (Peters et al., 2001). Diese Daten werden jedoch von anderen Arbeitsgruppen kontrovers diskutiert

(Radhakrishna and Donaldson, 1997; Brown et al., 2001). Es konnte zudem gezeigt werden, daß Arf6 ein Effektor der PI(4)P-5-Kinase ist (Honda et al., 1999). Durch Stimulierung von Arf6 kann so indirekt auch die PI(4)P-5-Kinase-Aktivität erhöht werden. In den durchgeführten Experimenten wurde deshalb die Erhöhung des PI(4,5)P₂-Gehalt entweder indirekt durch die Stimulation mit AIF oder direkt durch die Überexpression der PI(4)P-5-Kinase hervorgerufen. Damit verbunden sind dynamische Umlagerungen des Aktinzytoskelettes (ruffles) (Brown et al., 2001), die Erhöhung der Makropinozytose und das Auftreten von Aktinschwänzen um endogene Vesikel in der Zelle (Rozelle et al., 2000). Die hier durchgeführten Experimente deuten bei all diesen Prozessen auf eine Beteiligung des Annexin 2 hin. An den Membranruffles war Annexin 2 genauso mit Aktin und der PH-Domäne colokalisiert, wie es an den Aktinschwänzen der pinozytotischen Vesikel nachgewiesen wurde. In allen Fällen scheint das Vorkommen von PI(4,5)P₂ und Aktin in unmittelbarer Nähe von entscheidender Bedeutung für die Rekrutierung des Annexin 2 zu sein. Da sich diese Aktin-Kometen bevorzugt an cholesterinhaltigen Mikrodomänen (Rafts) ausbilden, scheint die Anwesenheit von Cholesterin ebenso essentiell wie eine Rekrutierung des Annexin 2 zu sein (Rozelle et al., 2000; Merrifield et al., 2001).

Annexin 2 könnte auch hier zur Stabilisierung der Mikrodomänen mit dem darunter liegenden Zytoskelett beitragen, da es mit diesen Domänen assoziiert (Harder et al., 1997). Interessanterweise sind an der Aktinpolymerisierung, die durch die Erhöhung des PI(4,5)P₂-Gehaltes ausgelöst wird, die gleichen Proteine beteiligt, wie bei der Pedestalbildung nach EPEC-Infektion (Higgs and Pollard, 2000; Rohatgi et al., 2000; Rozelle et al., 2000; Rohatgi et al., 2001; Benesch et al., 2002) oder bei der intrazellulären Bewegung von Vaccinia-Viren. Bei all diesen Prozessen ist jeweils die Tyrosin-Phosphorylierung eines bestimmten Proteins für die Entstehung der Aktinumlagerung entscheidend (Frischknecht et al., 1999a; Kenny, 1999; Rozelle et al., 2000). Das Protein Nck bindet dann zum einem an diese tyrosinphosphorylierten Proteine und zum anderen an N-WASP. Im Zusammenspiel von Nck und PI(4,5)P₂, ohne daß wie üblich die GTPase cdc42 notwendig ist, kann dann N-WASP den Arp2/3-Komplex rekrutieren und so die Polymerisation und mögliche Verzweigung des Aktin hervorrufen (Rohatgi et al., 2001).

In RBL-Zellen können durch einen hyperosmotischen Schock Makropinosomen induziert werden, die sich mit Aktinschweifchen in der Zelle bewegen. Merrifield et al. (2001) konnten zeigen, daß sich Annexin 2 dort zwischen dem Aktin und den Vesikeln befindet und

essentiell für die Bildung der Schweife ist. Abweichend davon konnten die hier durchgeführten Experimente in HeLa-Zellen nach Stimulierung mit AIF mit den verwendeten Untersuchungsmethoden jedoch kein Annexin 2 an der Spitze der Aktinschwänze nachweisen. Annexin 2 colokalisierte lediglich mit kleinen Aktinkometen oder umhüllte endozytotische, PI(4,5)P₂-positive Vesikeln in der Nähe des Zellkerns. Annexin 2 scheint nur in Verbindung mit Membranen, die Cholesterin und PI(4,5)P₂ enthalten, an der Umorganisation von Aktin zu Kometen beteiligt zu sein, da Untersuchungen in *Listeria monocytogenes*-infizierten Zellen keine Assoziationen des Annexin 2 mit Aktinschwänzen der Listerien zeigen (Merrifield et al., 2001). Auch im Falle der endozytotischen Vesikel könnte Annexin 2 eine verknüpfende Funktion zwischen Vesikelmembran, die reich an PI(4,5)P₂ ist, und den darunterliegenden Zytoskelettproteinen haben. Durch multiple Bindungen könnte es die vorhandenen Proteine in räumliche Nähe bringen und so eine Interaktionen ermöglichen, die schließlich zur Aktinpolymerisation durch den Arp2/3-Komplex führt

2 Annexin 2 in der Endozytose

Es gibt bereits zahlreiche Hinweise, daß Annexine an endozytotischen Prozessen beteiligt sein könnten (Gerke and Moss, 1997). Um die Beteiligung des Annexin 2 in der Endozytose näher zu charakterisieren, wurden zwei verschiedenen Strategien verfolgt. Zum einen wurde der Einfluß in biochemischen Analysen untersucht. Zum anderen wurden in zellbiologischen Ansätzen, zum Teil in lebenden Zellen, die Bedeutung des Annexin 2 mit Hilfe der Überexpression von verschiedenen Annexin 2-Mutanten oder auch durch Verringerung des Annexin 2-Gehaltes in der Zelle untersucht.

2.1 Umverteilung während der Endozytose

Neben der Assoziation mit der Plasmamembran ist Annexin 2 auch an endosomalen Membranen nachzuweisen. In lebenden BHK-Zellen konnte gezeigt werden, daß Annexin 2 während der rezeptorvermittelten Endozytose von Transferrin nicht nur an der Plasmamembran zu detektieren ist, sondern nach einer fünfminütigen Transferrinternalisierung mit Transferrin-positiven Vesikeln im Zytoplasma colokalisiert, bei denen es sich um frühe bzw. Sortierendosomen handelt. Nach 60-minütiger Inkubation

befindet sich das Transferrin in perinukleären Recyclingendosomen und colokalisiert dort auch mit Annexin 2. Diese Beobachtung stimmt gut mit biochemischen Membranisolierungen überein, bei denen Annexin 2 in der Fraktion früher Endosomen gefunden wurde (Jost et al., 1997). Eine näherer Charakterisierung der Annexin 2-positiven Strukturen zeigte, daß sie den Transferrinrezeptor und rab 4, aber nicht EEA-1 enthalten (Zeuschner et al., 2001). Ebenso konnte Annexin 2 auf rab 11-positiven Endosomen identifiziert werden (Trischler et al., 1999).

Annexin 2 könnte entweder zusammen mit dem internalisierten Transferrin von der Plasmamembran ins endosomale Kompartiment wandern, oder es könnte jeweils ein Teil des zuvor zytosolisch vorliegenden Proteins mit den Membranen neu assoziieren und so auf rab 4-, rab 11- und TfR-positiven Membranen zu finden sein. Da Annexin 2 nicht auf EEA-1 positiven Membranen gefunden wurde, spricht mehr für die neu Assoziation des vormals zytosolischen Annexin 2 während des Transports des Transferrins. Dabei scheint außerdem die Lipidkomposition der Membranen von Bedeutung zu sein, da Annexin 2 nur in Anwesenheit von Cholesterin an Recyclingendosomen bindet (Zeuschner et al., 2001). EEA1-positive Membranen enthalten dagegen überwiegend Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI(3)P), was möglicherweise eine Assoziation des Annexin 2 behindert.

Auffällig ist zudem, daß die Rekrutierung und die Umverteilung des Annexin 2 während der Endozytose nicht in allen Zelllinien beobachtet werden konnte. HeLa-Zellen z. B. zeigen keine vesikulären Strukturen mit gebundenen endogenem oder ektopisch exprimiertem Annexin 2. Auch nach Transferringabe colokalisiert Annexin 2 nicht mit dem Transferrin. Ein möglicher Grund könnte auch hier ein Unterschied in der Zusammensetzung der Membranbestandteile, z. B. Lipide, sein. Auch die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in HeLa-Zellen bewirkt keine Veränderung in der intrazellulären Verteilung des Annexin 2.

2.2 Homotypische Fusion früher Endosomen

Frühe Endosomen sind auch *in vitro* besonders fusogen. Diese Charaktereigenschaft reflektiert vermutlich den dynamischen Anteil aus Sortier- und Recyclingelementen. Nach Isolierung zweier verschieden markierter Endosomen-populationen wurde die Fusionsrate dieser Fraktionen *in vitro* gemessen. Nur in Anwesenheit von ATP fand eine deutlich meßbare Fusion statt. Daraus ergab sich die Möglichkeit, den Einfluß von Annexin 2 auf die Fusion früher Endosomen zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, daß das Peptid

A2PM1-27, welches den Aminosäuren 1-27 der N-terminalen Domäne des Annexin 2 jedoch mit mutierter S100A10-Bindungsstelle entspricht, die Fusionsrate deutlich erhöht. Die in diesem Peptid wirksame putative Endosomenbindungsstelle (Aminosäure 15-24) (Jost et al., 1997) scheint einen direkten Einfluß auf die Fusion auszuüben.

Dagegen inhibierten die beiden anderen eingesetzten Peptide A2 Ac1-14 und A2 N1-14, die den Aminosäuren 1-14 des Annexin 2 in acetylierter oder nicht-acetylierter Form entsprachen, die Fusion. Wie König et al. (1998) zeigen konnten, dissoziiert der Annexin 2/S100A10-Komplex bei Zugabe des Peptids A2 Ac1-14, da dieses Peptid mit dem Annexin 2-Protein um die Bindung mit S100A10 kompetiert. Für die Bildung des Komplexes ist die N-terminale Acetylierung von entscheidender Bedeutung, wie Kristallstrukturuntersuchungen ebenfalls bestätigen (Rety et al., 1999). Mit den Peptiden A2 Ac1-14 bzw. A2 N1-14 sollte der Einfluß dieser Komplexbildung auf die Fusion untersucht werden. Dabei sollte das nichtacetylierte Peptid A2 N1-14 den Komplex nicht beeinträchtigen, sondern eher als interne Kontrolle dienen. Da jedoch bei beiden eingesetzten Peptiden eine massive Störung der Fusion zu messen war, ist dieses Ergebnis vermutlich eher auf eine allgemeine, unspezifische Inhibition zurückzuführen, die allein durch Zugabe eines Peptids hervorgerufen wurde. Im Umkehrschluß ergibt sich daraus aber eine weitere Bestätigung dafür, daß das Peptid A2PM1-27 eine spezifische Erhöhung der Fusion verursacht, da hier im Gegensatz zu den anderen Peptiden ein Anstieg der Fusionsrate zu messen ist.

Der Einsatz des potentiell interferierenden Annexin 2-Antikörpers HH7 erniedrigte die Fusionsrate deutlich. Es zeigte sich jedoch, daß unspezifische MausIgGs ebenfalls zu einer Inhibition der Fusion führten, die nicht von der durch Annexin 2-Antikörper induzierten zu unterscheiden war. Vieles spricht daher auch hier für eine unspezifische Inhibition, die allein durch Zugabe von Gesamt-Immunglobulinen verursacht wird. Darüberhinaus ist der verwendete Annexin 2-Antikörper HH7 vielleicht nicht in der Lage zu interferieren, da sein Epitop mit der S100A10-Bindungsstelle überlappt (Thiel et al., 1992) und möglicherweise nicht für die Fusion von Bedeutung ist.

Annexin 2 befindet sich nicht nur auf den Endosomen, sondern auch als lösliches Protein im Zytosol, das den Endosomen-Fusionsexperimenten zugesetzt werden mußte. Von dort könnte es zur Fusion an die Membranen rekrutiert werden und die Funktion von Endosomen-assoziierten, aber durch interferierende Antikörper blockierten Annexin 2-Molekülen übernehmen. Nach Verringerung des zytosolischen Annexin 2-Gehaltes sollte deshalb der Einfluß des Annexin 2 bei der Fusion deutlicher hervortreten. Um den

zytosolischen Annexin 2-Gehaltes zu verringern, wurde in dieser Arbeit eine Immunopräzipitation mit HH7 oder mit MausIgGs als Kontrolle durchgeführt. Die Fusionsrate nach Zugabe dieses depletierten Zytosols unterschied sich jedoch nicht von der bei Einsatz von unbehandeltem Zytosol. Zur Verstärkung eines möglichen Effektes wurden zusätzlich noch Antikörper bei der Fusion hinzugefügt. Auch in diesem Fall ergab sich eine Inhibition der Fusion, die in der Kontrolle (Maus IgG) im gleichen Umfang wie bei Einsatz der Annexin 2-spezifischen IgGs auftrat. Allerdings war in der Westernblotanalyse des depletierten Zytosols noch ein starkes Annexin 2-Signal zuerkennen, so daß die Aussagekraft dieses Experiments limitiert ist. Mit den verwendeten Mengen gekoppelter Magnetpartikel scheint es nicht möglich zu sein, Annexin 2 effektiv aus dem Zytosol zu entfernen.

Untersucht man auch die Proteine, die durch HH7 oder Kontroll-MausIgGs präzipitiert wurden, so ist auch ein Annexin 2-Signal in den Kontrollen zu erkennen. Die unspezifischen MausIgGs scheinen ebenso Annexin 2 zu präzipitieren. Dieses würde auch den gleichen Einfluß auf die Fusion erklären.

In den durchgeführten Assays konnte selbst in Abwesenheit von ATP noch eine Fusionsrate von 20-40 % der optimalen Fusion in Gegenwart von ATP gemessen werden. Diese Hintergrundwert könnte durch zerstörte Vesikel zustande gekommen sein, die ihren Inhalt in den Reaktionsansatz entleert haben und so die Ausbildung von Avidin-Biotin-HRP-Komplexen ermöglichen konnten. Die eingesetzte Menge an Biotin-Insulin, die genau dieses Ereignis verhindern sollte, könnte in einigen Fällen nicht ausreichend gewesen sein. Obwohl die Unversehrtheit der frühen Endosomen zum Zeitpunkt der Messung größer als 70 % sein sollte, kann nicht ganz ausgeschlossen werden, daß bei der Lagerung und beim eigentlichen Assay noch weitere Vesikel zerstört wurden.

Es konnte von verschiedenen Gruppen gezeigt werden, daß es zwei verschiedene Arten der homotypischen Endosomemfusion geben kann: eine Ca^{2+} -unabhängige Fusion, in der ATP, Zytosol (Woodman and Warren, 1988) und GTP-bindende Proteine (Gorvel et al., 1991) benötigt werden, und eine Ca^{2+} -abhängige Fusion in Anwesenheit von mikromolaren Mengen freien Calciums (Mayorga et al., 1994). Dabei kann nach der Behandlung der Vesikel mit EDTA unter anderem durch Zugabe von Annexin 2 die Ca^{2+} -abhängige Fusion wiederhergestellt werden.

Für den gemessenen ATP-unabhängigen Anteil der Fusion von 20 - 40 % könnte so eine Ca^{2+} -abhängig Vesikelfusion verantwortlich sein. Obwohl kein freies Calcium im Assay hinzugegeben wurde, könnte die Calciumkonzentration im Zytosol und in den Fraktionen

der frühen Endosomen durch den Zellaufschluß bedingt erhöht worden sein, sodaß eine Ca^{2+} -abhängig Fusion möglich wäre.

Aufgrund der durchgeführten Versuche liegt eine Beteiligung des Annexin 2 bei der homotypischen Fusion nahe, ist aber noch nicht bewiesen. Dabei sind vermutlich die Aminosäuren 15-24 der N-terminalen Domäne entscheidend, die eine putative Bindungsstelle zu Strukturen auf Endosomen besitzen (Jost et al., 1997). Das Peptid A2PM1-27, welches diese Aminosäuren umfaßt, steigert deutlich die Fusionsrate früher Endosomen. Dabei könnte das Peptid zum einen endogenes Annexin 2 verdrängen, so daß eine bestimmte Domäne auf den Endosomen freigegeben wird, die zur Fusion benötigt wird. Zum anderen wären durch Zugabe des Peptids aber auch mehr potentiell funktionelle Gruppen, nämlich diese N-terminalen Domänen, vorhanden, die mit anderen Proteinen wechselwirken könnten. In vorläufigen Experimenten konnten mögliche Bindungspartner der AS 15-24 ermittelt werden. Als guter Kandidat wird ein 97 kDa großes Protein angesehen (König, 2000). Durch Bindung der N-terminalen Domäne an bestimmte Proteine könnte diese aktiviert werden, so daß mehr Fusionsereignisse in der gleichen Zeit stattfinden könnten. Das Ergebnis wäre eine erhöhte Fusionsrate, wie sie auch tatsächlich gemessen wurde.

2.3 Einfluß des Annexin 2 auf die Endozytose

Aufgrund zahlreicher Daten, die auf eine mögliche Beteiligung der N-terminalen Domäne des Annexin 2 auf die Endozytose hinwiesen, wurde deren Einfluß auch *in vivo* untersucht. Durch Überexpression der N-terminalen Domäne (Nanx2-GFP) des Annexin 2 konnte eine Veränderung in der zellulären Verteilung des Transferrins hervorgerufen werden.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen von 60-minütiger, kontinuierlicher Transferrinaufnahme bei 37 °C sollten sich das Transferrin, wie es auch in den Kontrollen zu sehen ist, in einem gut erkennbaren perinukleären Recyclingkompartiment ansammeln. Nanx2-GFP exprimierende Zellen zeigen dagegen kaum eine Akkumulation des aufgenommenen Transferrins im Recyclingkompartiment, sondern eine eher disperse Verteilung. In biochemischen Studien konnte gezeigt werden, daß sich die Transferrinaufnahme in Nanx2-GFP exprimierenden Zellen nicht veränderte, die Recyclingrate in Nanx2-GFP exprimierenden Zellen jedoch im Vergleich mit GFP-exprimierenden Kontrollzellen etwas erhöht war. Untersuchungen zur Verteilung der über Flüssigphase aufgenommenen Stoffe (z. B. Dextran) oder der über Rezeptoren

aufgenommenen Liganden (z. B. LDL), die anschließend zur Degradation den Lysosomen zugeführt werden, ergaben keine Veränderungen in der Lokalisation in Nanx2-GFP exprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen.

Es konnte somit demonstriert werden, daß die N-terminale Domäne des Annexin 2 einen spezifischen Einfluß auf den Transport des Transferrins innerhalb der Zelle hat. Dabei könnte die Domäne entweder den Weg von den Sortierendosomen zu den Recyclingendosomen und/oder den Weg von den Recyclingendosomen zurück zur Plasmamembran regulieren. Da die Aufnahme des Transferrin nicht verändert wurde, scheint Annexin 2 darauf keinen Einfluß zu haben. Ebenso kann eine Beteiligung des Annexin 2 beim Transport über die späten Endosomen zu den Lysosomen ausgeschlossen werden, da kein Unterschied zu nicht-transfizierten Zellen festgestellt werden konnte.

Durch den Einsatz von kurzen doppelsträngigen siRNA-Oligos, die in der Sequenz homolog zur Annexin 2-mRNA sind, konnte der Annexin 2-Gehalt vermindert werden, wie Immunfluoreszenz- und Westernblotanalysen zeigten. Dabei wurde mit dem monoklonalen Antikörper HH7 in siRNA-transfizierten Zellen kaum Annexin 2 detektiert, während der polyklonale Anti-Annexin 2-Antikörper msa419 auch in Zellen, die einen verringerten Annexin 2-Gehalt aufwiesen, stets eine Färbung der Plasmamembran zeigte. Vermutlich erkennt der Antikörper HH7 nur monomeres Annexin 2, da als Antigen zur Immunisierung ein Peptid verwendet wurde, welches den Aminosäuren 1 bis 18 der N-terminalen Domäne des Annexin 2 entsprach und somit auch die S100A10-Bindungsstelle beinhaltete (Thiel et al., 1992). Demgegenüber detektiert der polyklonale Antikörper msa419 auch sich im Komplex befindendes Annexin 2. Das Signal an der Plasmamembran würde somit der Lokalisation des verbliebenen Annexin 2/S100A10-Komplexes entsprechen. Da der Komplex eine viel höhere Halbwertszeit (ca. 40 h) als das Monomer (ca. 15 h) besitzt (Zokas and Glenney, 1987), könnte dies auch erklären, warum das Signal an der Plasmamembran bestehen bleibt, obwohl zytosolisches, monomeres Annexin 2 nach siRNA-Behandlung nicht mehr detektiert werden kann. Das verwendete siRNA-Oligo ha2.3 verursachte eine gezielte Verminderung des Annexin 2-Gehaltes, während die Expression des nächsten homologen Verwandten in der Annexin-Familie, Annexin 1, davon unbeeinflusst blieb.

Durch diese selektive Verminderung des Annexin 2-Gehaltes ergaben sich neue Möglichkeiten, die Bedeutung des Annexin 2 für die Endozytose zu untersuchen. Dieses Verfahren der kurzfristigen Verringerung des Annexin 2-Gehaltes bietet Vorteile

gegenüber Knockout-Modellen, bei denen zumindest im Falle des Annexin 6 möglicherweise kompensatorische Hochregulationen von anderen Proteinen der Annexin-Familie beobachtet wurden (Song et al., 2002). Aufgrund der nur transienten Verminderung des Annexin 2-Gehaltes in den siRNA-behandelten Zellen wird die spezifische Funktion vermutlich nicht von anderen Annexinen übernommen, so daß ein Phänotyp leichter auszumachen ist.

In Zellen mit so vermindertem Annexin 2-Gehalt akkumulierte Transferrin nach einem Pulse/Chase-Protokoll in einem perinukleären Kompartiment, während in Zellen mit normaler Annexin 2 Expression wie erwartet, keine Akkumulation zu detektieren war. Eine nähere Charakterisierung der Strukturen ergab, daß sie mit rab11, einem Marker für Recyclingendosomen (Ullrich et al., 1996; Sonnichsen et al., 2000), colokalisierten.

Dabei wird die Akkumulation im Recyclingkompartiment wahrscheinlich durch eine Veränderung im Recyclingverhalten hervorgerufen, da die Aufnahme des Transferrins in Zellen mit vermindertem Annexin 2-Gehalt nicht verändert war. Dies zeigten Untersuchungen bei Temperaturen unter 20 °C, zwar eine Aufnahme des Transferrins in die frühen/Sortierendosomen, jedoch keinen Weitertransport zu den Recyclingendosomen oder den späten Endosomen erlauben (Goldenberg et al., 1991; Sipe et al., 1991). Tatsächlich ergab die Messung der Recyclingrate eine geringfügige Erniedrigung in Zellen mit verringerter Annexin 2-Expression.

Die Verteilung aufgenommener Stoffe, die zur Degradation den Lysosomen zugeführt werden, war in den Zellen mit geringem Annexin 2-Gehalt jedoch nicht verändert, wie Studien zur Internalisierung von LDL und DQRed-BSA zeigten.

Vergleicht man die Verteilung des Transferrins in Zellen, die die N-terminale Domäne des Annexin 2 überexprimierten, mit denen, die einen verminderten Annexin 2-Gehalt aufwiesen, so zeigte sich in beiden Fällen eine Beeinträchtigung.

In Nanx2-GFP exprimierenden Zellen konnte eine Akkumulation des Transferrins in den Recyclingendosomen kaum nachgewiesen werden, was mit einer höheren Recyclingrate einhergeht. Zellen mit verminderter Annexin 2-Expression zeigten dagegen eine starke Akkumulation des Transferrins sowie eine verminderte Recyclingrate. Da beide experimentellen Ansätze zu einer veränderten Transferrinverteilung im Zusammenhang mit dem Recyclingendosomen führten, beeinflußt Annexin 2 vermutlich den Transport von den Sortierendosomen zu den Recyclingendosomen und/oder den Transport von den Recyclingendosomen zurück zur Plasmamembran. Bei Überexpression der N-terminalen

Domäne könnte der Weg zu den Recyclingendosomen verlangsamt sein, so daß insgesamt weniger Transferrin in das Recyclingkompartiment gelangt, oder aber der Transport von den Recyclingendosomen zurück zur Plasmamembran könnte schneller vonstatten gehen. Bei vermindertem Annexin 2-Gehalt könnte ein entgegengesetzter Mechanismus auftreten. Dabei wäre der Weg zu den Recyclingendosomen bevorzugt oder aber Rücktransport zur Plasmamembran verzögert, so daß mehr Transferrin in den Recyclingendosomen akkumuliert.

Die geringen Effekte auf die Recyclingrate trotz auffälliger Veränderungen in der Verteilung des Transferrins in der Zelle lassen sich bei genauerer Betrachtung durch das Recyclingverhalten des Transferrins selbst erklären. Auch in Abwesenheit von perinukleären Recyclingendosomen findet ein Rücktransport von internalisiertem Transferrin an die Plasmamembran statt (Sheff et al., 2002). Dabei können etwa 76 % des Transferrins direkt von den Sortierendosomen zur Plasmamembran transportiert werden, während nur 24 % überhaupt in die Recyclingendosomen gelangen. Der Hauptanteil des Transferrins wird demnach vermutlich über den direkten und schnelleren Weg vom Sortierendosomen zur Plasmamembran transportiert. Die geringen Veränderungen bei der Messung der Recyclingrate in *Nanx2*-exprimierenden Zellen oder in Zellen mit vermindertem Annexin 2-Gehalt würden demzufolge nur auf eine Veränderung in dem geringen Anteil des Transferrins zurückzuführen sein, welcher über das Recyclingkompartiment zurück zur Plasmamembran transportiert wird. Damit würde Annexin 2 als ein wichtiger Effektor den Transport des Transferrin über die Recyclingendosomen regulieren.

Außerdem ist bei den biochemischen Untersuchungen zu den Recyclingraten zu berücksichtigen, daß nicht alle Zellen in den Versuchsansätzen transfiziert waren und die erhaltenen Ergebnisse das Verhalten aller Zellen darstellen. In einer Population aus 100 % transfizierten Zellen sollten die Meßergebnisse noch eindeutiger sein.

Endosomale Subpopulationen unterscheiden sich in der Zusammensetzung verschiedener rab-Proteine. Rab11 befindet sich hauptsächlich auf den Recyclingendosomen, während rab4 auf den Sortierendosomen detektierbar ist und mit dem schnellen Transport des Transferrin von den Sortierendosomen direkt zur Plasmamembran in Verbindung gebracht wird (van der Sluijs et al., 1992; Daro et al., 1996; Sheff et al., 1999; Sheff et al., 2002). Nach Isolierung endosomaler Membranfraktionen konnte Annexin 2 sowohl auf rab4-positiven als auch auf rab11-positiven Endosomen nachgewiesen werden, während EEA1,

welches sich zusammen mit rab5 auf frühen Endosomen befindet, mit Annexin 2 nicht colokalisiert werden konnte (Trischler et al., 1999; Zeuschner et al., 2001).

Die ultrastrukturellen Untersuchungen von Zellen mit vermindertem Annexin 2 Gehalt bestätigten die Abwesenheit von Annexin 2, während ansonsten keine signifikanten morphologischen Veränderungen zu beobachten waren. Auffällig jedoch war die Erhöhung von Clathrin-positiven Knospen (buds) auf endosomalen Transferrinrezeptor-positiven Schläuchen in Zellen mit vermindertem Annexin 2-Gehalt. Diese Schläuche werden als Recyclingendosomen angesehen. Clathrin-positive Vesikel, denen jedoch AP-2 fehlt, lösen sich von diesen Strukturen ab und gelangen zur Plasmamembran (Stoorvogel et al., 1996). Desweiteren wird eine Dynamin-Beteiligung bei der Ablösung dieser buds diskutiert (van Dam and Stoorvogel, 2002). In BHK-Zellen konnte Annexin 2 auch teilweise mit Clathrin-positiven buds colokalisiert werden (Zeuschner et al., 2001), und es wurde auch zusammen mit Clathrin-umhüllten Vesikeln (CCV) aus adrenokortikalem Gewebe isoliert (Turpin et al., 1998). Durch die Verminderung des Annexin 2-Gehaltes könnten sich mehr buds bilden, so daß mehr Transferrin an die Plasmamembran transportiert wird. Dieses widerspricht auf den ersten Blick den Beobachtungen einer reduzierten Recyclingrate. Jedoch könnte auch der Weg von den Sortierendosomen zum Recyclingkompartiment beschleunigt sein, so daß zum Ausgleich mehr Transferrin von den Recyclingendosomen zur Plasmamembran zurücktransportiert wird. Es ist aber auch denkbar, daß sich die Clathrin-positiven buds nicht von den Endosomen ablösen, sondern ein Ablösen verhindert wird und sie an den Endosomen akkumulieren. Es würde so ebenfalls weniger Transferrin an die Plasmamembran gelangen, was eine leicht verringerte Recyclingrate zur Folge hätte, wie sie auch tatsächlich gemessen wurde. Bei allen beschriebenen Möglichkeiten würde durch das Fehlen des Annexin 2 eine Veränderung bei der Knospung bzw. Abschnürung der Vesikel hervorgerufen werden. Annexin 2 ist demzufolge ein wichtiges strukturelles Element beim Transport des Transferrins zu den Recyclingendosomen und/oder von dort zur Plasmamembran.

Durch Überexpression der N-terminalen Domäne in Zellen mit verringertem Annexin 2-Gehalt konnte der siRNA-Phänotyp in den Zellen revertiert werden. Die Nanx2-GFP exprimierenden Zellen mit vermindertem Annexin 2-Gehalt zeigten keine Akkumulation des Transferrins im Recyclingkompartiment. Beide verwendeten Ansätze scheinen deshalb an der gleichen Stelle im Transferrintransport einzugreifen. Das Entfernen des Annexin 2 bewirkt eine Akkumulation des Transferrins im Recyclingkompartiment, während Nanx2-GFP einer Anreicherung entgegenwirkt.

Für Annexin 2 konnte so eine direkte Beteiligung bei der Sortierung und Regulierung im Transportweg des Transferrin von den Sortierendosomen zu den Recyclingendosomen gezeigt werden. Annexin 2 könnte dabei als strukurales Element die Abschnürung von Vesikeln an den rab4-positiven frühen Endosomen und dem Transport zu den bzw. die Reifung von rab11-positiven Recyclingendosomen regulieren. Durch Verknüpfung des Annexin 2 mit dem Zytoskelett könnte auch die Stabilität der Kompartimente und die räumliche Nähe bestimmte Proteine zu den Endosomen gewährleistet werden, die entscheidend in die Transport- bzw. Reifungsprozesse eingreifen.

2.4 Modell zur Funktion des Annexin 2 beim Membrantransport

Abschließend soll in einem Modell die verschiedenen Funktionen des Annexin 2 an der Plasmamembran und intrazellulären Transportprozessen zusammengefaßt werden.

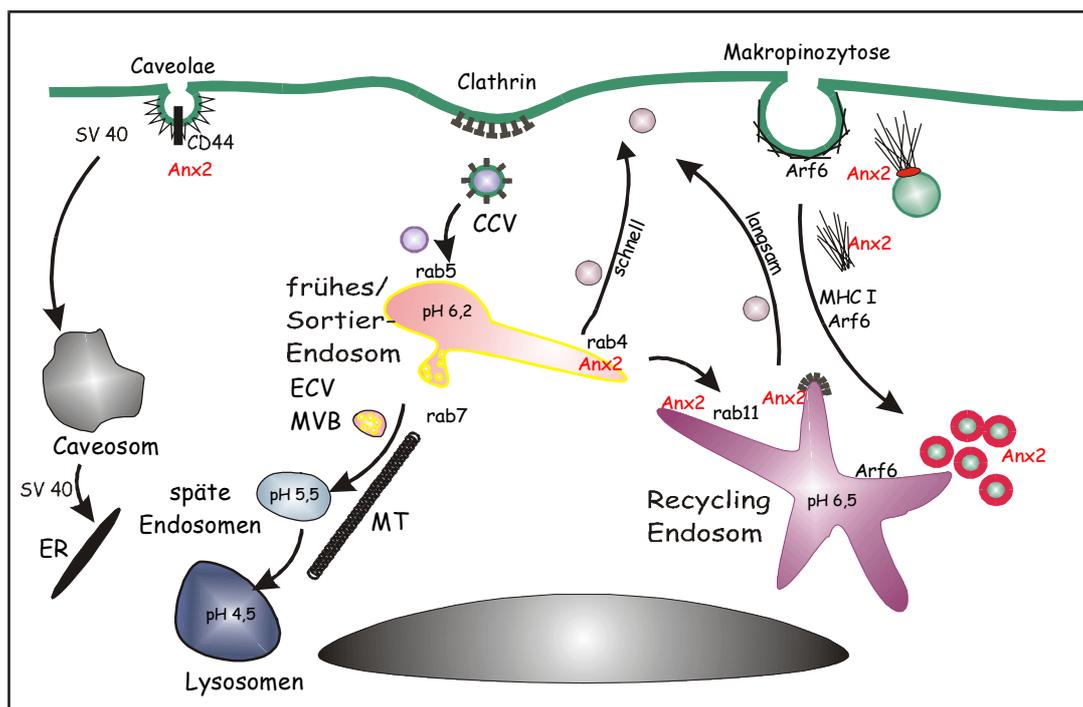


Abb. 36: Modell intrazellulärer Transportprozesse. Dargestellt sind charakteristische Endozytosewege sowie die endozytotischen Kompartimente. Die Beteiligung des Annexin 2 (rot) ist schematisch dargestellt. Annexin 2 ist an Caveolae lokalisiert, ebenso wie an makropinozytotischen Vesikeln und an Aktinschwänzen. Auf rab4-positiven frühen Endosomen und rab11-positiven Recyclingendosomen konnte Annexin 2 ebenfalls detektiert werden. Membranenfärbungen: grün: PI(4,5)P₂; gelb: PI(3)P; violett: PI(4)P.

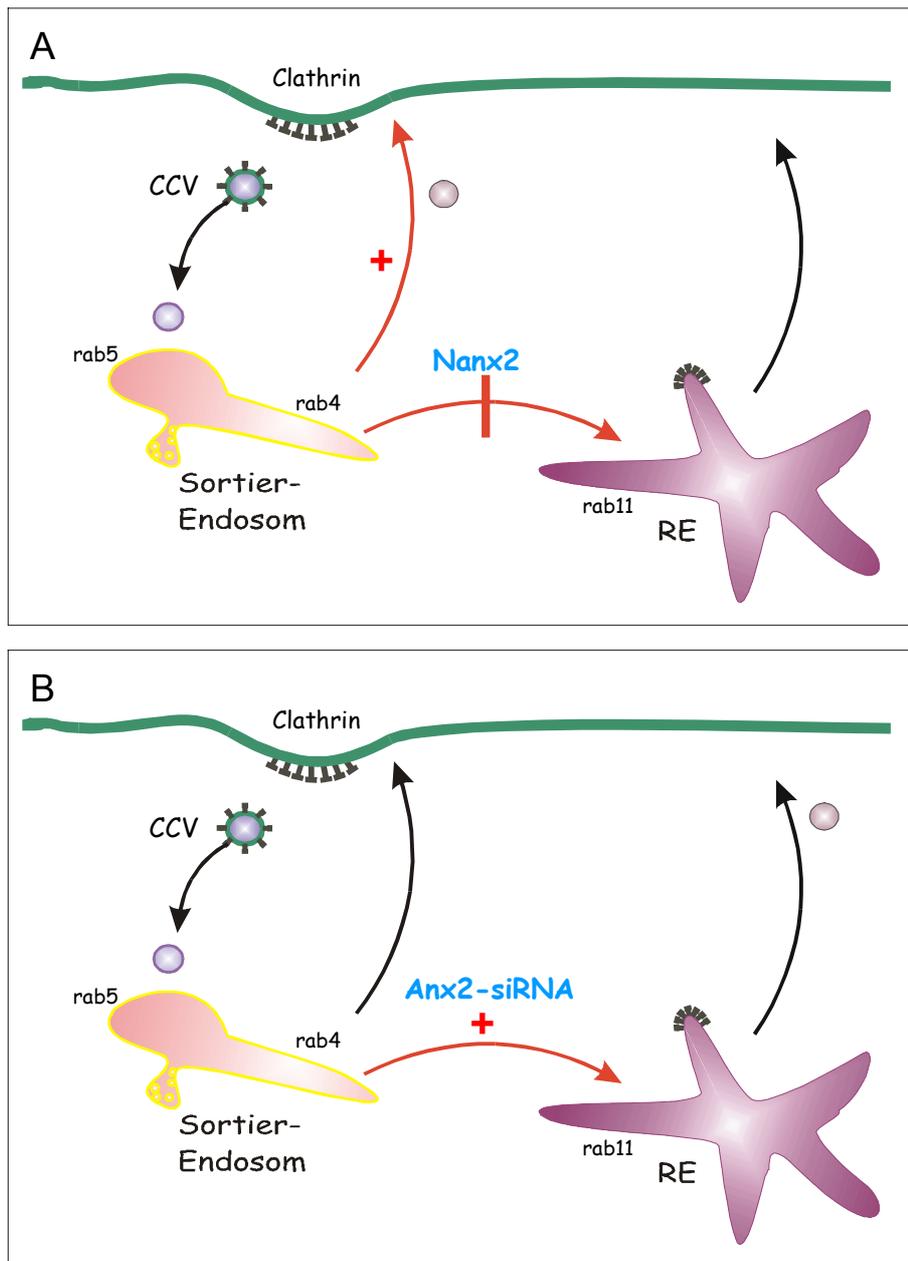


Abb. 37: Einfluß des Annexin 2 auf den Transport von Transferrin. A) Bei Überexpression der N-terminalen Domäne des Annexin 2 (Nanx2) ist internalisiertes Transferrin kaum im Recyclingkompartiment nachzuweisen. Es konnte zusätzlich eine Erhöhung der Recyclingrate gemessen werden. B) Die Verminderung des Annexin 2-Gehaltes durch spezifische Annexin 2-siRNA-Oligos (ha2.3) führt zu einer starken Akkumulation des Transferrins im Recyclingkompartiment und einer leicht erniedrigten Recyclingrate. Die Annexin 2 reguliert dabei vermutlich den Transport von den Sortierendosomen zu den Recyclingendosomen. In Anwesenheit von großen Mengen der N-terminalen Domäne wird der schnelle Recyclingweg von den Sortierendosomen zur Plasmamembran begünstigt. In Abwesenheit von Annexin 2 wird dagegen der Weg zu den Recyclingendosomen gefördert.

V Literaturverzeichnis

- Anderson, D.M. and Schneewind, O. (1999) Type III machines of Gram-negative pathogens: injecting virulence factors into host cells and more. *Curr Opin Microbiol*, **2**, 18-24.
- Anderson, R.G. (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem*, **67**, 199-225.
- Ando, Y., Imamura, S., Owada, M.K. and Kannagi, R. (1991) Calcium-induced intracellular cross-linking of lipocortin I by tissue transglutaminase in A431 cells. Augmentation by membrane phospholipids. *J Biol Chem*, **266**, 1101-1108.
- Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G. and Gruenberg, J. (1993) Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J Cell Biol*, **123**, 1373-1387.
- Apodaca, G. (2001) Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic*, **2**, 149-159.
- Arrigo, A.P., Darlix, J.L. and Spahr, P.F. (1983) A cellular protein phosphorylated by the avian sarcoma virus transforming gene product is associated with ribonucleoprotein particles. *Embo J*, **2**, 309-315.
- Ausubel F.M., B.R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. (1995) *Current protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Ayala-Sanmartin, J. (2001) Cholesterol enhances phospholipid binding and aggregation of annexins by their core domain. *Biochem Biophys Res Commun*, **283**, 72-79.
- Babiychuk, E.B. and Draeger, A. (2000) Annexins in cell membrane dynamics. Ca²⁺-regulated association of lipid microdomains. *J Cell Biol*, **150**, 1113-1124.
- Bain, C., Keller, R., Collington, G.K., Trabulsi, L.R. and Knutton, S. (1998) Increased levels of intracellular calcium are not required for the formation of attaching and effacing lesions by enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli. *Infect Immun*, **66**, 3900-3908.
- Baldwin, T.J., Ward, W., Aitken, A., Knutton, S. and Williams, P.H. (1991) Elevation of intracellular free calcium levels in HEp-2 cells infected with enteropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun*, **59**, 1599-1604.
- Bass, B.L. (2000) Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell*, **101**, 235-238.
- Becker, T., Weber, K. and Johnsson, N. (1990) Protein-protein recognition via short amphiphilic helices; a mutational analysis of the binding site of annexin II for p11. *Embo J*, **9**, 4207-4213.
- Benesch, S., Lommel, S., Steffen, A., Stradal, T.E., Scaplehorn, N., Way, M., Wehland, J. and Rottner, K. (2002) PIP₂-induced vesicle movement depends on N-WASP and involves Nck, WIP and Grb2. *J Biol Chem*, **279**, 29.
- Benz, J., Bergner, A., Hofmann, A., Demange, P., Gottig, P., Liemann, S., Huber, R. and Voges, D. (1996) The structure of recombinant human annexin VI in crystals and membrane-bound. *J Mol Biol*, **260**, 638-643.
- Biener, Y., Feinstein, R., Mayak, M., Kaburagi, Y., Kadowaki, T. and Zick, Y. (1996) Annexin II is a novel player in insulin signal transduction. Possible association between annexin II phosphorylation and insulin receptor internalization. *J Biol Chem*, **271**, 29489-29496.
- Blackwood, R.A. and Ernst, J.D. (1990) Characterization of Ca²⁺-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins. *Biochem J*, **266**, 195-200.

- Blackwood, R.A., Smolen, J.E., Transue, A., Hessler, R.J., Harsh, D.M., Brower, R.C. and French, S. (1997) Phospholipase D activity facilitates Ca²⁺-induced aggregation and fusion of complex liposomes. *Am J Physiol*, **272**, C1279-1285.
- Blumenthal, R., Henkart, M. and Steer, C.J. (1983) Clathrin-induced pH-dependent fusion of phosphatidylcholine vesicles. *J Biol Chem*, **258**, 3409-3415.
- Boll, W., Ohno, H., Songyang, Z., Rapoport, I., Cantley, L.C., Bonifacino, J.S. and Kirchhausen, T. (1996) Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes. *Embo J*, **15**, 5789-5795.
- Bomsel, M., Parton, R., Kuznetsov, S.A., Schroer, T.A. and Gruenberg, J. (1990) Microtubule- and motor-dependent fusion in vitro between apical and basolateral endocytic vesicles from MDCK cells. *Cell*, **62**, 719-731.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brown, D.A. and London, E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**, 111-136.
- Brown, F.D., Rozelle, A.L., Yin, H.L., Balla, T. and Donaldson, J.G. (2001) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol*, **154**, 1007-1017.
- Burger, A., Berendes, R., Liemann, S., Benz, J., Hofmann, A., Gottig, P., Huber, R., Gerke, V., Thiel, C., Romisch, J. and Weber, K. (1996) The crystal structure and ion channel activity of human annexin II, a peripheral membrane protein. *J Mol Biol*, **257**, 839-847.
- Caplan, S., Naslavsky, N., Hartnell, L.M., Lodge, R., Polishchuk, R.S., Donaldson, J.G. and Bonifacino, J.S. (2002) A tubular EHD1-containing compartment involved in the recycling of major histocompatibility complex class I molecules to the plasma membrane. *Embo J*, **21**, 2557-2567.
- Caroni, P. (2001) New EMBO members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts. *Embo J*, **20**, 4332-4336.
- Celli, J., Olivier, M. and Finlay, B.B. (2001) Enteropathogenic Escherichia coli mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. *Embo J*, **20**, 1245-1258.
- Chasserot-Golaz, S., Vitale, N., Sagot, I., Delouche, B., Dirrig, S., Pradel, L.A., Henry, J.P., Aunis, D. and Bader, M.F. (1996) Annexin II in exocytosis: catecholamine secretion requires the translocation of p36 to the subplasmalemmal region in chromaffin cells. *J Cell Biol*, **133**, 1217-1236.
- Chaudhary, A., Chen, J., Gu, Q.M., Witke, W., Kwiatkowski, D.J. and Prestwich, G.D. (1998) Probing the phosphoinositide 4,5-bisphosphate binding site of human profilin I. *Chem Biol*, **5**, 273-281.
- Chavrier, P., Parton, R.G., Hauri, H.P., Simons, K. and Zerial, M. (1990) Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell*, **62**, 317-329.
- Chen, C. and Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*, **7**, 2745-2752.
- Condeelis, J. (2001) How is actin polymerization nucleated in vivo? *Trends Cell Biol*, **11**, 288-293.
- Crane, J.K. and Oh, J.S. (1997) Activation of host cell protein kinase C by enteropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun*, **65**, 3277-3285.
- Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M.R., Luthi, A., Kim, W.T., Takei, K., Daniell, L., Nemoto, Y., Shears, S.B., Flavell, R.A., McCormick, D.A. and De Camilli, P. (1999) Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell*, **99**, 179-188.
- Czech, M.P. (2000) PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface. *Cell*, **100**, 603-606.

- Damke, H., Baba, T., van der Blik, A.M. and Schmid, S.L. (1995) Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J Cell Biol*, **131**, 69-80.
- Daro, E., van der Sluijs, P., Galli, T. and Mellman, I. (1996) Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 9559-9564.
- Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A. and Lodish, H.F. (1983) pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 2258-2262.
- de Diego, I., Schwartz, F., Siegfried, H., Dauterstedt, P., Heeren, J., Beisiegel, U., Enrich, C. and Grewal, T. (2002) Cholesterol modulates the membrane binding and intracellular distribution of annexin 6. *J Biol Chem*, **277**, 32187-32194.
- de Duve, C. (1963) Lysosomes. In de Reuck, A.V.S., Cameron, M.P. (ed.), *Ciba Foundation Symposium*. Churchill, London, pp. 411-412.
- DeVinney, R., Gauthier, A., Abe, A. and Finlay, B.B. (1999) Enteropathogenic Escherichia coli: a pathogen that inserts its own receptor into host cells. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 961-976.
- Diakonova, M., Gerke, V., Ernst, J., Liautard, J.P., van der Vusse, G. and Griffiths, G. (1997) Localization of five annexins in J774 macrophages and on isolated phagosomes. *J Cell Sci*, **110**, 1199-1213.
- Diaz-Munoz, M., Hamilton, S.L., Kaetzel, M.A., Hazarika, P. and Dedman, J.R. (1990) Modulation of Ca²⁺ release channel activity from sarcoplasmic reticulum by annexin VI (67-kDa calcimedlin). *J Biol Chem*, **265**, 15894-15899.
- D'Souza-Schorey, C., Li, G., Colombo, M.I. and Stahl, P.D. (1995) A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science*, **267**, 1175-1178.
- D'Souza-Schorey, C., van Donselaar, E., Hsu, V.W., Yang, C., Stahl, P.D. and Peters, P.J. (1998) ARF6 targets recycling vesicles to the plasma membrane: insights from an ultrastructural investigation. *J Cell Biol*, **140**, 603-616.
- Dytoc, M., Fedorko, L. and Sherman, P.M. (1994) Signal transduction in human epithelial cells infected with attaching and effacing Escherichia coli in vitro. *Gastroenterology*, **106**, 1150-1161.
- Eberhard, D.A., Karns, L.R., VandenBerg, S.R. and Creutz, C.E. (2001) Control of the nuclear-cytoplasmic partitioning of annexin II by a nuclear export signal and by p11 binding. *J Cell Sci*, **114**, 3155-3166.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- Elliott, S.J., Yu, J. and Kaper, J.B. (1999) The cloned locus of enterocyte effacement from enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 is unable to confer the attaching and effacing phenotype upon E. coli K-12. *Infect Immun*, **67**, 4260-4263.
- Emans, N., Gorvel, J.P., Walter, C., Gerke, V., Kellner, R., Griffiths, G. and Gruenberg, J. (1993) Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles. *J Cell Biol*, **120**, 1357-1369.
- Erikson, E. and Erikson, R.L. (1980) Identification of a cellular protein substrate phosphorylated by the avian sarcoma virus-transforming gene product. *Cell*, **21**, 829-836.
- Erikson, E., Tomasiewicz, H.G. and Erikson, R.L. (1984) Biochemical characterization of a 34-kilodalton normal cellular substrate of pp60v-src and an associated 6-kilodalton protein. *Mol Cell Biol*, **4**, 77-85.
- Fava, R.A. and Cohen, S. (1984) Isolation of a calcium-dependent 35-kilodalton substrate for the epidermal growth factor receptor/kinase from A-431 cells. *J Biol Chem*, **259**, 2636-2645.
- Favier-Perron, B., Lewit-Bentley, A. and Russo-Marie, F. (1996) The high-resolution crystal structure of human annexin III shows subtle differences with annexin V. *Biochemistry*, **35**, 1740-1744.

- Fiedler, K., Lafont, F., Parton, R.G. and Simons, K. (1995) Annexin XIIIb: a novel epithelial specific annexin is implicated in vesicular traffic to the apical plasma membrane. *J Cell Biol*, **128**, 1043-1053.
- Filipenko, N.R. and Waisman, D.M. (2001) The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin. *J Biol Chem*, **276**, 5310-5315.
- Franco, M., Peters, P.J., Boretto, J., van Donselaar, E., Neri, A., D'Souza-Schorey, C. and Chavrier, P. (1999) EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization. *Embo J*, **18**, 1480-1491.
- Frischknecht, F., Cudmore, S., Moreau, V., Reckmann, I., Rottger, S. and Way, M. (1999a) Tyrosine phosphorylation is required for actin-based motility of vaccinia but not Listeria or Shigella. *Curr Biol*, **9**, 89-92.
- Frischknecht, F., Moreau, V., Rottger, S., Gonfloni, S., Reckmann, I., Superti-Furga, G. and Way, M. (1999b) Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling. *Nature*, **401**, 926-929.
- Frischknecht, F. and Way, M. (2001) Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization. *Trends Cell Biol*, **11**, 30-38.
- Fruman, D.A., Meyers, R.E. and Cantley, L.C. (1998) Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem*, **67**, 481-507.
- Futter, C.E., Felder, S., Schlessinger, J., Ullrich, A. and Hopkins, C.R. (1993) Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol*, **120**, 77-83.
- Galan, J.E. and Collmer, A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, **284**, 1322-1328.
- Galbiati, F., Razani, B. and Lisanti, M.P. (2001) Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell*, **106**, 403-411.
- Galli, T., Chilcote, T., Mundigl, O., Binz, T., Niemann, H. and De Camilli, P. (1994) Tetanus toxin-mediated cleavage of cellubrevin impairs exocytosis of transferrin receptor-containing vesicles in CHO cells. *J Cell Biol*, **125**, 1015-1024.
- Geisow, M.J., Fritsche, U., Hexham, J.M., Dash, B. and Johnson, T. (1986) A consensus amino-acid sequence repeat in Torpedo and mammalian Ca²⁺-dependent membrane-binding proteins. *Nature*, **320**, 636-638.
- Gerke, V. and Moss, S.E. (1997) Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta*, **1357**, 129-154.
- Gerke, V. and Moss, S.E. (2002) Annexins: from structure to function. *Physiol Rev*, **82**, 331-371.
- Gerke, V. and Weber, K. (1984) Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin. *Embo J*, **3**, 227-233.
- Gerke, V. and Weber, K. (1985) The regulatory chain in the p36-kd substrate complex of viral tyrosine-specific protein kinases is related in sequence to the S-100 protein of glial cells. *Embo J*, **4**, 2917-2920.
- Geuze, H.J., Slot, J.W., Strous, G.J., Lodish, H.F. and Schwartz, A.L. (1983) Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis. *Cell*, **32**, 277-287.
- Glenney, J.R., Jr., Tack, B. and Powell, M.A. (1987) Calpactins: two distinct Ca⁺⁺-regulated phospholipid- and actin-binding proteins isolated from lung and placenta. *J Cell Biol*, **104**, 503-511.

- Goldenberg, H., Seelos, C., Chatwani, S., Chegini, S. and Pumm, R. (1991) Uptake and endocytic pathway of transferrin and iron in perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta*, **1067**, 145-152.
- Goosney, D.L., DeVinney, R. and Finlay, B.B. (2001) Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pedestals. *Infect Immun*, **69**, 3315-3322.
- Goosney, D.L., DeVinney, R., Pfuetzner, R.A., Frey, E.A., Strynadka, N.C. and Finlay, B.B. (2000a) Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actinin. *Curr Biol*, **10**, 735-738.
- Goosney, D.L., Gruenheid, S. and Finlay, B.B. (2000b) Gut feelings: enteropathogenic *E. coli* (EPEC) interactions with the host. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 173-189.
- Gorvel, J.P., Chavrier, P., Zerial, M. and Gruenberg, J. (1991) rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell*, **64**, 915-925.
- Grewal, T., Heeren, J., Mewawala, D., Schnitgerhans, T., Wendt, D., Salomon, G., Enrich, C., Beisiegel, U. and Jackle, S. (2000) Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of low density lipoprotein to the prelysosomal compartment. *J Biol Chem*, **275**, 33806-33813.
- Gruenberg, J. and Howell, K.E. (1989) Membrane traffic in endocytosis: insights from cell-free assays. *Annu Rev Cell Biol*, **5**, 453-481.
- Gruenheid, S., DeVinney, R., Bladt, F., Goosney, D., Gelkop, S., Gish, G.D., Pawson, T. and Finlay, B.B. (2001) Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nat Cell Biol*, **3**, 856-859.
- Haigler, H.T., Fitch, J.M., Jones, J.M. and Schlaepfer, D.D. (1989) Two lipocortin-like proteins, endonexin II and anchorin CII, may be alternate splices of the same gene. *Trends Biochem Sci*, **14**, 48-50.
- Hannon, G.J. (2002) RNA interference. *Nature*, **418**, 244-251.
- Harder, T. and Gerke, V. (1993) The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin IIp11(2) complex. *J Cell Biol*, **123**, 1119-1132.
- Harder, T., Kellner, R., Parton, R.G. and Gruenberg, J. (1997) Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. *Mol Biol Cell*, **8**, 533-545.
- Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P. and Simons, K. (1998) Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol*, **141**, 929-942.
- Harder, T. and Simons, K. (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 534-542.
- Harder, T., Thiel, C. and Gerke, V. (1993) Formation of the annexin IIp112 complex upon differentiation of F9 teratocarcinoma cells. *J Cell Sci*, **104**, 1109-1117.
- Henley, J.R., Krueger, E.W., Oswald, B.J. and McNiven, M.A. (1998) Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol*, **141**, 85-99.
- Higgs, H.N. and Pollard, T.D. (2000) Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J Cell Biol*, **150**, 1311-1320.
- Higgs, H.N. and Pollard, T.D. (2001) Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem*, **70**, 649-676.
- Hinshaw, J.E. (2000) Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 483-519.

- Hofmann, M.W., Honing, S., Rodionov, D., Dobberstein, B., von Figura, K. and Bakke, O. (1999) The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *J Biol Chem*, **274**, 36153-36158.
- Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A.J., Frohman, M.A. and Kanaho, Y. (1999) Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell*, **99**, 521-532.
- Horiuchi, H., Lippe, R., McBride, H.M., Rubino, M., Woodman, P., Stenmark, H., Rybin, V., Wilm, M., Ashman, K., Mann, M. and Zerial, M. (1997) A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell*, **90**, 1149-1159.
- Hubaishy, I., Jones, P.G., Bjorge, J., Bellagamba, C., Fitzpatrick, S., Fujita, D.J. and Waisman, D.M. (1995) Modulation of annexin II tetramer by tyrosine phosphorylation. *Biochemistry*, **34**, 14527-14534.
- Huber, L.A., Fialka, I., Paiha, K., Hunziker, W., Sacks, D.B., Bahler, M., Way, M., Gagescu, R. and Gruenberg, J. (2000) Both calmodulin and the unconventional myosin Myr4 regulate membrane trafficking along the recycling pathway of MDCK cells. *Traffic*, **1**, 494-503.
- Huber, R., Berendes, R., Burger, A., Schneider, M., Karshikov, A., Luecke, H., Romisch, J. and Paques, E. (1992) Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins. *J Mol Biol*, **223**, 683-704.
- Huber, R., Romisch, J. and Paques, E.P. (1990) The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *Embo J*, **9**, 3867-3874.
- Jarvis, K.G., Giron, J.A., Jerse, A.E., McDaniel, T.K., Donnenberg, M.S. and Kaper, J.B. (1995) Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7996-8000.
- Jeng, R.L. and Welch, M.D. (2001) Cytoskeleton: actin and endocytosis--no longer the weakest link. *Curr Biol*, **11**, R691-694.
- Johannes, L. and Lamaze, C. (2002) Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic*, **3**, 443-451.
- Johnsson, N., Marriott, G. and Weber, K. (1988) p36, the major cytoplasmic substrate of src tyrosine protein kinase, binds to its p11 regulatory subunit via a short amino-terminal amphiphatic helix. *Embo J*, **7**, 2435-2442.
- Johnsson, N., Nguyen Van, P., Soling, H.D. and Weber, K. (1986) Functionally distinct serine phosphorylation sites of p36, the cellular substrate of retroviral protein kinase; differential inhibition of reassociation with p11. *Embo J*, **5**, 3455-3460.
- Johnsson, N. and Weber, K. (1990) Alkylation of cysteine 82 of p11 abolishes the complex formation with the tyrosine-protein kinase substrate p36 (annexin 2, calpactin 1, lipocortin 2). *J Biol Chem*, **265**, 14464-14468.
- Johnstone, S.A., Hubaishy, I. and Waisman, D.M. (1992) Phosphorylation of annexin II tetramer by protein kinase C inhibits aggregation of lipid vesicles by the protein. *J Biol Chem*, **267**, 25976-25981.
- Jones, P.G., Moore, G.J. and Waisman, D.M. (1992) 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.
- Jost, M. and Gerke, V. (1996) Mapping of a regulatory important site for protein kinase C phosphorylation in the N-terminal domain of annexin II. *Biochim Biophys Acta*, **1313**, 283-289.
- Jost, M., Weber, K. and Gerke, V. (1994) Annexin II contains two types of Ca(2+)-binding sites. *Biochem J*, **298 Pt 3**, 553-559.

- Jost, M., Zeuschner, D., Seemann, J., Weber, K. and Gerke, V. (1997) Identification and characterization of a novel type of annexin-membrane interaction: Ca²⁺ is not required for the association of annexin II with early endosomes. *J Cell Sci*, **110**, 221-228.
- Kaetzel, M.A., Chan, H.C., Dubinsky, W.P., Dedman, J.R. and Nelson, D.J. (1994) A role for annexin IV in epithelial cell function. Inhibition of calcium-activated chloride conductance. *J Biol Chem*, **269**, 5297-5302.
- Kalman, D., Weiner, O.D., Goosney, D.L., Sedat, J.W., Finlay, B.B., Abo, A. and Bishop, J.M. (1999) Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. *Nat Cell Biol*, **1**, 389-391.
- Kamal, A., Ying, Y. and Anderson, R.G. (1998) Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes. *J Cell Biol*, **142**, 937-947.
- Karasik, A., Pepinsky, R.B., Shoelson, S.E. and Kahn, C.R. (1988) Lipocortins 1 and 2 as substrates for the insulin receptor kinase in rat liver. *J Biol Chem*, **263**, 11862-11867.
- Kawasaki, H., Nakayama, S. and Kretsinger, R.H. (1998) Classification and evolution of EF-hand proteins. *Biometals*, **11**, 277-295.
- Kenny, B. (1999) Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol Microbiol*, **31**, 1229-1241.
- Kenny, B. (2002) Mechanism of action of EPEC type III effector molecules. *Int J Med Microbiol*, **291**, 469-477.
- Kenny, B. and Finlay, B.B. (1997) Intimin-dependent binding of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma1. *Infect Immun*, **65**, 2528-2536.
- Kirchhausen, T. (2000) Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 187-198.
- Kobayashi, T., Beuchat, M.H., Lindsay, M., Frias, S., Palmiter, R.D., Sakuraba, H., Parton, R.G. and Gruenberg, J. (1999) Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat Cell Biol*, **1**, 113-118.
- Kobayashi, T., Gu, F. and Gruenberg, J. (1998) Lipids, lipid domains and lipid-protein interactions in endocytic membrane traffic. *Semin Cell Dev Biol*, **9**, 517-526.
- König, J. (2000) Zur Beteiligung des Annexin II an zellulären Membrantransportprozessen. *IMB. Universitaet Muenster, Muenster*.
- König, J. and Gerke, V. (2000) Modes of annexin-membrane interactions analyzed by employing chimeric annexin proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1498**, 174-180.
- König, J., Prenen, J., Nilius, B. and Gerke, V. (1998) The annexin II-p11 complex is involved in regulated exocytosis in bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Biol Chem*, **273**, 19679-19684.
- Kube, E., Becker, T., Weber, K. and Gerke, V. (1992) Protein-protein interaction studied by site-directed mutagenesis. Characterization of the annexin II-binding site on p11, a member of the S100 protein family. *J Biol Chem*, **267**, 14175-14182.
- Kurzchalia, T.V. and Parton, R.G. (1999) Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 424-431.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

- Lafont, F., Lecat, S., Verkade, P. and Simons, K. (1998) Annexin XIIIb associates with lipid microdomains to function in apical delivery. *J Cell Biol*, **142**, 1413-1427.
- Levine, M.M., Bergquist, E.J., Nalin, D.R., Waterman, D.H., Hornick, R.B., Young, C.R. and Sotman, S. (1978) Escherichia coli strains that cause diarrhoea, but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins are non-invasive. *Lancet*, **1**, 1119-1122.
- Liemann, S., Bringemeier, I., Benz, J., Gottig, P., Hofmann, A., Huber, R., Noegel, A.A. and Jacob, U. (1997) Crystal structure of the C-terminal tetrad repeat from synexin (annexin VII) of Dictyostelium discoideum. *J Mol Biol*, **270**, 79-88.
- Lin, H.C., Sudhof, T.C. and Anderson, R.G. (1992) Annexin VI is required for budding of clathrin-coated pits. *Cell*, **70**, 283-291.
- Liu, Y., Casey, L. and Pike, L.J. (1998) Compartmentalization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in low-density membrane domains in the absence of caveolin. *Biochem Biophys Res Commun*, **245**, 684-690.
- Luecke, H., Chang, B.T., Mailliard, W.S., Schlaepfer, D.D. and Haigler, H.T. (1995) Crystal structure of the annexin XII hexamer and implications for bilayer insertion [see comments]. *Nature*, **378**, 512-515.
- Luk, A.S., Kaler, E.W. and Lee, S.P. (1993) Phospholipase C-induced aggregation and fusion of cholesterol-lecithin small unilamellar vesicles. *Biochemistry*, **32**, 6965-6973.
- Manjarrez-Hernandez, H.A., Baldwin, T.J., Williams, P.H., Haigh, R., Knutton, S. and Aitken, A. (1996) Phosphorylation of myosin light chain at distinct sites and its association with the cytoskeleton during enteropathogenic Escherichia coli infection. *Infect Immun*, **64**, 2368-2370.
- Martinez-Quiles, N., Rohatgi, R., Anton, I.M., Medina, M., Saville, S.P., Miki, H., Yamaguchi, H., Takenawa, T., Hartwig, J.H., Geha, R.S. and Ramesh, N. (2001) WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nat Cell Biol*, **3**, 484-491.
- Maxfield, F.R. and Yamashiro, D.J. (1987) Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. *Adv Exp Med Biol*, **225**, 189-198.
- Mayorga, L.S., Beron, W., Sarrouf, M.N., Colombo, M.I., Creutz, C. and Stahl, P.D. (1994) Calcium-dependent fusion among endosomes. *J Biol Chem*, **269**, 30927-30934.
- McBride, H.M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R. and Zerial, M. (1999) Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell*, **98**, 377-386.
- McKinley, D.N. and Wiley, H.S. (1988) Reassessment of fluid-phase endocytosis and diacytosis in monolayer cultures of human fibroblasts. *J Cell Physiol*, **136**, 389-397.
- McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A. and Murray, D. (2002) PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **31**, 151-175.
- McNew, J.A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R.J., Paz, K., Paumet, F., Sollner, T.H. and Rothman, J.E. (2000) Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature*, **407**, 153-159.
- Meresse, S., Gorvel, J.P. and Chavrier, P. (1995) The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes. *J Cell Sci*, **108**, 3349-3358.
- Merrifield, C.J., Moss, S.E., Ballestrom, C., Imhof, B.A., Giese, G., Wunderlich, I. and Almers, W. (1999) Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. *Nat Cell Biol*, **1**, 72-74.
- Merrifield, C.J., Rescher, U., Almers, W., Proust, J., Gerke, V., Sechi, A.S. and Moss, S.E. (2001) Annexin 2 has an essential role in actin-based macropinocytic rocketing. *Curr Biol*, **11**, 1136-1141.

- Mineo, C. and Anderson, R.G. (2001) Potocytosis. Robert Feulgen Lecture. *Histochem Cell Biol*, **116**, 109-118.
- Moews, P.C. and Kretsinger, R.H. (1975) Refinement of the structure of carp muscle calcium-binding parvalbumin by model building and difference Fourier analysis. *J Mol Biol*, **91**, 201-225.
- Mohrmann, K., Gerez, L., Oorschot, V., Klumperman, J. and Van Der Sluijs, P. (2002) rab4 Function in Membrane Recycling from Early Endosomes Depends on a Membrane to Cytoplasm Cycle. *J Biol Chem*, **277**, 32029-32035.
- Morgan, R.O. and Fernandez, M.P. (1995) Molecular phylogeny of annexins and identification of a primitive homologue in *Giardia lamblia*. *Mol Biol Evol*, **12**, 967-979.
- Mukherjee, S., Ghosh, R.N. and Maxfield, F.R. (1997) Endocytosis. *Physiol Rev*, **77**, 759-803.
- Nilius, B., Gerke, V., Prenen, J., Szucs, G., Heinke, S., Weber, K. and Droogmans, G. (1996) Annexin II modulates volume-activated chloride currents in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, **271**, 30631-30636.
- Oh, P., McIntosh, D.P. and Schnitzer, J.E. (1998) Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol*, **141**, 101-114.
- Oliferenko, S., Paiha, K., Harder, T., Gerke, V., Schwarzler, C., Schwarz, H., Beug, H., Gunthert, U. and Huber, L.A. (1999) Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*, **146**, 843-854.
- Parlati, F., McNew, J.A., Fukuda, R., Miller, R., Sollner, T.H. and Rothman, J.E. (2000) Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion. *Nature*, **407**, 194-198.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J. and Helenius, A. (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol*, **3**, 473-483.
- Pepinsky, R.B. and Sinclair, L.K. (1986) Epidermal growth factor-dependent phosphorylation of lipocortin. *Nature*, **321**, 81-84.
- Perretti, M. (1997) Endogenous mediators that inhibit the leukocyte-endothelium interaction. *Trends Pharmacol Sci*, **18**, 418-425.
- Peters, P.J., Gao, M., Gaschet, J., Ambach, A., van Donselaar, E., Traverse, J.F., Bos, E., Wolffe, E.J. and Hsu, V.W. (2001) Characterization of coated vesicles that participate in endocytic recycling. *Traffic*, **2**, 885-895.
- Peters, P.J., Hsu, V.W., Ooi, C.E., Finazzi, D., Teal, S.B., Oorschot, V., Donaldson, J.G. and Klausner, R.D. (1995) Overexpression of wild-type and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments. *J Cell Biol*, **128**, 1003-1017.
- Pitzalis, C., Pipitone, N. and Perretti, M. (2002) Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci*, **966**, 108-118.
- Poirier, M.A., Xiao, W., Macosko, J.C., Chan, C., Shin, Y.K. and Bennett, M.K. (1998) The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle. *Nat Struct Biol*, **5**, 765-769.
- Powell, M.A. and Glenney, J.R. (1987) Regulation of calpactin I phospholipid binding by calpactin I light-chain binding and phosphorylation by p60v-src. *Biochem J*, **247**, 321-328.
- Prekeris, R., Klumperman, J., Chen, Y.A. and Scheller, R.H. (1998) Syntaxin 13 mediates cycling of plasma membrane proteins via tubulovesicular recycling endosomes. *J Cell Biol*, **143**, 957-971.
- Puisieux, A., Ji, J. and Ozturk, M. (1996) Annexin II up-regulates cellular levels of p11 protein by a post-translational mechanisms. *Biochem J*, **313**, 51-55.

- Qualmann, B., Kessels, M.M. and Kelly, R.B. (2000) Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*, **150**, F111-116.
- Radhakrishna, H., Al-Awar, O., Khachikian, Z. and Donaldson, J.G. (1999) ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *J Cell Sci*, **112**, 855-866.
- Radhakrishna, H. and Donaldson, J.G. (1997) ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J Cell Biol*, **139**, 49-61.
- Radhakrishna, H., Klausner, R.D. and Donaldson, J.G. (1996) Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase. *J Cell Biol*, **134**, 935-947.
- Radke, K., Gilmore, T. and Martin, G.S. (1980) Transformation by Rous sarcoma virus: a cellular substrate for transformation-specific protein phosphorylation contains phosphotyrosine. *Cell*, **21**, 821-828.
- Raynal, P. and Pollard, H.B. (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1197**, 63-93.
- Ren, M., Xu, G., Zeng, J., De Lemos-Chiarandini, C., Adesnik, M. and Sabatini, D.D. (1998) Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6187-6192.
- Rescher, U., Zobiack, N. and Gerke, V. (2000) Intact Ca(2+)-binding sites are required for targeting of annexin I to endosomal membranes in living HeLa cells. *J Cell Sci*, **113**, 3931-3938.
- Rety, S., Sopkova, J., Renouard, M., Osterloh, D., Gerke, V., Tabaries, S., Russo-Marie, F. and Lewit-Bentley, A. (1999) The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nat Struct Biol*, **6**, 89-95.
- Rohatgi, R., Ho, H.Y. and Kirschner, M.W. (2000) Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol*, **150**, 1299-1310.
- Rohatgi, R., Nollau, P., Ho, H.Y., Kirschner, M.W. and Mayer, B.J. (2001) Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J Biol Chem*, **276**, 26448-26452.
- Rohde, G., Wenzel, D. and Haucke, V. (2002) A phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site within mu2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol*, **158**, 209-214.
- Rosenberger, C.M., Brumell, J.H. and Finlay, B.B. (2000) Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. *Curr Biol*, **10**, R823-825.
- Rosengarth, A., Gerke, V. and Luecke, H. (2001) X-ray structure of full-length annexin 1 and implications for membrane aggregation. *J Mol Biol*, **306**, 489-498.
- Rosenshine, I., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B. and Finlay, B.B. (1992) Signal transduction between enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. *Embo J*, **11**, 3551-3560.
- Rosenshine, I., Ruschkowski, S. and Finlay, B.B. (1996) Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic Escherichia coli depends on growth phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells. *Infect Immun*, **64**, 966-973.
- Rozelle, A.L., Machesky, L.M., Yamamoto, M., Driessens, M.H., Insall, R.H., Roth, M.G., Luby-Phelps, K., Marriott, G., Hall, A. and Yin, H.L. (2000) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol*, **10**, 311-320.

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. and Lanzavecchia, A. (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*, **182**, 389-400.
- Sambrook J., F.E.F.u.M.T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sarafian, T., Pradel, L.A., Henry, J.P., Aunis, D. and Bader, M.F. (1991) The participation of annexin II (calpactin I) in calcium-evoked exocytosis requires protein kinase C. *J Cell Biol*, **114**, 1135-1147.
- Scaplehorn, N., Holmstrom, A., Moreau, V., Frischknecht, F., Reckmann, I. and Way, M. (2002) Grb2 and nck act cooperatively to promote actin-based motility of vaccinia virus. *Curr Biol*, **12**, 740-745.
- Schlaepfer, D.D. and Haigler, H.T. (1988) In vitro protein kinase C phosphorylation sites of placental lipocortin. *Biochemistry*, **27**, 4253-4258.
- Schnitzer, J.E., Liu, J. and Oh, P. (1995) Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. *J Biol Chem*, **270**, 14399-14404.
- Sechi, A.S. and Wehland, J. (2000) The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci*, **113**, 3685-3695.
- Seemann, J., Weber, K., Osborn, M., Parton, R.G. and Gerke, V. (1996) The association of annexin I with early endosomes is regulated by Ca²⁺ and requires an intact N-terminal domain. *Mol Biol Cell*, **7**, 1359-1374.
- Sheff, D., Pelletier, L., O'Connell, C.B., Warren, G. and Mellman, I. (2002) Transferrin receptor recycling in the absence of perinuclear recycling endosomes. *J Cell Biol*, **156**, 797-804.
- Sheff, D.R., Daro, E.A., Hull, M. and Mellman, I. (1999) The Receptor Recycling Pathway Contains Two Distinct Populations of Early Endosomes with Different Sorting Functions. *J Cell Biol*, **145**, 123-139.
- Shin, J.S. and Abraham, S.N. (2001) Co-option of endocytic functions of cellular caveolae by pathogens. *Immunology*, **102**, 2-7.
- Shin, J.S., Gao, Z. and Abraham, S.N. (2000) Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science*, **289**, 785-788.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.
- Singh, T.K. and Liu, L. (2000) Modification of cysteine residues by N-ethylmaleimide inhibits annexin II tetramer mediated liposome aggregation. *Arch Biochem Biophys*, **381**, 235-240.
- Sipe, D.M., Jesurum, A. and Murphy, R.F. (1991) Absence of Na⁺,K⁺-ATPase regulation of endosomal acidification in K562 erythroleukemia cells. Analysis via inhibition of transferrin recycling by low temperatures. *J Biol Chem*, **266**, 3469-3474.
- Smith, P.D. and Moss, S.E. (1994) Structural evolution of the annexin supergene family. *Trends Genet*, **10**, 241-246.
- Sollner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. and Rothman, J.E. (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion [see comments]. *Nature*, **362**, 318-324.

- Song, G., Harding, S.E., Duchon, M.R., Tunwell, R., O'Gara, P., Hawkins, T.E. and Moss, S.E. (2002) Altered mechanical properties and intracellular calcium signaling in cardiomyocytes from annexin 6 null-mutant mice. *FASEB J*, **16**, 622-624.
- Sonnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. and Zerial, M. (2000) Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol*, **149**, 901-914.
- Sternweis, P.C. and Gilman, A.G. (1982) Aluminum: a requirement for activation of the regulatory component of adenylate cyclase by fluoride. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 4888-4891.
- Stoorvogel, W., Oorschot, V. and Geuze, H.J. (1996) A novel class of clathrin-coated vesicles budding from endosomes. *J Cell Biol*, **132**, 21-33.
- Swanson, J.A. and Watts, C. (1995) Macropinocytosis. *Trends Cell Biol*, **5**, 424-427.
- Takei, K. and Haucke, V. (2001) Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol*, **11**, 385-391.
- Taunton, J., Rowning, B.A., Coughlin, M.L., Wu, M., Moon, R.T., Mitchison, T.J. and Larabell, C.A. (2000) Actin-dependent propulsion of endosomes and lysosomes by recruitment of N-WASP. *J Cell Biol*, **148**, 519-530.
- Thiel, C., Osborn, M. and Gerke, V. (1992) The tight association of the tyrosine kinase substrate annexin II with the submembranous cytoskeleton depends on intact p11- and Ca(2+)-binding sites. *J Cell Sci*, **103**, 733-742.
- Thiel, C., Weber, K. and Gerke, V. (1991) Characterization of a discontinuous epitope on annexin II by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett*, **285**, 59-62.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Tran, J.T., Rosengarth, A. and Luecke, H. (2002) Cloning, purification and crystallization of full-length human annexin 2. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **58**, 1854-1857.
- Trischler, M., Stoorvogel, W. and Ullrich, O. (1999) Biochemical analysis of distinct Rab5- and Rab11-positive endosomes along the transferrin pathway. *J Cell Sci*, **112**, 4773-4783.
- Turpin, E., Russo-Marie, F., Dubois, T., de Paillerets, C., Alfsen, A. and Bomsel, M. (1998) In adrenocortical tissue, annexins II and VI are attached to clathrin coated vesicles in a calcium-independent manner. *Biochim Biophys Acta*, **1402**, 115-130.
- Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M. and Parton, R.G. (1996) Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol*, **135**, 913-924.
- Ungewickell, E. and Branton, D. (1981) Assembly units of clathrin coats. *Nature*, **289**, 420-422.
- van Dam, E.M. and Stoorvogel, W. (2002) Dynamin-dependent transferrin receptor recycling by endosome-derived clathrin-coated vesicles. *Mol Biol Cell*, **13**, 169-182.
- van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Male, P., Goud, B. and Mellman, I. (1992) The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell*, **70**, 729-740.
- Van Dyke, R.W. and Belcher, J.D. (1994) Acidification of three types of liver endocytic vesicles: similarities and differences. *Am J Physiol*, **266**, C81-94.
- Varma, R. and Mayor, S. (1998) GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*, **394**, 798-801.

- Varnai, P. and Balla, T. (1998) Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[3H]inositol-labeled phosphoinositide pools. *J Cell Biol*, **143**, 501-510.
- Varticovski, L., Chahwala, S.B., Whitman, M., Cantley, L., Schindler, D., Chow, E.P., Sinclair, L.K. and Pepinsky, R.B. (1988) Location of sites in human lipocortin I that are phosphorylated by protein tyrosine kinases and protein kinases A and C. *Biochemistry*, **27**, 3682-3690.
- Verkade, P., Harder, T., Lafont, F. and Simons, K. (2000) Induction of caveolae in the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol*, **148**, 727-739.
- Watt, S.A., Kular, G., Fleming, I.N., Downes, C.P. and Lucocq, J.M. (2002) Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta1. *Biochem J*, **363**, 657-666.
- Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T.H. and Rothman, J.E. (1998) SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, **92**, 759-772.
- Weng, X., Luecke, H., Song, I.S., Kang, D.S., Kim, S.H. and Huber, R. (1993) Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution. *Protein Sci*, **2**, 448-458.
- Wice, B.M. and Gordon, J.I. (1992) A strategy for isolation of cDNAs encoding proteins affecting human intestinal epithelial cell growth and differentiation: characterization of a novel gut-specific N-myristoylated annexin. *J Cell Biol*, **116**, 405-422.
- Woodman, P.G. and Warren, G. (1988) Fusion between vesicles from the pathway of receptor-mediated endocytosis in a cell-free system. *Eur J Biochem*, **173**, 101-108.
- Wurmser, A.E., Gary, J.D. and Emr, S.D. (1999) Phosphoinositide 3-kinases and their FYVE domain-containing effectors as regulators of vacuolar/lysosomal membrane trafficking pathways. *J Biol Chem*, **274**, 9129-9132.
- Yang, C., Huang, M., DeBiasio, J., Pring, M., Joyce, M., Miki, H., Takenawa, T. and Zigmond, S.H. (2000) Profilin enhances Cdc42-induced nucleation of actin polymerization. *J Cell Biol*, **150**, 1001-1012.
- Yuhan, R., Koutsouris, A., Savkovic, S.D. and Hecht, G. (1997) Enteropathogenic Escherichia coli-induced myosin light chain phosphorylation alters intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, **113**, 1873-1882.
- Zeuschner, D., Stoorvogel, W. and Gerke, V. (2001) Association of annexin 2 with recycling endosomes requires either calcium- or cholesterol-stabilized membrane domains. *Eur J Cell Biol*, **80**, 499-507.
- Zokas, L. and Glenney, J.R., Jr. (1987) The calpactin light chain is tightly linked to the cytoskeletal form of calpactin I: studies using monoclonal antibodies to calpactin subunits. *J Cell Biol*, **105**, 2111-2121.

VI Anhang

1 Sequenzen

humanes Annexin 2

c-DNA-Sequenz: NCBI-Datenbank: NM_004039

```

1 ATGTCTACTG TTCACGAAAT CCTGTGCAAG CTCAGCTTGG AGGGTGATCA
51 CTCTACACCC CCAAGTGCAT ATGGGTCTGT CAAAGCCTAT ACTAACTTTG
101 ATGCTGAGCG GGATGCTTTG AACATTGAAA CAGCCATCAA GACCAAAGGT
151 GTGGATGAGG TCACCATTGT CAACATTTTG ACCAACCGCA GCAATGCACA
201 GAGACAGGAT ATTGCCTTCG CCTACCAGAG AAGGACCAA AAGGAAC TTG
251 CATCAGCACT GAAGTCAGCC TTATCTGGCC ACCTGGAGAC GGTGATTTTG
301 GGCCTATTGA AGACACCTGC TCAGTATGAC GCTTCTGAGC TAAAAGCTTC
351 CATGAAGGGG CTGGGAACCG ACGAGGACTC TCTCATTTGAG ATCATCTGCT
401 CCAGAACCAA CCAGGAGCTG CAGGAAATTA ACAGAGTCTA CAAGGAAATG
451 TACAAGACTG ATCTGGAGAA GGACATTATT TCGGACACAT CTGGTGACTT
501 CCGCAAGCTG ATGGTTGCC TGGCAAAGGG TAGAAGAGCA GAGGATGGCT
551 CTGTCATTGA TTATGAACTG ATTGACCAAG ATGCTCGGGA TCTCTATGAC
601 GCTGGAGTGA AGAGGAAAGG AACTGATGTT CCCAAGTGGA TCAGCATCAT
651 GACCGAGCGG AGCGTGCCCC ACCTCCAGAA AGTATTTGAT AGGTACAAGA
701 GTTACAGCCC TTATGACATG TTGGAAAGCA TCAGGAAAGA GGT TAAAGGA
751 GACCTGAAAA ATGCTTTCCCT GAACCTGGTT CAGTGCATTC AGAACAAGCC
801 CCTGTATTTT GCTGATCGGC TGTATGACTC CATGAAGGGC AAGGGGACGC
851 GAGATAAGGT CCTGATCAGA ATCATGGTCT CCCGCAGTGA AGTGGACATG
901 TTGAAAATTA GGTCTGAATT CAAGAGAAAG TACGGCAAGT CCCTGTACTA
951 TTATATCCAG CAAGACACTA AGGGCGACTA CCAGAAAGCG CTGCTGTACC
1001 TGTGTGGTGG AGATGACTGA

```

Aminosäuresequenz:

MSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKAYTNFDAERDALNIETAIKTKGVDEVTI
VNILNRSNAQRQDIAFAYQRRTKKELASALKSALS GHLETVILGLLKTPAQYDAS
ELKASMKGLGTDEDSLIEIICSR TNQELQEINRVYKEMYKTDLEKDIISDTS GDFRK
LMVALAKGRRAEDGSVIDYELIDQDARDLYDAGVKRKGTDV PKWISIMTERSVPH
LQKVFD RYKSYSPYDML ESIRKEVKGDLENAFLNLVQCIQNKPLYFADRLYDSMK
GKGTRDKVLIRIMVSRSEVDMLKIRSEFKRKYGKSLYYYYIQQDTKG DYQKALLYL
CGGDD

Humanes S100A10

c-DNA-Sequenz: NCBI-Datenbank: NM_005625

```

1 ATGGCAAAAA TCTCCAGCCC TACAGAGACT GAGCGGTGCA TCGAGTCCCT
51 GATTGCTGTC TTCCAGAAGT ATGCTGGAAA GGATGGTTAT AACTACACTC
101 TCTCCAAGAC AGAGTTCCCTA AGCTTCATGA ATACAGAACT AGCTGCCTTC
151 ACAAAGAACC AGAAGGACCC TGGTGTCCCTT GACCGCATGA TGAAGAACT
201 GGACACCAAC AGTGATGGTC AGCTAGATTT CTCAGAATTT CTTAATCTGA
251 TTGGTGGCCT AGCTATGGCT TGCCATGACT CCTTCCTCAA GGCTGTCCCT
301 TCCAGAAGC GGACCTGA

```

Aminosäuresequenz:

MAKISSPTETERCIESLIAVFQKYAGKDGNYTLSKTEFLSFMNTELA AFTKNQKD
PGVLDRMMKKLDTNSDGQLDFSEFLNLIGGLAMACHDSFLKAVPSQKRT

Humane PLC- δ 1**c-DNA-Sequenz: NCBI-Datenbank: NM_006225 (Basen 95-648)**

```

1 ATGGACTCGG GCCGGGACTT CCTGACCCTG CACGGCCTAC AGGATGATGA
51 GGATCTACAG GCGCTGCTGA AGGGCAGCCA GCTCCTGAAG GTGAAGTCCA
101 GTCATGGAG GAGAGAGCGG TTCTACAAGT TGCAGGAGGA CTGCAAGACC
151 ATCTGGCAGG AGTCCCACAA GGTCATGCGG ACCCCGGAGT CCCAGCTGTT
201 CTCCATCGAG GACATTCAGG AGGTGCGAAT GGGGCACCGC ACGGAGGGTC
251 TGGAGAAGTT CGCCCGTGAT GTGCCCGAGG ACCGCTGCTT CTCCATTGTC
301 TTCAAGGACC AGCGCAATAC ACTAGACCTC ATCGCCCCAT CGCCAGCTGA
351 TGCCAGCAC TGGGTGCTGG GGCTGCACAA GATCATCCAC CACTCAGGCT
401 CCATGGACCA GCGTCAGAAG CTACAGCACT GGATTCACTC CTGCTTGCGA
451 AAAGCTGACA AAAACAAGGA CAACAAGATG AGCTTCAAGG AGCTGCAGAA
501 CTTCTGAAG GAGCTCAACA TCCAGGTGGA CGACAGCTAT GCCCGGAAGA
551 TCTT

```

Aminosäuresequenz:

MDSGRDFLTLHGLQDDEDLQALLKGSLLKVKSSSWRRERFYKLQEDCKTIWQE
SRKVMRTPESQLFSIEDIQEVRMGHRTEGLEKFARDVPEDRCFSIVFKDQRNTLDLI
APSPADAQHWWLGLHKIIHHSMSMDQRQKLQHWIHSCLRKADKNKDNKMSFKEL
QNFLKELNIQVDDSYARKI

GPI-GPF**c-DNA-Sequenz:**

```

GAATTCGGAG AGCCACCTCC TCTCCCAGGA ACTGAACCCA AAGGATCACC
TGGTATTCCC TGAGAGTACA GATTTCTCCG GCGTGGCCCT CAAGGGACAG
ACATGGCTCA GCGGATGACA ACACAGCTGC TGCTCCTTCT AGTGTGGGTG
GCTGTAGTAG GGGAGGCTCA GACAAGGATT GCAGAACAAA AACTAATAAG
CGAGGAGGAC CTGgtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc
ccatcctggt cgagctggac ggcgacgtga acggccacaa gttcagcgtg
tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac ggcaagctga ccctgaagtt
catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc ctctgacca
ccttcaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgcc gaaggctacg tccaggagcg
caccatcttc ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga
agttcgaggg cgacaccctg gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac
ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac aagctggagt acaactaaa
cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac ggcatcaagg
tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc
cgacaaccac tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gacccaacg
agaagcgcga tcacatggtc ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc
actcacggca tggacgagct gtacaagGCT GCAGCCATGA GTGGGGCTGG

```

GCCCTGGGCA GCCTGGCCTT TCCTGCTTAG CCTGGCCCTA ATGCTGCTGT
GGCTGCTCAG CTGACCCAAG CTT

Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-kinase, type I, alpha (PIP5K1A)

c-DNA-Sequenz: NCBI-Datenbank NCBI-Datenbank NM_003557

c-DNA-Sequenz:

1 ATGGCGTCGG CCTCCTCCGG GCCGTCGTCT TCGGTCGGTT TTTCATCCTT
51 TGATCCCGCG GTCCCTTCCT GTACCTTGTC CTCAGCATCT GGAATCAAGA
101 GACCCATGGC ATCTGAGGTG CCTTATGCCT CTGGCATGCC CATCAAGAAA
151 ATAGGCCATA GAAGTGTGTA TTCCCTCAGGA GAGACAACAT ATAAAAAGAC
201 AACCTCATCA GCCTTGAAAAG GTGCCATCCA GTTAGGCATT ACCCACACTG
251 TGGGGAGCCT GAGTACCAA CCAGAGCGTG ATGTCCTCAT GCAAGATTTT
301 TACGTGGTTG AGAGTATCTT CTTTCCCAGT GAAGGGAGCA ACCTGACCCC
351 TGCTCATCAC TACAATGACT TTCGTTTCAA GACCTATGCA CCTGTTGCCT
401 TCCGCTACTT CCGGGAGCTA TTTGGTATCC GGCCCGATGA TTACTTGTAT
451 TCCCTCTGCA GTGAGCCGCT GATTGAACTC TGTAGCTCTG GAGCTAGTGG
501 TTCCCTATTC TATGTGTCCA GCGACGATGA GTTCATTATT AAGACAGTCC
551 AACATAAAGA GCGGAATTT CTGCAGAAGC TGCTTCCAGG ATACTACATG
601 AACCTCAACC AGAACCCTCG GACTTTGCTG CCTAAATTC ATGGACTGTA
651 CTGTGTGCAG GCAGGTGGCA AGAACATTCG GATTGTGGTG ATGAACAATC
701 TTTTACCAAG ATCGGTAAAA ATGCATATCA AATATGACCT CAAAGGCTCA
751 ACCTACAAA GCGGGGCTTC CCAGAAAAGAG CGAGAGAAGC CTCTTCCCAC
801 ATTTAAAGAC CTAGACTTCT TACAAGACAT CCCTGATGGT CTTTTTTTTGG
851 ATGCTGACAT GTACAACGCT CTCTGTAAGA CCCTGCAGCG TGACTGTTTG
901 GTGCTGCAGA GCTTCAAGAT AATGGATTAC AGCCTCTTGA TGTCAATCCA
951 TAATATAGAT CATGCACAAC GAGAGCCCTT AAGCAGTGAA ACACAGTACT
1001 CAGTTGATAC TCGAAGACCG GCCCCCCAAA AGGCTCTGTA TTCCACAGCC
1051 ATGGAATCCA TCCAGGGAGA GGCTCGACGG GGTGGTACCA TGGAGACTGA
1101 TGACCATATG GGTGGCATCC CTGCCCCGAA TAGTAAAGGG GAAAGGCTTC
1151 TGCTTTATAT TGGCATCATT GACATTCTAC AGTCTTACAG GTTTGTTAAG
1201 AAGTTGGAGC ACTCTTGGA AGCCCTGGTA CATGACGGAG ACACTGTCTC
1251 AGTGCATCGC CCAGGCTTCT ACGCTGAACG GTTCCAGCGC TTCATGTGCA
1301 ACACAGTATT TAAGAAGATT CCCTTGAAGC CTTCTCCTTC CAAAAAGTTT
1351 CGGTCTGGCT CATCTTTCTC TCGGCGAGCA GGCTCCAGTG GCAACTCCTG
1401 CATTACTTAC CAGCCATCGG TCTCTGGGGA ACACAAGGCA CAAGTGACAA
1451 CAAAGGCAGA AGTGGAGCCA GGCGTTCACC TTGGTTCGTCC TGATGTTTTA
1501 CCTCAGACTC CACCTTTGGA GGAAATCAGT GAGGGCTCGC CTATTCCTGA
1551 CCCAGTTTC TCACCTCTAG TTGGAGAGAC TTTGCAAATG CTAACTACAA
1601 GTACAACCTT GGAAAAGCTT GAAGTTGCAG AGTCAGAGTT CACCATTAA
1651

2 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits bzw. werden veröffentlicht

Originalarbeiten:

Rescher, U., Zobiack, N. and Gerke, V. (2000) Intact Ca(2+)-binding sites are required for targeting of annexin 1 to endosomal membranes in living HeLa cells. *J Cell Sci*, **113**, 3931-3938.

Zobiack, N., Gerke, V. and Rescher, U. (2001) Complex formation and submembranous localization of annexin 2 and S100A10 in live HepG2 cells. *Febs Lett*, **500**, 137-140.

Zobiack, N., Rescher, U., Laarmann, S., Michgehl, S., Schmidt, M.A. and Gerke, V. (2002) Cell-surface attachment of pedestal-forming enteropathogenic E. coli induces a clustering of raft components and a recruitment of annexin 2. *J Cell Sci*, **115**, 91-98.

Zobiack, N., Rescher, U., Ludwig, C., Zeuschner, D. and Gerke V. (2002) Annexin A2 controls recycling of the transferrin receptor. *J Cell Biol*, (eingereicht)

Auf Kongressen präsentierte wissenschaftliche Beiträge (Poster):

50. Harden-Konferenz, Wye, England (1999): Endocytosis in DT40 Annexin 2 Knock-out cells.

ELSO-Meeting, Genf, Schweiz (2000): Redistribution of annexin 1 and 2 during endocytosis.

First Joint French-German Congress on Cell Biology, Strassbourg, Frankreich (2001): Clustering of raft components and recruitment of annexin 2 beneath attached enteropathogenic E.coli.

ELSO-Meeting, Nizza, Frankreich (2002): Enteropathogenic E.coli (EPEC) cluster raft components und recruit annexin 2 beneath sites of attachment.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, daß diese Dissertation selbstständig von mir verfasst wurde und alle benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben sind. Übernommene Ergebnisse und Gedanken sind als solche gekennzeichnet.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht schon einmal als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Nicole Zobiack

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Volker Gerke für die Bereitstellung des Themas sowie für die Betreuung meiner Arbeit und sein reges Interesse, das sich in zahlreichen Diskussionen und Anregungen ausdrückte. Insbesondere bedanke ich mich für die Ermöglichung der zahlreichen Kongressbesuche und die Förderung des wissenschaftlichen Austausches.

Bei Herrn Prof. Dr. Walter Müller, Zentrum Biochemie, Medizinischen Hochschule Hannover, bedanke ich mich für die Vertretung und Betreuung meiner Doktorarbeit in der Fachschaft Chemie der Universität Hannover und für sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Frau Dr. Ursula Rescher gehört mein besonders großer Dank für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für medizinische Biochemie möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und das nachmittägliche Kaffeetrinken bedanken. Ganz besonders möchte ich mich bei meinen direkten Labormitarbeitern Carsten Ludwig und Markus Knop, sowie Dagmar Zeuschner und Julia König, die mich beide leider nur ein Stück meiner Doktorarbeit begleitet haben, bedanken. Annette Janning, Stefanie Ernst, Daniela Ruhe, Anke Strey danke für den wissenschaftlichen Austausch, sowie die freundschaftliche Atmosphäre. Carsten Lange hat mir besonders in der letzten Phase bei dringenden EDV-Problemen sehr geholfen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Ines Nasdala und Lars Tatenhorst, dafür daß sie immer da sind, wenn man sie am dringendsten braucht.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Chadi Touma bedanken, der die Höhen und Tiefen während der gesamten Arbeit miterleben mußte und immer aufmunternde Worte und stets eine einfache Lösung fand.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Nicole Zobiack
Geburtstag	05.11.1972 in Gifhorn
Familienstand	ledig

Schulbildung

1979-92	Besuch von Grund- und weiterführenden Schulen in Plön und Burgdorf bis zur Erlangung der allgemeinen Hochschulreife, im Juni 1992 in Burgdorf
---------	---

August 1992 - August 93	Aufenthalt in den USA als Au-Pair.
--------------------------------	------------------------------------

Studium

1993-1998	Studium der Biochemie an der Universität Hannover
Juli 1998	Beginn der Diplomarbeit: Studien zur Funktion des Ca^{2+} /Lipid-bindenden Proteins Annexin II
Dezember 1998	Abschluß als Diplom Biochemikerin

Promotion

Februar 1999	Beginn der Promotionsarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. V. Gerke im Institut für medizinische Biochemie, ZMBE der Universität Münster. Betreuung der Dissertation an der Universität Hannover durch Prof. Dr. W. Müller, Zentrum Biochemie, Medizinischen Hochschule Hannover.
--------------	--

Tätigkeiten	seit 01.02.1999 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für medizinische Biochemie (ZMBE) der Universität Münster
-------------	---