

Kurzzusammenfassung

Es wird angenommen, dass Annexine während der Initiierung der Kalzifizierung vermutlich zwei entscheidende Funktionen übernehmen. Über gleichzeitige Interaktion mit Matrixvesikeln und den Kollagenen II und X positionieren sie die Vesikel in der extrazellulären Matrix und ermöglichen durch Ausbildung von Ionenkanälen das Wachstum der Hydroxyapatit-Kristalle innerhalb der Matrixvesikel und damit die Biomineralisierung. Bisher ist jedoch nicht geklärt, welche der zwölf Annexin Proteine in Vertebraten für den Mineralisierungsprozess von essentieller Bedeutung sind.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zunächst die Expression der Annexine AnxA1, AnxA2, AnxA3, AnxA4, AnxA5, AnxA6, AnxA7 und AnxA8 in der murinen Wachstumsfuge auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen werden. Die beschriebenen Annexine konnten in einem hohen Reinheitsgrad rekombinant hergestellt werden. Die korrekte α -helikale Faltung der Proteine sowie eine Kalzium-abhängige Konformationsänderung der Annexine AnxA1 und AnxA13 wurde mit Hilfe der Zirkularer Dichroismus Spektroskopie gezeigt. Für AnxA13 konnte des Weiteren mittels Fluoreszenzspektroskopie die Affinität des Proteins zu Kalzium bestimmt werden. Die Experimente zur Bestimmung der Kalziumkanalfunktion der Annexine in Zellen wurden etabliert, um nach zukünftig durchgeführten Versuchen weiterführende Aussagen über die Kalziumkanalfunktion der Annexine treffen zu können.

Die Annexine AnxA1, AnxA3, AnxA4 und AnxA8 konnten mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) als neue Bindungspartner der Kollagene II und X identifiziert und die für AnxA2, AnxA5 und AnxA6 beschriebenen Interaktionen bestätigt werden. Die getesteten Annexine, für die die Gleichgewichtsdissoziations-Konstanten bestimmt werden konnten, banden mit vergleichbarer, hoher Affinität sowohl an Kollagen II als auch an Kollagen X.

Alle aufgereinigten Annexine banden in SPR-Versuchen Kalzium-abhängig an Phosphatidylserin-haltige Liposomen und in Liposomensedimentationsexperimenten an artifiziell hergestellte, matrixvesikelartige Liposomen. Dabei zeigten verschiedene Annexine deutliche Unterschiede in ihrer Fähigkeit mit den Liposomen zu interagieren. Die Annexine AnxA4 und AnxA6 besitzen im Vergleich zu den Annexinen AnxA1, AnxA2, AnxA3, AnxA5 und AnxA13 die höchste Affinität zu beiden Liposomenarten. Lediglich AnxA8 besaß im Vergleich zu den übrigen Annexinen eine niedrigere Affinität. Der nachfolgend durchgeführte Sequenzvergleich der Proteine zeigte, dass bei AnxA8 in drei der vier Kalzium Bindemotive negativ geladene, konservierte Aminosäurereste, die die für die Interaktion mit Phosphatidylserin entscheidenden Aminosäuren darstellen, durch polare oder positiv geladene Reste ersetzt wurden. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die Annexine AnxA3, AnxA4, AnxA5 und AnxA8 mit dem auf der Oberfläche von sterbenden Zellen

exponierten Phosphatidylserin wechselwirken und damit auch unter physiologischen Bedingungen an Phosphatidylserin binden können. Somit könnten die Proteine über die Bindung an dieses Lipid Oberflächen-vermittelte Prozesse wie z. B. die Erkennung sterbender Zellen durch Zellen des Immunsystems beeinflussen. Für die Annexine AnxA3 und AnxA5 konnte hier bereits gezeigt werden, dass ihre Interaktion mit dem auf der Oberfläche apoptotischer Zellen lokalisierten Phosphatidylserin die Phagozytose sterbender Zellen durch Makrophagen inhibiert.

Zusammengenommen zeigen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, dass die neben AnxA2, AnxA5 und AnxA6 in der Wachstumsfuge exprimierte Annexine AnxA1, AnxA3, AnxA4, AnxA8 und AnxA13 ebenfalls in der Lage sind, mit Kollagenen und Matrixvesikel-ähnlichen Liposomen zu interagieren, wobei die zur Interaktion mit Phosphatidylserin essentiellen Aminosäurereste im Kalziumbindemotiv identifiziert werden konnten. Diese Ergebnisse erweitern damit das bestehende Model der Annexin/Kollagen-vermittelten Biomineralisierung. Durch die zeitliche und räumliche Expression oder ihre unterschiedlichen Affinitäten zu Liposomen könnten verschiedene Annexine individuelle Funktionen während der enchondralen Ossifikation übernehmen.

Abstract

It is assumed that annexins fulfill two important roles during the initiation of calcification. By binding to matrix vesicles and collagens annexins may anchor vesicles to the extracellular matrix and due to their calcium channel activities promote hydroxyapatite crystal formation and the biomineralisation process. Until now it is not known which of the twelve vertebrate annexins play an important role during biomineralization.

Here, expression of the annexins AnxA1 to AnxA8 within the murine growth plate was shown at the RNA and protein level. These annexins were recombinantly expressed, purified and correct α -helical folding was demonstrated by circular dichroism spectroscopy. For AnxA1 and AnxA13 calcium induced changes in conformation could be observed and for AnxA13 the affinity to calcium could be determined. Initial experiments to characterize the calcium channel activity were performed and such studies will in the future clarify to what extent annexins mediate the calcium influx into matrix vesicles and cells.

Using surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy annexins AnxA1, AnxA3, AnxA4 and AnxA8 could be identified as new binding partners of collagens II and X and the well described interactions of AnxA2, AnxA5 and AnxA6 could be confirmed. The K_D values were calculated when feasible and showed a similarly high affinity binding of annexins to collagens II and X.

All tested annexins bound in a calcium-dependent manner to liposomes containing phosphatidylserine in SPR spectroscopy experiments. In addition, annexins interacted with matrix vesicle like liposomes in sedimentation assays even though obvious differences in binding were observed. AnxA4 and AnxA6 bound strongly to both types of liposomes when compared to annexins AnxA1, AnxA2, AnxA3, AnxA5 and AnxA13. Only AnxA8 showed a very low affinity to these liposomes. ClustalW alignment of protein sequences identified essential amino acid residues for the interaction with phosphatidylserine in the type 2 calcium binding motif. These negatively charged amino acids found in AnxA3, AnxA4, AnxA5 and AnxA13 are replaced by positively charged ones in the protein sequence of AnxA8. When studying the interaction of annexins with phosphatidylserine exposed at the cell surface of dying cells, only annexins containing the conserved negatively charged amino acids in their type 2 binding motif bind at physiological conditions to phosphatidylserine whereas AnxA8 lacks this ability. Moreover, this interaction can modulate cell surface mediated reactions as seen in phagocytosis experiments. Binding of AnxA3 or AnxA5 to phosphatidylserine can efficiently inhibit the uptake of dying cells by macrophages.

In conclusions this study demonstrated that new annexins AnxA1, AnxA3, AnxA4 and AnxA13 are expressed in the growth plate and able to interact with collagens and matrix-

vesicle-like liposomes. These annexins contain a highly conserved binding motif mediating the recognition of phosphatidylserine at the surface of matrix vesicles to link these vesicles to the collagen network of the extracellular matrix. Presumably, their different affinities to matrix vesicles as well as their temporal and local expression during endochondral ossification defines the contribution of individual annexins to the mineralization process during endochondral ossification.