

**Entwicklungsbiologische und funktionelle
Untersuchungen zu Annexin A7**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
MICHAELA RICK

Gießen 2003

Aus dem Institut für Biochemie I der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
Betreuer: Prof. Dr. A. A. Noegel

Eingereicht über das Institut für Biochemie und Endokrinologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. E. Eigenbrodt

Entwicklungsbiologische und funktionelle Untersuchungen zu Annexin A7

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
MICHAELA RICK
Tierärztin aus Lippstadt

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. A. Noegel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Eigenbrodt

Tag der mündlichen Prüfung: 3.7.2003

Meinen Eltern und Peter

Danksagung

Frau Prof. Dr. Angelika A. Noegel möchte ich besonders herzlich für die interessante Themenstellung, die fachliche Betreuung der Arbeit, die zahlreichen Anregungen und Vorschläge sowie für ihre ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Prof. Dr. Erich Eigenbrodt danke ich für die freundliche Bereitschaft, die Betreuung der veterinärmedizinischen Seite meiner Arbeit und das Koreferat zu übernehmen.

Besonders dankbar bin ich Herrn Dr. Christian Grohé, Herrn Prof. Dr. Meyer und Herrn Dr. Rolf Schröder (Universität Bonn) für ihre fachlichen Ratschläge und die Bereitstellung der technischen Hilfsmittel für die kardiologischen Untersuchungen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Claudia Herr, die an der Korrektur dieser Arbeit maßgeblich beteiligt war und Herrn Dr. Andreas Hasse, Herrn Dr. Christoph Clemen und Herrn Dipl. Biol. Henning Korte für ihre ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Allen Mitarbeitern im Labor 12 bin ich für die freundliche Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit dankbar. Besonders erwähnen möchte ich Frau Maria Stumpf und Herrn Rolf Müller für die vielen technischen Hilfestellungen und Herrn Berthold Gassen für die Versorgung und Bereitstellung der Versuchstiere.

Herrn Dr. Martin van Eickels (Universität Bonn) danke ich herzlich für die Unterstützung bei den kardiologischen Untersuchungen.

Allen nicht namentlich erwähnten Kollegen des Arbeitskreises gebührt mein Dank für die kooperative und gute Zusammenarbeit in den letzten Jahren.

Des Weiteren möchte ich dem gesamten Praxisteam der Tierarztpraxis Dr. Renner meinen Dank aussprechen, die gerade in der letzten Zeit viel Geduld und Verständnis bewiesen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt zuletzt meinen Eltern und Peter, die mir immer hilfreich und geduldig zur Seite gestanden haben.

Einleitung

1	Einleitung	1
1.1	Überblick über die Familie der Annexine	1
1.1.1	Molekulare Struktur der Annexine	1
1.1.2	Charakterisierung der Bindungen von Ca^{2+} und sauren Phospholipiden an Annexinmoleküle	3
1.1.3	Funktionen der Annexine	5
1.1.4	Annexin A7 (Synexin).....	6
1.2	Die Embryonalentwicklung der Maus	8
1.2.1	E5- Das Stadium des „Eizylinders“	8
1.2.2	E8- Frühe Organogenese	8
1.2.3	Die Keimblätter	9
1.3	Modelle der induzierten Myocardhypertrophie.....	11
1.3.1	Pathophysiologie der Herzarbeit	11
1.3.2	Tiermodelle zur Induktion einer Myocardhypertrophie.....	11
1.4	Aufgabenstellung.....	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material.....	15
2.1.1	Antikörper, Enzyme, Antibiotika und Reagenzien.....	15
2.1.2	Radionukleotide.....	17
2.1.3	Puffer und andere Lösungen.....	17
2.1.4	Labormaterial.....	18
2.1.5	Geräte	18
2.2	Proteinchemische und immunologische Methoden.....	20
2.2.1	Herstellung von Proteinhomogenaten aus Mausorganen	20
2.2.2	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE)	20
2.2.3	Protein Färbungen	22
2.2.4	Western Blot Analyse.....	22
2.2.5	Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose	23
2.2.6	Western Blot Stripping	24

2.2.7	Aufreinigung von IgG aus Hybridoma-Kulturüberständen.....	24
2.2.8	Bestimmung der Proteinkonzentration	25
2.3	Histologische und immunhistologische Methoden	26
2.3.1	Präparation von Gefrier- und Paraffinschnitten.....	26
2.3.2	HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)	27
2.3.3	Indirekte Immunfluoreszenz.....	28
2.3.4	Vorbehandlung von Paraffinschnitten.....	28
2.3.5	Direktes Markieren monoklonaler Antikörper mit dem Alexa Fluor [®] 488 Protein Labeling Kit.....	30
2.3.6	Nachweis von Peroxidase-markierten Antikörpern mit DAB	
	(3, 3', 4, 4'-Tetraaminobiphenyl-Tetrahydrochlorid).....	30
2.3.7	Mikroskopie.....	31
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	33
2.4.1	Northern Blot Analyse.....	33
2.4.2	Radioaktive Markierung von DNA-Proben mit dem Stratagene Prime [®] It II- Kit	33
2.4.3	Nachweis mit radioaktiv markierten Sonden.....	33
2.4.4	Northern Blot Stripping.....	34
2.5	Zellkultur	35
2.5.1	Kultur von Neuroblastomzellen (N2A-Zellen).....	35
2.5.2	Einfrieren und Auftauen von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)	35
2.6	Methoden zu Funktionsuntersuchungen am Herzmuskel.....	37
2.6.1	Mäusezucht und Haltung.....	37
2.6.2	EKG-Messungen	37
2.6.3	Implantation osmotischer Minipumpen bei Mäusen	37
2.6.4	Statistische Absicherung	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Untersuchungen zur Expression von Annexin A7 in der Embryogenese der Maus	39
3.1.1	Expression von Annexin A7 in verschiedenen Stadien der murinen Embryogenese (Northern Blot Analyse).....	39

3.1.2	Immunhistochemische Untersuchungen der frühen Embryonalentwicklung..	40
3.1.3	Western Blot Analyse von murinen embryonalen Stammzellen.....	46
3.1.4	Annexin A7 in den Zellen des sich entwickelnden Gehirns.....	47
3.2	Lokalisation von Annexin A7 im Gehirn adulter Mäuse	49
3.2.1	Verteilung von Annexin A7 in der Hippocampusformation	50
3.2.2	Lokalisation von Annexin A7 im murinen Cerebellum	52
3.2.3	Immunhistologie der Großhirnrinde.....	54
3.2.4	Western Blot Analysen.....	56
3.3	Kardiovaskuläre Phänotypisierung der AnxA7-defizienten Mauslinie.....	57
3.3.1	Morphologische Analyse des Herzens von <i>AnxA7^{-/-}</i> Mäusen.....	57
3.3.2	EKG-Auswertungen	58
3.3.3	Induzierte kardiale Hypertrophie.....	63
4	Diskussion.....	65
4.1	Untersuchungen zur Expression von Annexin A7 in der Embryogenese der Maus	65
4.1.1	Analyse der frühen murinen Embryogenese	65
4.1.2	Zelluläre Verteilung von Annexin A7 während der pränatalen Entwicklung	67
4.1.3	Methodische Probleme bei den Untersuchungen: Modifizierung des	69
4.2	Lokalisation von Annexin A7 im murinen Gehirn.....	71
4.2.1	Annexin A7 in Astrozyten.....	71
4.2.2	Annexin A7 in Neuronen.....	72
4.3	Kardiovaskuläre Phänotypisierung der AnxA7-defizienten Mauslinie.....	74
4.3.1	Morphologische Analyse des Herzens von <i>AnxA7^{-/-}</i> Mäusen.....	75
4.3.2	EKG-Auswertungen	76
4.3.3	Induzierte kardiale Hypertrophie.....	77
5	Zusammenfassung	80
6	Summary	82
7	Literatur	84

Abkürzungen

^{32}P	radioaktives Isotop des Phosphoratoms
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cAMP	cyclisches AMP
cDNA	complementäre DNA (komplementär zur mRNA)
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxyribonukleotid-Triphosphat
E	Embryonalstadium (z.B. E5= fünf Tage alter Embryo)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EKG	Elektrokardiogramm
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fa.	Firma
g	Gramm
h	Stunde(n)
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilo Dalton
M	molar
mA	Milliampere
mab	monoklonaler Antikörper (engl. <u>monoclonal antibody</u>)

Abkürzungen

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
p.c.	post coitum
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit(s), Einheit der Enzymaktivität
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
WT	Wildtyp

Chemische Elemente und Verbindungen, physikalische Größen und Einheiten werden entsprechend den internationalen Richtlinien abgekürzt.

1 Einleitung

1.1 Überblick über die Familie der Annexine

Annexine gehören zur einer Familie von strukturell verwandten Proteinen, die sich im wesentlichen durch zwei Eigenschaften auszeichnet. Alle Mitglieder enthalten ein konserviertes Sequenzelement aus ca. 70 Aminosäuren, das sich vier- oder achtmal wiederholt und allen gemein ist die Fähigkeit, Ca^{2+} -abhängig saure Phospholipide zu binden. Der Name Annexin wurde von dem griechischen Wort „annex“ abgeleitet, was „zusammenhalten/zusammenbringen“ bedeutet (1990 von Crumpton und Dedman eingeführt). Mitglieder dieser Familie wurden in mehr als 65 verschiedenen Spezies nachgewiesen, beginnend mit Einzellern (z.B. *Giardia lamblia*, Fiedler und Simons, 1995) und Pilzen, über höhere Pflanzen (Smallwood et al., 1990) bis hin zu einer Vielzahl an höheren Vertebraten.

1.1.1 Molekulare Struktur der Annexine

Jedes Annexin besteht aus zwei Domänen. Die spezifische N-terminale Domäne verleiht dem Molekül seine funktionale Diversität (Raynal und Pollard, 1994). Die konservierte C-terminale Core-Domäne ist für die Fähigkeit Ca^{2+} zu binden verantwortlich. Sie besteht in der Regel aus vier Wiederholungen von je 70-80 Aminosäuren (Segmente). Einzige Ausnahme stellt Annexin A6 dar, welches acht Wiederholungen aufweist.

Die erste dreidimensionale Struktur eines Annexins wurde für Annexin A5 aufgeklärt (Huber et al, 1990; Lewit-Bentley et al., 1992). Es zeigt eine sehr charakteristische Faltung, die mittlerweile in mehr als 10 anderen Annexinen, so z.B. Annexin A1-A4 und A12 (Weng et al., 1993; Luecke et al., 1995; Burger et al., 1996; Favier-Perron et al., 1996; Kawasaki et al., 1996), nachgewiesen werden konnte und als Muster für alle Mitglieder der Familie gelten kann (siehe Abb. 1.1). Jede der Wiederholungen des Core-Bereiches bildet für sich eine Subdomäne aus fünf α - Helices. Die vier Segmente ordnen sich symmetrisch um eine zentrale hydrophile Pore an und bilden eine eng gepackte, leicht gekrümmte

Scheibe. Die konvexe Seite dieser Struktur enthält die Ca^{2+} Bindungsstellen und ist der Membran zugewandt, wenn das Annexin an saure Phospholipide gebunden ist. Die konkave Seite zeigt von der Membran weg und ermöglicht die Interaktionen der N-terminalen Domäne. In der N-terminalen Domäne befinden sich Stellen für Phosphorylierung, Proteolyse und Interaktionen mit anderen Proteinen (Raynal und Pollard, 1994; Gerke und Moss, 1997).

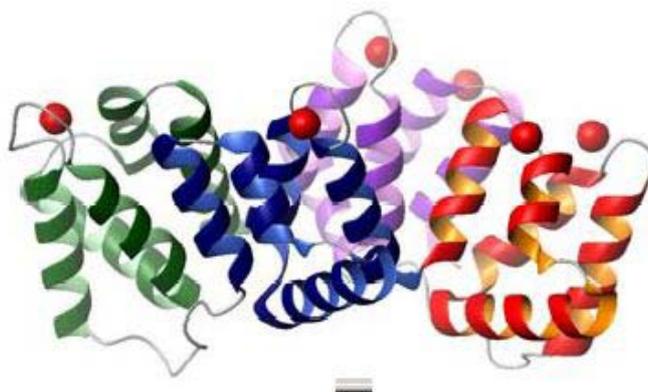


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der kristallinen Struktur der Core-Domäne von Annexin A5. Jede Subdomäne ist farblich gekennzeichnet (Domäne I: grün; Domäne II: blau; Domäne III: violett; Domäne IV: rot) (nach Liemann, 1996).

Unterschiede zwischen den Mitgliedern der Annexinfamilie zeigen sich auf molekularer Ebene vor allem in der Anzahl und der exakten Lokalisation der Ca^{2+} -Bindungsstellen und im Aufbau der N-terminalen Domäne. Diese kann sehr unterschiedliche Längen und Sequenzen aufweisen und Bindungen mit unterschiedlichen Partnern eingehen. So haben Annexin A4 und A5 nur 12 bzw. 13 Aminosäuren lange N-Termini, Annexin A7 hingegen besitzt mehr als 160 Aminosäuren im N-Terminus. Annexin A2 bindet an seinen N-Terminus 2 Moleküle des Proteins p11 um ein Heterotetramer zu bilden (Annexin II₂p11₂). Dieser 90 kDa-Komplex ermöglicht die Aggregation von Membranen in Gegenwart von mikromolaren Ca^{2+} -Konzentrationen, eine Eigenschaft die er weder mit dem Monomer noch mit anderen Annexinen teilt (Waisman, 1995). Auch Benzodiazepine und ihre Derivate zeichnen sich durch ihre Ko-Kristallisation mit Annexinen aus. Das Benzodiazepin K201 bindet Annexin A5 und hemmt dadurch seine Kanalaktivität. (Kaneko et al., 1997). Verwandte Benzodiazepinverbindungen konnten als Liganden mehrerer Annexine mit einer auf den gleichen strukturellen Prinzipien beruhenden Interaktion identifiziert werden (Hofmann et al., 1998).

Zusätzliche Polymorphismen können durch alternatives Spleißen der mRNA auftreten. Dieser Mechanismus konnte sowohl für Annexin A6 als auch für Annexin A7 nachgewiesen werden. Die beiden Isoformen von Annexin A6 unterscheiden sich durch sechs zusätzliche Aminosäuren, die zu Beginn der siebten Subdomäne des Core-Bereiches eingefügt werden (Moss und Crumpton, 1989), die Annexin A7 Isoformen unterscheiden sich im N-terminalen Bereich (Zhang-Keck et al., 1994).

1.1.2 Charakterisierung der Bindungen von Ca^{2+} und sauren Phospholipiden an Annexinmoleküle

Eine der wichtigsten biochemischen Eigenschaften von Annexinen ist ihre Fähigkeit Ca^{2+} zu binden. In der Regel weisen Annexine zwei bis vier Bindungsstellen für Ca^{2+} auf. Diese befinden sich an der konvexen Seite der Core-Domäne. Im Gegensatz zu Proteinen der Familie der „EF-Hand“-Proteine (z.B. Calmodulin, Troponin C oder Proteinkinase C) binden Annexine das Ion nicht über eine „Helix-Loop-Helix“-Struktur. Daraus resultiert eine sehr niedrige Affinität zu Ca^{2+} ($K_d = 25\text{-}1000 \mu\text{M}$) mit Ausnahme von Annexin A6 mit einer Dissoziationskonstante von ca. $1 \mu\text{M}$.

In Gegenwart von Ca^{2+} binden Annexine ferner bevorzugt saure bzw. anionische Phospholipide. Die Affinität zu Phospholipiden sinkt in der folgenden Reihenfolge:

Phosphatidylsäure > Phosphatidylserin > Phosphatidylinositol (Raynal und Pollard, 1994)

Die Bindungen sind reversibel. So führt die Entfernung des Ca^{2+} zu einer Freisetzung der Annexine aus der Phospholipidmatrix. Einige Phospholipide wie z.B. Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin benötigen jedoch eine sehr hohe Konzentration an Ca^{2+} , um gebunden zu werden (Crumpton und Dedman, 1990). Die *in vitro* beobachtete Bindung der Annexine an saure Phospholipide reflektiert in einem physiologischen Szenario die Bindung dieser Proteine an zelluläre Membranen wie die Innenseite der Plasmamembran und zahlreiche Membranen der Zellorganelle. Annexine sind in der Lage sich sowohl an die Membranen anzulagern als auch in diese einzudringen (siehe Abb. 1.2). Allen Annexinen gemein ist zwar die Eigenschaft Phospholipide Ca^{2+} -abhängig zu binden, die einzelnen Mitglieder dieser Familie unterscheiden sich jedoch stark in ihrer Ca^{2+} Sensitivität und der Spezifität der Core-Domäne in bezug auf

Membranenbindung in lebenden Zellen. So wurde nachgewiesen, dass in ein und demselben Zelltyp die Annexin A1 Core-Domäne endosomal lokalisiert ist, Annexin A4 hauptsächlich an die Strukturen der Plasmamembranen bindet und Annexin A2 eine alleinige zytoplasmatische Verteilung aufweist (Rescher et al., 2000).

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass auch Ca^{2+} unabhängige Lipidbindungen in der Familie der Annexine existieren (Gerke und Moss, 2002). Der wichtigste Parameter, der diese Bindungen reguliert, ist der pH Wert. Annexin A5 bindet und penetriert die aus Phosphatidylserin (PS) bestehende Wand von Vesikeln bei einem pH Wert von 4 (Koehler et al., 1997), pH 5 hingegen induziert die Auflösung der PS-Vesikel (Hoekstra et al., 1993). Beide Aktivitäten wurden in der Abwesenheit von Ca^{2+} beobachtet. Bei neutralem pH Wert ist aber eine Ca^{2+} Bindung für eine Interaktion mit Lipiden notwendig. Diese Unterschiede sind auf die Änderung der dreidimensionalen Struktur des Moleküls zurückzuführen. Das saure Milieu sorgt für eine Entfaltung des Moleküls und somit zu einer Änderung seiner biochemischen Eigenschaften (siehe Abb. 1.2).

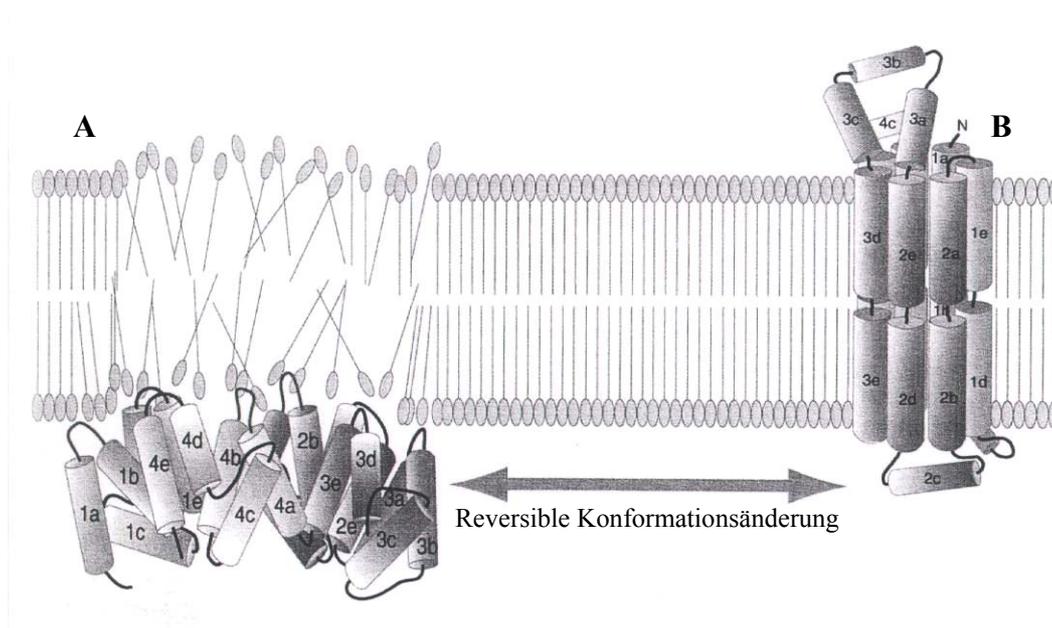


Abb. 1.2: Mögliche Interaktion eines Annexin-Monomers mit zytoplasmatischen Membranen. (A) Durch die Anlagerung des Moleküls an die Phospholipidschicht kommt es zur Membranendestabilisation. (B) Bei saurem pH-Wert ist durch eine Destabilisierung der α -Helix-Struktur eine Einlagerung des Annexins in die Membran möglich (nach Langen et al., 1998).

1.1.3 Funktionen der Annexine

Obwohl die strukturellen und biochemischen Eigenschaften der Annexine weitestgehend bekannt sind, bleibt ihre Funktion *in vivo* im wesentlichen noch ungeklärt. Studien hierzu sind hauptsächlich im zellfreien System oder an permeabilisierten Zellen durchgeführt worden. Dabei wurde eine Vielzahl von Aktivitäten entdeckt. Im folgenden werden die wichtigsten experimentellen Hinweise, die Anlass geben zu Hypothesen über die Funktionen der Annexine wie Bildung und Modellierung von Ionenkanälen, Beteiligung am submembranösen Zytoskelett, an Endo- und Exozytosevorgängen, an Inflammation und Koagulation, kurz dargestellt.

Für mehrere Annexine konnte eine Aktivität als Ionenkanal nachgewiesen werden. So besitzen die Annexine A1, A2, A3, A5, A6 und A7 *in vitro* eine spannungsgeladene Ca^{2+} -Kanalaktivität. Sowohl Ca^{2+} - als auch spannungsabhängig binden sie an Membranen und dringen später auch in diese ein, um Ionenkanäle spezifisch für Ca^{2+} , Ba^{2+} , Li^+ oder Cs^+ zu bilden (Rojas et al., 1990). Elektronenmikroskopische Messungen von Annexin A5 zeigten jedoch, dass es die Zielmembran nicht penetriert, sondern sich außen anlagert (Demange et al., 1994).

Neben der Bildung von Ionenkanälen spielen Annexine auch im submembranösen Zytoskelett eine Rolle. Aus Zytoskelett-Präparationen der Rinderlunge konnten die Annexine A1-A6 isoliert werden, aus dem Bürstensaumepithel des Darms Annexin A1 und A2 (Ikebuchi und Waisman, 1990; Gerke und Weber, 1984). Darüber hinaus zeigten *in vitro*-Versuche, dass Annexine eine Aktin-modulierende Funktion haben (Burgoyne und Geisow, 1989). Für einige Mitglieder der Annexinfamilie konnten die Bindungspartner im Zytoskelett oder die Ca^{2+} -abhängigen Wirkungsmechanismen *in vitro* aufgeklärt werden. Ein Beispiel hierfür ist die Ca^{2+} -abhängige Bindung des Annexin $\text{II}_2\text{p11}_2$ -Komplexes an Zytoskelett-Moleküle wie F-Aktin oder Spektrin sowie die Regulation der Bildung des Intermediärfilamentprotein GFAP (Glia fibrilläres saures Protein) durch diesen Komplex (Thiel et al., 1992). Das S100 Protein inhibiert die Bildung der Filamente, der $\text{II}_2\text{p11}_2$ -Komplex jedoch stimuliert die GFAP-Filamentenbildung. Beide Proteine wirken somit gegensätzlich zueinander und regulieren die Ausbildung von glialen Intermediärfilamenten.

Für die meisten Annexine konnte eine Beteiligung an Endo- und Exozytosevorgängen nachgewiesen werden. Viele Annexine fördern in Anwesenheit unphysiologisch hoher Ca^{2+} -Konzentrationen (>10 mM) die Aggregation und Fusion von Liposomen oder sekretorischen Vesikeln. Ausnahmen sind Annexin A1 und A2. Studien an permeabilisierten Zellen zeigten eine Abnahme der Sekretion durch eine Verarmung an zytosolischen Proteinen. Nach Zugabe von Annexinen ins Medium blieb den Zellen die Fähigkeit zur Exozytose dagegen über einen längeren Zeitraum erhalten (Sarafian et al., 1987; Ali et al., 1989).

Annexin A1 und A5 wird eine regulatorische Wirkung in Entzündungsreaktionen zugeordnet. Über eine Inhibierung der Phospholipase A₂ (PL A₂) kann Annexin A1 direkt die Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden hemmen. Arachidonsäure ist Ausgangssubstanz für die Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen (Rothhut et al., 1983). Auch Annexin A5 wird eine antiinflammatorische Wirkung durch die Inhibierung der PL A₂ zugeschrieben (Chollet et al., 1992). Die Blutgerinnung kann durch Mitglieder der Annexinfamilie ebenfalls gestört werden. So konnte nach der Isolierung der Annexine A2-A4 aus dem Blutplasma und aus plazentalem Gewebe ihre antikoagulierende Wirkung nachgewiesen werden (Reutelingsperger et al., 1985; Funakoshi et al., 1987; Tait et al., 1988). Diese ist wahrscheinlich auf die Besetzung der anionischen Phospholipid-Oberflächen von Mitgliedern der Gerinnungskaskade durch die Annexine zurückzuführen.

1.1.4 Annexin A7 (Synexin)

Aufgrund seiner Fähigkeit, die Fusion chromaffiner Granula in Gegenwart von Ca^{2+} zu ermöglichen, wurde Annexin A7 1978 als erstes Annexin entdeckt (Creutz et al., 1978). Man gab dem Protein den Namen „Synexin“ (synexis: griech. Treffen). Mit der Entdeckung weiterer strukturell ähnlicher Proteine wurde der Name in Annexin A7 geändert, da die cDNA als siebtes Mitglied der Familie kloniert und sequenziert wurde. Das Annexin A7 Gen (*Anxa7*) ist beim Menschen auf Chromosom 10 (Shirvan et al., 1994) und bei der Maus auf Chromosom 14 (Zhang-Keck et al., 1994) lokalisiert und besteht aus 14 Exons. Exon 2 bis 7 kodieren für die N-terminale Domäne, Exon 8 bis 13 für die Core-Region (Zhang-Keck et al., 1994). Annexin A7 zeichnet sich durch einen sehr langen und

hydrophoben Aminoterminus (humanes Annexin A7 163 AS, murines Annexin A7 164 AS) aus, der durch eine gewebsspezifische Insertion eines zusätzlichen Exons verlängert werden kann. Die beiden Isoformen haben Molekulargewichte von 47 und 51 kDa. Im Muskelgewebe konnte ausschließlich das 51 kDa Protein nachgewiesen werden, in Hirn und Herz treten beide Isoformen auf, alle übrigen Gewebe exprimieren nur die 47 kDa Isoform (Magendzo et al., 1991; Selbert et al., 1995; Clemen et al., 1999). Die durch alternatives Spleißen eingefügte 66 bp große Exonkassette (Exon 6) führt zu einer Inserierung von drei geladenen Aminosäuren in den sonst ungeladenen N-Terminus. Neben seiner Länge ist auch die Zusammensetzung des N-Terminus charakteristisch. Er enthält eine größere Anzahl von Motiven der Sequenz „GYP“, ein Motiv, das auch in anderen membranassoziierten Proteinen wie Synaptophysin (Buckley et al., 1987; Leube et al., 1987; Südhof et al., 1987), Annexin A11 (Towle und Treadwell, 1992) und Comitin (p24) aus *Dictyostelium discoideum* (Noegel et al., 1990) gefunden wurde.

Über mögliche Funktionen von Annexin A7 *in vivo* ist bisher wenig bekannt. Pollard und Rojas leiteten 1988 aus den *in vitro*-Aktivitäten des Proteins seine Rolle in der Ca^{2+} -abhängigen Aggregation von Phospholipidvesikeln und sekretorischen Granula bei der Bildung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle ab. Im humanen Gehirn konnte die Lokalisation von Annexin A7 in Astrogliazellen gezeigt werden (Clemen et al., 2001). Diese restriktive Verteilung des Proteins könnte Hinweise auf eine Funktion im Gehirn liefern.

Die Generierung einer für Annexin A7 heterozygoten Mauslinie sollte weitere Einblicke in die *in vivo*-Funktion des Proteins liefern (Srivastava et al., 1999). Die homozygoten Nachkommen dieser AnxA7-defizienten Mauslinie starben allerdings bereits am 10. Tag der Embryonalentwicklung. Heterozygote Nachkommen zeigten einen Defekt in der Ca^{2+} -Signaltransduktion und Insulinsekretion in den Langerhans-Inseln des Pankreas. Herr et al. gelang es jedoch 2001, eine weitere AnxA7-defiziente Mauslinie (*AnxA7^{-/-}*) zu etablieren, die überlebensfähig ist. Diese knock-out Tiere haben keinen auffälligen Phänotyp, sind fertil und mobil. Die Skelettmuskulatur ist normal entwickelt und zeigt keine pathologischen Veränderungen. Die Mäuse weisen keinen Defekt in der Insulinsekretion wie bei Srivastava et al. auf. Ergebnisse zu Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten der *AnxA7^{-/-}* Maus werden in späteren Kapiteln eingehend erläutert.

1.2 Die Embryonalentwicklung der Maus

Untersuchungen zur Verteilung eines Proteins in der Embryonalentwicklung können wichtige Hinweise auf seine Funktion liefern. In der vorliegenden Arbeit wurde das Auftreten von Annexin A7 in der murinen Embryogenese untersucht. Aus diesem Grund sind an dieser Stelle die wichtigsten Stadien der frühembryonalen Entwicklung von Mäusen kurz dargestellt (siehe Abb. 1.3).

1.2.1 E5- Das Stadium des „Eizylinders“

Der fünfte Tag in der Embryonalentwicklung der Maus stellt auch zugleich das erste postimplantatorische Stadium dar. Es ist der Wendepunkt von der Blastozyste zum sogenannten „Eizylinder“. Dieser zeichnet sich durch seine zweischichtige Struktur aus. Die Zellen des Ektoderms stellen die innere Zellmasse dar, die äußere Schicht aus kuboidalen Zellen wird durch das Endoderm gebildet.

1.2.2 E8- Frühe Organogenese

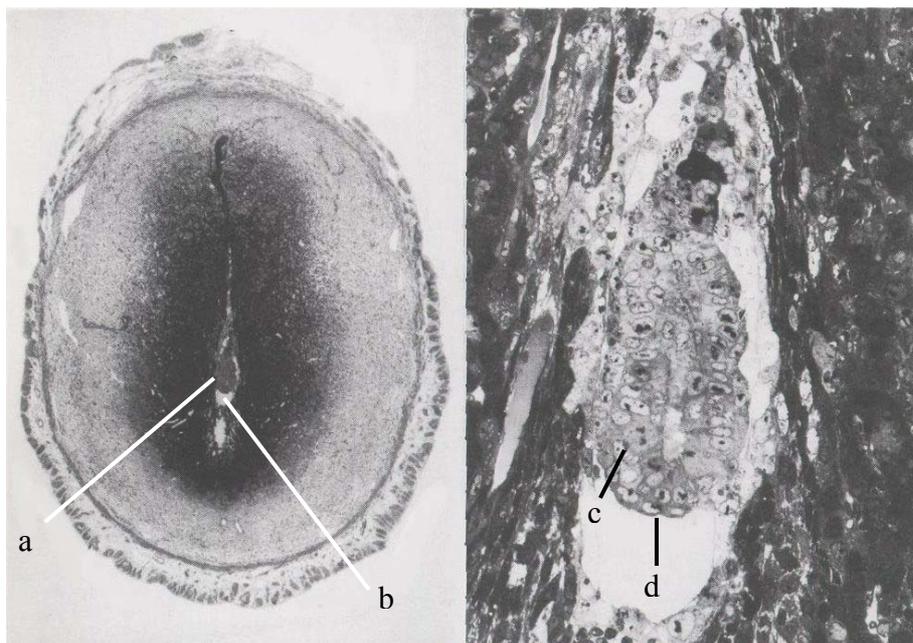
Am achten Tag der Entwicklung beginnt die typische axiale Rotation des Mäuseembryos, durch die es zur Inversion der Keimblätter kommt. Die frühe Organogenese beginnt. Zellen des Ektoderms bilden die Neuralfalten aus, die durch ihre Fusion das Neuralrohr entstehen lassen. Das Endoderm bildet ebenfalls ein Rohr aus, welches in Vorder-, Mittel- und Hinterdarm unterteilt wird. Eine S-förmige Herzplatte entsteht und die Somiten (Vorläufer der späteren Muskulatur) differenzieren sich aus dem paraxialen Mesoderm.

1.2.3 Die Keimblätter

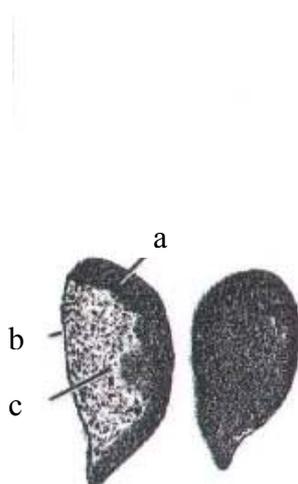
Alle sich entwickelnden Strukturen und Organe lassen sich auf die drei Keimblätter in der frühen Phase der Embryonalentwicklung zurückführen. Ein hochzylindrisches mehrreihiges Epithel bildet das Ektoderm, kleine polyedrische Zellen das Endoderm. Zwischen diesen beiden Keimblättern entsteht dann eine dritte Zellschicht, das Mesoderm. Die folgende Tabelle gibt Auskunft über die Herkunft verschiedener Organe aus den drei Keimblättern.

<u>Ektoderm</u>	<u>Mesoderm</u>	<u>Endoderm</u>
Zentrales Nervensystem	Bindegewebe, Knorpel, Knochen	Epitheliale Auskleidung des Darm- und Respirationstrakt
Peripheres Nervensystem	Quergestreifte und glatte Muskulatur	Parenchym der Tonsillen, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Thymus, Leber, Pankreas
Sinnesepithel von Ohr, Nase, Auge	Zellen des Blutes und der Lymphe, Wandung des Herzens, der Blut- und Lymphgefäße, Milz	Epitheliale Auskleidung der Harnblase und Harnröhre
Epidermis, Haare, Horn	Nieren und Keimdrüsen und dazugehörige Ausführungsgänge	Epitheliale Auskleidung der Paukenhöhle und Tuba auditiva

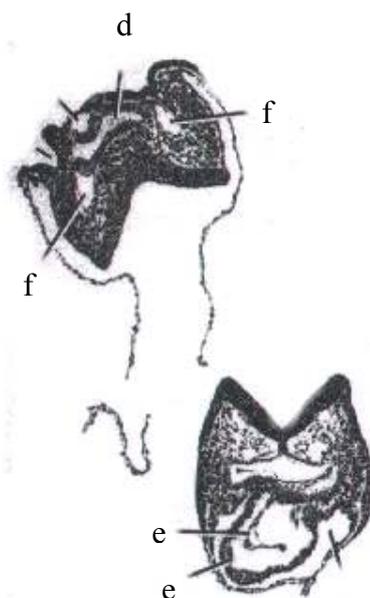
A



B



C



D

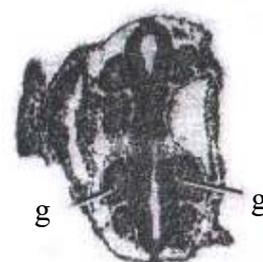
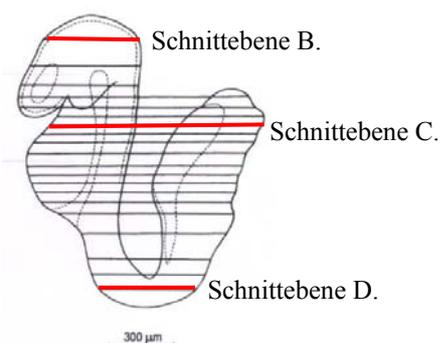


Abb. 1.3: Transversalschnitte durch einen Mäusembryo.

(A) Am fünften Tag der Embryogenese besteht der „Eizylinder“ (a) in der Dottersackhöhle (b) aus einer inneren Zellmasse (c) und einer äußeren Schicht Endodermzellen (d). (B) Der Schnitt durch die Kopfregion eines acht Tage alten Embryos zeigt das Neuroepithel (a), das Oberflächenektoderm (b) und das mesenchymale Gewebe der Halsregion (c). (C) Auf Höhe der Herzregion dieses Mäusembryos befindet sich das Hinterdarmdivertikel (d), die Herzplatte (e) und die dorsale Aorta (f). (D) Entlang des Neuralrohrs formen sich die Somiten (g). (E) Die schematische Darstellung zeigt die Schnittebenen aus B-D (nach M.H.Kaufman und Bard, 1999).

E



1.3 Modelle der induzierten Myokardhypertrophie

Beide Isoformen von Annexin A7 kommen in Herzmuskelzellen vor. Zellkontraktionsversuche gaben Hinweis auf eine gestörte elektromechanische Koppelung der Kardiomyozyten in der *AnxA7*-defizienten Mauslinie bei hohen Ca^{2+} -Spiegeln (Herr et al., 2001). Im Gegensatz dazu hatten embryonale *AnxA7*^{-/-} Kardiomyozyten die gleiche Fähigkeit zur spontanen Kontraktion und vergleichbare Aktionspotentiale wie die Kardiomyozyten aus WT-Tieren. Dies deutete auf eine Rolle von Annexin A7 in der Regulation der Ca^{2+} -Homöostase oder der Kontraktilität der Myofibrillen hin und gab Anlass zu weiteren Untersuchungen auf diesem Gebiet.

1.3.1 Pathophysiologie der Herzarbeit

Die linksventrikuläre Myokardhypertrophie ist ein zentraler pathogenetischer Aspekt kardiovaskulärer Erkrankungen, deren exakter Pathomechanismus nur unzureichend geklärt ist. Eindeutig belegt ist jedoch, dass sowohl die Reorganisation des Zytoskeletts als auch die Ca^{2+} -Homöostase eine wichtige Rolle im Übergang der Hypertrophie zur Herzinsuffizienz spielen.

1.3.2 Tiermodelle zur Induktion einer Myokardhypertrophie

Um eine mögliche Rolle verschiedener Proteine in diesem Pathomechanismus aufzudecken, wurden in den letzten Jahren verschiedene Tiermodelle zur Induktion einer Herzmuskelhypertrophie entwickelt. Aufgrund der relativ leichten Verfügbarkeit transgener Mäuse kommt dem Modell Maus in diesem Rahmen eine besondere Bedeutung zu. In der vorliegenden Arbeit sollte die *in vivo* Funktion von Annexin A7 in Herzmuskelzellen anhand einer induzierten Myokardhypertrophie untersucht werden.

Infarktmodell

Besonders in Studien an Rattenherzen hat sich das Modell der Infarktinduktion bewährt, um die Pathophysiologie des Herzversagens im Tiermodell zu simulieren (Smits et al., 1994; Hongo et al., 1997). Durch Unterbindung der linken Herzkranzarterie entsteht ein akuter Myokardinfarkt. Das infarzierte linksventrikuläre Gewebe wird innerhalb weniger Wochen über eine Koagulationsnekrose in Narbengewebe umgewandelt. Um aber ein bestimmtes Herzminutenvolumen aufrechtzuerhalten, muss sich das überlebende Restgewebe an den funktionellen Wegfall der vernarbten Region anpassen. Dieser Prozess wird als „Remodeling“ (Umbau) bezeichnet und endet in einer Hypertrophie des Myokards. Bei ausgedehnten Infarkten kann sich das Volumen der überlebenden Myozyten nahezu verdoppeln. Auch bei Mäusen resultiert die Ligatur der linken Koronararterie in einem Myokardinfarkt (Michael et al., 1995). Oft aber lässt sich zwar eine Dilatation des linken Ventrikels verzeichnen, jedoch keine messbare Massenzunahme des Herzmuskels (Daemen et al., 1997).

„pressure-overload“ Hypertrophie

Eine weitere Möglichkeit eine Hypertrophie des Herzmuskels zu erzeugen, ist eine dauerhafte Erhöhung des Blutdruckes. Das belastete Herzgewebe reagiert auf diese Druckbelastung mit einer Verdickung des Muskels. In der Regel wird durch eine Verengung der Aorta in unterschiedlichen Körperabschnitten (supravalvular, thorakal, suprarenal) eine Druckerhöhung erreicht. Zu diesem Modell gehört auch die von Rockman et al. (1991) erstmals beschriebene transversale aortale Konstriktion (TAK), bei der die Aorta der Tiere im Brustkorb ligiert wird. Dies führt zu einer Hypertrophie des linken Ventrikels.

Renovaskuläre Hypertension

Um eine renovaskuläre Hypertension bei Mäusen zu erzeugen, setzten Wiesel et al. (1997) Clips mit einem Durchmesser von 0,12 mm an die Arterien der Nieren. Die größere Blutdruckerhöhung und somit eine deutliche Myokardhypertrophie erzielten sie mit der Platzierung eines Clips an einer Niere.

α -und β -adrenerge Stimulation

Diese pharmakologische Methode zeichnet sich durch eine persistierende α -und/oder β -adrenerge Stimulation aus, die in einer arteriellen Hypertonie resultiert und somit eine Myokardhypertrophie verursacht. Kudej et al. untersuchten 1997 die Wirkung des Katecholamins Isoproterenol auf den Herzmuskel und wiesen eine durch diese Substanz induzierbare Herzmuskelverdickung nach. Um eine konstante Freisetzung des Medikamentes zu gewährleisten ist die Implantation von osmotischen Minipumpen von Vorteil. Je nach Modell setzen diese gleichmäßig über einen bestimmten Zeitraum die gewünschte pharmakologische Substanz frei.

1.4 Aufgabenstellung

Untersuchungen zu Annexin A7 haben gezeigt, dass im Laufe der Differenzierung der Myoblasten zu adulten Skelettmuskeln eine Änderung der Lokalisation der 51 kDa Isoform von Annexin A7 stattfindet (Clemen et al., 1999). Es kommt zu einer Umverteilung des Proteins von membranösen Strukturen im Zytoplasma hin zur Plasmamembran. Diese Umlokalisierung gibt Anlass zu der Annahme, dass Annexin A7 in der Myogenese eine wichtige Rolle spielt.

Ziel dieser Arbeit ist die Analyse der Verteilung von Annexin A7 auf zellulärer und subzellulärer Ebene in der embryonalen Entwicklung der Maus, um weitere Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion in Differenzierungsprozessen von Zellen ziehen zu können. An adulten Tieren soll die Verteilung im murinen Gehirn näher untersucht werden.

Ein weiterer zentraler Aspekt der Studie sind Untersuchungen zur Physiologie der Herzmuskelzellen von WT- und *AnxA7^{-/-}* Tieren, um weitere *in vivo* Funktionen des Proteins am Herzen aufzudecken. Zu diesem Zweck werden EKG-Messungen durchgeführt und osmotische Minipumpen zur Induktion einer linksventrikulären Hypertrophie implantiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper, Enzyme, Antibiotika und Reagenzien

Antikörper

Primäre Antikörper:

Anti- β -Actin-Antikörper	Sigma
Anti-Annexin A7-Antikörper mab 203-217	Selbert et al., 1995
Anti-Annexin A7-Antikörper mab 204-289	Selbert et al., 1995
Anti-Annexin A7-Antikörper mab 204-204	Selbert et al., 1995
Anti-Annexin A7-Antikörper (polyklonal)	Herr et al., 2000
Anti-GFAP-Antikörper	DAKO

Sekundäre Antikörper:

Ziege-anti-Maus-IgG, Peroxidase-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, Cy3-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, Alexa Fluor 488-Konjugat	Molecular Probes
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Alexa Fluor 568-Konjugat	Molecular Probes
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-Konjugat	Sigma

Enzyme für die Molekularbiologie

Klenow-Fragment	Life Technologies, Amersham
-----------------	-----------------------------

Inhibitoren

Benzamidin	Sigma
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma

Antibiotika

Penicillin/Streptomycin Biochrom

Reagenzien

Aceton p.a. Riedel-de-Häen
Acrylamid (Protogel:30:0,8 AA/Bis-AA) National Diagnostics
Agarose (electrophorese grade) Life Technologies
BSA (Rinderserumalbumin) Roth
Coomassie-Brilliant-Blau R 250 Serva
p-Cumarinsäure Fluka
DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium) Biochrom
DMSO (Dimethylsulfoxid) Merck
DTT (1,4-Dithiothreitol) Gerbu
EDTA (Ethyldinitrotetraessigsäure) Merck
EGTA (Ethylenglycolbis[2-aminoethylether]-N, N, N',N'- Sigma
tetraessigsäure)
Ethanol Riedel-de-Häen
FCS (Fötales Käberserum) Biochrom, Life Technologies
Fischgelatine Sigma
Glycin Degussa
Harnstoff (ultrapure) Pharmacia
Isopropanol Merck
Methanol Riedel-de-Häen
 β -Mercaptoethanol Sigma
Natriumazid Merck
Paraformaldehyd Sigma
SDS (Natriumdodecylsulfat) Serva
Tris (hydroxymethyl)aminomethan (ultrapure) Sigma
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-monolaurat) Roth
Xylol p.a. Fluka

Alle übrigen nicht aufgelisteten Chemikalien in p.A. Qualität wurden von den Firmen Fluka, Gibco BRL, Merck, Roth, Serva, Sigma und Riedel-de-Haen bezogen.

2.1.2 Radionukleotide

α -³²P-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (10 mCi/ml) Amersham

2.1.3 Puffer und andere Lösungen

Puffer und Lösungen, die hier nicht aufgeführt sind, finden sich unter den jeweiligen Methoden.

NCP-Puffer (pH 8,0)

100 mM Tris/HCl

1,5 M NaCl

5 ml Tween 20

2,0 g Natriumazid

auf 1 l mit Wasser auffüllen

PBS (pH 7,2)

10 mM KCl

10 mM NaCl

16 mM Na_2HPO_4

32 mM KH_2PO_4

auf 1 l mit Wasser auffüllen

PBG (pH 7,4)

0,5 % BSA

0,045 % Fischgelatine

in 1x PBS

20x SSC

3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

TBST-Puffer

150 mM NaCl

10 mM Tris (pH 8,0)

0,2 % Tween 20

auf 1 l mit Wasser auffüllen

Kits

Alexa Fluor [®] 488 Protein Labeling Kit	Molecular Probes
Stratagene Prime [®] It II	Stratagene

2.1.4 Labormaterial

Einfrierröhrchen, 1 ml	Nunc
3 MM Filterpapier	Whatman
Gewebekulturflaschen, 25 cm ² , 75 cm ² und 175 cm ²	Nunc
Nitrocellulose, Typ BA85	Schleicher und Schüll
Nitrocellulose-Rundfilter, BA85 Ø 82 mm	Schleicher und Schüll
Plastikküvetten	Greiner
Quarzküvette Intrasil	Greiner
Reaktionsgefäße, 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt
15 ml Röhrchen, Typ 2095	Falcon
50 ml Röhrchen, Typ 2070	Falcon
Röntgenfilm X-omat AR-5	Kodak
Sterilfilter, 0,45 µm und 0,2 µm	Gelman Science

2.1.5 Geräte

Blotkammer Trans-Blot SD	Bio-Rad
Chromatographiesystem:	
Bio Logic Workstation	Bio-Rad
Einbettautomat Citadel 1000	Shandon
Fraktionssammler, Modell 2128	Biorad
Gewebekühlplatte COP 20	Medite
Heizblöcke:	
Typ DIGI-Block JR	neo-lab
Typ Thermomixer	Eppendorf

Hybridisierungsöfen	Hybaid
Inkubationsöfen Lab-Therm	Kühner
Isoflurane Vapor 19.3	Dräger
Kryostat CM3050	Leica
Laser Scan Mikroskop, Typ MZ FLIII	Leica
Mikroskope:	
Fluoreszenzlichtmikroskop Typ DMR	Leica
Stereofluoreszenzmikroskop, Typ MZ FLIII	Leica
Multipipette, Multipipette plus	Eppendorf
Paraffin Einbettssystem TB S88	Medite
pH-Meter 766	Knick
Rotationsmikrotom Typ HM 355S	Mikrotom GmbH
Rotoren:	
Typ JA-10	Beckman
Typ JA-25.50	Beckman
SLA-1500	Sorvall
SLA-3000	Sorvall
SS-34	Sorvall
TLA 45	Beckman
Rüttler 3015	GFL
Rüttler Lab-Shaker	Kühner
Tischzentrifugen:	
Kühlzentrifuge Biotech fresco	Heraeus Instruments
Sigma	B.Braun Biotech Instruments
Ultra-Turrax	IKA Labortechnik
Ultrazentrifuge Optima TLX	Beckman
Wasserbäder	GFL
Zentrifugen:	
Beckman Avanti J25	Beckman
Sorvall RC 5C plus	Sorvall

2.2 Proteinchemische und immunologische Methoden

2.2.1 Herstellung von Proteinhomogenaten aus Mausorganen

TEDABP-Puffer

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

1 mM DTT

1 mM EGTA

0,02 % Natriumazid

1 mM Benzamidin

0,5 mM PMSF

Die Organe wurden den durch zervikale Dislokation getöteten Tieren entnommen und entweder sofort weiterverarbeitet oder zur Lagerung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Bei Bedarf wurde schockgefrorenes Gewebe lyophilisiert. 100 mg Organgewebe wurden mit 6 Vol kaltem TEDABP-Puffer versetzt, mit einem Ultra-Turrax homogenisiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Homogenat zentrifugiert (30.000 x g, 20 min) und Überstand und Pellet analysiert bzw. bei -80 °C gelagert. Um mehrmaliges Auftauen zu vermeiden, wurde das Homogenat aliquotiert.

2.2.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

5 x SDS-Probenpuffer

2,5 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,5)

4,0 ml 10 % Natriumdodecylsulfat

2,0 ml Glycerin

1,0 ml 14,3 M β -Mercaptoethanol

200 μ l 10 % Bromphenolblau

10 x SDS-PAGE-Laufpuffer

0,25 M Tris

1,9 M Glycin

1 % Natriumdodecylsulfat

	Trenngele			Sammelgel
	10 %	12 %	15 %	5 %
Acrylamid ¹ 30:0,8 (ml)	19,7	23,6	30	
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 (ml)	16	16	16	2
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 (ml)				
10 % SDS (μl)	590	590	590	200
TEMED (μl)	23	23	23	8
10 % APS (μl)	165	165	165	80
Wasser (ml)	23,5	19,6	13,2	14,3

1) 30:0,8 = Acrylamid:Biacrylamid

Die Mengenangaben in der Tabelle beziehen sich auf die Herstellung von 12 Minigelen.

Molekülmassenstandard:

LMW-Marker (Pharmacia) (kDa): 94; 67; 43; 30; 24; 20,1; 14,4

Prestained-Marker (Biorad) (kDa): 250; 150; 100; 75; 50; 37; 25; 15; 10

Für die diskontinuierliche SDS-PAGE wurden 10 bis 15 %ige Trenngele in einer Größe von 7,5 cm x 10 cm x 0,05 cm mit 5 %igem Sammelgel hergestellt. Anschließend wurden die aufzutrennenden Proteinlösungen je nach Bedarf mit unterschiedlichen Mengen 5 x SDS-Probenpuffer versetzt, kurz abzentrifugiert und ca. 5 min auf 95 °C erhitzt. In der Regel wurden 5-20 μl Zellextrakt in jede Probenflasche geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 9-15 V/cm in 1 x SDS-PAGE-Laufpuffer. Als Molekülmassenstandard galten die oben aufgeführten Marker.

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Proteine entweder mit Coomassie-Blau gefärbt oder auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

2.2.3 Protein Färbungen

Coomassie-Blau-Färbung

Färbelösung

0,1 % Coomassie-Brilliant-Blau R 250
50 % Ethanol
10 % Essigsäure
vor Gebrauch filtrieren

Entfärber

10 % Ethanol
7 % Essigsäure

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele mindestens 15 min in Färbelösung geschüttelt und nicht gebundene Farbstoffe anschließend im Entfärber ausgewaschen.

PonceauS- Anfärbung von Proteinen auf Nitrocellulose:

Färbelösung

2 g Ponceau S-Farbstoff (Sigma) gelöst in
100 ml 3 %ige Trichloressigsäure

Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Protein-Transfer für eine Minute in der Färbelösung inkubiert und anschließend kurz in Wasser geschüttelt bis die Proteinbanden sichtbar waren. Die Entfärbung erfolgte durch kurzes Waschen mit Wasser, gefolgt von einer Inkubation mit TBST-Puffer.

2.2.4 Western Blot Analyse

Western-Transfer-Puffer

25 mM Tris/HCl (pH 8,5)
190 mM Glycin
20 % Methanol
0,02 % SDS

Die Übertragung von Proteinen aus den Polyacrylamidgelen auf eine Nitrocellulosemembran wurde sowohl mittels Nass-Transfer-Verfahren (Proteine > 80 kDa) als auch mittels Halbtrocken-Transfer-Verfahren durchgeführt (Proteine < 80 kDa). Vorteil des Halbtrocken-Transfer-Verfahren ist die kurze Transferdauer (30-45 min, 10 V) und geringer Pufferverbrauch im Vergleich zum Nass-Transfer-Verfahren (mind. 14 h Stunden, 20 V, 4 °C), das besonders für größere Proteine eine wesentlich bessere Transfereffizienz besitzt. Zur Größenmarkierung des Proteinstandards sowie zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Membran mit PonceauS gefärbt und anschließend wieder entfärbt (siehe 2.2.3).

2.2.5 Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose

Luminol

2 ml 1 M Tris/HCl (pH 8,0)

200 µl (0,25 M in DMSO) 3-Aminonaphthylhydrazid

89 µl (0,1 M in DMSO) p-Cumarsäure

18 ml Wasser

6,1 µl 30 %ige H₂O₂-Lösung

Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrocellulosemembran mindestens für 2 h mit Magermilchpulver in TBST-Puffer (2,5 g in 50 ml Puffer lösen) geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper in Form von Hybridomaüberständen oder aufgereinigten Antikörpern (mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C).

Zwei bis drei Waschschrte für jeweils 10 min mit TBST-Puffer schlossen sich an. Der sekundäre Antikörper, an den Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war, inkubierte dann 1 h bei Raumtemperatur. Nicht gebundene Antikörper wurden in ca. vier Waschschrten für jeweils 10 min mit dem Puffer entfernt. Die Visualisierung der Immunmarkierung erfolgte mit Hilfe von Chemilumineszenz. Dabei wird das Luminol durch die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert. Die Reaktion startet nach Zugabe von 30 %iger H₂O₂-Lösung. Die durch die Oxidation von Luminol hervorgerufene

Lichtreaktion bei 430 nm verursacht eine Schwärzung des Röntgenfilm auf den die Membran für ca. 5 sek bis 30 min exponiert wird.

2.2.6 Western Blot Stripping

Stripping-Puffer

62,5 mM Tris/HCl (pH 6,7)

100 mM β -Mercaptoethanol

2 % Natriumdodecylsulfat

Um eine mit Proteinen beladene Membran mehrfach zu benutzen, wurde die Membran gestrippt. Durch diese Methode konnten primäre und sekundäre Antikörper von der Nitrocellulosemembran entfernt werden, indem man sie für ca. 30 min bei 50 °C in Stripping-Puffer geschüttelt hat. Anschließend folgten noch zwei Waschungen mit NCP bzw. TBST Puffer.

2.2.7 Aufreinigung von IgG aus Hybridoma-Kulturüberständen

Gesättigte, filtrierte Ammoniumsulfatlösung

4,1 (3,9) mol/l Ammoniumsulfat bei 25 °C (4 °C)

Unter Rühren solange in vorgewärmtes A.dest geben bis nichts mehr in Lösung geht. Vor Gebrauch den Überstand filtrieren.

Puffer

Dialysepuffer	100 mM Tris/HCl	pH 8,9
Elutionspuffer	0,1 M Zitronensäure	pH 3,5
Neutralisierungspuffer	2 M Tris	pH 9
Regenerationspuffer	0,1 M Zitronensäure	pH 3,0
Waschpuffer	100 mM Tris/HCl 3 M NaCl	pH 8,9

Erster Schritt bei der Aufreinigung monoklonaler Antikörper war die Präzipitation der im Kulturüberstand vorhandenen Proteine. Dazu wurden 45 Teile Hybridomaüberstand langsam und unter ständigem Rühren mit 55 Teilen kalter, gesättigter Ammoniumsulfatlösung gemischt und über Nacht bei 4 °C gerührt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (8000 x g, 20 min, 4 °C), der Niederschlag in 50-100 ml 100 mM Tris/HCl (pH 8,9) gelöst und über Nacht gegen 100 mM Tris/HCl (pH 8,9) dialysiert. Das Dialysat wurde nochmals zentrifugiert (8000 x g, 20 min, 4 °C) und der Überstand mit Festsubstanz auf 3 M NaCl gebracht. Diese Lösung wurde auf eine mit Waschpuffer äquilibrierte Protein A-Sepharosesäule (1 ml Protein A-Sepharose CL4B, Pharmacia) geladen. Das Ablösen der gebundenen Antikörper erfolgte dann mit Hilfe des Elutionspuffers, wobei in jedem Röhrchen des Fraktionssammlers 50 µl 2 M Tris/HCl (pH 9,0) zur sofortigen Neutralisation vorgelegt wurden. Die Antikörper enthaltenden Fraktionen wurden über Nacht gegen PBS dialysiert und bei 4 °C gelagert. Die Protein A Säule wurde mit 0,1 M Zitronensäure regeneriert und mit Waschpuffer äquilibriert. Eine Säule konnte mehrmals für denselben Antikörper verwendet werden und wurde in Waschpuffer mit 0,1 % Natriumazid bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinbestimmungen wurden nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Bindung von Coomassie „Brilliant Blue“ G 250 an Proteine. Dadurch wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm verschoben. Zur Erstellung einer Eichkurve wird BSA als Standard verwendet. Sowohl für die Probe als auch für den Standard wurden für jeden Ansatz 33 µl Proteinlösung mit 33 µl Wasser versetzt. Anschließend wurde 1 ml Bradford-Reagenz (Sigma) hinzugegeben und nach fünf Minuten die Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen.

2.3 Histologische und immunhistologische Methoden

2.3.1 Präparation von Gefrier- und Paraffinschnitten

Die Tötung von Wildtyp- und Annexin A7-defizienten Mäusen erfolgte mittels cervicaler Dislokation. Die gewünschten Organe wurden entnommen und für Paraffinschnitte je nach Dicke der Gewebe in 4 % igem Paraformaldehyd inkubiert. Es gilt als Faustregel ca. 1h Fixierung für 1 cm Gewebeschicht.

Für die Gefrierschnitte wurde das jeweilige Gewebe in Tissue-Tek-Einbettmedium (Sekura) nach kurzem Eintauchen in Methylbutan auf Trockeneis eingefroren.

Paraffinschnitte:

Nach der Fixierung in Paraformaldehyd wurden die Organe im Einbettautomat Citadel 1000 (Shandon) behandelt.

Zur Entwässerung durchliefen die Proben zuerst Alkoholbäder (3 h 70 % EtOH; 1 h 80 % EtOH; 1 h 90 % EtOH; 1 h 96 % EtOH; 2 h abs. Alkohol; 2 h abs. Alkohol) gefolgt von drei Xylolbädern für jeweils 1½ h. Zum Abschluß wurden die Gewebestücke noch zweimal im Paraplast Plus-Bad bei 60 °C für 2 bzw. 3 h gelagert, um für eine gute Infiltration des Paraffins in das Gewebe zu sorgen.

Es folgte die Einbettung der Organe mit Paraffin in Formschälchen (Roth) mit Hilfe des Paraffin Einbettsystems TB S88 der Fa. Medite. Die Blöcke wurden bei 4 °C gelagert und bei Bedarf mit einem Rotationsmikrotom (Leica) auf eine Dicke von ca. 5-8 µm geschnitten und bei 37 °C vor der weiteren Verarbeitung getrocknet. Nicht benötigte Schnitte können danach bei 4 °C gelagert werden.

Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte zuerst 3 x 2 min in ein Xylolbad geführt und danach folgte eine absteigende Reihe von Alkoholbädern (je 1-2 min in 96, 90, 80, 70, 50, 30 % EtOH) und ein kurzes Eintauchen in Wasser.

Gefrierschnitte:

Die Schnitte wurden mit Hilfe des Kryostat CM3050 angefertigt und mindestens 2 h oder über Nacht bei RT getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die so behandelten Schnitte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.3.2 HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)Hämalaun nach Mayers

1 g Hämatoxylin (Merck)
0,2 g Natriumjodat
50 g Kaliumalaun
50 g Chloralhydrat
1 g krist. Zitronensäure
ad 1 l Aqua dest.

Erythrosin

1 %ige Stocklösung ansetzen aus
Erythrosin (Fluka)
auf 0,5 %ige Lösung mit Aqua
dest. verdünnen

Zum besseren Verständnis der Histologie einzelner Organe wurden zu Beginn HE-Färbungen angefertigt. Nach der Entparaffinierung der Schnitte erfolgte zuerst die Inkubation in Hämalaun (nach Mayers) für 4-10 min. Danach schloss sich das Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 min an. Nach kurzem Eintauchen in Aqua dest. wurden die Schnitte dann in Erythrosin (0,5 %ig) für 2-5 min gefärbt. Zum Abschluss folgten Bäder in aufsteigender Alkoholreihe (70, 96 % EtOH, Isopropanol) und in Xylol für ca. 2 min bevor die Schnitte in Permout (Eukitt, Faust) eingebettet wurden. Die so gefärbten Schnitte sind bei Raumtemperatur über Jahre lagerbar.

Zellkerne färben sich mit dieser Methode blau an, Zytoplasma und Fasern rot bis blassrosa.

2.3.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Gelvatol

20 g Gelvatol 20-30 (Polyvinylglykol, MW 10.000) in 1 x PBS in PBS 16 h rühren,
40 ml Glycerin zugeben, 16 h rühren, 15 min bei 12.000 x g zentrifugieren,
25 ng/ml DABCO zum Überstand geben,
aliquotiert in Eppendorfgefäßen bei -20 °C lagern

Bei der indirekten Immunfluoreszenz werden die im Gewebe vorhandenen Proteine mit einem Antikörper markiert, der wiederum durch den sekundären, fluoreszierenden Ziege-anti-Maus oder Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper sichtbar gemacht wird. Zunächst wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert (siehe 2.3.2) und 3 x 10 min in PBS gewaschen. Bei der Verwendung von Gefrierschnitten wurden die Schnitte erst mit Aceton für 5 min fixiert. Die nachfolgenden Schritte erfolgten auf die gleiche Art und Weise: Unspezifische Bindungsstellen wurden mit PBG und 10 % Ziegen Serum für mindestens 2 h geblockt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte dann bei 4 °C über Nacht. Fünf Waschschriffe für je 5 min mit PBG entfernten nicht gebundene Antikörper, so dass im nächsten Schritt der sekundäre, fluoreszenzmarkierte Antikörper für 1 h zugegeben werden konnte. Die Verdünnungen erfolgten jeweils nach Herstellerangaben. Es schlossen sich drei Waschungen mit PBG und drei Waschungen mit PBS sowie ein kurzes Eintauchen in Wasser an. Zum Schluß wurden die Gewebeschnitte in Gelvatol eingebettet und zum Aushärten über Nacht bei 4 °C gelagert (Langanger et al., 1983).

2.3.4 Vorbehandlung von Paraffinschnitten

Um möglichst optimale Färbegergebnisse zu erlangen, wurden die Gewebeschnitte vor der indirekten Immunfluoreszenz vorbehandelt. Häufig können die von den Antikörpern zu erkennenden Epitope durch eine Vorbehandlung besser zugänglich gemacht werden und somit bessere Färbungen und weniger unspezifische Hintergrundfluoreszenz erzielt werden.

Eine Methode zur Antigendemaskierung ist die Behandlung der Schnitte in feuchter Hitze, vorzugsweise in der Mikrowelle. Die Behandlung erfolgt nach der Entparaffinierung und der absteigenden Alkoholreihe. Es können verschiedene Pufferlösungen zur Erzeugung der feuchten Hitze verwendet werden.

Citratpuffer

Stammlösung A: 0,1 M Zitronensäure in 1 l Aqua dest.

Stammlösung B: 0,1 M Natriumcitrat in 1 l Aqua dest.

9 ml Stammlösung A und 41 ml Stammlösung B zu 450 ml Aqua dest geben

Harnstoff (6 M)

24,02 g Harnstoff in 100 ml PBS lösen

Um das Abschwimmen von entparaffinierten Gewebeschnitten zu vermeiden, wurden beschichtete Objektträger verwendet (Super-FrostPlus Objektträger, Menzel). Die Schnitte wurden in einem geeigneten Glas- oder Plastikgefäß in die Mikrowelle gestellt und 15-20 min im jeweiligen Puffer sprudelnd gekocht, wobei darauf geachtet werden musste, dass die Schnitte beim Kochvorgang nicht austrockneten. Anschließend kühlten die Objektträger ca. 20-30 min bei RT ab und einmaliges Abspülen mit Aqua dest. sowie drei Waschungen für je 5 min in PBS folgten. Immunhistochemische Nachweise wie oben beschrieben schlossen sich an.

Enzymatische Vorbehandlung

Enzymatische Vorbehandlungen werden ebenfalls im Anschluß an die Entparaffinierung durchgeführt. Hierzu wurden die Gewebeschnitte ca. 5-15 min bei RT mit 0,1 % Trypsin in PBS inkubiert. Es folgten drei Waschungen in PBS bevor die indirekte Immunfluoreszenz fortgesetzt wurde.

Die Kombination beider Methoden ist auch möglich und wurde ebenfalls durchgeführt. Hierbei schloss sich die enzymatische Behandlung der Behandlung mit feuchter Hitze an.

2.3.5 Direktes Markieren monoklonaler Antikörper mit dem Alexa Fluor[®] 488 Protein Labeling Kit

Eine Möglichkeit den unspezifischen Hintergrund in den Immunfluoreszenzfärbungen zu reduzieren, ist das direkte Markieren eines Antikörpers mit einem Fluorochrom. Mit Hilfe des Alexa Fluor[®] 488 Protein Labeling Kits wurde der fluoreszierende Farbstoff direkt an die monoklonalen Antikörper (203-217) einer gereinigten Immunglobulinfraktion gebunden.

Um den pH-Wert der Reaktionslösung anzuheben wurden 0,5 ml Proteinlösung (2 mg/ml) mit 50 µl 1 M Natriumbicarbonatlösung (pH 8,3) versetzt. Nach Zugabe der Alexa 488-Farbstofflösung wurde das Reaktionsgemisch 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit konnte die mitgelieferte Säule zur Aufreinigung des markierten Proteins vorbereitet werden und das Reaktionsgemisch anschließend über die Säule aufgetrennt werden. Die Elution erfolgte mit dem mitgelieferten Elutionspuffer. Zur Kontrolle der Auftrennung wurde eine UV-Lampe gegen die Säule gehalten, um die Trennung des markierten Proteins von der ungebundenen Farbstoffraktion (obere Bande) zu beobachten. Nur die zuerst eluierende Fraktion wurde aufgefangen. Der Grad der Markierung wurde durch die Messung der Absorption der Konjugatlösung bei 280 und 494 nm bestimmt. Die markierte Proteinlösung kann bei 4 °C lichtgeschützt gelagert werden.

2.3.6 Nachweis von Peroxidase-markierten Antikörpern mit DAB (3, 3', 4, 4'-Tetraaminobiphenyl-Tetrahydrochlorid)

Stammlösungen

50 mg/ml DAB in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) (DAB= 3, 3', 4, 4'-Tetraaminobiphenyl-Tetrahydrochlorid)

40 mg/ml Ammoniumchlorid in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4)

13 mg/ml Nickelsulfat in Aqua dest.

100 mg/ml β-D-Glucose in Aqua dest.

1,2 mg/ml Glucoseoxidase in Aqua dest.

Alle Stammlösungen bei -20 °C lagern.

Reaktionslösung erst vor Gebrauch ansetzen:

Zu 1,4 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) nacheinander

30 µl DAB-Lösung

15 µl Ammoniumchlorid-Lösung

30 µl Nickelsulfat-Lösung

30 µl β-D-Glucose-Lösung

5 µl Glucoseoxidase-Lösung

geben.

Diese weitere immunhistochemische Färbung dient dem Nachweis von Antigenen mit Peroxidase-markierten sekundären Antikörpern. Bei der Umsetzung des DAB-Substrates kommt es zu den typische schwarz gefärbten Signalen.

Nach dem Entparaffinieren und den Waschschrinen in PBS wurde zuerst die zelleigene Peroxidase mit 0,3 %igem H₂O₂ in PBS geblockt (2 x 15 min bei RT). Die Kontrolle dieser Reaktion erfolgte über das Beobachten von aufsteigenden Bläschen auf dem Gewebeschnitt. Es schloss sich das Blocken und die Inkubation des ersten Antikörpers wie in 2.3.3 beschrieben an. Als zweiter Antikörper diente ein Peroxidase-markierter AK in einer Verdünnung von 1:100. Dieser inkubierte für 1 h bei RT. Nach drei Waschungen mit PBG und drei Waschungen mit PBS wurde das DAB-Substrat zugegeben. Verstärkt wurde das Signal durch die Zugabe von Nickel und Glucoseoxidase. Die Reaktion fand unter mikroskopischer Kontrolle für ca. 10-30 min statt und resultierte in einer schwärzlichen Färbung des Gewebes. Mittels PBS wurde die Reaktion gestoppt und vor dem Einbetten in Permount mussten die Schnitte noch eine aufsteigende Alkoholreihe durchlaufen.

2.3.7 Mikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde das Fluoreszenzmikroskop DMR der Firma Leika mit PCO CCD Imaging Software sowie ein Leica MZ FLIII Stereomikroskop mit Diskussoftware verwendet.

Für die konfokale Lasermikroskopie wurde das von der Fa. Leica entwickelte CLSM-SP-Mikroskop benutzt, das optische Schnittebenen durch die Präparate erlaubt. Die Präparate

können bei 63-facher Vergrößerung (Pl APO 63 x/1,32-0,6/ Öl) betrachtet werden. Das Gerät ist mit einem Krypton- und einem Argonlaser ausgestattet und ermöglicht elektronische Anregung bei unterschiedlichen Wellenlängen. Der Emissionsbereich des zu empfangenden Signals kann durch die Software eingegrenzt werden, so dass Kreuzanregungen durch die beiden Laser verhindert werden. Die Daten werden mit dem begleitenden Bildverarbeitungssystem der Fa. Leica weiterverarbeitet.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Northern Blot Analyse

Durch eine Northern Blot Analyse lassen sich RNA-Produkte nachweisen. RNA wird auf eine Nylonmembran übertragen, nachdem sie vorher der Größe nach in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Mouse Embryo MTN Blot (Clontech) erworben auf dem bereits ca. 2 µg poly A⁺ RNA pro Spur aus vier verschiedenen Entwicklungsstadien muriner Embryonen (E7, E11, E15, E17) gebunden waren.

2.4.2 Radioaktive Markierung von DNA-Proben mit dem Stratagene Prime[®] It II-Kit

Es wurden ungefähr 25 ng DNA mit Wasser zu einem Endvolumen von 24 µl aufgefüllt und mit 10 µl random-oligonucleotide-primer versetzt. Die Probe wurde 5 min auf 92 °C erhitzt, 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend mit 10 µl 5 x Primer-Puffer, 5 µl α-³²P-dATP (50 µCi) und 2 U Klenow-Enzym versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei 37 °C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Zentrifugation (3.000 UpM, 2 min) über eine 1 ml Sephadex G-50-Säule in TE-Puffer abgetrennt. Die radioaktiv markierte Probe wurde vor ihrem Einsatz im Northern-Blot bei 100 °C für 10 min denaturiert und danach 5 min auf Eis abgekühlt.

2.4.3 Nachweis mit radioaktiv markierten Sonden

Waschlösung 1

2 x SSC

0,05 % SDS

Waschlösung 2

0,1 x SSC

0,1 % SDS

Durch Hybridisierung mit einer spezifischen, radioaktiv markierten DNA-Sonde lässt sich spezifische RNA im Northern Blot (2.4.1) als Bande im Autoradiogramm nachweisen.

Um unspezifische Bindungen an die Membran zu vermeiden, wurde diese zunächst für 30 min im mitgelieferten Puffer (*Express Hyb*) geschüttelt. Danach folgte die Inkubation für 1 h bei 68 °C in einem Rotationsofen in einer Glashybridisierungsröhre. Hierzu wurde neuer Puffer mit der zuvor denaturierten Sonde versetzt und auf die Membran gegeben. Um Reste der Sonde sowie unspezifisch gebundene DNA zu entfernen, folgten Waschungen (Waschlösung 1 bei RT für 30-40 min; Waschlösung 2 bei 50 °C für 2 x 40 min).

Die Membran wurde kurz getrocknet, in Polyethylen-Folie eingepackt und einem Röntgenfilm exponiert. Das Ergebnis der Hybridisierung wurde mittels Autoradiographie mit verschiedenen Expositionszeiten ausgewertet.

2.4.4 Northern Blot Stripping

Das Entfernen der radioaktiv markierten Sonde von der Membran erfolgte durch das sogenannte „Stripping“. Hierzu wurde steriles Aqua dest. mit 0,5 % SDS auf ca. 90-100 °C erhitzt. Der Blot wurde zu dieser Lösung gegeben und 10 min bei ständigem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Lösung noch 10 min abgekühlt bevor die Membran entfernt, in Folie verpackt und bei -20 °C gelagert wurde.

2.5 Zellkultur

2.5.1 Kultur von Neuroblastomzellen (N2A-Zellen)

N2A-Zell-Kulturmedium

DMEM (1000 g/l Glucose)

10 % FBS

120.000 IE/l Penicillin / 120.000 µg/l Streptomycin (=P/S)

10 mM Glutamin

6 ml 1 % MEM (non essential aminoacids; Biochrom)

Murine Neuroblastomzellen (N2A-Zellen) wurden in modifiziertem DMEM-Kulturmedium in Wasser gesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert.

Die Zellen wurden alle 2-3 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und dann mit 0,05 % Trypsin (ca. 1 ml/90 mm Schale, ca. 5 min bei 37 °C) abgelöst. Durch Auf- und Abpipettieren mit der Pasteurpipette wurden die Zellen vereinzelt und in neuem Medium ausplattiert.

Zur Differenzierung von N2A-Zellen wurden die Zellen in Kulturmedium mit nur 0,2 % Serum überführt. Die Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach etwa 2-3 Tagen hatten sich Neuriten entwickelt und die Zellen konnten geerntet werden.

2.5.2 Einfrieren und Auftauen von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)

Einfriermedium

DMEM (high glucose)

20 % FBS

10 % DMSO

Bereits kultivierte ES-Zellen der D3-Linie (Doetschmann et al., 1985) wurden im Rahmen dieser Arbeit gelagert und nach dem Auftauen für Western Blot Analysen verwendet. Das

Einfrieren der Zellen erfolgte in Cryo-Tubes im Einfriermedium bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder in flüssigem Stickstoff.

In einem Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die Zellen zügig aufgetaut, 5 min bei 1000 UpM zentrifugiert, um sie vom Einfriermedium zu trennen und dann entsprechend weiter verarbeitet.

2.6 Methoden zu Funktionsuntersuchungen am Herzmuskel

2.6.1 Mäusezucht und Haltung

Für die im folgenden beschriebenen Experimente wurden Wildtyp und Annexin A7-defiziente Mäuse des Stammes SV129 gezüchtet. Die Tiere wurden in einem künstlichen Tag-Nacht Rhythmus gehalten mit einer Beleuchtung von 5:00 bis 17:00 Uhr und Dunkelheit von 17:00 bis 5:00 Uhr.

2.6.2 EKG-Messungen

Die zur Durchführung der EKG-Messungen erforderliche Anästhesie wurde mittels Inhalationsnarkose (1,5 % Isoflurane) durchgeführt. Die Ableitung erfolgte mit einem EKG Verstärker und einem Powerlab AD Wandler der Firma ADI Instruments und wurde mit dem dazugehörigen Chart 4 Analyseprogramm digital aufgezeichnet. Es handelte sich dabei um eine Extremitätenableitung der rechten Vorderpfote und der linken Hinterpfote mit Nadelelektroden.

2.6.3 Implantation osmotischer Minipumpen bei Mäusen

Mittels Implantation von osmotischen Minipumpen sollte bei den zu untersuchenden Mäusen eine linksventrikuläre Myokardhypertrophie induziert werden. Es wurden osmotische Minipumpen der Firma Alzet, Sulfeld, Modell 2002 verwendet. Diese wurden unter sterilen Bedingungen mittels einer mitgelieferten stumpfen Kanüle befüllt. Dabei wurden die Medikamente in PBS mit 0,5 mM Ascorbinsäure gelöst. Jede Pumpe fasst ein Volumen von 200 μl . und hat eine Förderungsleistung von 0,52 $\mu\text{l}/\text{h}$. Die Medikamentendosis wurde dem jeweiligen Tiergewicht angepasst. In mehreren Versuchsansätzen wurden folgende Dosen einzeln oder in Kombination verwendet:

	Orciprenalin (Sigma)	Phenylephrin (Sigma)
Dosis (mg/kg/Tag)	60	30
	30	15
	60	
		15
		30
		60

Vor der endgültigen Implantation wurden die befüllten Pumpen bei 37 °C im Wärmeschrank in PBS ca. 1-2 h gelagert. Zum Vergleich Wildtyp versus *AnxAT^{-/-}* Mäuse wurden zwei Gruppen mit jeweils ca. 10 Wochen alten männlichen Tieren gebildet. Es folgte die Vorbereitung für den chirurgischen Eingriff. Hierzu wurde die Inhalationsnarkose mittels eines Isofluraneverdampfers (Fa. Dräger) in einer Kammer eingeleitet. Die Operationsstelle konnte unter Sedation rasiert und desinfiziert werden und die Tiere wurden auf dem Operationstisch an das Narkosegerät angeschlossen. Es folgte ein ca. 1,5 cm großer Hautschnitt, um die Pumpen unter die Haut auf Höhe der Schulterblätter (interscapulär) einzupflanzen. Danach wurde die Hautnaht mit 7/0 Perma-Hand Seide (Ethicon) verschlossen und die Mäuse in der Aufwachphase unter Rotlicht gestellt. Nach 1-2 Wochen wurden die Tiere durch cervicale Dislokation getötet und das Herz entnommen. Zur Feststellung der Körperindices wurde das Gesamtgewicht der Tiere ermittelt, die Tibialänge vermessen und das Herzgewicht sowie Gewicht des rechten und des linken Ventrikels bestimmt. Das Gewebe des linken Ventrikels wurde für weitere Analysen entweder in Tissue-Tek-Einbettmedium getaucht oder bei -80 °C gelagert.

2.6.4 Statistische Absicherung

Zum Vergleich zweier Messreihen verwendet man den t-Test. Überprüft wird die Entfernung zweier Mittelwerte (X_a , X_b) zueinander. Als Maß hierfür dient die Größe t . Zu einem t lässt sich die Wahrscheinlichkeit (P) errechnen. Beträgt die Wahrscheinlichkeit (P) der Übereinstimmung $< 5\%$ ($P < 0,05$) so spricht man von einem signifikanten Unterschied. Die statistischen Berechnungen erfolgten durch die Microsoft Excel Tabellenkalkulation.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Expression von Annexin A7 in der Embryogenese der Maus

Untersuchungen zur Verteilung eines Proteins in der Embryonalentwicklung können wichtige Rückschlüsse über seine mögliche Funktion liefern. Clemen et al. (1999) zeigten, dass es im Laufe der Differenzierung von Myoblasten zum adulten Skelettmuskel sowohl zu einer Änderung der Expression der Isoformen als auch zu einer Umlokalisierung des Annexin A7 von membranösen Strukturen im Zytoplasma zur Plasmamembran kommt. Diese Beobachtungen deuten auf eine wichtige Rolle von Annexin A7 in der Myogenese hin und waren Anlass zu weiteren Analysen auf diesem Gebiet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisation von Annexin A7 auf Protein- und mRNA-Ebene in der frühen Entwicklung von Mäusembryonen untersucht.

3.1.1 Expression von Annexin A7 in verschiedenen Stadien der murinen Embryogenese (Northern Blot Analyse)

Zu Beginn der Studie wurde die Verteilung von Annexin A7 auf mRNA-Ebene untersucht. Dazu wurde ein käuflicher Northern-Blot mit mRNA von Maus-Embryonen des siebten, elften, fünfzehnten und siebzehnten Tages (post coitum) mit einer ³²P-markierten *Anxa7* cDNA-Probe wie unter 2.4.3 hybridisiert. Die Sonde umfasst die gesamte cDNA. In allen vier Embryonalstadien erkannte die *Anxa7* cDNA-Sonde zwei RNA-Spezies von 2,4 und 1,8 kb (siehe Abb. 3.1). Diese RNA-Spezies werden auch in adulten Tieren beobachtet und sind auf eine unterschiedliche Prozessierung im 3'-Ende des Gens zurückzuführen. Der gleiche Blot wurde mit einer β -Aktin-Sonde hybridisiert, um zu überprüfen, ob in allen Spuren gleich große RNA-Mengen aufgetragen wurden (im Kit enthalten). Diese Sonde umfasst nach Herstellerangaben die gesamte cDNA von β -Aktin von 2.000 bp Länge.

β -Aktin wird in zwei Isoformen exprimiert, wovon nur die größere schon in der frühen Embryonalentwicklung vorhanden ist. Diese wird immer auf gleichem Niveau exprimiert und ist damit als Kontrolle geeignet. Der Blot zeigt in allen Spuren gleiche Transkriptmengen der größeren Isoform, so dass von gleichen mRNA-Mengen in jeder Spur ausgegangen werden kann. Die kleinere Isoform wird erst später gebildet und wird im Northern-Blot erst in 15 und 17 Tage alten Embryonen detektiert. Im Vergleich dazu finden sich bereits ab dem siebten Tag der Embryonalentwicklung beide mRNA-Spezies von Annexin A7, wobei die Transkriptmengen auf dem gleichen Niveau bleiben mit Ausnahme von E11. Zu diesem Zeitpunkt sind die nachweisbaren Transkriptmengen beider Isoformen reduziert.

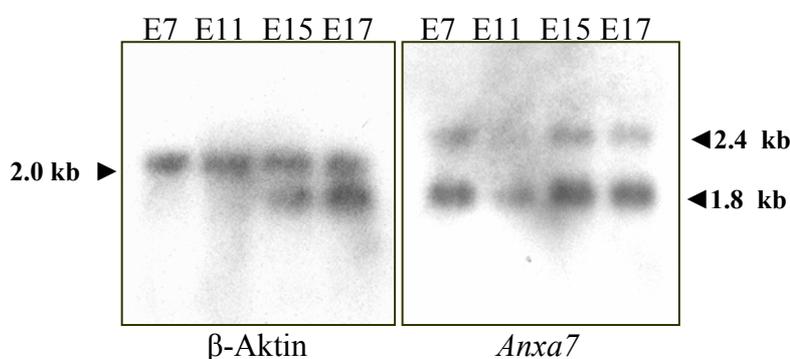


Abb. 3.1: Kommerzieller Northern-Blot mit mRNA von Maus-Embryonen des 7., 11., 15. und 17. Tag p.c.. Die Hybridisierung erfolgte mit einer ^{32}P -markierten *Anxa7* cDNA-Probe. Es konnten beide mRNA Spezies von *Anxa7* an allen untersuchten Tagen nachgewiesen werden. Am 11. Tag der Entwicklung war die Transkriptmenge vermindert. Als Positivkontrolle diente eine β -Aktin Sonde.

3.1.2 Immunhistochemische Untersuchungen der frühen Embryonalentwicklung

Die Immunhistologie ermöglicht den Nachweis eines Proteins im Gewebeschnitt. Um genaue Aussagen über das erste Auftreten von Annexin A7 während der Embryogenese und seine zelluläre Lokalisation treffen zu können, wurden Paraffinschnitte von 5-17 Tage alten Embryonen angefertigt und mittels indirekter Immunfluoreszenz markiert.

Bevorzugt wurden monoklonale Antikörper (203-217 und 204-289) verwendet, die gegen Maus-AnxA7 hergestellt worden waren (Selbert et al., 1995), und polyklonale anti-AnxA7-AK gegen das Maus-AnxA7 (Herr et al., 2000). Um optimale Färbeergebnisse zu erzielen, wurden die Gewebeschnitte verschiedenen Vorbehandlungen unterzogen und mit

aufgereinigtem Antikörper 203-217, der direkt mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Alexa Fluor 488) markiert war, gefärbt.

E5- Das Stadium des „Eizylinders“

Der 5. Tag in der Embryonalentwicklung der Maus stellt auch zugleich das erste postimplantatorische Stadium dar und ist somit das früheste zu untersuchende Stadium in der Immunhistologie. Im sogenannte „Eizylinder“ konnte sowohl in der inneren Zellmasse als auch in der äußeren Zellschicht das gesuchte Protein detektiert werden (siehe Abb. 3.2). Es zeigte sich eine deutliche Färbung des Zytoplasmas der Ekto- und Endodermzellen, nicht aber des Kerns.

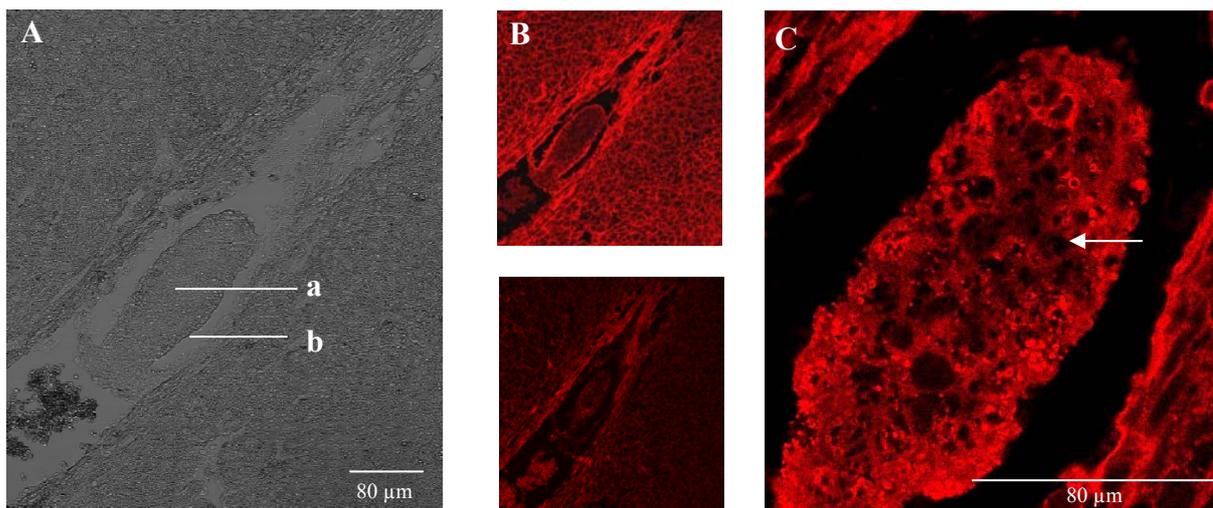
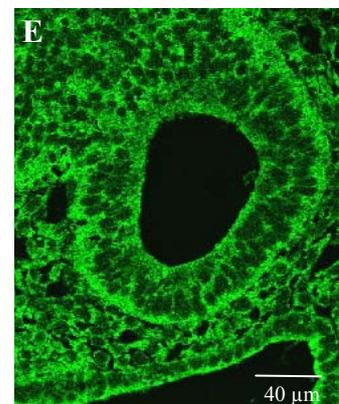
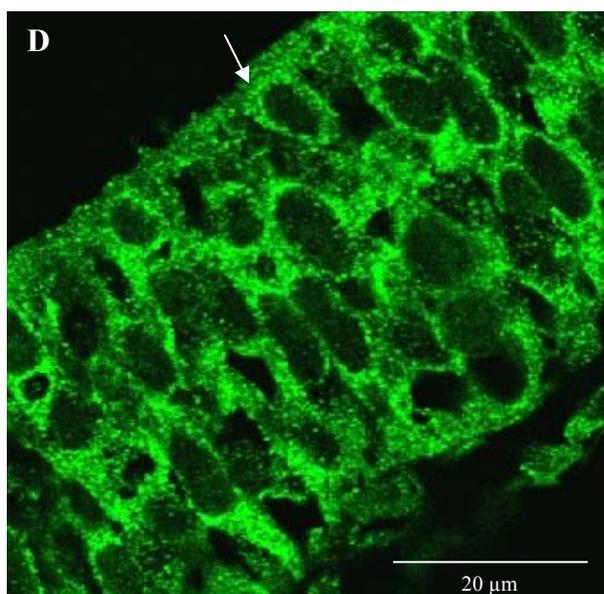
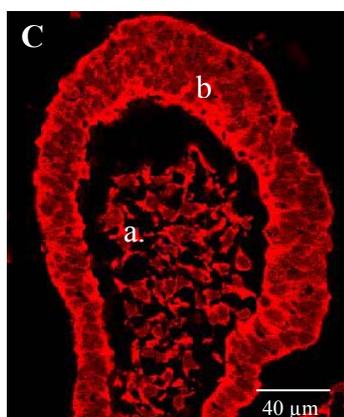
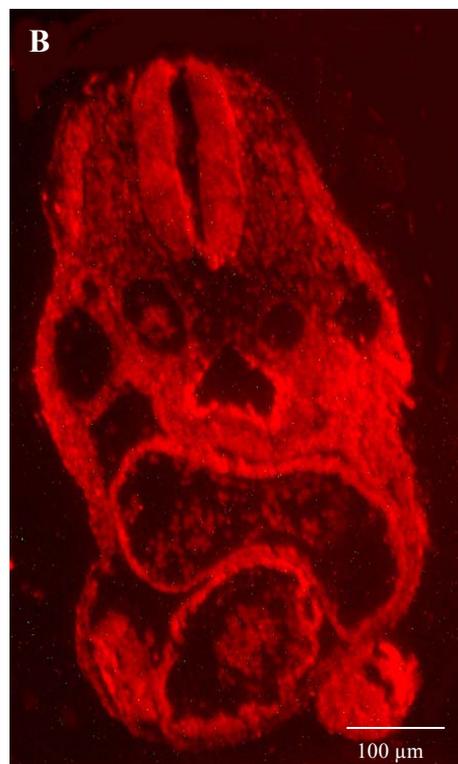
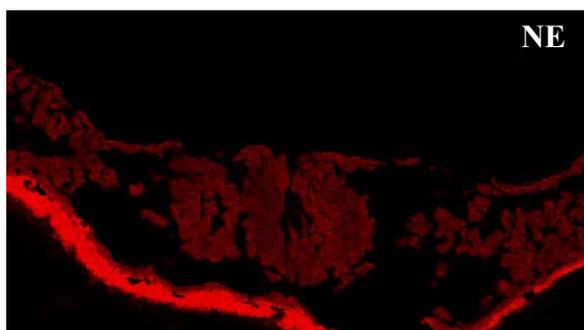
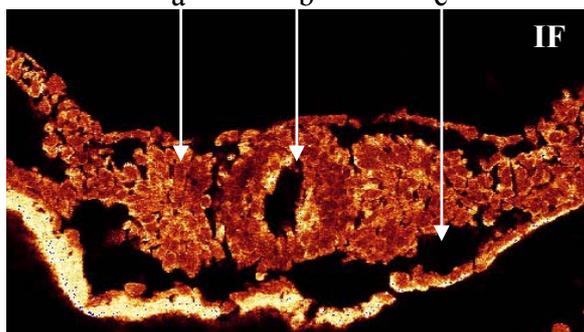
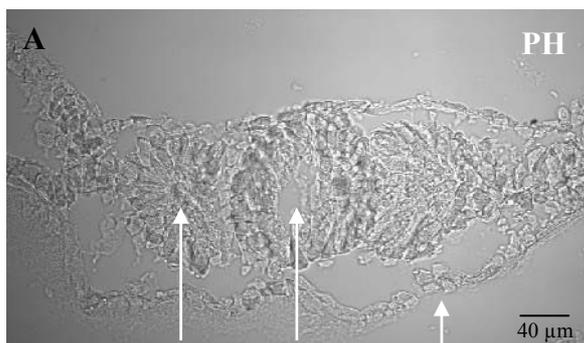


Abb. 3.2: Lokalisation von Annexin A7 im „Eizylinder“ (E5). **(A)** Die Phasenkontrastdarstellung zeigt den zweischichtigen Aufbau aus einer inneren Zellmasse (a) und einer äußeren Schicht kuboidaler Zellen endodermalen Ursprungs (b). **(B)** Die Markierung mit dem anti-AnxA7-AK 203-217 und eine Visualisierung dieser Bindung durch einen Cy3-markierten Sekundär-AK wiesen auf die Präsenz von Annexin A7 in beiden Schichten hin. Die Negativkontrolle (B, unten) erfolgte durch alleinige Zugabe des zweiten, Cy3-markierten AK. **(C)** In der konfokalen Mikroskopie wurde eine ausschließliche Lokalisation von Annexin A7 im Zytoplasma der Zellen deutlich (Pfeil=Kern).

E8- Frühe Organogenese

Der achte Tag der murinen Embryogenese zeichnet sich durch eine typische axiale Rotation aus, die zur Inversion der Keimblätter führt. Die frühe Organogenese beginnt. Die beiden Neuralfalteln schließen sich und bilden das Neuralrohr. Seitlich dieses Rohrs formen sich aus dem Mesoderm die Somiten (Vorläufer der Muskelzellen). Eine primitive Herzplatte entsteht. Zu diesem Zeitpunkt lässt sich das Darmrohr in den Vorder-, Mittel- und Hinterdarm unterteilen und besteht aus einer einschichtigen Epithelschicht und den umgebenden Mesenchymzellen. Besonderes Augenmerk wurde in den folgenden Analysen auf die Frage gelegt, ob eine unterschiedliche Verteilung des Proteins in Zusammenhang mit dem embryonalen Ursprung der Zellen aus den drei Keimblättern beobachtet werden kann. Sowohl in Paraffin- als auch in Gefrierschnitten konnte Annexin A7 am achten Tag in allen Zellen des Embryos nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.3). Punktförmige Strukturen ließen sich vor allem im Zytoplasma detektieren.

Abb. 3.3: Annexin A7-Lokalisation (Detektion mit mab 204-289) in Zellen eines acht Tage alten Mäusembryos (Transversalschnitte). Die Phasenkontrastdarstellung (**PH**) zeigt den Aufbau des Neuralrohrs: In der Mitte befindet sich das angeschnittene Neuralrohr (a), seitlich die Zellen der sich nun formenden Somiten (b). Der Embryo ist vom Amnion umgeben (c); Die Immunfluoreszenzfärbung (**IF**) erfolgte nach Vorbehandlung des Paraffinschnittes mit Trypsinvorverdauung und Mikrowellenbehandlung in Citratpuffer. Bei der Negativkontrolle (**NE**) wurde auf die Zugabe des ersten AK verzichtet. (**B**) Übersichtsfärbungen zeigten, dass neben dem Neuralrohr auch eine Annexin A7 positive Immunoreaktivität in allen übrigen Zellen zu verzeichnen war. Die konfokale Mikroskopie bestätigte die Verteilung von Annexin A7 in allen drei Keimblättern. (**C**) Die Neuralfalte besteht aus dem neuronales Ektoderm (a) und den Mesenchymzellen (b), die später die Mittelhirnregion bilden (Zellen mit mesodermaler Ursprung). In Zellen beider Schichten war Annexin A7 nachweisbar. (**D**) Auf subzellulärer Ebene wurden punktförmige Signale im Zytoplasma (Pfeil) der Zellen des neuronalen Ektoderms sichtbar. (**E**) Auch in Zellen des perikardio-peritonealen Kanals (endodermalen Ursprungs) ließ sich Annexin A7 in der Immunfluoreszenz detektieren. Die Visualisierung der Reaktionen erfolgte in diesen Abbildungen mit Hilfe eines mit Alexa Fluor 488 (grüne Signale) oder mit Alexa Fluor 568 (rote Signale) markierten Sekundäntikörpers.



E11-E16: Vergleich der Verteilung von Annexin A7 in Organen des Mausembryos

Diese Phase der Embryogenese ist gekennzeichnet durch eine fortschreitende Organentwicklung. Generell hat sich gezeigt, dass in allen untersuchten Organen Annexin A7 nachgewiesen werden konnte. Das entspricht der Verteilung beim adulten Tier.

Es bestand kein Zusammenhang zwischen dem zellulären Ursprung eines Organs und der Stärke seiner Signale in der Immunfluoreszenz. So waren in Übersichtsfärbungen z.B. Darm und Metanephros nahezu gleich stark gefärbt, die Zellen des Gehirns hingegen schwächer (Daten nicht gezeigt).

Die folgende Tabelle zeigt die Verteilung von Annexin A7 in verschiedenen Organen der Entwicklungsstadien E11-E16 im Vergleich

	E11	E12	E13	E14	E15	E16
Herz	+	+	+	+	+	+
Darm	+	+	++	++	++	++
Leber	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Metanephros			++	++	++	++
Gehirn	+	+	+	+	+	+
Somiten	+	+	+	+	+	+
Auge	++	++	++	++	++	++
Lunge	+	+	++	++	++	++

+: Signal in der Immunfluoreszenz (Die Anzahl der Pluszeichen zeigt die Stärke des Signals)

Im nächsten Schritt wurden die einzelnen Zellen eines Organs genauer untersucht. Eine Vielzahl von Organen entwickelt sich in Form eines „Schlauches“ mit einer inneren Epithelschicht und den umgebenden Mesenchymzellen. In allen diesen Organen (z.B. Darm, Niere, Lunge, etc.) konnte beobachtet werden, dass im Epithel deutlichere Signale in der Immunfluoreszenz zu verzeichnen waren als im Mesenchym. Auf der subzellulären Ebene waren punktförmige Strukturen im Zytosol zu erkennen. Eine Färbung war auch im Zellkern sichtbar (siehe Abb. 3.4).

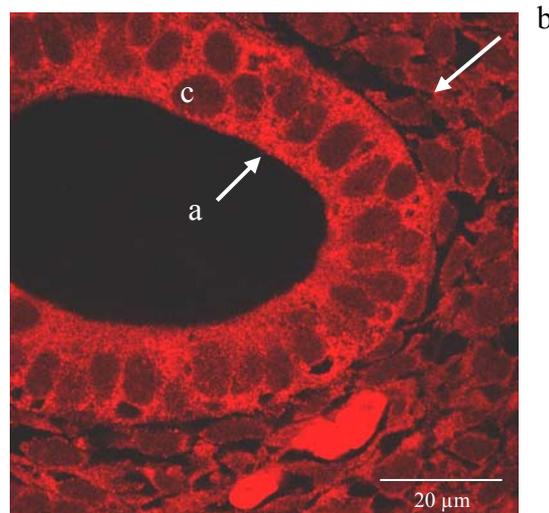


Abb. 3.4: Querschnitt eines Darmrohrs, E11. Die innere, noch einschichtige Epithelschicht (a) des Darmrohrs war stärker gefärbt als die umgebenden Mesenchymzellen (b). Annexin A7 war vor allem im Zytosol nachweisbar (c=Zellkern).

Bei den hier verwendeten monoklonalen Antikörpern handelt es sich um murine Immunglobuline. Das hat den Nachteil, dass der zweite Antikörper zum Teil nicht durch den Primär-AK markiertes Mausegewebe binden kann und es zu falsch positiven Ergebnissen und hoher Hintergrundfluoreszenz kommt. Um dies auszuschließen, haben wir eine gereinigte Immunglobulinfraktion unseres Antikörpers (mab 203-217) direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 markiert. Es zeigte sich die gleiche Verteilung der angefärbten Zellen und somit eine Bestätigung der Ergebnisse (siehe Abb. 3.5).

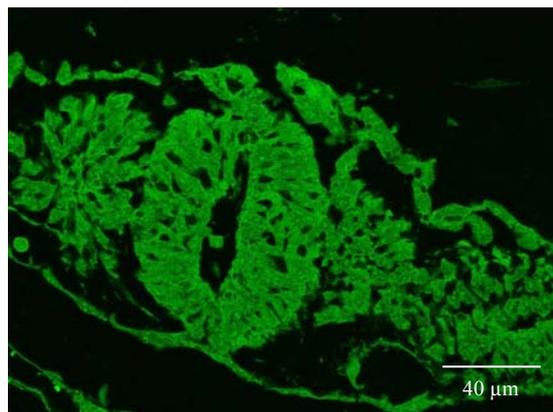


Abb. 3.5: Beispiel einer immunhistochemischen Färbung eines Gewebeschnittes (E8, vgl. Abb. 3.3) mit einem Alexa Fluor 488 markierten Antikörper (mab 203-217). Dargestellt ist ein Transversalschnitt durch das Neuralrohr.

3.1.3 Western Blot Analyse von murinen embryonalen Stammzellen

Da in der Immunhistologie gezeigt werden konnte, dass Annexin A7 bereits am Tag der Implantation des Embryos in die Plazenta in den Zellen exprimiert wird, konzentrierte sich der nächste Schritt der Untersuchungen auf die Analyse muriner ES-Zellen. Western Blot Analysen von murinen ES-Zellen der D3-Linie sollten Aufschluss über die Expression der beiden Isoformen in diesen Vorläuferzellen geben. Es fand sich in den untersuchten Zellen nur die 47 kDa Isoform (siehe Abb. 3.6).

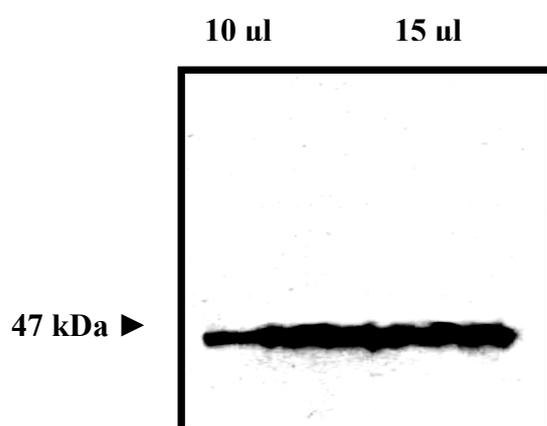


Abb. 3.6: Western Blot Analyse von ES-Zellen. Proteine von Zellhomogenaten (10 bzw. 15 μ l aufbereitete Proben aufgetragen) wurden im SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Getestet wurde mit dem monoklonalen AK 203-217.

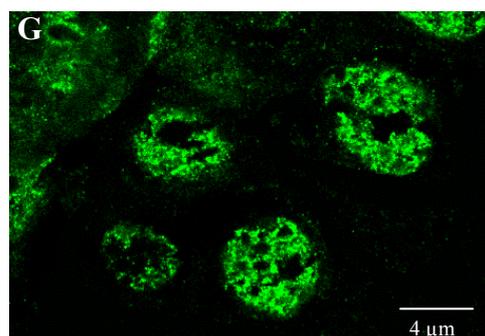
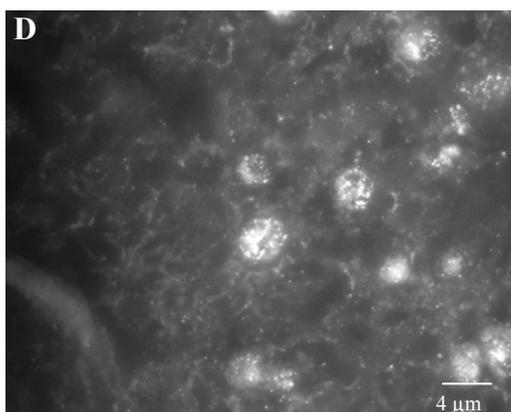
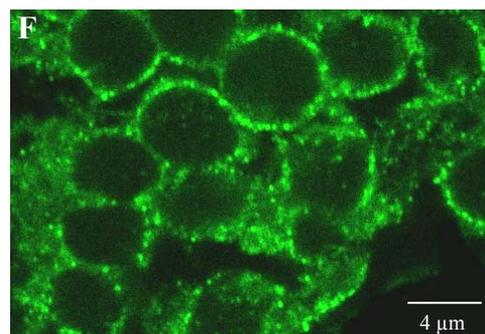
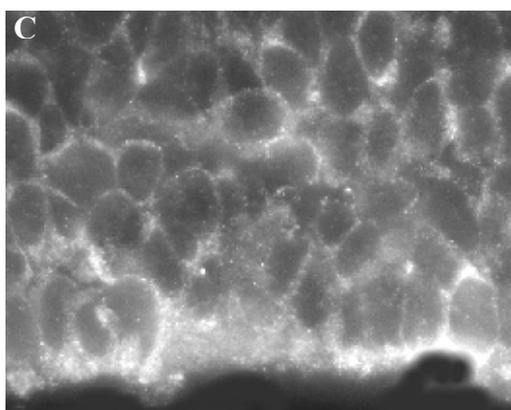
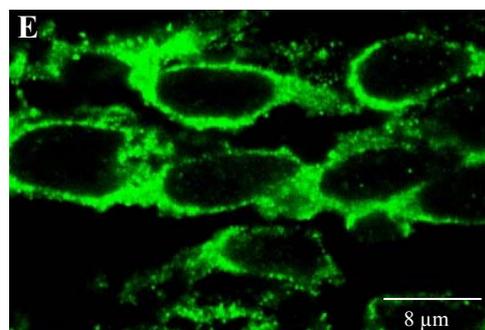
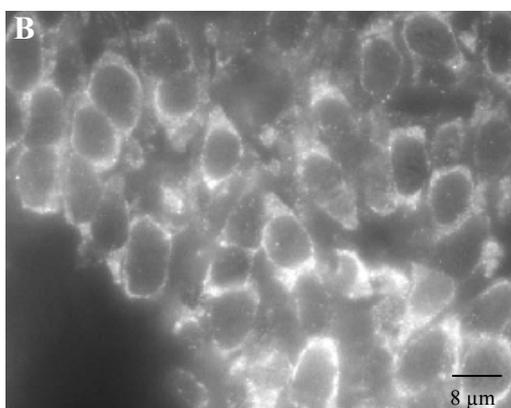
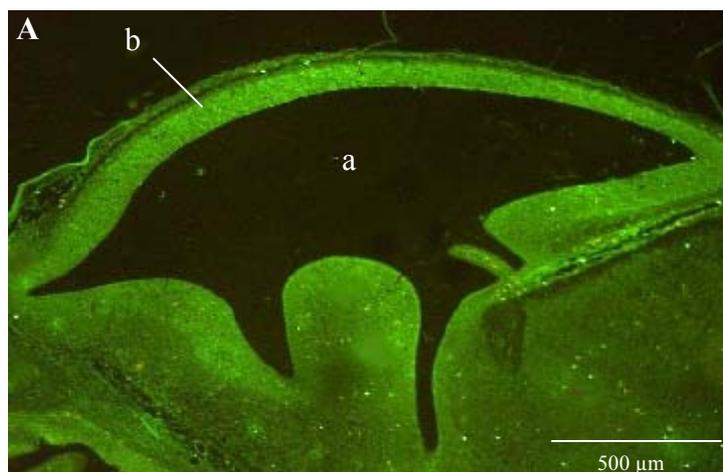
3.1.4 Annexin A7 in den Zellen des sich entwickelnden Gehirns

Clemen et al. (2001) wiesen an humanen Gehirnen die ausschließliche Lokalisation von Annexin A7 in Astrozyten des Temporallappens und der Hippocampusformation nach. Dies gab Anlass, die Verteilung von Annexin A7 in Zellen des sich entwickelnden murinen Gehirns näher zu untersuchen. Für andere Annexine (Annexin A1, A2, A4, A5) konnte gezeigt werden, dass ihre Expression auf unterschiedliche Zelltypen des ZNS beschränkt ist und während der Gehirnentwicklung verschiedenen Regulationsmechanismen unterliegt (Reeves et al., 1992; Giambanco et al., 1993; Eberhard et al., 1994). Annexin A4 wiederum gilt als ein Marker für die sich entwickelnden Zellen der Mittellinie im murinen ZNS (Hamre et al., 1996).

Immunfluoreszenzstudien an Gehirnschnitten von Mäuseembryonen (E13-E16) sollten Aufschluss über die Verteilung von Annexin A7 auf zellulärer und subzellulärer Ebene liefern. Aus Neuroepithelzellen, welche das Neuralrohr formen, bilden sich durch Teilung Neuroblasten, die Vorläuferzellen der späteren Nervenzellen. Bereits am neunten Tag der murinen Embryonalentwicklung erweitert sich der craniale Teil des Neuralrohrs und bildet drei primitive Hirnbläschen aus. Die Innenräume dieser Bläschen sind die Grundlage der späteren Ventrikel im adulten Gehirn. Die sie auskleidende Schicht ist das Stratum germinativum. Aus dieser Schicht heraus beginnt sowohl die Migration der sich differenzierenden Neuroblasten als auch der Glioblasten in den Neocortexbereich am sechzehnten und siebzehnten Tag der Gehirnentwicklung (Yuasa, 2001).

Die Immunfluoreszenzfärbungen der untersuchten Gehirne (E13-E15) zeigten eine distinkte Lokalisation des Proteins im Zytosol der Zellen des Stratum germinativum (siehe Abb. 3.7). Ab E16 konnten jedoch Kernfärbungen von Zellen beobachtet werden, die zwischen dem Stratum germinativum und dem Neocortex zu finden waren. Dies deutet auf eine Umverteilung von Annexin A7 vom Zytoplasma in den Kern während des Differenzierungsprozesses der Zellen des ZNS hin.

Abb. 3.7: Lokalisation von Annexin A7 im embryonalen Gehirn, E13-E16. Als Primär-AK wurde ein anti-AnxA7-AK (203-217) verwendet und zur Visualisierung diente ein Alexa Fluor 488 gekoppelter Sekundär-AK. **(A)** Am 13. Tag p.c. ist der laterale Ventrikel (a) von dem stark angefärbten Stratum germinativum (b) umgeben. **(B)** Zu diesem Zeitpunkt ließ sich Annexin A7 im Zytosol der spindelförmigen Zellen detektieren. **(C)** Zwei Tage später rundeten diese Zellen sich ab und die Fluoreszenzsignale im Zytosol wurden schwächer. **(D)** Am 16. Tag p.c. zeigte sich zusätzlich eine Kernfärbung in den Zellen der Intermediärschicht. **(E-G)** Die konfokale Mikroskopie bestätigte die Verteilung des Proteins.



3.2 Lokalisation von Annexin A7 im Gehirn adulter Mäuse

Verschiedene Annexine, wie Annexin A1, A2, A4 und A5 konnten bereits in früheren Untersuchungen im Gehirn lokalisiert werden. Ihre Expression ist in diesem Gewebe auf unterschiedliche Zelltypen beschränkt. Für Annexin A7 konnte eine distinkte Verteilung in Astrozyten des humanen Gehirns in Immunfluoreszenzstudien nachgewiesen werden (Clemen et al., 2001). Als spezifischer Marker für astrogliale Zellen dient GFAP (Glia fibrillary acidic protein), ein wichtiges Zytoskelettprotein in diesen Zellen. Es wird im adulten Gehirn in protoplastischen Astrozyten der grauen Substanz und in fibrösen Astrozyten der weißen Substanz exprimiert. Im folgenden wurden Immunfluoreszenzfärbungen an Gehirnschnitten von WT- und *AnxA7*^{-/-}-Tieren mit monoklonalen (203-217) und polyklonalen anti-AnxA7-AK durchgeführt. Die Analysen konzentrierten sich auf drei unterschiedliche Gehirnabschnitte: Großhirnrinde (Cortex temporalis), Kleinhirn (Cerebellum) und Hippocampusformation.

Es konnten zwei verschieden anfärbbare Zelltypen in allen drei Gehirnabschnitten identifiziert werden (siehe Abb. 3.8). Der eine Zelltyp zeichnet sich vor allem durch seine Kernanfärbung aus und konnte anhand seiner typischen Verteilung als Neuron identifiziert werden. Der andere Zelltyp zeigte in der doppelten Immunfluoreszenz eine GFAP-Aktivität und gehört somit zu den Astrogliazellen.

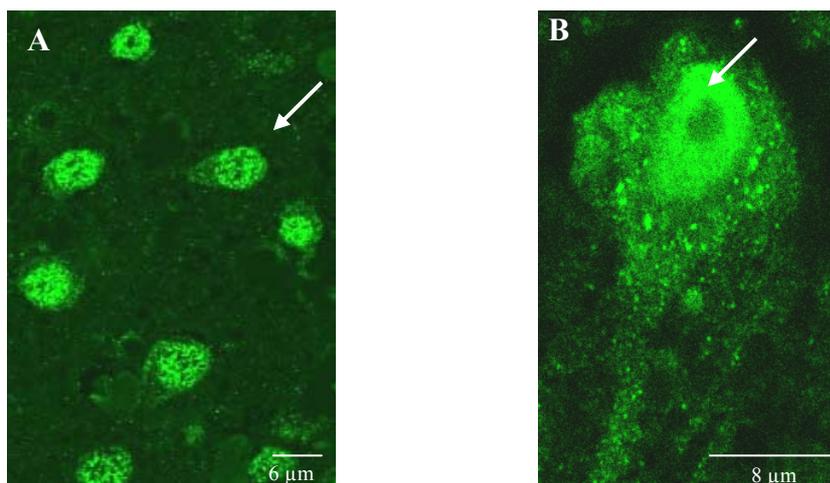


Abb. 3.8: Lokalisation von Annexin A7 in zwei Zelltypen des murinen Gehirns (Paraffinschnitte). Die Annexin A7 Markierung erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper (203-217), als Sekundär-AK diente ein mit Alexa Fluor 488 gekoppelter AK. **(A)** Neuronen zeigten eine typische Kernfärbung, hier dargestellt aus dem Cortexbereich des Temporallappens. **(B)** In den Astrozyten des gleichen Gehirnabschnittes färbten sich sowohl der Kern als auch das Zytoplasma an (Pfeil=Kern).

3.2.1 Verteilung von Annexin A7 in der Hippocampusformation

Die Hippocampusformation setzt sich aus dem Hippocampus und dem Gyrus dentatus zusammen und ist Teil des limbischen Systems (siehe Abb. 3.9). Als wesentliche Aufgabe fällt diesem Abschnitt des Gehirns der Prozess des Lernens zu. Charakteristisch für die Hippocampusformation ist die Schicht an Pyramidenzellen, multipolare Neurone mit einem annähernd dreieckigen Zellkörper. Dieser Zelltyp zeigte in den Immunfluoreszenzenstudien eine starke Kernfärbung (siehe Abb. 3.10). Es wurde sowohl mit monoklonalem AK (203-217) als auch mit polyklonalem anti-AnxA7 AK gefärbt. Als Negativkontrolle dienten Gehirnschnitte von AnxA7-defizienten Mäusen.

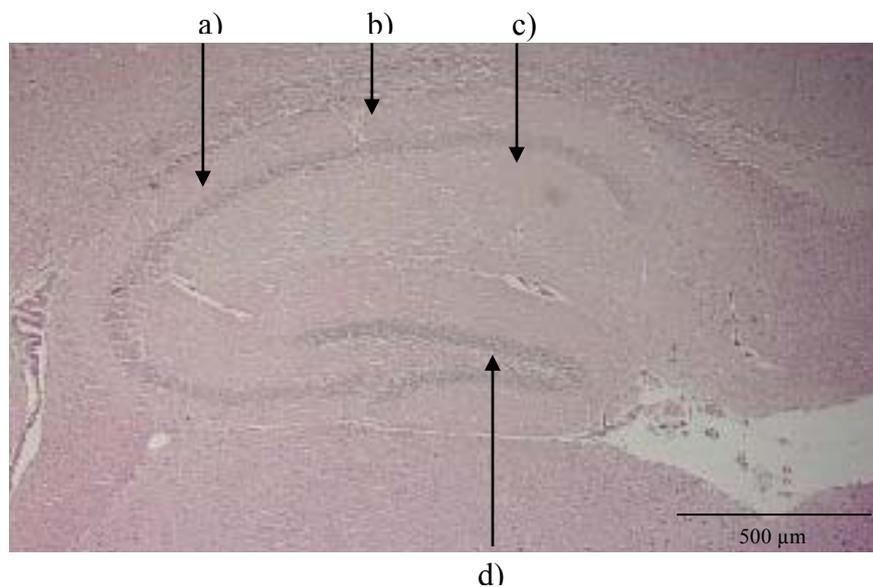


Abb. 3.9: HE-Färbung einer Hippocampusformation im Mausgehirn. Charakteristisch ist die Pyramidenzellschicht (a) die von der polymorphen Schicht (b) und dem Stratum moleculare begrenzt wird. Zur Hippocampusformation zählt ferner der Gyrus dentatus (d) mit gleichem Schichtenaufbau.

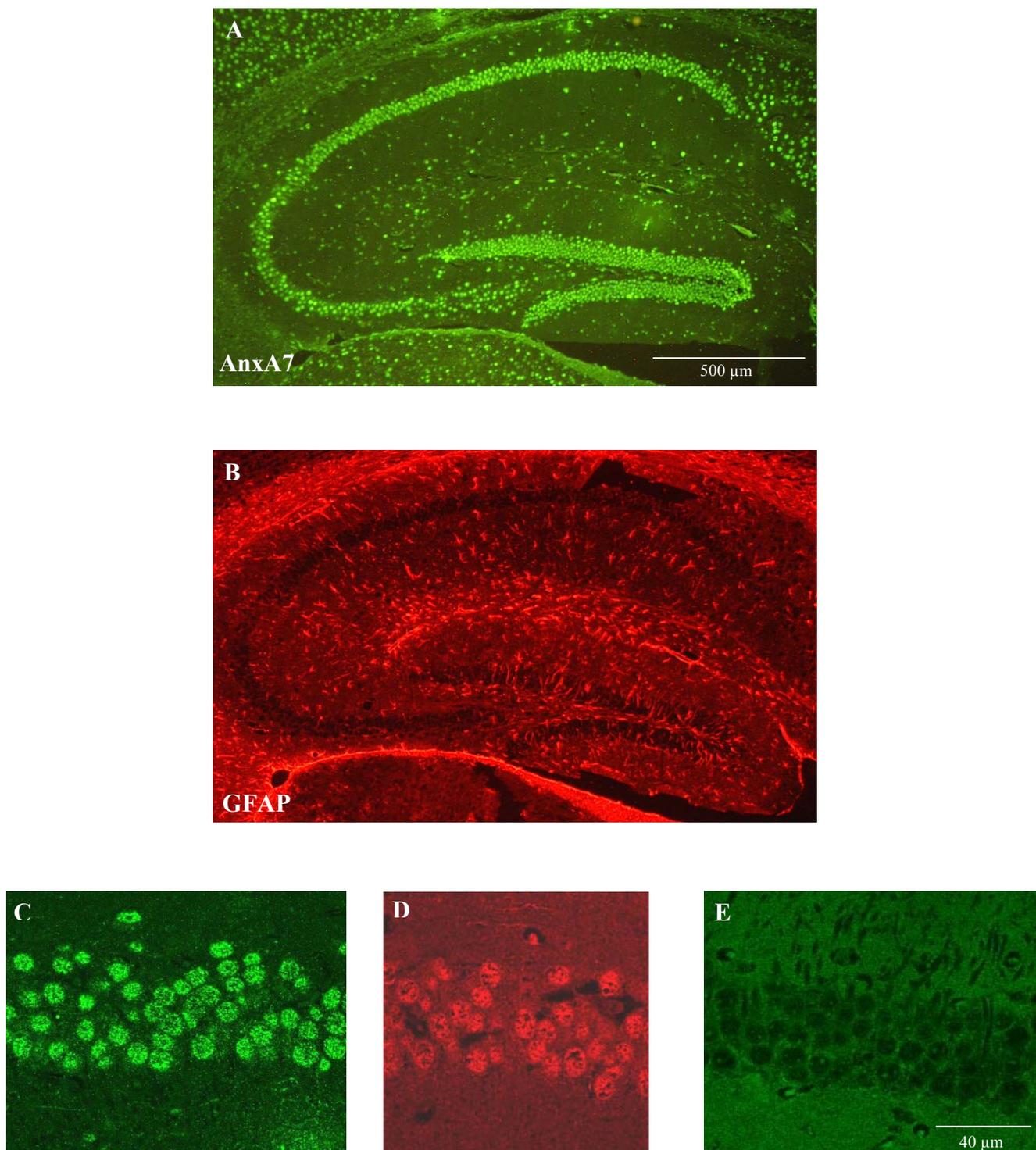


Abb. 3.10: Immunfluoreszenzfärbungen der Zellen der Hippocampusformation. **(A, B)** Paraffinschnitte der Hippocampusformation wurden mit einem anti-AnxA7-AK (mab 203-217) markiert und Immunfluoreszenzfärbungen mit einem polyklonalen anti-GFAP-AK gegenübergestellt. **(C)** Die konfokale Mikroskopie zeigte eine deutliche AnxA7-positive Kernfärbung der Zellen der Pyramidenzellschicht. **(D)** Markierung des gleichen Gehirnabschnittes mit polyklonalem anti-AnxA7-AK bestätigte die Verteilung des Proteins. **(E)** In den Gehirnschnitten einer AnxA7 defizienten Maus (Markierung mit mab 203-217) fehlten die Signale im Kern der Neuronen. Als Sekundär-AK wurde ein Alexa Fluor 488 Konjugat bei monoklonalem Primär-AK und ein Alexa Fluor 568 Konjugat bei polyklonalem Primär-AK verwendet.

3.2.2 Lokalisation von Annexin A7 im murinen Cerebellum

Das Kleinhirn dient der Koordination und Feinabstimmung der Motorik und der Regulation des Muskeltonus. Die graue Substanz des Cerebellums bildet die Kleinhirnrinde, bestehend aus dem Stratum moleculare und dem Stratum granulosum. Zwischen diesen beiden Schichten befindet sich die Purkinje-Zellschicht (siehe Abb. 3.11). Diese Zellen reihen sich mit ihren ca. 30 μm großen Perikaryen in typischer Weise perlschnurartig auf und ihre zwei starken Dendritenäste zweigen sich sparlierbaumartig bis an die Kleinhirnoberfläche auf. Die Purkinje-Zellen, die den gesamten Output der Kleinhirnrinde weiterleiten, senden ihre Axone in die darunterliegende weiße Substanz (Kleinhirnmak).

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels indirekter Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass besonders die Kerne der Neurone in der Körnerschicht sowie die Purkinje-Zellen eine Präsenz des untersuchten Proteins Annexin A7 aufweisen. Auch die Fasern der weißen Substanz besitzen in der doppelten Immunfluoreszenz eine GFAP- und eine AnxA7-Aktivität (siehe Abb. 3.11).



Abb. 3.11: Transversalschnitt durch das murine Kleinhirn, HE-Färbung. Die graue Substanz des Kleinhirns besteht aus dem Stratum moleculare (a), der Purkinje-Zellschicht (b) und dem Stratum granulosum (c). Das Kleinhirnmak ist die weiße Substanz des Cerebellums (d).

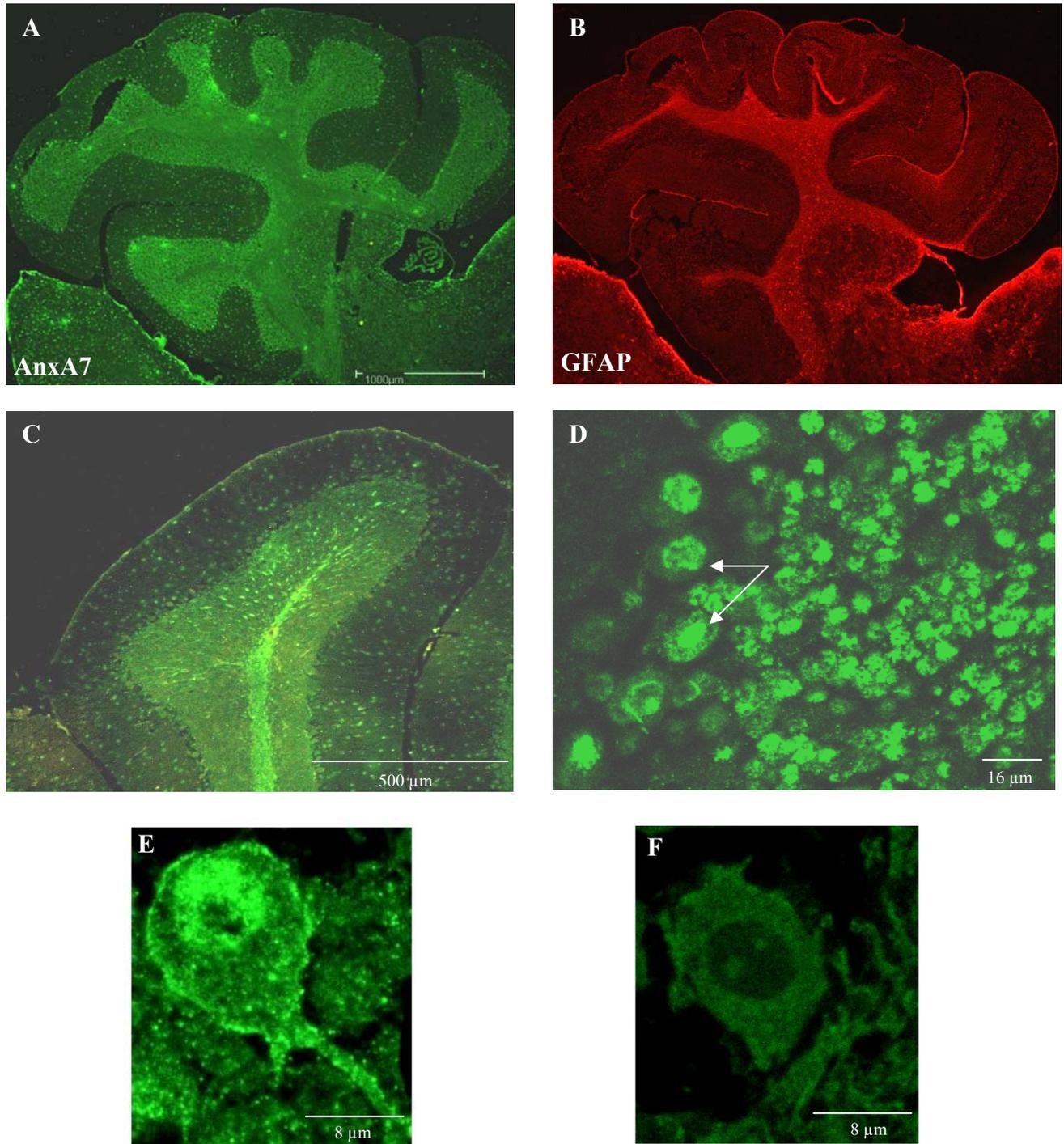


Abb. 3.12: Immunfluoreszenzfärbungen des murinen Cerebellum. **(A, B)** Das Kleinhirn wurde in einer doppelten Immunfluoreszenzstudie mit monoklonalem anti-AnxA7-AK (203-217) und polyklonalem anti-GFAP-AK gefärbt. **(C)** Eine gleiche Verteilung von Annexin A7 ergab sich durch eine Markierung dieses Gehirnabschnittes mit polyklonalem anti-AnxA7-AK (sekundärer AK hier Alexa Fluor 488 gekoppelt). **(D)** In der konfokalen Mikroskopie (aus A) ließ sich die perlschnurartige Aufreihung der Purkinje-Zellen (Pfeil) am Übergang zum Stratum granulosum beobachten. **(E)** Der Zellkörper und die zwei typischen Dendriten zeigten eine positive Färbung und eine intensive Kernfärbung. **(F)** Diese Signale konnten in der Färbung des Kleinhirns einer *AnxA7^{-/-}* Maus mit einem anti-AnxA7 monoklonalem AK nicht beobachtet werden. Monoklonale AK wurden mit einem Alexa Fluor 488 Konjugat und polyklonale AK mit einem Alexa Fluor 568 Konjugat visualisiert.

3.2.3 Immunhistologie der Großhirnrinde

Der dritte untersuchte Gehirnabschnitt ist die Großhirnrinde des Temporallappens (Cortex temporalis). Sie stellt die graue Substanz des Großhirns dar und hat bei der Maus einen sechsschichtigen Aufbau. Zwischen den Neuronen der einzelnen Schichten finden sich die für die graue Substanz typischen protoplastischen Astrozyten.

Auch in dieser Gehirnregion ließ sich eine intensive Kernfärbung der Neuronen mittels der indirekten Immunfluoreszenz und einer DAB-Färbung gut darstellen (siehe Abb. 3.13).

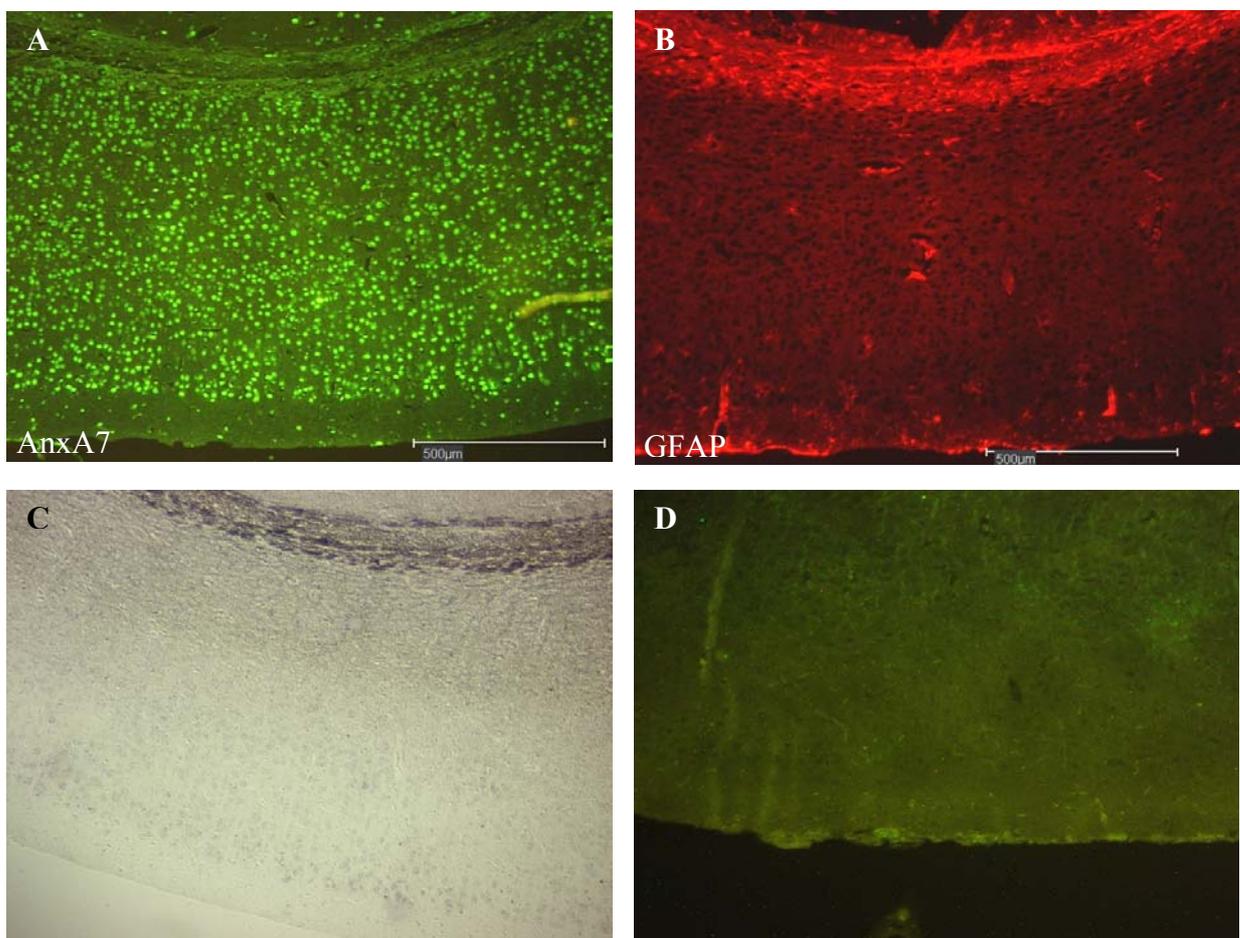


Abb. 3.13: Immunhistologische Färbungen der Großhirnrinde. **(A, B)** Es wurden die Immunreaktivitäten auf einen anti-AnxA7-AK (203-217) und auf einen anti-GFAP-AK in einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung verglichen. **(C)** Die DAB-Färbung zeigte die gleiche Verteilung der Zellen mit AnxA7 positiven Signalen in der Großhirnrinde. **(D)** In Gehirnschnitten einer *AnxA7*^{-/-} Maus, die mit dem gleichen AK wie in A und C markiert wurden, fehlten diese Signale. Als Sekundär-AK wurden ein Alexa Fluor 488 und ein Alexa Fluor 568 markierter AK verwendet sowie ein Peroxidase gekoppelter AK in der DAB-Färbung.

Zwischen den stark gefärbten Neuronen wies noch eine zweite Zellart AnxA7 Immunreaktivität auf. Auf subzellulärer Ebene konnte in der doppelten Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass diese Zellen die für das GFAP typische fibrilläre Streifung und die für Annexin A7 typischen punktförmigen Strukturen im Zytosol und im Kern aufwiesen (siehe Abb. 3.14). Aufgrund der GFAP-Färbung wurden diese Zellen als Astrozyten identifiziert und das Vorhandensein von Annexin A7 in Astrozyten von Mäusen nachgewiesen.

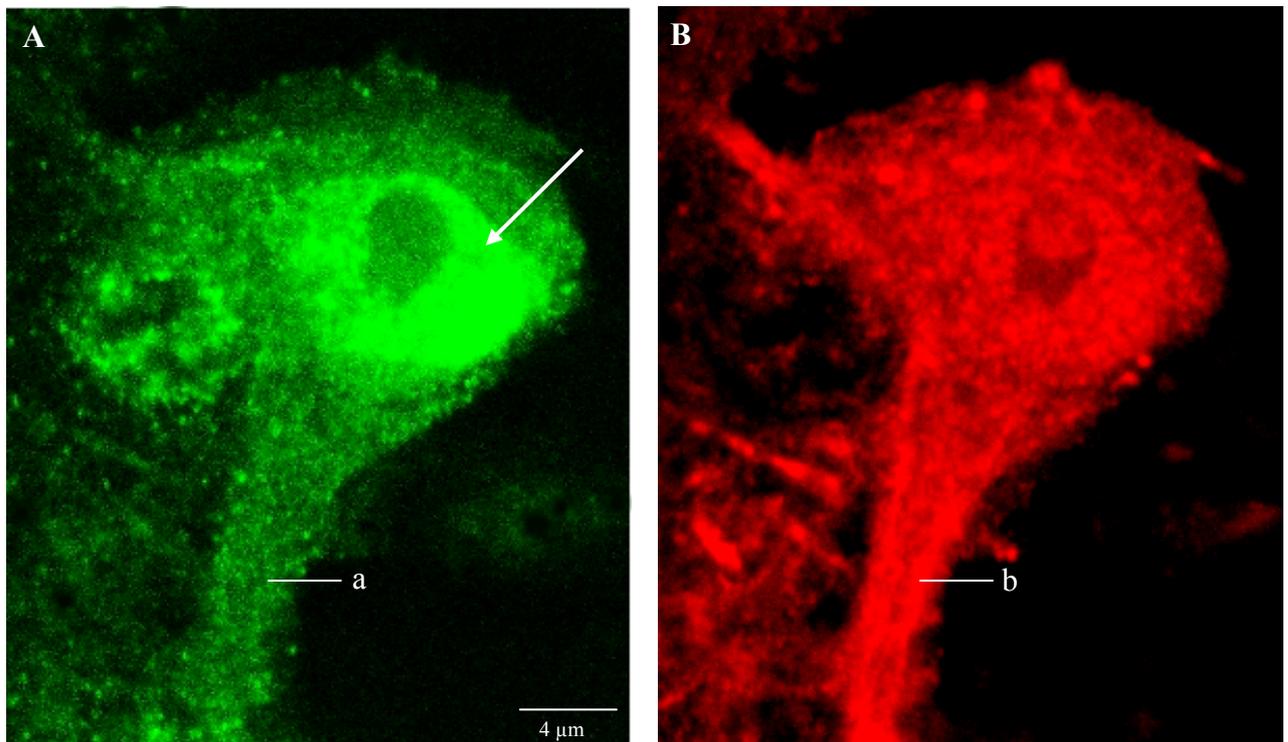


Abb. 3.14: Doppelte Immunfluoreszenzfärbung eines Astrozyten im Cortex temporalis. **(A)** Der anti-AnxA7-AK (203-217) erkannte punktförmige Strukturen (a) im Kern (Pfeil) und im Zytosol. **(B)** Markierung mit einem polyklonalen anti-GFAP-AK zeigte die typische Streifung (b) der Zellausläufer des Astrozyten. Als Sekundär-AK diente ein Alexa Fluor 488 gekoppelter AK (grüne Signale) und ein Alexa Fluor 568 markierter AK (rote Signale).

3.2.4 Western Blot Analysen

Nach den Ergebnissen der Immunfluoreszenzstudien war die Analyse der Verteilung der Isoformen von Annexin A7 in Neuronen von Bedeutung. Western Blot Analysen aus Proteinextrakten der neuronalen Tumorzelllinie N2A sollten darüber Aufschluss geben. In Gewebehomogenaten von murinem Gehirn und Herz konnte sowohl die 47 kDa als auch die 51 kDa Isoform nachgewiesen werden (Clemen et al., 2001). Proben dieser beiden Gewebe dienen als Positivkontrolle. Der monoklonale Antikörper 203-217 detektierte in den N2A Zellen ein Protein mit einer molekularen Masse von 47 kDa (siehe Abb. 3.15 A). Ob der Differenzierungsgrad der Zellen Einfluß auf das Vorkommen der Annexin A7 Isoformen hat, wurde im nächsten Schritt untersucht. Durch eine veränderte Zusammensetzung des Nährmediums wurden die Neuroblastomzellen in Kultur zur Differenzierung gebracht und erneut Western Blot Analysen durchgeführt. Wiederum lag in den Zellen nur die 47 kDa Isoform vor (siehe Abb. 3.15 B).

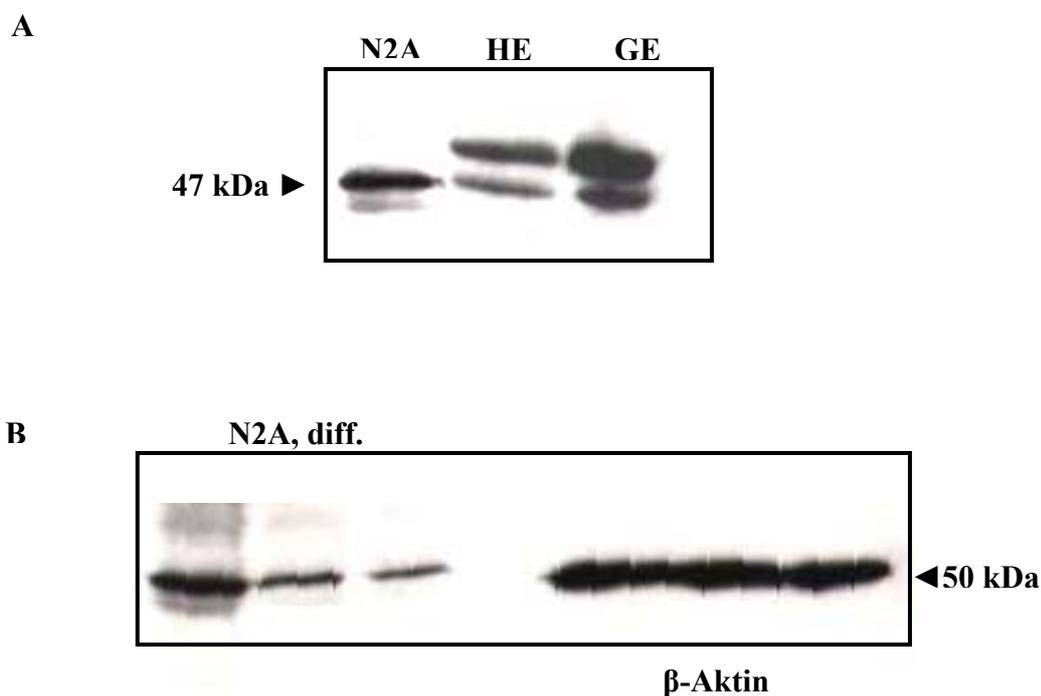


Abb. 3.15: Western Blot Analyse von N2A-Zellen. Proteinfractionen aus Zellhomogenaten wurden in einer SDS-PAGE (12 % Acrylamid) aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Annexin A7 wurde mit mAb 203-217 nachgewiesen. Die Visualisierung durch Chemilumineszenz erfolgte nach Bindung des zweiten, Peroxidase-gekoppelten AK. Verglichen wurde die Annexin A7 Expression in undifferenzierten (**A**) und differenzierten (**B**) N2A Zellen. Als Positivkontrolle dienten Gewebehomogenate aus Herz (HE) und Gehirn (GE) von ca. 10 Wochen alten Wildtypmäußen bzw. ein anti- β -Aktin Primär-AK. N2A, diff.= differenzierte N2A Zellen.

3.3 Kardiovaskuläre Phänotypisierung der AnxA7-defizienten Mauslinie

In der Herzmuskulatur werden beide Isoformen von Annexin A7 exprimiert. Über die genaue Funktion des Proteins im Herzen ist jedoch noch nichts bekannt. Für Annexin A6 ist dagegen gezeigt worden, dass eine Überexpression in Mäusen zu kardialer Hypertrophie und Herzversagen führt (Gunteski-Hamblin et al., 1996).

Um Rückschlüsse auf die Funktion von Annexin A7 ziehen zu können, wurde eine AnxA7-defiziente Mauslinie (*AnxA7^{-/-}*) erzeugt. In den bisherigen Analysen wurden keine Unterschiede im allgemeinen Erscheinungsbild zwischen den Wildtyptieren und den *AnxA7^{-/-}* Tieren beobachtet. Die knock-out Mäuse sind vital, fertil und zeigen in ihrer Bewegung und Aktivität keine Einschränkungen (Herr et al., 2001). Ob es Unterschiede in der Herzmorphologie und in der Herzfunktion gibt, war Gegenstand der nachfolgenden Analysen.

3.3.1 Morphologische Analyse des Herzens von *AnxA7^{-/-}* Mäuse

Für die morphologische Analyse des Herzens von *AnxA7^{-/-}* Mäusen wurden die Herzen von je acht Tieren pro Gruppe (Wildtyp und *AnxA7^{-/-}*) entnommen und folgende Parameter bestimmt: Körpergewicht (KGW), Tibialänge (TL), Herzgewicht (HG), Gewicht rechter und linker Ventrikel (RV und LV), Herzgewicht zu Körpergewicht (HG/KGW), Gewicht linker Ventrikel zu Körpergewicht (LV/KGW), Herzgewicht zu Tibialänge (HG/TL) und Gewicht linker Ventrikel zu Tibialänge (LV/TL).

Die Analyse der erhaltenen Basiswerte ergab keine nennenswerten Unterschiede in den Gewichten der verglichenen Herzen bezogen sowohl auf das Körpergewicht als auch auf die Tibialänge (siehe Abb. 3.16). Das Fehlen des Proteins führt folglich nicht zu einer Veränderung im Gesamtherzgewicht oder im Gewicht der einzelnen Hauptkammern. Ebenso fielen während der Präparation keine makroskopisch sichtbaren morphologischen Veränderungen an den Herzen der knock-out Tiere auf. Wir beobachteten allerdings eine große Varianz der Werte, die die Interpretation späterer Versuche erschwerte. Dieses Verhalten scheint typisch für den SV129 Mausstamm zu sein.

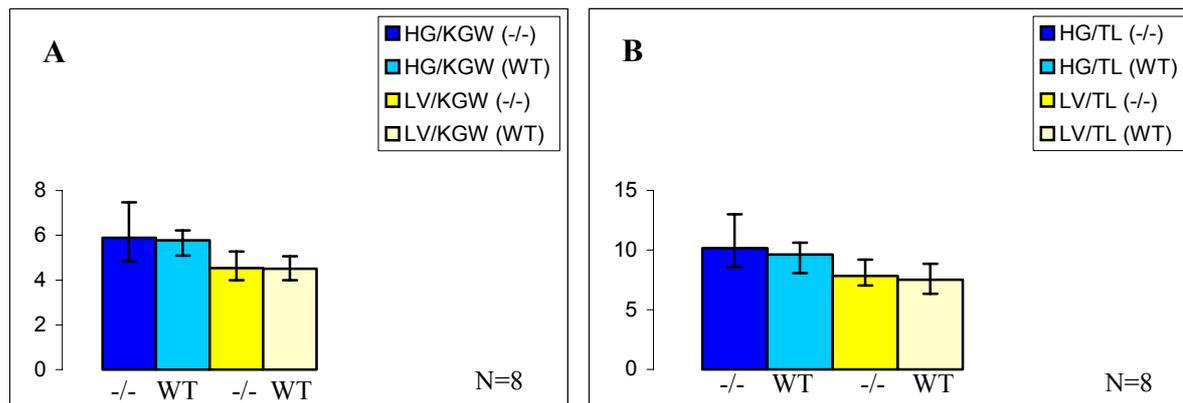


Abb. 3.16: Analyse der Herzgewichte von WT und *AnxA7*^{-/-} Tieren. Schematische Darstellung von Herzgewicht und Gewicht des linken Ventrikels in Relation zum Körpergewicht (**A**) und zur Tibiallänge (**B**). Die y-Achse gibt die berechneten Verhältnisse in Absolutzahlen an. HG= Herzgewicht; KGW= Körpergewicht; LV= Gewicht des linken Ventrikels; TL= Tibiallänge; WT= Wildtyptiere; -/-= *AnxA7*^{-/-} Tiere.

3.3.2 EKG-Auswertungen

Im Elektrokardiogramm (EKG) werden elektrische Spannungen (Potentialdifferenzen, kurz Potentiale, in mV) registriert, die als Folge der Herzerregung auftreten. Das EKG ist damit Ausdruck der elektrischen Erregungsvorgänge am Herzen und gibt Auskunft über Herzfrequenz, Erregungsrhythmus, Impulsausbreitung, Erregungsrückbildung und deren Störungen. So führen z.B. Veränderungen der K⁺- und Ca²⁺-Konzentrationen im Serum zu Myokarderregungs- und damit auch zu EKG-Veränderungen. Anhand der EKG-Kurven werden verschiedene Zeiten berechnet, die die Herzaktionen widerspiegeln. Die PQ-Zeit ist das Zeitintervall vom Beginn der Vorhoferregung bis zum Beginn der Kammererregung. Sie gibt Auskunft über die sogenannte Überleitungszeit. Die Dauer des QRS-Komplexes stellt die Zeit der Kammererregung dar. Die Zeit, die die Herzkammern für ihre De- und Repolarisation benötigen, ist das QT-Intervall.

Die bisherigen Analysen zur Funktion von Annexin A7 am Herzen stützen sich auf Zellkontraktionsexperimente an isolierten Kardiomyozyten der *AnxA7*^{-/-} Maus. Die Zellen der knock-out Maus zeigen unter basalen Bedingungen keine Veränderung durch den Verlust von Annexin A7. Dagegen war bei den adulten Kardiomyozyten aber eine Beeinträchtigung der Frequenz-induzierten Zunahme der Zellverkürzung zu verzeichnen. Der Effekt wurde jedoch nur im hohen Frequenzbereich beobachtet und erwies sich somit nicht als letal und hat keine offensichtliche Auswirkung auf die Lebensqualität der Tiere

unter den vorhandenen Bedingungen. Dennoch ist dieser Befund ein Hinweis auf eine gestörte elektromechanische Koppelung bei hohen Ca^{2+} -Spiegeln und deutet auf eine Rolle von Annexin A7 in der Regulation der Ca^{2+} -Homöostase oder der Kontraktilität der Myofibrillen hin (Herr et al., 2001).

Ziel der vorliegenden Studie war es, mögliche Störungen in der elektromechanischen Koppelung am Herzen der *AnxA7*^{-/-} Tiere mit Hilfe des EKGs aufzudecken. Es wurden die EKG-Kurven von acht WT-Tieren und acht *AnxA7*-defiziente Tieren unter Narkose über einen Zeitraum von 10 Minuten aufgezeichnet und vermessen.

Die Berechnung der PQ-Zeit zeigte, dass die *AnxA7*^{-/-} Tiere eine signifikant verkürzte PQ-Zeit im Vergleich zu Wildtyptieren aufweisen (siehe Abb. 3.17 und Abb. 3.19, A). Die Höhen der P-Welle unterschieden sich im allgemeinen aber nicht zwischen den beiden getesteten Gruppen.

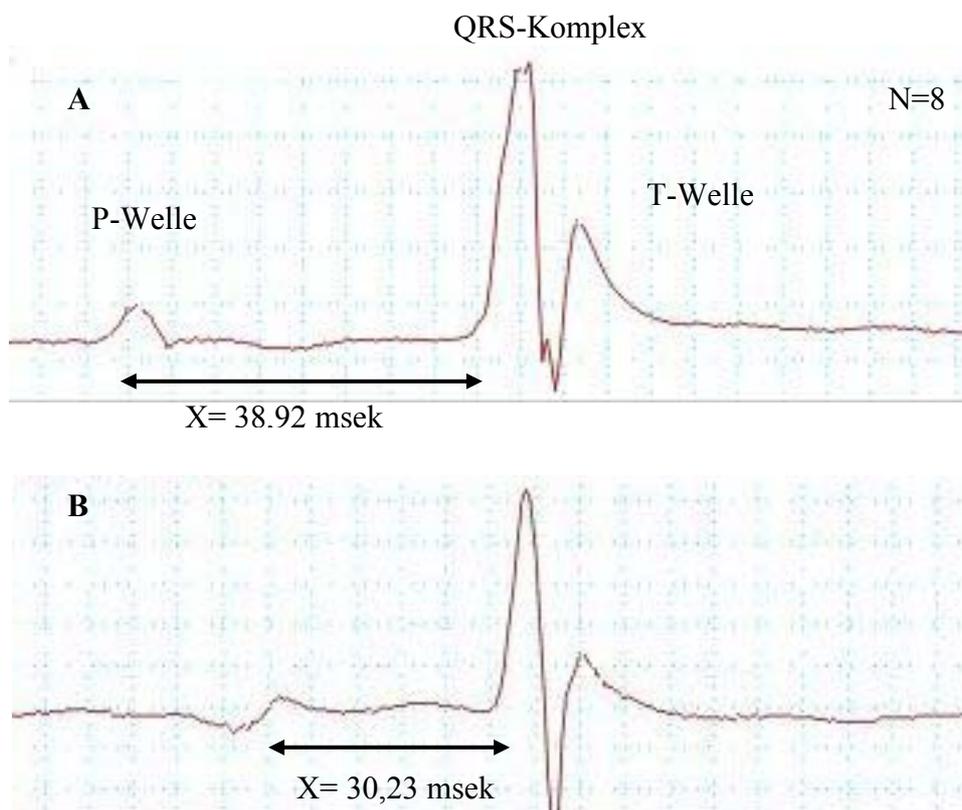


Abb. 3.17: Vergleich einer typischer EKG-Kurve einer WT-Maus (A) und einer *AnxA7*^{-/-} Maus (B). Bei der Vermessungen der PQ-Zeit konnte ein Mittelwert (X) von 38,92 msec in der WT-Gruppe und ein Mittelwert von 30,23 msec in der *AnxA7*^{-/-} Gruppe ermittelt werden. $P < 0,05$ gegen *AnxA7*^{-/-} (siehe 2.6.4).

Auch die Vermessung des QRS-Komplexes wies Unterschiede in den beiden untersuchten Gruppen auf. Der Mittelwert dieser Zeit zeigte in der Gruppe der Annexin A7 defizienten Tiere eine signifikante Verkürzung im Vergleich zum Mittelwert der Wildtypiere (siehe Abb. 3.18 und Abb. 3.19 A). Die Dauer der Kammererregung ist folglich bei den *AnxA7* Nullmutanten kürzer. Das PQ-Intervall war in den beiden verglichenen Gruppen nahezu gleich lang (siehe Abb. 3.19 A). In Bezug auf diesen Parameter wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und *AnxA7*^{-/-} Tieren gefunden. Bei der Auswertung der Elektrokardiogramme fielen in beiden Gruppen keine pathologischen EKG-Veränderungen wie z.B. Extrasystolen, AV-Blöcke oder Arrhythmien auf (siehe Abb. 3.19 B).

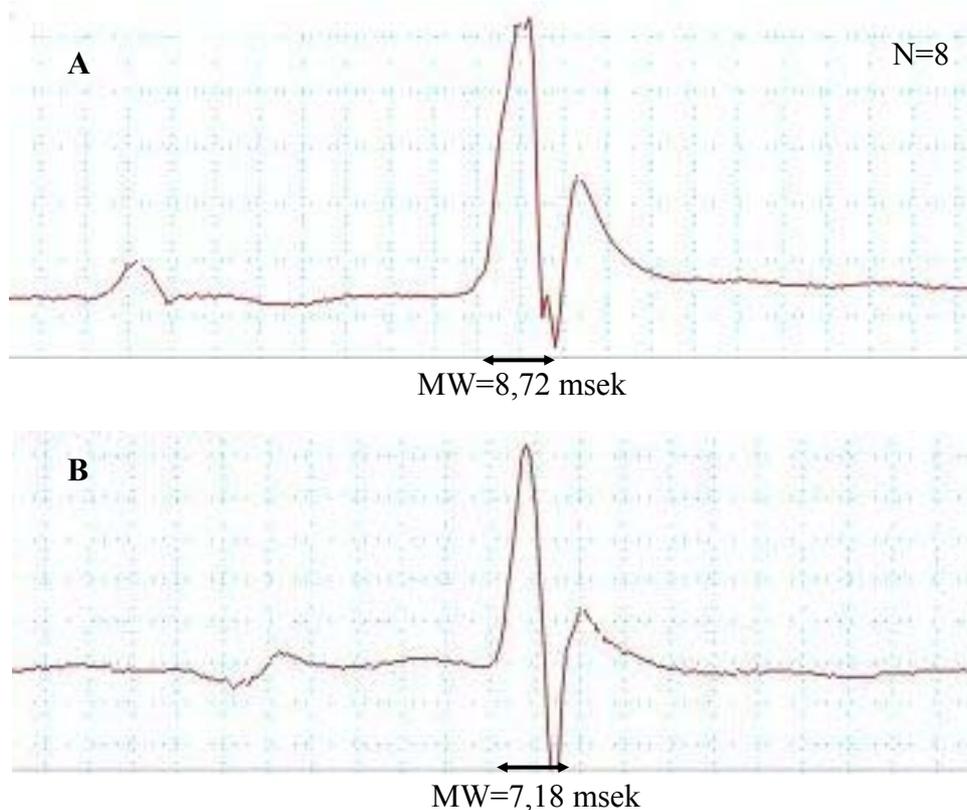


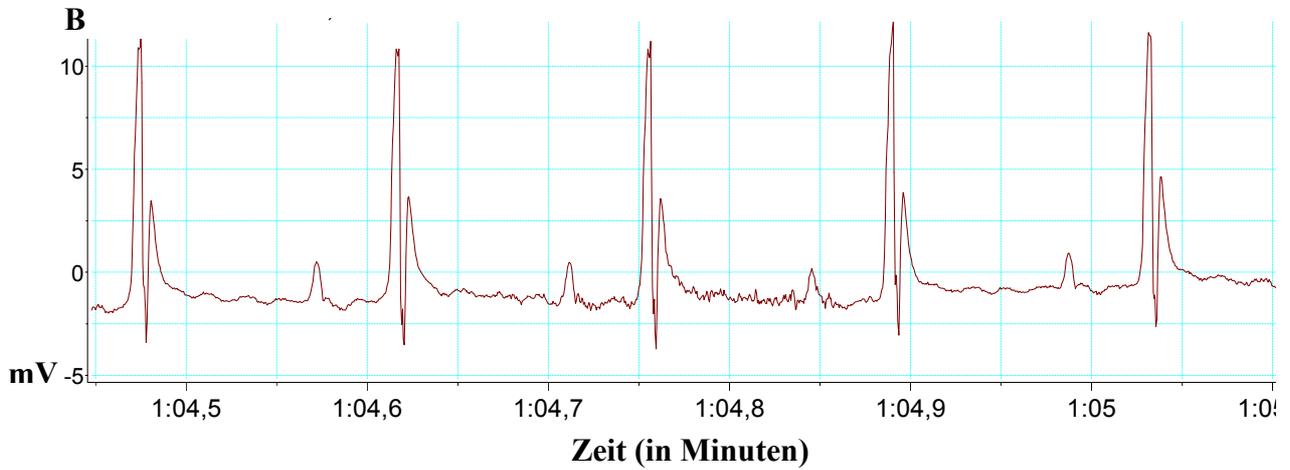
Abb. 3.18: Vermessung des QRS-Komplexes an beispielhaften EKG-Kurven eines WT und eines *AnxA7*^{-/-} Tieres. **(A)** Die EKG-Kurven der WT-Tiere wiesen eine durchschnittliche QRS-Komplex-Dauer von 8,72 msek auf. **(B)** Der Mittelwert der QRS-Komplex-Zeit betrug bei den *AnxA7*^{-/-} Tieren 7,18 msek. $P < 0,05$ gegen *AnxA7*^{-/-}.

Die Herzfrequenz wurde bei allen Tieren während der Anästhesie bei einer Körpertemperatur von ca. 38 °C gemessen. Der Mittelwert der Herzfrequenz betrug bei den WT-Tieren 428 Schläge pro Minute (BPM= beats per minute) und bei den *AnxA7*^{-/-} Tieren 355 Schläge pro Minute. Auch hier ist ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden verglichenen Gruppen zu verzeichnen (siehe Abb. 3.19, C und D). Die *AnxA7* defizienten Mäuse haben in Sedation eine niedrigere Herzfrequenz als die Wildtypmäuse.

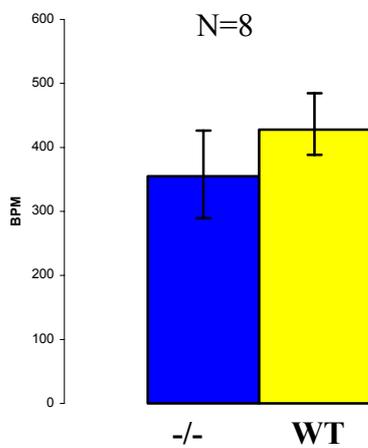
Abb. 3.19: EKG-Messungen an WT- und *AnxA7*^{-/-} Tieren. **(A)** Die QRS-Komplex-Zeit und die PQ-Zeit der *AnxA7*^{-/-} Tiere (-/-) war verzögert. Die Vermessung der QT-Zeit zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede in den verglichenen Gruppen. **(B)** Die EKG-Kurven der *AnxA7*^{-/-} Tiere wiesen keine Störungen wie Extrasystolen oder AV-Blöcke auf (beispielhafte EKG-Kurve eines *AnxA7*-defizienten Tieres). **(C und D)** Die anhand der EKG-Kurven ermittelte Herzfrequenz war bei den *AnxA7*^{-/-} Mäusen signifikant erniedrigt. $P < 0,05$ gegen *AnxA7*^{-/-} (BPM= beats per minute).

A

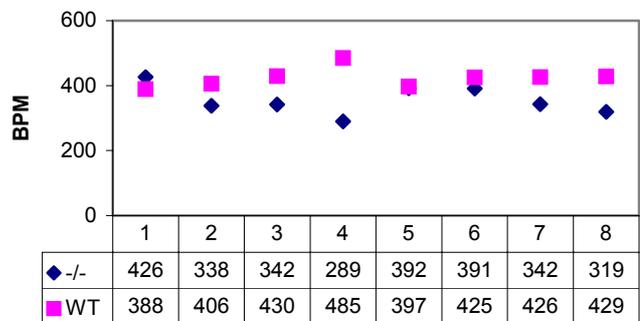
	PQ-Zeit (msek)	QRS-Komplex (msek)	QT-Zeit (msek)
WT	38,93 ± 3,21	8,72 ± 0,59	22,19 ± 2,48
-/-	30,23 ± 6,51	7,18 ± 0,66	21,26 ± 4,49



C



D



3.3.3 Induzierte kardiale Hypertrophie

Die oben beschriebenen Untersuchungen zeigten keine Unterschiede in der Herzmorphologie der *AnxA7^{-/-}* Maus (siehe 3.3.1). Die Veränderungen im EKG lassen jedoch auf eine Störung der elektromechanischen Koppelung nach Verlust des Proteins schließen. Auch vorangegangene Analysen im Rahmen von Zellkontraktions-Experimenten an isolierten Kardiomyozyten von adulten knock-out Mäusen ergaben Hinweise auf eine relevante Funktionsstörung der Herzmuskulatur. Daher sollten Veränderungen an den Herzen der *AnxA7^{-/-}* Tiere unter physiologischen Extrembedingungen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Grohé (Universität Bonn) initiiert. Ziel der Studie war es, sowohl bei *AnxA7^{-/-}* Mäusen als auch bei Wildtyptieren eine Linksherzhypertrophie mittels Medikamentenpumpen zu induzieren. Gewählt wurde ein Hypertrophiemodell in dem mit Hilfe osmotischer Minipumpen, die unter die Haut gepflanzt werden und Katecholamine freisetzen, eine kardiale Hypertrophie erzeugt werden sollte. Es wurden verschiedene Medikamentendosen getestet: 30 mg/kg/d Phenylephrin (P30); 60 mg/kg/d Phenylephrin (P60); 60 mg/kg/d Orciprenalin (O60); 60 mg/kg/d Phenylephrin mit 30 mg/kg/d Orciprenalin (P60/O30); 30 mg/kg/d Phenylephrin mit 15 mg/kg/d Orciprenalin (P30/O15). Die Dauer der Medikamenteninfusion betrug 14 Tage (siehe Abb. 3.20). Bei der Verwendung von Monopräparaten zeigte sich bei beiden Medikamenten nach der vorgeschriebenen Zeit keine Hypertrophie der Herzmuskulatur. Sowohl die Tiere der knock-out Gruppe als auch die der WT Gruppe waren vital und das Körpergewicht stieg in dem Zeitraum der zwei Wochen an. Anders verhielt es sich bei der Implantation von Pumpen, die sowohl Orciprenalin als auch Phenylephrin enthielten. Bei einer Dosis von 60 mg/kg/d Phenylephrin und 30 mg/kg/d Orciprenalin starben alle Versuchstiere im Zeitraum von zwei Wochen. Die Sektion der toten Tiere gab außer einem hypertrophierten Herzen keine makroskopisch sichtbaren Hinweise auf die Todesursache, so dass von einem plötzlichen Herztod ausgegangen werden kann. Nach Implantation der Pumpen gefüllt mit 30 mg/kg/d Phenylephrin und 15 mg/kg/d Orciprenalin verstarben 86 % der operierten Wildtyptiere und 62 % der *AnxA7^{-/-}* Tiere. Die überlebenden Tiere zeigten eine durchschnittliche kardiale Muskelmassenzunahme von 18 %. Bezogen auf die Einzelgruppen nahmen die *AnxA7^{-/-}* Tiere ca. 9 % an Herzmuskelmasse zu, im Vergleich dazu wiesen die Wildtyptiere eine Zunahme von 26 % auf. Da durch die hohe Sterberate

nach Pumpenimplantation mit dieser Dosis (P30/O15) die untersuchten Gruppen jedoch sehr klein waren, kann lediglich eine Tendenz, keinesfalls aber eine Signifikanz angenommen werden.

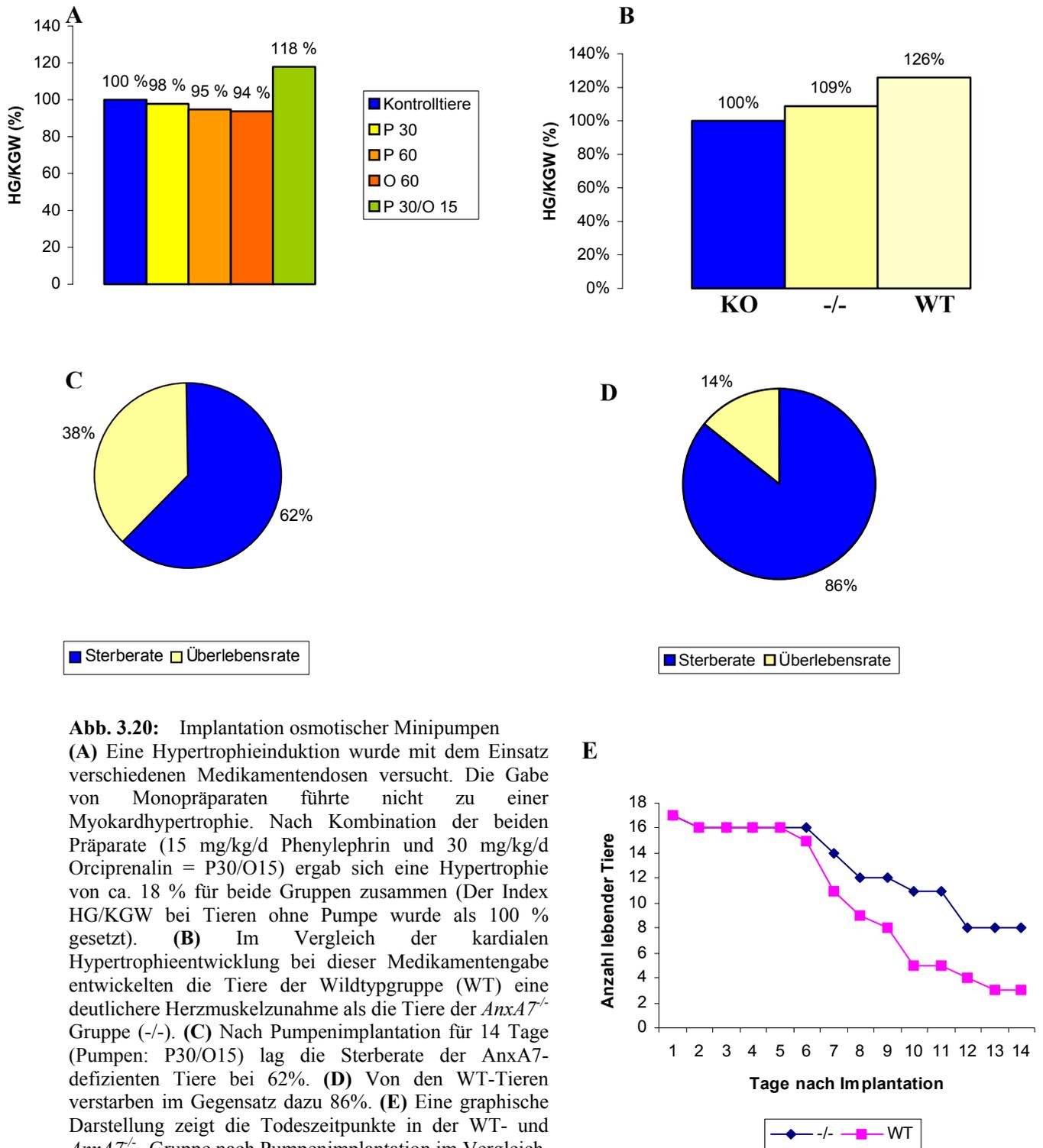


Abb. 3.20: Implantation osmotischer Minipumpen

(A) Eine Hypertrophieinduktion wurde mit dem Einsatz verschiedenen Medikamentendosen versucht. Die Gabe von Monopräparaten führte nicht zu einer Myokardhypertrophie. Nach Kombination der beiden Präparate (15 mg/kg/d Phenylephrin und 30 mg/kg/d Orciprenalin = P30/O15) ergab sich eine Hypertrophie von ca. 18 % für beide Gruppen zusammen (Der Index HG/KGW bei Tieren ohne Pumpe wurde als 100 % gesetzt). (B) Im Vergleich der kardialen Hypertrophieentwicklung bei dieser Medikamentengabe entwickelten die Tiere der Wildtypgruppe (WT) eine deutlichere Herzmuskelzunahme als die Tiere der *AnxA7*^{-/-} Gruppe (-/-). (C) Nach Pumpenimplantation für 14 Tage (Pumpen: P30/O15) lag die Sterberate der *AnxA7*-defizienten Tiere bei 62%. (D) Von den WT-Tieren verstarben im Gegensatz dazu 86%. (E) Eine graphische Darstellung zeigt die Todeszeitpunkte in der WT- und *AnxA7*^{-/-}-Gruppe nach Pumpenimplantation im Vergleich. Tag 0 ist der Tag der Operation. Es wurden 17 Tiere je Gruppe beobachtet.

4 Diskussion

4.1 Untersuchungen zur Expression von Annexin A7 in der Embryogenese der Maus

4.1.1 Analyse der frühen murinen Embryogenese

Während in den letzten 20 Jahren Annexin A7 viele biochemische Eigenschaften zumindest *in vitro* zugeordnet werden konnten, ist über seine Verteilung während der Embryonalentwicklung nichts bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die Lokalisation dieses Proteins in den Embryonalstadien der Maus zu untersuchen, um mögliche Rückschlüsse auf seine Funktionen zu ziehen.

Für Annexin A5 konnte anhand von immunhistochemischen Untersuchungen und durch *in situ* Hybridisierungen gezeigt werden, dass dieses Mitglied der Annexinfamilie zu Beginn der murinen Embryonalentwicklung (E11) mit Zellen des sich entwickelnden vaskulären Systems, später auch des Knorpel- und Knochensystems assoziiert ist und somit als Marker für diese Zelllinien gelten kann (Brachvogel et al., 2001).

Erste Hinweise auf eine mögliche funktionelle Bedeutung von Annexin A7 in der Entwicklung und Differenzierung von Zellen ergaben sich aus Studien an humanen und murinen myogenen Zelllinien von Clemen et al. (1999). In Zellfraktionierungsexperimenten konnte eine Umverteilung von Annexin A7 während des Differenzierungsprozesses der Myoblasten zu adulten Skelettmuskelzellen gezeigt werden. In undifferenzierten Zellen ist Annexin A7 sowohl in der zytosolischen als auch in der membranären Fraktion nachweisbar, wohingegen die differenzierten Zellen ein ausschließliches Vorkommen des Proteins in der Membranfraktion aufweisen. Diese Beobachtungen können als Hinweis auf eine mögliche Rolle des untersuchten Proteins in der Myogenese gedeutet werden.

In Northern Blot Analysen mit RNA der embryonalen Stadien E7, E11, E15 und E17 p.c. konnte das Vorhandensein der beiden Annexin A7-spezifischen Transkripte, die sich in ihrem nichttranslatierten 3'-Bereich unterscheiden (Zhang-Keck et al., 1994), nachgewiesen werden. Beide Spezies waren ab dem siebten Tag der Embryonalentwicklung der Maus mit gleichen Mengen in allen vier untersuchten Stadien

vertreten. Eine Ausnahme bildete der elfte Tag der Embryonalentwicklung. Hier kam es zu einer Verminderung der detektierbaren Transkriptmengen. Am siebten Tag der murinen Embryonalentwicklung sind im Embryo bereits die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm vorhanden (Kaufman und Bard, 1999). Aus diesen drei Schichten gehen im Laufe der Entwicklung alle sich differenzierenden Körperzellen hervor. Die Untersuchungen zeigen somit, dass beide Transkriptformen von Annexin A7 in undifferenzierten Vorläuferzellen der Mausentwicklung vertreten sind und sich das Niveau ihrer Transkriptmenge bis zum 17. Tag nicht ändert. Immunfluoreszenzstudien sollten weitere Hinweise auf die Verteilung von Annexin A7 in den drei Keimblättern geben. In acht Tage alten Embryonen konnte sowohl in Zellen ektodermalen (z.B. Neuralrohr), mesodermalen (z.B. Somiten) als auch endodermalen (z.B. perikardio-peritonealer Kanal) Ursprungs Annexin A7 detektiert werden. Es scheint also keinen Zusammenhang zwischen dem embryonalen Ursprung einer Zellart und der Verteilung von Annexin A7 zu geben. Auch zum Zeitpunkt der Implantation (E4,5-E5) konnte im embryonalen Ekto- und Endoderm das Protein nachgewiesen werden. Auf subzellulärer Ebene zeigte sich eine vorrangig zytosolische Verteilung. Da Annexin A7 in den frühen Stadien der Embryogenese bereits in allen untersuchten Zelltypen vertreten ist, könnte über eine kritische Funktion des Proteins während der frühen Embryonalentwicklung der Maus spekuliert werden. Über die Expression anderer Mitglieder der Annexinfamilie während der Embryogenese der AnxA7-defizienten Tiere ist nichts bekannt. Möglicherweise gibt es Kompensationsmechanismen, die sicherstellen, dass die Annexin-Funktion erfüllt wird. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Northern Blot Analyse gibt es in embryonalen Stammzellen noch keine Spleißvarianten; in Western Blot Analysen kann nur die 47 kDa Isoform nachgewiesen werden. Auch andere Annexine wie z.B. Annexin A5 konnten in embryonalen Stammzellen detektiert werden (Brachvogel et al., 2001). Für dieses Protein zeigte sich erst mit der Differenzierung des Gefäßsystems (E11,5) eine unterschiedliche Verteilung und somit Hinweise auf eine mögliche Funktion.

In den frühen Phasen der Organentwicklung (E11-E15) ist Annexin A7 in allen analysierten Organen vorhanden und zeigt keine spezifische Verteilung zwischen den einzelnen Zelltypen. Die Signale in der Immunfluoreszenz waren in Mesenchymzellen jedoch schwächer als in den bereits differenzierten Epithelzellen. Es scheint also während des Differenzierungsprozesses zu einer Akkumulation von Annexin A7 zu kommen.

4.1.2 Zelluläre Verteilung von Annexin A7 während der pränatalen Entwicklung des Mausgehirns

Die späte Phase der Embryonalentwicklung ist gekennzeichnet durch Differenzierungsprozesse der Zellen der einzelnen Organe (späte Organogenese). Eine eingehende Immunfluoreszenzstudie sollte Aufschluss über die Verteilung von Annexin A7 während der Differenzierung der Zellen des ZNS liefern. Hamre et al. analysierten 1995 die Expression der Annexine A1, A2, A4, A5 und A6 im murinen embryonalen Gehirn. Jedes Annexin besaß ein unterschiedliches Verteilungsmuster. Allen gemein war jedoch eine Lokalisation in den Strukturen der Mittellinie (embryonale Achse, bestehend aus Notochord, Boden- und Deckplatte). Die Strukturen der Mittellinie bestehen aus nicht-neuronalen Zellen mesodermalen Ursprungs und beeinflussen maßgeblich die Entwicklung des Gehirns wie z.B. den Schluß des Neuralrohrs (Induktion). Weitere Analysen auf diesem Gebiet zeigten, dass genetisch modifizierte Mäuse mit nicht oder fehlerhaft geschlossenem Neuralrohr keine Expression von Annexin A4 in der Deckplatte mehr aufwiesen (Hamre et al., 1996). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Annexine am Prozess der Induktion während der Differenzierung von Neuronen beteiligt sind. Im Gegensatz zu den Versuchen von Hamre et al. konnte für Annexin A7 keine typische Verteilung in den Zellen der Mittellinie zu Beginn der Gehirnentwicklung gezeigt werden. Sowohl die Zellen mit induktiver Funktion (Mittellinie) als auch das Neuroepithel selbst exprimierten das Protein bereits am 8. Tag der Embryogenese.

Die Differenzierung des Nervensystems und die damit verbundene Entwicklung des Gehirns beginnt mit dem achten und neunten Tag. An diesen Tagen wird das aus mehrreihigem, undifferenziertem Neuroepithel bestehende Neuralrohr geschlossen und die primitiven Gehirnteile Proencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon werden in Form von Hirnbläschen gebildet. Diese Bläschen sind Ausstülpungen des cranialen Teils des Neuralrohrs und bleiben in der weiteren Entwicklung als Gehirnventrikel erhalten. Ihre Wand besteht zu diesem Zeitpunkt noch aus einer einzigen Zellschicht, dem undifferenzierten Neuroepithel. Aus dieser Epithelschicht gehen die Neuroblasten, die eigentlichen Vorläuferzellen der Neuronen, hervor. Die Neurogenese beginnt mit dem 11. Tag der murinen Embryonalentwicklung und setzt sich bis zum 17. Tag fort (Caviness, 1982). Aus den ehemals apolaren Neuroblasten entwickeln sich zuerst multipolare

Neuroblasten und dann die Neuronen (Langman, 1989). Ein Teil der Neuroepithelzellen bildet zwei radiale Fortsätze aus und wird als radiale Glia bezeichnet (Misson et al., 1988). Während des Differenzierungsprozesses (E15-E17) findet die neuronale Migration statt, die durch die Fortsätze der radialen Glia gesteuert wird (Gadisseux et al., 1990; Edwards et al., 1990; Misson et al., 1991). Das Stratum germinativum weist eine mosaikartige Verteilung der sich differenzierenden Neuronen auf, die sich aus dieser Schicht heraus auf den Neocortexbereich zubewegen (Altman und Bayer, 1988; 1990). Vermutlich durch die gleichen Mechanismen wird die Migration und Differenzierung der Astrogliazellen geleitet, die ebenfalls am fünfzehnten Tag der Entwicklung beginnt (Yuasa, 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte dargestellt werden, dass die AnxA7 positiven Zellen in der Immunfluoreszenz eine vergleichbare Wanderung durchlaufen. Zu Beginn der Neurogenese konnten Signale nur im Zytosol der Zellen des Stratum germinativum detektiert werden (E13-E15). Mit fortschreitender Differenzierung zeigten sich Kernfärbungen in der Intermediärschicht und im Neocortexbereich (E16). Ob es sich bei den Zellen jedoch um die Vorläuferzellen von Neuronen oder um Astrogliazellen handelt, läßt sich ohne speziellen Marker für einen der beiden Zelltypen nicht sicher beantworten. Im adulten Gehirn dient GFAP als spezifischer Marker für Gliazellen, im embryonalen Gehirn jedoch ist dieses Protein als Marker nicht geeignet (Eng et al., 2000). Yuasa (2001) schlägt als Alternative zur Kennzeichnung embryonaler Astrozyten das Protein Tenascin-C vor. Doppelte Immunfluoreszenzstudien mit anti-Tenascin-C-Antikörper und anti-AnxA7-Antikörper an embryonalen Gehirnschnitten schlugen jedoch fehl (Daten nicht gezeigt). Ein Grund hierfür könnte sein, dass zu diesem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung die detektierbare Menge an Tensacin-C noch nicht hoch genug für einen Proteinnachweis ist. Die bisherigen Untersuchungen von Yuasa stützen sich nur auf Analysen der Genexpression von Tenascin-C im sich entwickelnden Gehirn.

Während der Differenzierung von Nervenzellen scheint es zu einer Umverteilung des Proteins Annexin A7 vom Zytoplasma in den Kern zu kommen. Studien an Myoblasten zeigten während des Differenzierungsprozesses ebenfalls eine Umlokalisation des Annexin A7 von membranösen Strukturen im Zytoplasma hin zur Plasmamembran (Clemen et al., 1999). Kernfärbungen mit AnxA7-spezifischen Antikörpern konnten in diesen Zellen ebenfalls beobachtet werden. Sie waren jedoch nicht abhängig vom Differenzierungsgrad der Zelle. Als Ca^{2+} - und membranbindendes Protein ist eine alleinige Kernlokalisierung von

Annexin A7 bisher nicht nachgewiesen. Erste Hinweise auf ein kernständiges Annexin lieferten Studien an embryonalen Fibroblastenzelllinien der Ratte (3Y1), in denen Annexin A11 vorrangig im Kern detektiert werden konnte (Mizutani et al., 1992). Weitere Studien an Rattenembryonen zeigten, dass es während der Entwicklung des Rückenmarks zu einer Umlokalisierung von Annexin A11 vom Kern in das Zytosol kommt (Mamiya et al., 1994). Der Differenzierungsgrad einer Zelle scheint Einfluss auf die subzelluläre Verteilung von Annexinen zu haben. Annexin A11 bindet Ca^{2+} -abhängig Calcyclin, ein Mitglied der S-100 Proteinfamilie, das die Regulation von Wachstumsvorgängen beeinflusst (Mizutani et al., 1992). Ob diese Bindung jedoch eine Rolle beim Durchtritt durch die Kernporen spielt, ist unklar. Verantwortlich für die kernständige Lokalisation von Annexin A11 wird eher der lange N-Terminus des Proteins (202 Aminosäuren) gemacht (Mizutani et al., 1995). Auch Annexin A7 besitzt im Vergleich zu den übrigen Mitgliedern der Familie ein langes N-terminales Ende. Dies legt die Überlegung nahe, ob auch im Fall von Annexin A7 der N-Terminus eine entscheidende Rolle in der Kernlokalisierung des Proteins spielen könnte.

4.1.3 Methodische Probleme bei den Untersuchungen: Modifizierung des Immunfluoreszenzprotokolls

Für die Immunfluoreszenzanalysen wurden die monoklonalen anti-AnxA7-Antikörper 203-217 und 204-289 verwendet, die beide Isoformen im Gewebeschnitt erkennen. Diese Antikörper wurden in der Maus hergestellt. Der sekundäre, farbstoffgebundene Ziege-anti-Maus-Antikörper kann, da er Maus-IgG erkennt, auch nicht durch den ersten Antikörper markiertes Mausgewebe binden und somit zu falschen Schlussfolgerungen führen. Um diese Effekte zu klären, wurden Färbungen mit Antikörpern durchgeführt, die direkt mit dem Fluorochrom Alexa 488 markiert waren. Diese Experimente bestätigten die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenzfärbungen. Die Signale waren jedoch schwächer. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass in der indirekten Fluoreszenz mehrere sekundäre Antikörper an einen primären Antikörper binden können. Im Gegensatz dazu ist in der direkten Immunfluoreszenz nur die Bindung eines farbstoffgekoppelten Antikörpers an das gesuchte Protein möglich. Da jeder Antikörper nur eine begrenzte

Menge an Farbstoffen binden kann, ist die direkte Immunfluoreszenzmethode zwar spezifischer, ihre Signale sind jedoch häufig schwächer.

Um generell die Qualität der Färbungen zu optimieren, wurden die Schnitte außerdem verschiedenen Vorbehandlungen unterzogen. Die Vorbehandlungen der Paraffinschnitte vor den Färbungen dienen der Antigen-Demaskierung. Durch die Fixierung der Gewebestücke in Paraformaldehyd werden Methylen-Kreuzverbindungen zwischen Proteinmolekülen geschaffen, die durch die saure und basische Hydrolyse der Vorbehandlung gelöst werden können. An den Gewebeschnitten von Mäuseembryonen wurden sowohl Mikrowellenbehandlungen in Citratpuffer und Harnstoff als auch ein enzymatischer Vorverdau mit Trypsin durchgeführt. Für jedes Antigen bzw. jeden Antikörper muß die am besten geeignete Methode gefunden werden (Cuevas et al., 1994; Pileri et al., 1997; Shi et al., 1998). Für Annexin A7 erwies sich eine Vorverdauung mit Trypsin als beste Vorbehandlung von allen getesteten Verfahren.

4.2 Lokalisation von Annexin A7 im murinen Gehirn

Die besondere Verteilung von Annexin A7 im embryonalen Gehirn (siehe 4.1.2) war der Anlass, auch im adulten Mausgehirn die Lokalisation des Proteins näher zu untersuchen. Bisher ist bekannt, dass beide Isoformen im Gehirn exprimiert werden (Magendzo et al., 1991; Clemen et al., 2001). Für das menschliche Gehirn konnte eine restriktive Verteilung von Annexin A7 in Astrozyten des Temporallappens und der Hippocampusformation aufgezeigt werden (Clemen et al., 2001). Diese Ergebnisse konnten durch Immunfluoreszenzstudien für murines Hirngewebe nicht bestätigt werden. Sowohl im Cortex- und im Hippocampusbereich als auch im Kleinhirn zeigten Astrozyten und Neuronen eine Annexin A7 positive Färbung.

4.2.1 Annexin A7 in Astrozyten

Neben Annexin A7 werden weitere Annexine in Gliazellen exprimiert. Für die Annexine A2 und A6 konnte eine funktionelle Verbindung mit dem glialen Intermediärfilament GFAP gezeigt werden. Beide sind an der Regulation der Polymerisation von GFAP-Filamenten beteiligt, wobei das S100 Protein die Polymerisation von GFAP inhibiert, der Π_2p11_2 -Komplex dagegen stimulierend wirkt (Thiel et al., 1992; Bianchi et al., 1995). Die Immunfluoreszenzstudien zeigten eine punktuelle Verteilung von Annexin A7 in den Astrozyten. Dies deutet auf eine Kolo-kalisation mit vesikulären Strukturen im Zytoplasma dieser Zellen hin. Ein wichtiger Mechanismus der Signalkette in Astrozyten sind Ca^{2+} -Wellen. Sie spielen sowohl in der neuronalen als auch in der glialen Aktivität eine große Rolle (Fam et al., 2000). Clemen et al. (2001) zeigten in Studien an Glioblastomzellen von Ratten eine Umverteilung von Annexin A7 vom Zytoplasma zur Plasmamembran nach Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels. Auch dies ist als Hinweis auf den Zusammenhang zwischen Annexin A7 und Ca^{2+} -Strömen in Gliazellen zu werten. Dabei könnte auch die bereits früher beschriebene Interaktion des Proteins mit Sorcin wichtig sein (Verzili et al., 2000), welches als Bindungspartner des Ryanodinrezeptors am ER und der α_1 Untereinheit der spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanäle der Plasmamembran

bekannt ist (Pickel et al., 1997). Studien an isolierten Astrozyten, die diesen Mechanismus näher untersuchen, werden zurzeit durchgeführt.

4.2.2 Annexin A7 in Neuronen

Im Gegensatz zu den Studien an humanen Gehirnen deuten die hier vorgestellten Ergebnisse auf eine Expression von Annexin A7 in murinen Neuronenkernen hin. Besonders deutliche Signale ließen sich in der Purkinje-Zellschicht, der Pyramidenzellschicht des Hippocampus und in Neuronen des Cortex temporalis beobachten. Die Expression von Annexinen in Neuronen ist bereits in früheren Arbeiten beschrieben worden (Eberhard et al., 1994). Erst kürzlich untersuchten Moga und Zhou (2002) die Immunoreaktivität von Annexin A6 in Zellen von Rattengehirnen. Neuronen des Neocortex, der Purkinje-Zellschicht und des lateralen Hypothalamus zeigten eine Expression des untersuchten Proteins. In diesen Zellen waren Signale sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma zu sehen. Auch in Gliazellen des Hippocampus und des Cerebellums konnte Annexin A6 nachgewiesen werden. Diese Verteilung wurde als Hinweis auf eine Beteiligung von Annexin A6 an Ca^{2+} -abhängigen Prozessen in Neuronen und Gliazellen gewertet. Annexin A7 besitzt zwar ein ähnliches Verteilungsmuster in Gehirnzellen von Mäusen, die dominante Präsenz des Proteins im Kern der Zellen ist aber neu. Obwohl die Mitglieder der Annexinfamilie hauptsächlich an Plasmamembranen, im Zytoplasma oder in Assoziation mit dem Zytoskelett lokalisiert sind, wurde für Annexin A1, A2, A5, A6 und A7 zumindest eine partielle Lokalisation in Zellkernen beschrieben (Raynal et al., 1992; Sun et al., 1992). Die für Annexin A11 typische kernständige Lokalisation in sich entwickelnden Zellen des ZNS von Rattenembryonen wurde bereits an anderer Stelle diskutiert (siehe 4.1.2). Studien an humanen Vorhautfibroblasten zeigten eine stärkere Färbung für Annexin A1, A4 und A5 im Nukleus der Zellen als im Zytoplasma (Barwise und Walker, 1996). Dem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration folgte eine verstärkte Akkumulation der Proteine an der Kernmembran. Dies könnte auch hier eine Verbindung von Annexinen im Kern und Ca^{2+} -Wellen innerhalb der Zellen andeuten. Der Wachstumsstatus der Zellen scheint einen großen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation von Annexinen zu haben. Annexin A5 wird hauptsächlich während den

Proliferationsphasen von Fibroblastenzellen im Kern detektiert, was Anlass zur Diskussion über eine mögliche Beteiligung von Serumfaktoren an der Kernlokalisierung des Proteins gab (Barwise et al., 1996).

Moleküle bis ca. 40 kDa können durch die Kernporen diffundieren (Paine und Horowitz, 1980; Koster et al., 1993). Größere Proteine benötigen für den Durchtritt durch die Kernmembran sogenannte Kernlokalisierungssignale (Jans, 1995 und 1996). Diese kurzen Sequenzen von ca. 4-8 AS ermöglichen dem Protein eine Interaktion mit dem Kernporenkomplex und eine Passage durch die Kernmembran. Als wesentlicher Kontrollmechanismus beeinflussen Phosphorylierungen von Proteinen den Kerntransport. Annexin A7 kann aufgrund seiner Größe die Kernporen nicht permeieren. Deshalb sollte ein spezieller Mechanismus vorhanden sein, der dem Protein den Durchtritt durch die Kernporen erlaubt. Ein offensichtliches Kernlokalisierungssignal wurde in der Sequenz von Annexin A7 jedoch nicht identifiziert. Im Fall von Annexin A2 wird die Phosphorylierung des Monomers im Zytosol für den Eintritt in den Kern verantwortlich gemacht (Eberhard et al., 2001). Sequestrierung im Zytosol in Form von Komplexen mit dem S100 Protein p11 ($AnxII_2/p11_2$) verhindern den Eintritt in den Zellkern. Der Export aus dem Kern erfolgt mit Hilfe des N-Terminus von Annexin A2, der ein Exportsignal in der Anx II 3-12 Region enthält. Als mögliche Funktion der Annexine im Kern wurde z.B. eine Beteiligung an dem Primase Erkennungs-Proteinkomplex vermutet, der die DNA Polymerase α -Aktivität *in vitro* erhöht (Jindal et al., 1991). Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet könnten sich für Annexin A7 auf die Suche nach diesen speziellen Mechanismen konzentrieren.

Auch wenn die Ergebnisse auf eine wichtige Funktion von Annexinen sowohl in Glia- als auch in Nervenzellen hindeuten, haben die *AnxA7*-defizienten Tiere keine offensichtlichen neuronalen Störungen. Eberhard et al. (1994) untersuchten die Expression der Annexine A1, A2, A4 und A6 im humanen Hippocampus unter verschiedenen pathologischen Bedingungen. Es zeigte sich ein für jedes Annexin typisches Verteilungsmuster in Neuronen und/oder Astrozyten, das sich je nach Verletzung änderte. Annexine scheinen also in neuronale und gliale Reaktionen auf Verletzungen involviert zu sein. Vorstellbar ist eine ähnliche Beteiligung von Annexin A7 im murinen Gehirn, was zur Folge hätte, dass Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der *AnxA7*^{-/-} Maus nur unter pathologischen Gehirnzuständen zu Tage treten würde. Nach der Behandlung von Ratten mit dem potenten

Neurotoxin Kainicsäure konnte eine deutliche Reduzierung von Annexin A7 und der heat-shock Kofaktoren HOP/p60 und SP-22 in Zellen des Gehirns beobachtet werden (Krapfenbauer et al., 2001). Auch hier spiegelt sich eine mögliche Rolle von Annexin A7 an Reparaturmechanismen des Gehirns wider.

Die mit humanem und murinem Gehirn erzielten unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise auf die unterschiedliche Methodik zurückzuführen. In meiner Studie wurden Paraffinschnitte verwendet, wohingegen bei den humanen Geweben mit Gefrierschnitten gearbeitet wurde. Je nach verwendeten Fixierungsmitteln kann es zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen kommen (mündliche Mitteilung, Dr. E. Korenbaum). Alternativ könnte es bei der Weiterentwicklung des Gehirns vom Nager zum Mensch zu einem Verlust des Proteins in Neuronen gekommen sein.

4.3 Kardiovaskuläre Phänotypisierung der AnxA7-defizienten Mauslinie

Bei der Suche nach möglichen *in vivo* Funktionen der Annexine spielt ihre Eigenschaft Ca^{2+} -abhängig Phospholipide zu binden eine große Rolle. Herzmuskelzellen zeichnen sich vor allem durch die für diese Zellen wichtige Ca^{2+} -Homöostase aus. Bereits für die Annexine A2, A4, A5, A6 und A7 konnte eine Lokalisation in Herzmuskelzellen nachgewiesen werden (Jans et al., 1995; Wang et al., 1995; Luckcuck et al., 1997 und 1998). Zahlreiche Hinweise auf eine Funktion der Annexine in Kardiomyozyten sind in den letzten Jahren zusammengetragen worden. So führt eine Überexpression von Annexin A6 in transgenen Mäusen zu einer Dilatation des Herzmuskels und zu akutem Herzversagen (Gunteski-Hamblin et al., 1996). Ferner untersuchten Song et al. (1998) die Verteilung der Annexine A2, A5 und A6 am humanen Herzen im Endstadium des Herzversagens. In diesem finalen Stadium stiegen die mRNA- und Proteinmengen von Annexin A2 und A5, wohingegen die von Annexin A6 sanken. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Matteo und Moravec (2000). Humane Herzen im Stadium des Herzversagens wiesen erhöhte Proteinmengen an Annexin A4 und A5 auf und es kam zu einer Umverteilung der Proteine. Die Expression von Annexin A6 blieb in diesen

Versuchen jedoch unverändert. Die Mitglieder der Annexinfamilie scheinen unterschiedlichen Regulationsmechanismen am Herzen zu unterliegen bzw. unterschiedliche Funktionen zu erfüllen. Als die beiden wichtigsten Annexine in Säugerherzen gelten Annexine A5 und A6 (Pula et al., 1990; Doubell et al., 1993). Über Annexin A7 und seine Funktion am Herzmuskel ist kaum etwas bekannt.

4.3.1 Morphologische Analyse des Herzens von *AnxA7*^{-/-} Mäuse

Zu Beginn der Untersuchungen wurden Herzen von Wildtyp- und *AnxA7*-defizienten Tieren präpariert und nach Unterschieden in den beiden Gruppen gesucht. Die Mittelwerte der Gesamtherzgewichte, sowohl auf das Körpergewicht als auch auf die Tibialänge bezogen, waren identisch und stimmen mit den Angaben aus der Literatur für den Mausstamm SV129 überein (Doevendans et al., 1998). Ebenso verhielt es sich mit den Gewichten der Ventrikel. Makroskopisch führte der Verlust des Proteins nicht zu Veränderungen des Herzmuskels. Auch scheint seine Funktion unter normalen Lebensbedingungen nicht beeinträchtigt zu sein. In den Beständen wurden keine Anzeichen, die auf eine Herzinsuffizienz hindeuten könnten, beobachtet. So sind die Mutanten vital, mobil und zeigen keine erhöhte Sterberate bzw. plötzliche Todesfälle. Untersuchungen an Annexin A6-defizienten Mäusen wiesen ebenfalls auf eine normale kardiovaskuläre Funktion nach Verlust dieses Proteins hin (Hawkins et al., 1999).

Allerdings schwankten sowohl in der Wildtyp- als auch in der *AnxA7*^{-/-}-Gruppe die ermittelten Werte (HG/KGW; HG/TL; LV/KGW; LV/TL) stark um den Mittelwert. Das Herzgewicht im Mausstamm SV129 variiert also erheblich. Diese Schwankungen waren bisher noch nicht in der Literatur beschrieben (Doevendans et al., 1998). Diese Varianz erschwert jedoch die Interpretation von Befunden z.B. nach Induktion einer Hypertrophie in diesem Mausstamm.

4.3.2 EKG-Auswertungen

Im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen an isolierten ventrikulären Kardiomyozyten wird im Elektrokardiogramm die Erregungsbildung und -leitung, nicht aber die Kontraktilität der einzelnen Muskelzellen untersucht. Die Zellen der Erregungsbildung und -leitung weisen im Vergleich zum Arbeitsmyokard andere Muster ihrer Ionenströme auf. Die Erregung beginnt in den Zellen des Sinusknotens, der bei der Maus im Gegensatz zum Menschen nicht direkt im rechten Atrium liegt sondern in der Wand der Vena cava auf Höhe ihres Austritts aus dem rechten Vorhof (Lev et al., 1973). Es folgt die Weiterleitung des Signals über den AV-Knoten und die His-Bündel zum Myokard der Ventrikel. Im EKG lassen sich die elektrischen Störungen dieses Systems messen. Die PQ-Zeit repräsentiert die Überleitungszeit der Erregung von den Vorkammern auf die Hauptkammern. Der QRS-Komplex spiegelt die Dauer der Kammererregung, die QT-Zeit die Dauer der Repolarisation, wider.

Die durchgeführten EKG-Messungen zeigten eine signifikant verkürzte PQ-Zeit in der *AnxA7^{-/-}* Gruppe. Die Überleitung vom Atrium in den Ventrikel scheint nach Verlust von Annexin A7 also gestört zu sein. Die in dieses Leitungssystem involvierten Zellen weisen unterschiedliche Charakteristika ihrer Aktionspotentiale (AP) auf. Wesentlicher Unterschied ist der Anstieg und die Amplitude des Aktionspotentials sowie die Plateaudauer. Zellen mit schneller Leitung (Vorhofmyokard, His-Bündel) zeichnen sich durch eine hohe Anstiegssteilheit des AP aus, die durch einen schnellen und hohen Natriumeinstrom getragen wird. Im Vergleich dazu haben die Zellen vom Sinus- und AV-Knoten eine langsame Leitung mit einer geringen Anstiegssteilheit des AP. Dem AV-Knoten kommt also bei der Übertragung der Erregung eine bremsende Funktion zu. Eine Verkürzung der Überleitungszeit über den AV-Knoten (positiv dromotrope Wirkung) wird durch eine Verstärkung des langsamen Ca^{2+} Einwärtsstroms erklärt (Schmidt & Thews, 1990). Eine verkürzte PQ-Zeit könnte somit auf eine Störung dieses Systems durch den Verlust von Annexin A7 hindeuten. Neben der PQ-Zeit ist auch die Dauer des QRS-Komplex der *AnxA7*-defizienten Tiere verkürzt. Die Erregungen breiten sich also nicht nur über den Vorhof sondern auch über die Kammern schneller aus. In Current-Clamp Experimenten an *AnxA7^{-/-}* embryonalen Kardiomyozyten konnten normale Aktionspotentiale beobachtet werden und Voltage-Clamp-Messungen bestätigten die

funktionelle Expression der wichtigsten Ionenkanäle (Herr, 2001). Diese Beobachtungen zeigen die Notwendigkeit an, auch die AP der Zellen im adulten Herzen zu messen, wobei zwischen ventrikulärem Arbeitsmyokard und Erregungsbildungs- und -leitungssystem unterschieden werden sollte.

Die *AnxA7^{-/-}* Tiere hatten unter Sedation eine niedrigere Herzfrequenz als die Wildtyptiere. Die mittlere Herzfrequenz der WT-Tiere betrug in unseren Versuchen 428 BPM, die der *AnxA7*-defizienten Tiere 355 BPM. In der Literatur werden ca. 435 BPM für den Mausstamm SV 129 in Narkose angegeben (Kupersmidt et al., 1999; Wehrens et al., 2000). Somit ist die Herzfrequenz bei diesen Tieren durch den Verlust von Annexin A7 vermindert. Ursachen für eine Bradykardie können in der Impulsbildung und in der Impulsleitung liegen. Während der Impulsbildung wäre z.B. ein Abfall der Steilheit der diastolischen Depolarisation bzw. eine Verschiebung des maximalen diastolischen Potentials im Sinusknoten möglich. Eine verzögerte Impulsleitung kommt im vorliegenden Fall nicht in Frage, da die Ausbreitung der elektrischen Reize im EKG schneller erfolgte als in der Kontrollgruppe. Es sollten folglich nicht nur die Aktionspotentiale des AV-Knotens untersucht werden, sondern auch die des Sinusknotens.

4.3.3 Induzierte kardiale Hypertrophie

Zellkontraktionsmessungen an isolierten ventrikulären Kardiomyozyten von Annexin A6 knock-out Mäusen zeigten, dass das Fehlen des Proteins in einer verstärkten Kontraktionsfähigkeit dieser Zellen sowie in einer schnelleren Ausschleusung des Ca^{2+} aus dem Zytoplasma resultiert (Song et al., 2002). Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu vergleichbaren Untersuchungen an Herzmuskelzellen der *AnxA7*-defizienten Maus (Herr et al., 2001), in denen die Myozyten sich durch eine Verminderung ihrer Kontraktionsfähigkeit auszeichneten. Die Beeinträchtigung der Frequenz-induzierten Zunahme der Zellverkürzung zeigt sich jedoch nur im hohen Frequenzbereich und erweist sich somit nicht als letal und hat keine offensichtliche Auswirkung auf die Lebensqualität der Tiere. Dies konnte auch durch die morphologischen Untersuchungen an Herzen der *AnxA7^{-/-}* Gruppe bestätigt werden. Die Herzen sind normal entwickelt und haben ein zur Kontrollgruppe vergleichbares Herzgewicht. Die Gesamtheit der Ergebnisse lässt

vermuten, dass ein möglicher, durch den Verlust von Annexin A7 entstandener, Defekt nur unter Stresseinwirkungen auf den Herzmuskel zu Tage tritt. Aus diesem Grund sollte bei den Mäusen eine linksventrikuläre Hypertrophie erzeugt werden. Die Entscheidung viel zu Gunsten der Implantation osmotischer Minipumpen, da die Operation als solche einfach durchzuführen ist und bereits ausreichende Erfahrungen mit dieser Methode vorliegen (Kudej et al., 1997).

Die alleinige Gabe sowohl eines α -Sympatomimetikums (Phenylephrin) als auch eines β -Sympatomimetikums (Orciprenalin) führte in dem Mausstamm SV129 nicht zu einer kardialen Hypertrophieentwicklung. Eine Aktivierung der β -Rezeptoren am Herzen steigert die Herzfrequenz (positiv chronotrop) und die Kontraktionskraft (positiv inotrop) und verkürzt die Überleitungszeit (positiv dromotrop). α -Rezeptoren finden sich in den Wänden der Arterien (Schmidt & Thews, 1990). So führt ihre Aktivierung zu einer Blutdrucksteigerung über eine Vasokonstriktion in der Peripherie. Da den beiden Medikamenten unterschiedliche Mechanismen der Induktion einer Hypertonie zu Grunde liegen, wäre im vorliegenden Fall eine Kompensation eine mögliche Erklärung für die fehlende Hypertrophieentwicklung.

Erst die Kombination aus Phenylephrin und Orciprenalin resultierte in einer kardialen Hypertrophie bei den Versuchstieren. In beiden Gruppen konnte jedoch eine hohe Sterblichkeit nach der Implantation der Pumpen beobachtet werden. Die Tiere starben innerhalb von 14 Tagen nach der Operation. Bei der Sektion zeigten sich keine Anzeichen einer Entzündung an der OP-Wunde oder einer Sepsis, so dass die Ursache für die hohe Mortalität der Mäuse nicht in der Operationstechnik begründet ist. Vielmehr scheint der Mausstamm SV129 sehr empfindlich auf die verabreichten Medikamente zu reagieren. Ein weiteres Problem bei der Hypertrophieinduktion in diesem Mausstamm war die große Varianz der Basalwerte HG/KGW und HG/TL (siehe 4.3.3), die einen Vergleich zu den Kontrolltieren erschwerte. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich der Mausstamm SV129 nicht zur Induktion einer kardialen Hypertrophie mit Hilfe von osmotischen Minipumpen eignet. Aus diesem Grund werden zurzeit *AnxA7^{-/-}* Tiere in der Mauslinie BL6 gezüchtet. Auch die Methode zur Induktion der Herzmuskelverdickung sollte geändert werden. Planungen über die Durchführung einer transversalen aortalen Konstriktion an den Mäusen werden bereits diskutiert. Mit Hilfe dieser Methode wurde bereits die Expression und Lokalisation von Annexin A5 in hypertrophen Rattenherzen

untersucht (Jans et al., 1998). Es zeigte sich keine Veränderung der zellulären Lokalisation und der detektierbaren Menge des Proteins. Diese Ergebnisse wurden durch Versuche an isolierten neonatalen ventrikulären Myozyten bestätigt, an denen durch Phenylephringaben eine Hypertrophie erzeugt wurde. Anders verhielt es sich bei den Analysen von Herzen hypertensiver Meerschweinchen (Trouve et al., 1999). Die Aorta der Tiere wurde suprarenal ligiert und somit eine linksventrikuläre mechanische Hypertrophie erzeugt. Erstmals konnte gezeigt werden, dass es im linken Ventrikel zu einer Akkumulation der Annexine A2, A5 und A6 und zu einer zellulären Umverteilung der untersuchten Proteine im Stadium der kardialen Hypertrophie kam. Es wurde eine deutliche Anhäufung der Annexine im interstitiellen Gewebe beobachtet. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Annexine am Prozess des „Remodeling“ beteiligt sind.

In unserem Fall lag die Mortalität nach Pumpenimplantation in der WT-Gruppe bei 86 % und in der AnxA7-defizienten Gruppe bei 62 %. Auffällig war weiterhin, dass die Wildtypiere eine deutlichere Hypertrophie nach 14 Tagen entwickelt hatten als die Mutanten (26 % zu 9 %). Diese Werte lassen die Spekulation zu, dass der Verlust von Annexin A7 einen protektiven Effekt auf das Myokard haben könnte. Die ermittelten Gruppen waren jedoch aufgrund der hohen Mortalität sehr klein und es kann hier allenfalls von einer Tendenz, nicht aber von einer Signifikanz gesprochen werden.

5 Zusammenfassung

Annexin A7 ist ein Ca^{2+} - und Phospholipid-bindendes Protein, für das verschiedene Funktionen vorgeschlagen wurden wie die Fusion von Vesikeln, Aufbau von Ca^{2+} -Kanälen und die Beteiligung an exozytotischen/sekretorischen Vorgängen. Die physiologische Funktion des Proteins *in vivo* ist jedoch noch nicht geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung von Annexin A7 in der Embryonalentwicklung der Maus untersucht. Eine Expression des Proteins konnte in allen Geweben ab dem 5. Tag p.c. mittels immunhistologischen und Northern Blot Analysen dargestellt werden. Es zeigte sich eine subzelluläre Verteilung im Zytosol. Weitere Versuche konzentrierten sich auf die Detektion des Proteins im sich entwickelnden murinen Gehirn. Die zelluläre und subzelluläre Lokalisation von Annexin A7 änderte sich während der Differenzierung des Gehirns. Am 13.-15. Tag p.c. wiesen nur die undifferenzierten Zellen des Stratum germinativum im Zytosol eine Annexin A7 Immunoreaktivität auf. Mit fortschreitender Entwicklung (ab E16) zeigte sich eine Präsenz des Proteins im Kern der sich differenzierenden Zellen in der Intermediärschicht und im Neocortexbereich. Diese Umlokalisierung spiegelt die Wanderung der Neuronen und Astrogliazellen während ihres Differenzierungsprozesses wider und ist als Hinweis zu deuten, dass die subzelluläre Verteilung von Annexin A7 abhängig vom Entwicklungsgrad einer Zelle bzw. vom Zelltyp ist. Die Expression von Annexin A7 wurde auch im Gehirn von adulten Mäusen untersucht. Auffällig war seine Kernlokalisierung in Neuronen der Hippocampusformation, des Cerebellums und des Cortex temporalis. Darüber hinaus kommt Annexin A7 auch in glialen Zellen vor, die mit einer GFAP-Markierung als Astrozyten charakterisiert wurden.

Frühere Studien an der *AnxA7^{-/-}* Maus lieferten Hinweise auf eine gestörte Ca^{2+} Homöostase in den Kardiomyozyten nach Verlust des Proteins (Herr et al., 2001). Aus diesem Grund konzentrierte sich die Arbeit auf die Charakterisierung des kardiovaskulären Phänotyps und auf die Analyse der Herzfunktion der *AnxA7^{-/-}* Maus. Das Herz der *AnxA7^{-/-}* Tiere war normal entwickelt und zeigte keine pathologische Veränderung. In EKG-Messungen ließ sich bei den Annexin A7 defizienten Mäusen eine verkürzte PQ- und QRS-Komplex-Zeit sowie eine Bradykardie beobachten. Dies ist ein Anhaltspunkt für die Rolle von Annexin A7 in der elektromechanischen Koppelung von Herzmuskelzellen. Die

Induktion einer linksventrikulären Myokardhypertrophie bei den WT- und *AnxA7*^{-/-} Mäusen schlug aufgrund der Sensibilität des Mausstamms SV129 gegenüber den verabreichten Medikamenten fehl.

6 Summary

Annexin A7 is a Ca^{2+} - and phospholipid binding protein. Many functions have been proposed including the fusion of vesicles, acting as a Ca^{2+} channel and involvement in exocytosis/secretion. As with other family members, the physiological function *in vivo* remains to be determined. In the present study we explored the appearance of annexin A7 in mouse development. Immunohistochemistry and northern blot analysis showed expression of annexin A7 starting with day E5 in all tissues examined. At the subcellular level, annexin A7 was present in punctate structures, mainly in the cytosol. By contrast, the subcellular distribution in the developing brain changed. In the day 13-15 mouse embryo, the undifferentiated cells in the ventricular germinative zone were labeled mainly in the cytosol. One day later the first annexin A7 positive signals could be observed in the cells of the intermediate zone and the neopallium cortex. The cells showed a predominantly nuclear staining. The migratory pattern of annexin A7 positive cells from the ventricular germinative zone to the neocortex observed in this study was very similar to the developmental pattern of neuronal and astroglial precursors following the guidance of the radial glial cells. All these findings suggested that the subcellular localization of annexin A7 is regulated depending on the developmental stages and the cell types.

Previous studies demonstrated the exclusive expression of annexin A7 in astroglial cells in human brain tissue (Clemen et al., 2001). We studied its expression in the adult mouse brain and found that annexin A7 is present in astrocytes and in neurons with distinct subcellular localization in these cells. Neurons showed an intense immunoreactivity in the nucleus and a weaker signal in the cytosol, whereas in astrocytes the protein was localized to punctate structures mainly in the cytosol.

To understand the function of annexin A7 an *Anxa7^{-/-}* mouse was generated (Herr, 2000). Ca^{2+} regulation studied in isolated cardiomyocytes showed that while cells from early embryos displayed intact Ca^{2+} homeostasis, cardiomyocytes from adult *Anxa7^{-/-}* mice exhibited an altered cell shortening-frequency relationship when stimulated with high frequency. This defect does not interfere with the viability of animals maintained under normal conditions. Here we examined the cardiovascular phenotype of the knock-out mouse and the heart function under stress. Heart weight and weight of the ventricles is normal in the annexin A7 mouse. Analysing electrocardiograms from annexin A7 deficient

mice we observed a reduced PQ-time and QRS-complex-time and a bradycardia. This suggested a role for annexin A7 in electromechanical coupling, probably through Ca^{2+} homeostasis. At last, it should be noted that the induction of a cardiac hypertrophy failed in our study. This appears to be due to the high sensitivity of the mouse strain SV129 to the applied drugs.

7 Literatur

- Ali, S. M., MJ. Geisow, RD. Burgoyne. 1989. A role for calpactin in calcium-dependent exocytosis in adrenal chromaffin. *Nature*. **340**:313-5.
- Altman J., SA. Bayer. 1988. Development of the rat thalamus: I. Mosaic organization of the thalamic neuroepithelium. *J Comp Neurol*. **275**:346-77.
- Altman J., SA: Bayer. 1990. Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J Comp Neurol*. **301**:325-42.
- Barwise, JL., JH. Walker . 1996. Subcellular localization of annexin V in human foreskin fibroblasts: nuclear localization depends on growth state. *FEBS Lett*. **394**:213-6.
- Barwise, JL., JH. Walker. 1996. Annexins II, IV, V and VI relocate in response to rises in intracellular calcium in human foreskin fibroblasts. *J Cell Sci*. **109**:247-55.
- Bianchi, R., M. Garbuglia, M. Verzini, I. Giambanco, A. Spreca, and R. Donato. 1995. S-100 protein and annexin II2-p11(2) (calpactin I) act in concert to regulate the state of assembly of GFAP intermediate filaments. *Biochem Biophys Res Commun*. **208**:910-8.
- Blanchard, S., JL. Barwise, V. Gerke, A. Goodall, PF. Vaughan, JH. Walker. 1996. Annexins in the human neuroblastoma SH-SY5Y: demonstration of relocation of annexins II and V to membranes in response to elevation of intracellular calcium by membrane depolarisation and by the calcium ionophore A23187. *J Neurochem*. **67**:805-13.
- Brachvogel, B., H. Welzel, H. Moch, K. von der Mark, C. Hofmann, E. Pöschl. 2001. Sequential expression of annexin A5 in the vasculature and skeletal elements during mouse development. *Mech Dev*. **109**:389-93.
- Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **72**:248-54.
- Buckley, KM., E. Floor, RB. Kelly. 1987. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding p38, a major synaptic vesicle protein. *J Cell Biol*. **105**:2447-56.

- Burger, A., R. Berendes, S. Liemann, J. Benz, A. Hofmann, P. Göttig, R. Huber, V. Gerke, C. Thiel, J. Römisch, K. Weber. 1996. The crystal structure and ion channel activity of human annexin II, a. *J Mol Biol.* **257**:839-47.
- Burgoyne, RD., MJ. Geisow. 1989. The annexin family of calcium-binding proteins. Review article. *Cell Calcium.* **10**:1-10.
- Caviness, VS. Jr. 1982. Development of neocortical afferent systems: studies in the reeler mouse. *Neurosci Res Program Bull.* **20**:560-9.
- Chollet, P., F. Malecaze, F. Hullin, P. Raynal, JL. Arne, V. Pagot, J. Ragab-Thomas, H. Chap. 1992. Inhibition of intraocular fibrin formation with annexin V. *Br J Ophthalmol.* **76**:450-2.
- Clemen, CS., A. Hofmann, C. Zamparelli, AA. Noegel. 1999. Expression and localisation of annexin VII (synexin) isoforms in differentiating myoblasts. *J Muscle Res Cell Motil.* **20**:669-79.
- Clemen, CS., C. Herr, AA. Lie, AA. Noegel, R. Schröder. 2001. Annexin VII: an astroglial protein exhibiting a Ca²⁺-dependent subcellular distribution. *Neuroreport* **12**:1139-44.
- Creutz, CE. 1992. The annexins and exocytosis. *Science.* **258**:924-31.
- Creutz, CE., CJ. Pazoles, HB. Pollard. 1978. Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. *J Biol Chem.* **253**:2858-66.
- Crumpton, MJ., JR. Dedman. 1990. Protein terminology tangle. *Nature.* **345**:212.
- Cuevas, EC., AC. Bateman, BS. Wilkins, PA. Johnson, JH. Williams, AH. Lee, DB. Jones, DH. Wright. 1994. Microwave antigen retrieval in immunocytochemistry: a study of 80 antibodies. *J Clin Pathol.* **47**:448-52.
- Daemen, MJ., ED. de Munick, E. Lutgens, JF. Smits. 1997. Chronic myocardial infarction in mice: structural and functional consequences. *Circulation.* **96**:102.
- Demange, P., D. Voges, J. Benz, S. Liemann, P. Göttig, R. Berendes, A. Burger, and R. Huber. 1994. Annexin V: the key to understanding ion selectivity and voltage. *Trends Biochem Sci.* **19**:272-6.
- Doetschman, TC., H. Eistetter, M. Katz, W. Schmidt, R. Kemler. 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol.* **87**:27-45.

- Doevendans, PA., MJ. Daemen, ED. de Muinck, JF. Smits. 1998. Cardiovascular phenotyping in mice. Review article. *Cardiovasc Res.* **39**: 34-49.
- Doubell, AF., C. Lazure, C. Charbonneau, G. Thibault. 1993. Identification and immunolocalisation of annexins V and VI, the major cardiac annexins, in rat heart. *Cardiovasc Res.* **27**: 1359-1367.
- Eberhard, DA., LR. Karns, SR. VandenBerg, CE. Creutz. 2001. Control of the nuclear-cytoplasmic partitioning of annexin II by a nuclear export signal and by p11 binding. *J Cell Sci.* **114**:3155-66.
- Eberhard, DA., MD. Brown, SR. VandenBerg. 1994. Alterations of annexin expression in pathological neuronal and glial reactions. Immunohistochemical localization of annexins I, II (p36 and p11 subunits), IV, and VI in the human hippocampus. *Am J Pathol.* **145**:640-9.
- Edwards, MA., M. Yamamoto, VS. Caviness. 1990. Organization of radial glia and related cells in the developing murine CNS. An analysis based upon a new monoclonal antibody marker. *Neuroscience.* **36**:121-44.
- Eng, LF., RS. Ghirnikar, YL. Lee. 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* **25**: 1439-51.
- Fam, SR., CJ. Gallagher, MW. Salter. 2000. P2Y(1) purinoceptor-mediated Ca(2+) signaling and Ca(2+) wave propagation in dorsal spinal cord astrocytes. *J Neurosci.* **20**:2800-8.
- Favier-Perron, B., A. Lewit-Bentley, F. Russo-Marie. 1996. The high-resolution crystal structure of human annexin III shows subtle differences with annexin V. *Biochemistry.* **35**:1740-4.
- Fiedler, K., K. Simons. 1995. Annexin homologues in *Giardia lamblia*. *Trends Biochem Sci.* **20**:177-8.
- Funakoshi, T., LE. Hendrickson, BA. McMullen, K. Fujikawa. 1987. Primary structure of human placental anticoagulant protein. *Biochemistry.* **26**:8087-92.
- Gadisseux, JF., HJ. Kadhim, P. van den Bosch de Aguilar, VS. Caviness, P. Evrard. 1990. Neuron migration within the radial glial fiber system of the developing murine cerebrum: an electron microscopic autoradiographic analysis. *Brain Res Dev Brain Res.* **52**:39-56.

- Gerke, V., K. Weber. 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**:227-33.
- Gerke, V., SE. Moss. 1997. Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta.* **1357**:129-54.
- Gerke, V., SE. Moss. 2002. Annexins from structure to function. *Physiol Rev.* **82**: 331-71.
- Giambanco, I., M. Verzini, R. Donato. 1993. Annexins V and VI in rat tissues during post-natal development. *Biochem Biophys Res Commun.* **196**:1221-6.
- Gunteski-Hamblin, AM., G. Song, RA. Walsh, M. Frenzke, GP. Boivin, GW. Dorn, MA. Kaetzel, ND. Horseman, JR. Dedman. 1996. Annexin VI overexpression targeted to heart alters cardiomyocyte function in transgenic mice. *Am. J. Physiol.* **270** (*Heart Circ. Physiol.* **39**):H1091-H1100.
- Hamre, KM., CK. Keller-Peck, RM. Campbell, AC. Peterson, RJ. Mullen, D. Goldowitz. 1996. Annexin IV is a marker of roof and floor plate development in the murine CNS. *J Comp Neurol.* **368**:527-37.
- Hamre, KM., KP. Chepenik, D. Goldowitz. 1995. The annexins: specific markers of midline structures and sensory neurons in the developing murine central nervous system. *J Comp Neurol.* **352**:421-35.
- Hawkins, TE., J. Roes, D. Rees, J. Monkhouse, SE. Moss. 1999. Immunological development and cardiovascular function are normal in annexin VI null mutant mice. *Mol Cell Biol.* **19**:8028-32.
- Herr, C., N. Smyth, S. Ullrich, F. Yun, P. Sasse, J. Hescheler, B. Fleischmann, K. Lasek, K. Brixius, R. Schwinger, R. Fässler, R. Schröder, AA. Noegel. 2001. Loss of annexin A7 leads to alterations in frequency-induced shortening of isolated murine cardiomyocytes. *Mol Cell Biol.* **21**:4119-28.
- Hoekstra, D., R. Buist-Arkema, K. Klappe, CP. Reutelingsperger. 1993. Interaction of annexins with membranes: the N-terminus as a governing. *Biochemistry.* **32**:14194-202.
- Hofmann, A., A. Escherich, A. Lewit-Bentley, J. Benz, C. Raguene-Nicol, F. Russo-Marie, V. Gerke, L. Maroder, R. Huber. 1998. Interactions of benzodiazepine derivatives with annexins. *J Biol Chem.* **273**:2885-2894.

- Hongo, M., T. Ryoke, JJ. Ross. 1997. Animal models of heart failure: recent developments and perspectives. *Trends Cardiovasc Med.* **7**: 161-167.
- Huber, R., J. Römisch, EP Paques. 1990. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant that binds to calcium and membranes. *Embo J.* **9**:3867-74.
- Ikebuchi, NW., DM. Waisman. 1990. Calcium-dependent regulation of actin filament bundling by lipocortin-85. *J Biol Chem.* **265**:3392-400.
- Jans, DA. 1995. The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation. Review article. *Biochem J.* **311**:705-16.
- Jans, SW., M. van Bilsen, CP. Reutelingsperger, M. Borgers, YF. de Jong, GJ. van der Vusse. 1995. Annexin V in the adult rat heart: isolation, localization and quantitation. *J Mol Cell Cardiol.* **27**:335-48.
- Jans, SW., YF. De Jong, CP. Reutlingsperger, GJ. Van der Vusse, M. van Bilsen. 1998. Differential expression and localization of annexin V in cardiac myocytes during growth and hypertrophy. *Mol Cell Biochem.* **178**:229-236.
- Jindal, HK., WG. Chaney, CW. Anderson, RG. Davis, JK. Vishwanatha. 1991. The protein-tyrosine kinase substrate, calpactin I heavy chain (p36), is part of the primer recognition protein complex that interacts with DNA polymerase alpha. *J Biol Chem.* **266**:5169-76.
- Kaneko, N., H. Ago, R. Matsuda, E. Inagaki, M. Miyano. 1997. Crystal structure of annexin V with its ligand K-201 as a calcium channel activity inhibitor. *J Mol Biol.* **274**:16-20.
- Kaneko, N., R. Matsuda, M. Toda, K. Shimamoto. 1997. Inhibition of annexin V-dependent Ca(2+) movement in large unilamellar vesicles by K201, a new 1,4-benzothiazepine derivative. *Biochim Biophys Acta.* **1330**:1-7.
- Kaufman, MH., JBL. Bard. 1999. The anatomical basis of mouse development. *Academic Press*, London.
- Kawasaki, H., A. Avila-Sakar, CE. Creutz, RH. Kretsinger. 1996. The crystal structure of annexin VI indicates relative rotation of the two lobes upon membrane binding. *Biochim Biophys Acta.* **1313**:277-82.

- Köhler, G., U. Hering, O. Zschörnig, K. Arnold. 1997. Annexin V interaction with phosphatidylserine-containing vesicles at low and neutral pH. *Biochemistry*. **36**: 8189-8184.
- Koster, JJ., CM. Boustead, CA. Middleton, JH. Walker. 1993. The sub-cellular localization of annexin V in cultured chick-embryo fibroblasts. *Biochem J*. **291**:595-600.
- Krapfenbauer, K., M. Berger, A. Friedlein, G. Lubec, M. Fountoulakis. 2001. Changes in the levels of low-abundance brain proteins induced by kainic acid. *Eur J Biochem*. **268**:3532-7.
- Kudej, RK, M. Iwase, M. Uechi, DE. Vatner, N. Oka, Y. Ishikawa, RP. Shannon, SP. Bishop, SF. Vatner. 1997. Effects of chronic beta-adrenergic receptor stimulation in mice. *J Mol Cell Cardiol*. **29**:2735-2746.
- Kupersmidt, S., T. Yang, ME. Anderson, A. Wessels, KD. Niswender, MA. Magnuson, DM. Roden. 1999. Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ Res*. **84**:146-52.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680-5.
- Langanger, G., J. De Mey, H. Adam. 1983. 1,4-Diazobicyclo-(2,2,2)-octane (DABCO) retards the fading of immunofluorescence preparations. *Mikroskopie*. **40**:237-41.
- Langen, R., JM. Isas, WL. Hubbell, HAT. Haigler. 1998. A transmembrane form of annexin XII detected by site-directed spin labeling. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**:14060-5.
- Langman, J. 1989. Medizinische Embryologie. *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart.
- Leube, RE., P. Kaiser, A. Seiter, R. Zimbelmann, W. W. Franke, H. Rehm, P. Knaus, P. Prior, H. Betz, H. Reinke, and et al. 1987. Synaptophysin: molecular organization and mRNA expression as determined from cloned cDNA. *Embo J*. **6**:3261-8.
- Lev, M., J. Thaemert. 1973. The conduction system of the mouse heart. *Acta Anat*. **85**:342-352.
- Lewit-Bentley, A., GA. Bentley, B. Favier, LHG, M. Renouard. 1994. The interaction of metal ions with annexin V: a crystallographic study. *FEBS Lett*. **345**:38-42.

- Lewit-Bentley, A., S. Morera, R. Huber, G. Bodo. 1992. The effect of metal binding on the structure of annexin V and implications for membrane binding. *Eur J Biochem.* **210**:73-7.
- Liemann, S. 1996. Herstellung ,Reinigung und strukturelle Charakterisierung von Mutanten des humanen Annxin V; ESR-Spektroskopische Untersuchung des Annexin V-Membran-Komplexes; Reinigung und Kristallstruktur des Rekombinanten N-terminal verkürzten Annexin VII aus *Dictyostelium discoideum*. Dissertation. Universität München.
- Lu, QL., TA. Partridge. 1998. A new blocking method for application of murine monoclonal antibody to mouse tissue sections. *J Histochem Cytochem.* **46**:977-84.
- Luckcuck, T., PJ. Trotter, JH. Walker. 1997. Localization of annexin V in the adult and neonatal heart. *Biochem Biophys Res Commun.* **238**:622-8.
- Luckcuck, T., PJ. Trotter, JH. Walker. 1998. Localization of annexin VI in the adult and neonatal heart. *Cell Biol Int.* **22**:199-205.
- Luecke, H., BT. Chang, WS. Mailliard, DD. Schlaepfer, HT. Haigler. 1995. Crystal structure of the annexin XII hexamer and implications for bilayer insertion. *Nature.* **378**:512-5.
- Magendzo, K., A. Shirvan, C. Cultraro, M. Srivastava, HB. Pollard, AL. Burns. 1991. Alternative splicing of human synexin mRNA in brain, cardiac, and skeletal muscle alters the unique N-terminal domain. *J Biol Chem.* **266**:3228-32.
- Mamiya. N., S. Iino, A. Mizutani, S. Kobayashi, H. Hidaka. 1994. Development-related and cell-type specific nuclear localization of annexin XI: immunolocalization analysis in rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* **202**:403-9
- Matteo, RG., CS. Moravec. 2000. Immunolocalization of annexins IV, V and VI in the failing and non-failing human heart. *Cardiovasc Res.* **45**:961-70.
- Michael, LH., ML. Entman, CL Hartley. 1995. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol.* **269**:H2147-2154.
- Misson, JP., CP. Austin, T. Takahashi, CL. Cepko, VS. Jr. Caviness. 1991. The alignment of migrating neural cells in relation to the murine neopallial radial glial fiber system. *Cereb Cortex.* **1**:221-9.

- Misson, JP., MA. Edwards, M. Yamamoto, VS. Jr. Caviness. 1988. Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. *Brain Res Dev Brain Res.* **44**:95-108.
- Mizutani, A., N. Usuda, H. Tokumitsu, H. Minami, K. Yasui, R. Kobayashi, H. Hidaka. 1992. CAP-50, a newly identified annexin, localizes in nuclei of cultured fibroblast 3Y1 cells. *J Biol Chem.* **267**:13498-504.
- Mizutani, A., N. Watanabe, T. Kitao, H. Tokumitsu, H. Hidaka. 1995. The long amino-terminal tail domain of annexin XI is necessary for its nuclear localization. *Arch Biochem Biophys.* **318**:157-65.
- Moga, MM., D. Zhou. 2002. Annexin 6 immunoreactivity in select cell populations in the rat brain. *J Histochem Cytochem.* **50**:1277-80.
- Moss, SE., M.J. Crumpton. 1989. Alternative splicing or cloning artefact?. *Trends Biochem Sci.* **14**:325.
- Noegel, AA., G. Gerisch, F. Lottspeich, M. Schleicher. 1990. A protein with homology to the C-terminal repeat sequence of Octopus rhodopsin and synaptophysin is a member of a multigene family in Dictyostelium discoideum. *FEBS Lett.* **266**:118-22.
- Paine, PL., SB. Horowitz. 1980. *Cell Biol.* **4**:299-338.
- Pickel, VM., CL. Clarke, MB. Meyers. 1997. Ultrastructural localization of sorcin, a 22 kDa calcium binding protein, in the rat caudate-putamen nucleus: association with ryanodine receptors and intracellular calcium release. *J Comp Neurol.* **386**:625-34.
- Pileri, SA., G. Roncador, C. Ceccarelli, M. Piccioli, A. Briskomatis, E. Sabattini, S. Ascani, D. Santini, PP. Piccaluga, O. Leone, S. Damiani, C. Ercolessi, F. Sandri, F. Pieri, L. Leoncini, B. Falini. 1997. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. *J Pathol.* **183**:116-23.
- Pollard, HB., AL. Burns, E. Rojas. 1990. Synexin, a new member of the annexin gene family, is a calcium channel and membrane fusion protein. *Prog Clin Biol Res.* **349**:159-72.
- Pollard, HB., E. Rojas, AL. Burns. 1987. Synexin and chromaffin granule membran fusion. A novel "hydrophobic bridge" hypothesis for the driving and directing of the fusion process. *Ann N Y Acad Sci.* **493**:524-41.

- Pollard, HB., E. Rojas, RW. Pastor, EM. Rojas, HR. Guy, AL. Burns. 1991. Synexin: molecular mechanism of calcium-dependent membrane fusion and voltage-dependent calcium-channel activity. Evidence in support of the "hydrophobic bridge hypothesis" for exocytotic membrane fusion. *Ann N Y Acad Sci.* **635**:328-51.
- Pollard, HB., E. Rojas. 1988. Ca²⁺-activated synexin forms highly selective, voltage-gated Ca²⁺-channels in phosphatidylserine bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**:2974-8.
- Pollard, HB., H. Caohuy, AP. Minton, M. Srivastava. 1998. Synexin (annexin VII) hypothesis for Ca²⁺/GTP-regulated exocytosis. *Adv Pharmacol.* **42**:81-7.
- Pula, G., R. Bianchi, P. Ceccarelli, I. Giambanco, R. Donato. 1990. Characterization of mammalian heart annexins with special reference to CaBP 33 (annexin V). *FEBS Lett.* **277**: 53-58.
- Raynal, P., HB. Pollard. 1994. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family. *Biochim Biophys Acta.* **1197**:63-93.
- Raynal, P., PM. van Bergen en Henegouwen, F. Hullin, JM. Ragab-Thomas, J. Fauvel, A. Verkley, H. Chap. 1992. Morphological and biochemical evidence for partial nuclear localization of annexin 1 in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **186**:432-9.
- Reeves, SA., C. Chavez-Kappel, R. Davis, M. Rosenblum, MA. Israel. 1992. Developmental regulation of annexin II (Lipocortin 2) in human brain and expression in high grade glioma. *Cancer Res.* **52**:6871-6.
- Rescher, U., N. Zobiack, V. Gerke. 2000. Intact Ca²⁺ binding sites are required for targeting annexin I to endosomal membranes in living HeLa cells. *J Cell Sci.* **113**:3931-3938.
- Reutelingsperger, CP., G. Hornstra, HC. Hemker. 1985. Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries. *Eur J Biochem.* **151**:625-9.
- Reutelingsperger, CP., WL. van Heerde. 1997. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cell Mol Life Sci.* **53**:527-32.
- Rockman, HA., RS. Ross, AN. Harris. 1991. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* **88**:8277-8281.

- Rojas, E., HB. Pollard, HT. Haigler, C. Parra, AL. Burns. 1990. Calcium-activated endonexin II forms calcium channels across acidic phospholipid bilayer membranes. *J Biol Chem.* **265**:21207-15.
- Rothhut, B., F. Russo-Marie, J. Wood, M. Di Rosa, RJ. Flower. 1983. Further characterization of the glucocorticoid-induced antiphospholipase. *Biochem Biophys Res Commun.* **117**:878-84.
- Ruwhof, C., A. van der Laarse. 2000. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res.* **47**:23-37.
- Sarafian, T., D. Aunis, MF. Bader. 1987. Loss of proteins from digitonin-permeabilized adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem.* **262**:16671-6.
- Schmidt, RF., G. Thews. 1990. Physiologie des Menschen. *Springer Verlag.*
- Selbert, S. 1995. Vorkommen und Verteilung von Annexin VII (Synexin) in Muskelzellen. Dissertation. Universität Freiburg.
- Selbert, S., P. Fischer, D. Pongratz, M. Stewart, AA. Noegel. 1995. Expression and localization of annexin VII (synexin) in muscle cells. *J Cell Sci.* **108**:85-95.
- Seydel, U., DA. Jans. 1996. Evidence for an inhibitory feedback loop regulating simian virus 40 large T-antigen fusion protein nuclear transport. *Biochem J.* **315**:33-9.
- Shi, SR., ME. Key, KL. Kalra. 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem.* **39**:741-8.
- Shirvan, A., M. Srivastava, MG Wang, C. Cultraro, K. Magendzo, OW. McBride, HB Pollard, AL Burns. 1994. Divergent structure of the human synexin (annexin VII) gene and assignment to chromosome 10. *Biochemistry.* **33**:6888-6901.
- Smallwood, M., JN. Keen, DJ. Bowles. 1990. Purification and partial sequence analysis of plant annexins. *Biochem J.* **270**:157-61.
- Smits, JF., MJ. Daemen. 1994. Insights from animal models of myocardial infarction: do ACE inhibitors limit the structural response?. *Br Heart J.* **72**:61-64.
- Song, G., B. Campos, LE. Wagoner, JR. Dedman, RA. Walsh. 1998. Altered cardiac annexin mRNA and protein levels in the left ventricle of patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* **30**:443-451.

- Song, G., SE. Harding, M. Duchon, R. Tunwell, P. O'Gara. T. Hawkins, S. Moss. 2002. Altered mechanical properties and intracellular calcium signaling in cardiomyocytes from annexin 6 null-mutant mice. *FASEB J.* **16**:622-624.
- Srivastava, M., I. Atwater, M. Glasman, X. Leighton, G. Goping, H. Caohuy, G. Miller, J. Pichel, H. Westphal, D. Mears, E. Rojas, HB. Pollard. 1999. Defects in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression, Ca²⁺ signaling, and insulin secretion in the anx7(+/-) knockout mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:13783-8.
- Strauer, BE. 1997. Interventionelle Verfahren der Kardiologie. *Der Internist.* **38**:1-2.
- Südhof, TC., F. Lottspeich, P. Greengard, E. Mehl, R. Jahn. 1987. The cDNA and derived amino acid sequences for rat and human synaptophysin. *Nucleic Acids Res.* **15**:9607.
- Sun, J., HH. Salem, P. Bird. 1992. Nucleolar and cytoplasmic localization of annexin V. *FEBS Lett.* **314**:425-9.
- Tait, JF., M. Sakata, BA. McMullen, CH. Miao, T. Funakoshi, LE. Hendrickson, K. Fujikawa. 1988. Placental anticoagulant proteins: isolation and comparative characterization four members of the lipocortin family. *Biochemistry.* **27**:6268-76.
- Thiel, C., M. Osborn, V. Gerke. 1992. The tight association of the tyrosine kinase substrate annexin II with the submembranous cytoskeleton depends on intact p11- and Ca²⁺-binding sites. *J Cell Sci.* **103**:733-42.
- Towle, CA., BV. Treadwell. 1992. Identification of a novel mammalian annexin. *J Biol Chem.* **267**:5416-23.
- Trouve, P., S. Legot, I. Belikova, F. Marotte, D. Benevolensky, F. Russo-Marie, JL. Samuel, D. Charlemagne. 1999. Localization and quantitation of cardiac annexins II, V, and VI in hypertensive guinea pigs. *Am J Physiol.* **276**:H1159-66.
- Tse, J., S. Goldfarb. 1988. Immunohistochemical demonstration of estrophilin in mouse tissues using a biotinylated monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem.* **36**:1527-31.
- Verzili, D., C. Zamparelli, B. Mattei, AA. Noegel, E. Chiancone. 2000. The sorcin-annexin VII calcium-dependent interaction requires the sorcin N-terminal domain. *FEBS Lett.* **471**:197-200.
- Waisman, DM. 1995. Annexin II tetramer: structure and function. *Mol Cell Biochem.* **149/150**:301-322.

- Wang, LM., MM. Rahman, H. Iida, T. Inai, S. Kawabata, S. Iwanaga, Y. Shibata. 1995. Annexin V is localized in association with Z-line of rat cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* **30**:363-371.
- Wehrens, X., S. Kirchhoff, PA. Doevendans. 2000. Mouse electrocardiography: an interval of thirty years. Review article. *Cardiovasc Res.* **45**:231-237.
- Weng, X., H. Luecke, IS. Song, DS. Kang, SH. Kim, R. Huber. 1993. Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution. *Protein Sci.* **2**:448-58.
- Wiesel, P., L. Mazzolai, J. Nussberger, T. Pedrazzini. 1997. Two-kidney, one clip and one-kidney, one clip hypertension in mice. *Hypertension.* **29**:1025-1030.
- Yuasa, S. 2001. Development of astrocytes in the mouse embryonic cerebrum tracked by tenascin-C gene expression. *Arch Histol Cytol.* **64**:119-26.
- Yuasa, S. 2001. Development of astrocytes in the mouse hippocampus as tracked by tenascin-C gene expression. *Arch Histol Cytol.* **64**:149-58.
- Zamparelli, C., A. Ilari, D. Verzili, L. Giangiacomo, G. Colotti, S. Pascarella, E. Chiancone. 2000. Structure-function relationships in sorcin, a member of the penta EF-hand family. Interaction of sorcin fragments with the ryanodine receptor and an *Escherichia coli* model system. *Biochemistry.* **39**:658-66.
- Zhang-Keck, ZY., M. Srivastava, CA. Kozak, H. Caohuy, A. Shirvan, AL. Burns, HB. Pollard. 1994. Genomic organization and chromosomal localization of the mouse synexin gene. *Biochem J.* **301**:835-45.

