

PENGGUNAAN PROTEIN REPORTER GFP (GREEN FLUORESCENT PROTEIN) UNTUK PEMANTAUAN FUNGSI ANNEXIN I PADA PHAGOSITOSIS *BRUCELLA SUIIS*

USE OF REPORTER PROTEIN GFP (GREEN FLUORESCENT PROTEIN) FOR MONITORING ANNEXIN I FUNCTION IN *BRUCELLA SUIIS* PHAGOCYTOSIS

Asmarani Kusumawati¹

¹Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Hewan dan Pasca Sarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

ABSTRAK

Brucella spp adalah bakteri patogen intraseluler, fakultatif yang menyebabkan brucellosis dan bersifat zoonosis. Efisiensi masuknya *Brucella* ke dalam sel line macrophage J-774 dipertinggi dengan opsonisasi. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari fungsi fisiologis annexin 1 selama phagositosis, dengan cara memasukkan cDNA annexin 1 wild type (WT) yang difusikan dengan “green fluorescent protein” (GFP) di dalam vektor pEGFP/C1, dengan transfeksi menggunakan LipofecAmine. Pendekatan ini memungkinkan studi dinamik annexin 1 di dalam sel hidup. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi annexin 1 exogeneous yang berfluorescent hijau, ialah protein yang dimasukkan ke dalam sel, sangat tinggi. Juga menunjukkan terjadinya penurunan phagositosis *Brucella suis* setelah infeksi 30 menit pada sel J-774 yang mengekspresikan annexin 1 exogen fluorescent hijau. Akhirnya perlu dikemukakan bahwa fusi dengan GFP tidak hanya memungkinkan identifikasi sel yang tertransfeksi tetapi juga, berkat ekspresi protein exogen yang tinggi, fungsi ini dapat dipergunakan untuk studi mekanisme dengan “directed mutagenesis” karena efek protein endogen dapat dikalahkan oleh protein yang dimasukkan.

Kata kunci : annexin 1, J-774, phagositosis, *Brucella*, GFP

ABSTRACT

Brucella spp. are facultative intracellular pathogenic bacteria, agents of brucellosis, a zoonosis. The uptake of *Brucella* by the macrophagic cell line J-774 is highly enhanced by opsonization. The aim of this research work was to study the physiological function of annexin 1 during the phagocytosis, by introducing the cDNA of exogeneous WT annexin 1 fused to green fluorescent (GFP) gene in pEGFP/C1 vector, by transfection with LipofecAmine. This approach allow dynamic studies of annexin 1 in living cells. Our results showed that the expression of the green fluorescent annexin 1 exogeneous was very high. Also showed that at 30 min. infection the efficiency of phagocytosis of *Brucella suis* was decreased in green fluorescent exogeneous annexin 1-expressing J-774 cells. Finally, fusion to GFP not only enables the identification of transfected cells but also, owing to the high expression of the exogeneous protein, it may be used for mechanistic studies by directed mutagenesis as the effects of the endogeneous protein can be easily overcome by introduce.

Key words : annexin 1, J-774, phagocytosis, *Brucella*, GFP

PENDAHULUAN

Brucellosis, suatu zoonosis yang disebabkan oleh bakteri *Brucella*, menyebabkan keguguran pada hewan betina, infertilitas pada hewan jantan dan pada manusia penyakit ini disebut demam undulan atau demam malta. Sampai saat ini brucellosis masih merupakan persoalan penting baik dibidang kesehatan maupun ekonomi (Baldwin & Winter, 1994). Mekanisme yang dipergunakannya untuk menghindari pemusnahannya oleh makrofag belum diketahui. Diperkirakan bakteri bertahan karena mampu mencegah fungsi beberapa protein seperti annexin 1. Mencari mekanisme yang dipakai oleh *Brucella* untuk bertahan dan berkembang biak didalam makrofag, merupakan salah satu sistim pertahanan imun yang utama. Dengan penentuan mekanisme ini, maka diharapkan dapat ditemukan sarana yang efisien untuk membasminya.

Phagositosis merupakan suatu sistim pertahanan yang utama terhadap infeksi. Proses ini dilakukan oleh phagositosis professional dan makrofag. Proses ini sangat kompleks dan melibatkan berbagai protein dari kompleks di bawah membran. Diantaranya annexin 1 yang diperkirakan berperan pada fusi dan atau fisi membran. *Brucella* mampu bereplikasi di dalam sel phagosit baik yang professional maupun yang non professional (Detilleux *et al.*, 1990 ; Price *et al.*, 1990 ; Liautard , 1996). Hal ini merupakan strategi bakteri tersebut untuk tetap hidup di dalam sel dan bereplikasi walaupun telah dihadang oleh bermacam-macam mekanisme bakterisidal.

Annexin 1 termasuk famili protein yang berinteraksi dengan phospholipid membran yang bersifat negatif dan tergantung pada kalsium. Famili annexin memiliki struktur berikut : inti-protein terdiri dari 4 (annexin 32-34 kDa) atau 8 (annexin 6) domain homolog yang terdiri dari 70 asam amino. Bagian N-terminal sangat bervariasi dan spesifik untuk setiap jenis annexin (Burgoyne & Geisow, 1989). Bagian ini juga merupakan bagian regulasi dengan phosphorilasi (Drust & Creutz, 1988 ; Hoekstra *et al.*, 1993). Phosphorilasi Ser-27 berakibat inhibisi kemampuan annexin 1 untuk mengagregasi membran (Porte *et al.*, 1996).

Annexin sudah banyak dipelajari baik dibidang struktur maupun biokimia. Struktur tridimensi annexin 1 (Crégut *et al.*, 1994 ; Weng *et al.*, 1993), 3 (Favier-Perron *et al.*, 1996), 5 (Huber *et al.*, 1992), 12 (Luecke *et al.*, 1995) sudah ditentukan. Meskipun demikian fungsi fisiologi annexin belum dimengerti secara menyeluruh. Diperkirakan fungsi protein-protein annexin terlibat pada fusi dan/atau fisi membran seperti fusi endosom (Mayorga *et al.*, 1994), endositosis (Lin *et al.*, 1992), phagositosis (Harricane *et al.*, 1996 ; Diakonova *et al.*, 1997 ; Kusumawati *et al.*, 2001),

exositosis (Sarafian *et al.*, 1991 ; Creutz, 1992) atau trafik selular (Isacke *et al.*, 1989). Pada makrofag ditemukan annexin 1 juga annexin 2 (Isacke *et al.*, 1989) dan annexin 3 (Le Cabec *et al.*, 1994). Annexin 1 didapatkan pada phagosom stadium akhir berisi material inert (Diakonova *et al.*, 1997 ; Kusumawati dan Sri Widada, 2001), yeast dan bakteri non patogen (Harricane *et al.*, 1996) tetapi protein ini tidak ditemukan pada phagosom stadium akhir yang mengandung *Brucella* patogen hidup (Harricane *et al.*, 1996 ; Kusumawati *et al.*, 2000). Meskipun demikian, annexin 1 ditemukan pada phagosom stadium awal berisi patogen hidup, bakteri non patogen atau material inert (Kusumawati *et al.*, 2000). Maka protein ini terlibat pada tahap awal trafficking phagosome.

Brucella adalah bakteri Gram negatif non motil berukuran 0.5/1.5 μm . Ada 6 species *Brucella* : *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis* dan *B. suis*. Interaksi *Brucella* dengan sel inangnya belum dimengerti secara keseluruhannya. Bakteri ini mampu bertahan terhadap lingkungan asam dalam phagosome macrophage (Porte *et al.*, 1999) dan diperkirakan menghibisi fusi antara phagosom dengan lysosom dan dengan demikian tidak dimatikan oleh enzim lysosom (Arenas *et al.*, 2000). Diantara mekanisme yang mungkin terlibat ialah kemampuannya untuk menghibisi lokalisasi annexin 1 dalam phagosom tahap akhir (Kusumawati *et al.*, 2000) dan dengan demikian menghibisi fusi antara phagosom dengan lysosom. Delokalisasi ini dapat dilaksanakan misalnya dengan mengeluarkan suatu faktor yang memodifikasi protein ini.

Brucella menghambat fusi phagolysosom. Salah satu kemungkinan ialah dengan menghibisi lokalisasi annexin 1 pada phagosom dan dengan demikian menghambat fungsinya. Pada penelitian ini protein annexin 1 diekspresi dalam jumlah tinggi dengan memasukkan annexin 1 exogen secara transfeksi apakah efek inhibisi oleh *Brucella* dapat dihindarkan penjelasan dapat dilihat pada hasil penelitian dan diskusi.

MATERI DAN METODE

Pembuatan vektor ekspresi annexin 1 : annexin 1 cDNA dipotong dari vektor pKA/WT dengan *Nco*I, kemudian treatment dengan DNA Polymerase fragment Klenow agar menjadi blunt-end kemudian dengan ligasi dimasukkan kedalam vektor ekspresi eukaryot pEGFP-C1 (Clontech) yang dilineariskan dengan *Sma*I. Annexin 1 akan diekspresi sebagai protein yang berfusi dengan GFP (Green fluorescent Protein dari *Aequorea victoria*) pada N-terminal. Berkat autofluorescence GFP, maka annexin 1 akan dapat diobservasi dengan mikroskop fluorescent tanpa penambahan antibodi.

Amplifikasi dan analisa klon :

Hasil ligasi di-transfeksikan kedalam *E. coli* DH 5 α , dengan teknik TSS. Secara singkat, bakteri dibuat kompetent dengan pelarutan dalam TSS (10% PEG 6000, 5% DMSO, 35 mM MgCl₂ dalam media LB). Hasil ligasi dicampur, diinkubasi dalam es 30 menit, heat shock 90 detik pada suhu 42°C, kemudian dikultur diplate agar selama satu malam dengan kanamycine.

Klon klon yang didapatkan dianalisa dengan mempergunakan enzim restriksi *EcoRV* (satu site dalam insert), *EcoRI* dan *HindIII* (kedua enzim terakhir untuk menentukan arah Sens atau Anti-Sens). Fragment diseparasi dengan elektroforesis agarose.

Preparasi dan purifikasi plasmid yang dipakai untuk transfeksi dilakukan dengan menggunakan Endofree plasmid kit (Qiagen).

Kultur sel line J-774 :

Sel J-774 di kultur pada kaca bundar dalam plat kultur 24 sumuran, dalam 1 ml media (RPMI, 5.10⁻³ M glutamine, 10% fetal calf serum) (1.10⁵ sel per ml) dan inkubasi pada 37°C dan 5% CO₂.

Transfeksi sel line J-774

Untuk memasukkan vektor yang mengekspresikan annexin 1 sebagai protein yang berfusi dengan GFP, transfeksi dilakukan dengan menggunakan reagen LipofectAmine (Life Technologies). 10 μ l reagen dicampur dengan 2-4 μ g plasmid, inkubasi 15 menit (20°C) kemudian dimasukkan kedalam sumuran kultur sel J-774 dan inkubasi selama 1 jam (37°C, 5% CO₂). Sesudah tahap pencucian, sel dikultur kembali selama satu malam.

Kultur *Brucella*, pewarnaan bakteri dan phagositosis

Brucella dikultur dalam TS (*tryptic soy broth*) selama satu malam (37°C). Sesudah sentrifugasi, bakteri dilarutkan dalam PBS kemudian diwarnai dengan rhodamine. Pada larutan bakteri (10⁹ bakteri dalam 1 ml PBS) ditambahkan 10 μ l NHS-Rho (N-hydroxysuccinimidyl 5- (dan -6)-carboxytetramethyl-rhodamine (Sigma) (10 mg/ml dalam DMSO). Inkubasi 30 menit dengan agitasi, pada 4°C diruang gelap. Tahap pencucian kemudian reaksi diberhentikan dengan 1 ml PBS-Tris (900 μ l PBS, 100 μ l Tris M pH 8,3), 4°C, agitasi, ruang gelap selama 15 menit. Bakteri kemudian dicuci dengan PBS dan dilarutkan dalam RPMI.

Phagositosis dilaksanakan dengan inkubasi bakteri dengan sel J-774 selama 5 menit dan 30 menit (37°C).

Mikroskop fluorescent

Sesudah phagositosis, sel J-774 dicuci dengan PBS kemudian difiksasi dengan formaldehyde 3,7% dan selanjutnya ditempelkan pada gelas objek dengan menggunakan moviol dan sel di-observasi dengan mikroskop fluorescent dibuat dengan Cool View

Camera (Photonis Science, UK) dan gambar prosessor dihubungkan ke Leica DM IRB mikroskop (Leica, France). Filter yang digunakan untuk mendeteksi GFP fluorescence terdiri dari bandpass filter (450-490 nm), sebuah kaca dichroic (510 nm) dan emisi bandpass filter (515-560 nm). Filter digunakan untuk mendeteksi cahaya rhodamin terdiri dari sebuah bandpass filter (515-560 nm), sebuah kaca dichroic dan emisi filter (> 590 nm).

Analisis hasil

Observasi dilakukan secara mikroskopik. Akan dilihat apakah annexin 1 exogen yang berfusi dengan GFP (jadi berwarna hijau) tetap berasosiasi dengan phagosome berisi *Brucella* pada tahap akhir phagositosis. Kedua apakah ada perbedaan antara jumlah bakteri yang diphagositosiskan pada sel J-774 yang mengekspresi tinggi annexin 1 (exogen) dengan jumlah bakteri pada sel J-774 yang hanya mengekspresikan annexin 1 endogen. Analisa hasil dilakukan dengan T-test.

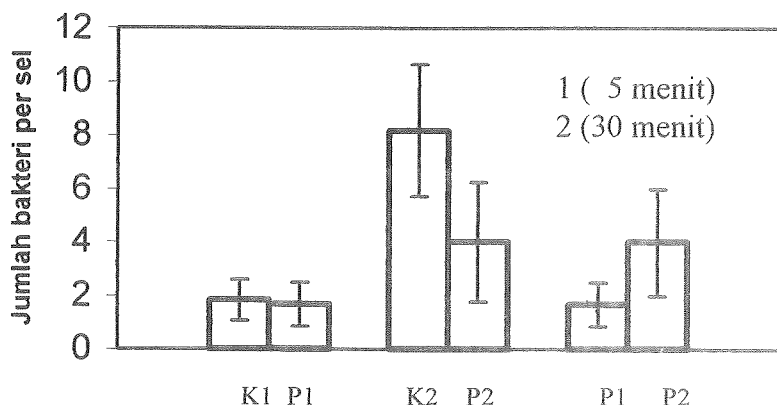
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan vektor ekspresi annexin 1 :

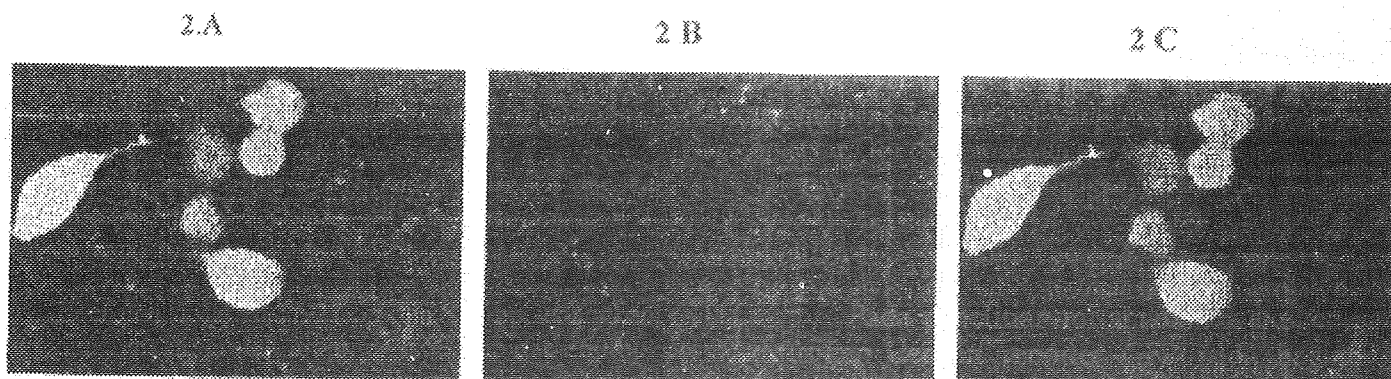
Transfeksi bereksresi sementara dapat digunakan untuk mempelajari mekanisme fungsi protein. Penulis menggunakan pendekatan dengan meneliti fungsi annexin 1 yang terlibat dalam phagositosis. Kusumawati *et al.*, 1999 meneliti efisiensi transfeksi pada sel line makrofag seperti sel line J-774, THP-1, HL-60 dan U-937 sangat rendah dan level ekspresi cDNA yang dimasukkan tidak diketahui, dengan penggunaan reporter seperti GFP, dapat secara langsung mengidentifikasi sel yang tertransfeksi dengan menggunakan mikroskop fluorescent tanpa menggunakan antibodi (Kusumawati *et al.*, 2001). Pada penelitian ini cDNA annexin 1 akan diekspresi sebagai protein yang berfusi dengan Green fluorescent Protein dari *Aequorea victoria* yaitu vektor pEGFP/C1 pada N-terminal (tertera pada cara penelitian). Transfeksi dengan menggunakan 10 μ l Lipofectamin^R dan 2 μ g cDNA annexin 1 diperoleh 5-10 % sel yang tertransfeksi hasil ini dapat langsung terdeteksi berkat autofluorescence GFP, maka annexin 1 akan dapat diobservasi dengan mikroskop fluorescent (Gambar 2). Klon klon yang didapatkan dianalisa dengan mempergunakan enzim restriksi *EcoRV* (satu site dalam insert, 6.751 bp), *EcoRI* dan *HindIII* (kedua enzim terakhir untuk menentukan arah Sens atau Anti-Sens). Fragment diseparasi dengan elektroforesis agarose didapat dengan enzim *EcoRI*, mRNA annexin 1 dengan arah sens diperoleh dua fragmen yaitu 5.751 bp dan 50 bp dan yang mRNA annexin 1 anti sens diperoleh fragmen 5.721 bp dan fragmen 1.080 bp. Penggunaan enzim *HindIII* ekspresi mRNA annexin

sens diperoleh fragmen 5.921 bp dan 870 bp sedangkan yang anti sens diperoleh fragmen 6.531 bp dan 260 bp. Konstruksi annexin 1 exogen diekspresikan dibawah kontrol promotor CMV yang difusi dengan protein GFP pada N-terminal, dan hasil annexin 1 yang difusi dengan GFP hasil ekspresinya sangat tinggi dan sel

Pada penelitian ini annexin 1 exogen yang difusikan dengan reporter GFP pada bagian N-terminal, kemudian ditransfeksikan pada sel line J-774, selama satu malam dalam incubator 5% CO₂, pada temperatur 37°C dan dilanjutkan dengan infeksi 5 menit dan 30 menit, terlihat pada



Gambar 1. Phagositosis *Brucella suis* pada sel line J-774 dengan ratio sel : bakteri (1 :500). Kontrol (K) sel line J-774 tanpa annexin exogen dan Perlakuan (P) dengan ekspresi annexin 1 exogen dengan infeksi 5 menit (1) dan 30 menit (2).



Gambar 2. Phagositosis *Brucella suis* (merah) infeksi selama 30 menit pada sel line J-774 ditransfeksi dengan annexin 1 exogen yang difusikan dengan reporter GFP (hijau). Sel line J-774 yang terekspresi annexin 1 exogen yang berfusi dengan reporter GFP (hijau), sel line J-774 tanpa ekspresi, tiap sel mengandung beberapa bakteri *Brucella suis* (2A). Bakteri *Brucella suis* yang diwarnai dengan NHS-Rhodamin (2B) dan sel J-774 yang terekspresi annexin 1 exogen yang berfusi dengan GFP (2C).

sangat mudah diidentifikasi. Dalam penelitian ini preparasi dan purifikasi plasmid yang dipakai untuk transfeksi menggunakan *Endofree plasmid kit* (Qiagen).

Observasi phagositosis *Brucella suis* secara mikroskopik pada sel yang berekspresi annexin 1 exogen yang berfusi dengan GFP.

gambar 1, pada infeksi 5 menit *Brucella suis* tidak terlihat signifikan jumlah bakteri yang terphagositosis pada sel yang tidak terekspresi exogen annexin GFP(K1) maupun sel yang terekspresi annexin 1 exogen GFP(P1) dengan rata-rata 2 bakteri, sedangkan pada infeksi 30 menit terlihat adanya signifikan ($P < 0.01$) pada sel yang tidak terekspresi exogen annexin 1 GFP, terlihat rata-rata jumlah bakteri

lebih banyak (K_2 ; $8,17 \pm 2,48$) dan rata-rata 3 bakteri (P_2 ; $3,33 \pm 2,25$) pada sel yang terekspresi exogen annexin 1 GFP (Gambar 1 dan 2) ini berarti bahwa annexin 1 exogen dapat menurunkan jumlah bakteri phagositosis namun mekanisme yang digunakan belum diketahui. Namun hasil ini merupakan argumen lebih lanjut mengenai pentingnya annexin 1 dalam proses phagositosis dan secara tidak langsung juga memperkuat hipotesis adanya interaksi langsung antara *Brucella* patogen dengan annexin 1 dan atau adanya kompetisi antara keduanya terhadap kompleks phagosomal. Pada gambar 1, terlihat pula peningkatan jumlah bakteri yang terphagositosis yang signifikan ($P < 0,05$) dengan bertambahnya waktu.

Pada pengamatan ekspresi exogen annexin 1 yang difusikan dengan GFP (Gambar 2A atau 2C) pada sitoplasma ataupun phagosom tidak ditemukan lagi struktur granuler, hal ini mungkin disebabkan karena autofluorescent GFP yang sangat tinggi, karena diketahui bahwa vektor untuk GFP dibawah kontrol promotor CMV. Pada infeksi 5 menit dan 30 menit juga tidak terlihat lokalisasi annexin 1 disekitar phagosom bakteri *Brucella suis*, ini berarti sekret *Brucella suis* masih sanggup menghilangkan annexin 1 disekitar phagosom dan kemungkinan lain karena ekspresi yang tinggi pula sehingga peneliti susah menginterpretasikan kondisi phagosom bahwa mekanisme yang terlibat dalam pengaturan harus diamati lebih lanjut. Menurut Kusumawati *et al.* (2000), struktur annexin 1 endogen yang dilabel dengan antibodi annexin 1 rhodamin terlihat jelas struktur granuler annexin 1 di bawah membran, di sitoplasma ataupun phagosom, dan terlihat adanya lokalisasi annexin 1 maupun filament actin. Struktur granuler masih tetap terlihat pada annexin 1 exogen yang dilihat dengan menggunakan antibodi annexin 1 berlabel rhodamin pada phagositosis menggunakan latex-beads ditempat yang sama (Kusumawati dan Sri Widada, 2001). Menurut Harricane *et al.* (1996) bahwa annexin 1 dikolokalisasi dengan *Yeast*, *E. coli JM 109* atau *Brucella* yang telah mati pada tahap akhir phagosom, dan protein tersebut hilang pada tahap akhir dengan menggunakan *Brucella* hidup yang diopsonisasi dan diinternalisasi pada sel line U-937. Ini berarti bahwa annexin 1 terlibat pada trafik phagosomal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Universitas Gadjah Mada yang telah memberi dana penelitian melalui anggaran DIKS-UGM, No : 754/P/LPN/2001 dan Pimpinan Pusat Studi Bioteknologi UGM atas fasilitas Laboratorium dan tenaga teknis. Penghargaan yang setinggi-tingginya penulis sampaikan kepada DR. J. Sri Widada dan DR. Francois Porte atas diskusi tentang molekuler dan

selluler dan Prof. drh. Hastari Wuryastuti, M.Sc, Ph.D. yang memberikan masukan dalam penulisan makalah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Arenas, G.M., Staskevitch, A.S., Aballay, A. & Mayorga, L.S., 2000. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect. Immun.*, **68** : 4255-4263.
- Baldwin, CL., Winter, A.J., 1994. Macrophage and *Brucella*. *Immunol. Ser.*, **60** : 363-380.
- Burgoyne, R.D. & Geisow, M.J., 1989. The annexin family of calcium binding proteins. *Cell Calcium*, **10**: 1-10.
- Crégut, D., Liautard, J.P. & Chiche, L., 1994. Homology modelling of annexin I: implicit solvation improves side-chain prediction and combination of evaluation criteria allows recognition of different types of conformational error. *Prot. Eng.*, **7**:1333-1334.
- Creutz, C.E., 1992. The annexins and exocytosis. *Science*, **258**: 924-931.
- Diakonova, M., Gerke, V., Ernst, J., Liautard, J.P., Van der Vusse, G. & Griffith, G., 1997. Localization of five annexins in J774 macrophages and on isolated phagosomes. *J. Cell. Sci.*, **110**: 1199-1213.
- Detileux, P.G., Deyoe, B.L., Cheville, N.F., 1990. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cell *in vitro*. *Infect. Immun.*, **58**: 2320-2328.
- Drust, D.S. & Creutz, C., 1988. Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. *Nature*, **331**: 88-91.
- Favier-Perron, B., Lewit-Bentley, A. & Russo-Marie, F., 1996. The high resolution crystal structure of human annexin III shows subtle differences with annexin V. *Biochemistry*, **35**: 1740-1744.
- Harricane, M.C., Caron, F., Porte, F. & Liautard, J.P., 1996. Distribution of annexin I during non-pathogen or pathogen phagocytosis by confocal imaging and immunogold electron microscopy. *Cell. Biol. Int.*, **20**: 193-203.

- Hoekstra, D., Buist-Arkema, R., Klappe, K. & Reitelingsperger, C.P.M., 1993. Interaction of annexins with membranes: the N-terminus as a governing parameter as revealed with a chimeric annexin. *Biochemistry*, **32**: 14194-14202.
- Huber, R., Berendes, R., Burger, A., Schneider, M., Karshikov, M. & Luecke, H., 1992. Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implication for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins. *J. Mol. Biol.*, **223**: 683-704.
- Isacke, C.M., Lindberg, R.A. & Hunter, T., 1989. Synthesis of p36 and p35 increased when U937 cells differentiate in culture but expression is not inducible by glucocorticoids. *Mol. Cell. Biol.*, **9**: 232-240.
- Kusumawati, A., Cazevieuille, C., Porte, F., Bettache, S., Liautard, J.P. & Sri Widada, J., 2000. Early events and implication of F-actin and annexin I associated structures in the phagocytic uptake of *Brucella suis* by the J-774A.1 murine cell line and human monocytes. *Microb. Pathog.*, **28**: 343-352.
- Kusumawati, A., Liautard, J.P. and Sri Widada, J., 2001. Implication of annexin I in phagocytosis: effects of N-terminal domain deletions and point mutations of the phosphorylation site Ser-27. *Cell Biol. Intern.*, **25**: 809-813
- Kusumawati, A., and Sri Widada, J., 2001. Use of GFP (Green fluorescent protein) for monitoring annexin I function in phagocytosis. *Ind. Jour. Biotech.* In press.
- Le Cabec, V. & Maridonneau-Parini, 1994. Annexin 3 is associated with cytoplasmic granules in neutrophils and monocytes and translocates to the plasma membrane in activated cells. *Biochem. J.*, **303**: 481-487.
- Liautard, J.P., 1996. Interactions between professional phagocytes and *Brucella spp.* *Microbiologia*, **12**: 197-206.
- Lin, H.C., Sudhof, T.C. & Anderson, R.G.W., 1992. Annexin VI is required for budding of clathrin-coated pits. *Cell*, **70**: 283-291.
- Luecke, H., Chang, B.T., Maillard, W.S., Schlaepfer, D.D. & Haigler, H.T., 1995. Crystal structure of the annexin XII hexamer and implication for bilayer insertion. *Nature*, **378**: 512-515.
- Mayorga, L.S., Beron, W., Sarrouf, M.N., Colombo, M.I., Creutz, C.E. & Stahl, P.D., 1994. Calcium-dependent fusion among endosomes. *J. Biol.Chem.*, **269**: 30927 -30934.
- Porte, F., de Santa Barbara, P., Phalipou, S., Liautard, J.P. & Sri Widada, J., 1996. Change in the N-terminal domain conformation of annexin I that correlates with liposomes aggregation is impaired by Ser-27 to Glu mutation that mimics phosphorylation. *Biochim., Biophys. Acta*, **1293**: 177-184.
- Porte, F., Liautard, J.P. & Köhler, S., 1999. Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect. Immun.*, **67**: 4041-4047.
- Raynal, P. & Pollard, H.B., 1994. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1197**: 63-93.
- Sarafian, T., Pradel, L.A., Henry, J.P., Aunis, D. & Bader, M.F., 1991. The participation of annexin II (calpactin I) in calcium-evoked exocytosis requires protein kinase C. *J. Cell. Biol.*, **114**: 1135-1147.
- Weng, X.W., Luecke, H., Song, I.S., Kang, D.S., Kim, S.H. & Huber, R., 1993. Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution. *Prot. Sci.*, **2**: 448-458.