

Annexinabhängige Modulation der Immunantwort und Hämostase

Autorin: Sandra Kreft

Kurzzusammenfassung

Die meisten Annexine können über Typ II Kalziumbindungsstellen positiv geladene Kalziumionen binden und auf diese Weise mit negativ geladenem Phosphatidylserin interagieren. Über die Interaktion mit Phosphatidylserin, das auf der Zelloberfläche apoptotischer Zellen exponiert wird, könnte deren Erkennung sowie Aufnahme durch professionelle Phagozyten verändert und Immunreaktionen beeinflusst werden. Auf der Thrombozytenoberfläche exponiertes Phosphatidylserin stellt außerdem eine Oberfläche zur Bindung und Aktivierung von Gerinnungsfaktoren bereit und Annexine könnten durch die Interaktion mit Phosphatidylserin diese Wechselwirkungen und damit die Hämostase beeinflussen. Aufgrund der strukturellen Homologie der zwölf Vertebraten-Annexine könnten Annexine redundante Funktionen in diesen Prozessen erfüllen, jedoch ist dies für die wenigsten Annexine untersucht, noch sind die molekularen Grundlagen der Phosphatidylserin-Wechselwirkungen genau definiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels eines Sequenzvergleichs und ortsspezifischer Mutagenese die für die Bindung an Phosphatidylserin essentiellen Aminosäuren innerhalb der Typ II Kalziumbindemotive der Annexine bestimmt. Rekombinante Fusionsproteine verschiedener AnxA8 Mutanten wurden in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. Anschließend konnte deren Bindung zu Phosphatidylserin in Liposomen-Sedimentations-Experimenten sowie in durchflusszytometrischen Assays mit phosphatidylserin-exponierenden apoptotischen Zellen charakterisiert werden. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass zwei Aspartatreste an den Positionen 112 und 272 in den Typ II Kalziumbindestellen für eine Interaktion mit Phosphatidylserin essentiell sind. In Expressionsanalysen konnte mit Hilfe quantitativer RT-PCR gezeigt werden, dass die Annexine Anxa1-Anxa7, Anxa9 und Anxa11 in professionellen Phagozyten exprimiert und die Expression in Abhängigkeit von pro- und antiinflammatorischen Stimuli moduliert wird. In Exsudatproben chronisch entzündeter Wunden wurde das antiinflammatorisch-wirkende AnxA1 als einziges der untersuchten Annexine vermehrt und in geschnittener Form mit verkürztem N-Terminus detektiert. Im *in vivo* Wundheilungsmodell ließ sich jedoch keine gestörte Wundheilung in Anxa1- oder Anxa5-defizienten Mäusen erkennen, während die intravenöse Injektion von AnxA5 zu starken Blutungen bei Hautverwundungen führte. In weiterführenden *in vitro* Versuchen mit den Annexinen AnxA1, AnxA3, AnxA4, AnxA5 und der phosphatidylserinbindenden AnxA8 Mutante wiesen diese unterschiedlich starke hemmende Effekte auf die intrinsisch und extrinsisch initiierte Blutgerinnung sowie die Thrombinbildung auf, während AnxA8 keinen Einfluss besaß. Hierbei konnte gezeigt werden,

dass neben der Phosphatidylserinbindung auch Multimerisierungseigenschaften sowie weitere phosphatidylserinunabhängige Wechselwirkungen die Gerinnung beeinflussen können. Mit Hilfe des *in vivo* Thrombosemodells konnte nachgewiesen werden, dass rekombinantes injiziertes AnxA5 nach Eisenchlorid-induzierter Gefäßwandschädigung in mesenterialen Arterien der Maus im geschädigten Bereich akkumuliert und auf diese Weise die lokale Annexinkonzentration erhöht. Im *in vivo* Sepsis-Modell konnte dagegen nicht bestätigt werden, dass AnxA5 die Extravasierung von Blutzellen, Entzündung, Nierenschädigung oder Thrombozytenaggregation im Verlauf einer LPS-induzierten Sepsis beeinflussen kann.

Zusammengenommen zeigen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, dass Annexine in professionellen Phagozyten exprimiert werden und über spezifische Aminosäuren vermittelte Wechselwirkungen mit Phosphatidylserin in der Lage sind, mit phosphatidylserinhaltigen Liposomen sowie sterbenden Zellen zu interagieren und deren Phagozytose zu beeinflussen. Ebenso modulieren Annexine die Blutgerinnung über phosphatidylserinabhängige und -unabhängige Wechselwirkungen. Diese Ergebnisse erweitern somit die bestehenden Erkenntnisse der phosphatidylserinabhängigen Annexinfunktionen im Immunsystem und der Hämostase.