

**Komponenten des gerichteten Proteintransports
in Säugetierzellen**

von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von
Dipl.-Biol. Martin Heine
geboren am 29. November 1976 in Springe

Referent: Prof. Dr. Ralf Jacob

Korreferent: Prof. Dr. Hassan Y. Naim

Tag der Promotion: 25. November 2005

Kurzbeschreibung

Der intrazelluläre Proteintransport verläuft in Säugetierzellen über den sekretorischen Transportweg vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran. Hierbei stellt sich die Frage nach zentralen Transportmechanismen auf molekularer Ebene. So konnten in der Arbeitsgruppe zwei Modellproteine etabliert werden, die beide in die apikale Membran polarer Zellen transportiert werden, sich dabei aber sowohl in ihrer Topologie als auch in ihrer Assoziation mit der Lipiddoppelschicht unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit soll anhand molekularbiologischer und biochemischer Untersuchungen der Einfluß dieser Unterschiede auf die Einsortierung in Transportvesikel und deren Interaktion mit Cytoskelettkomponenten aufgeschlüsselt werden.

Hierfür werden Fusionsproteine aus den zu untersuchenden Eiweißen und verschiedenen fluoreszierenden Reporterproteinen erzeugt, deren Einbau in Transportvesikel auch in lebenden Zellen untersucht werden kann. Durch den Einsatz von Komponenten des Cytoskeletts, die ebenfalls mit Reporterproteinen fusioniert sind, wird deren Rolle im intrazellulären Transportvorgang an die apikale Zelloberfläche analysiert. Protein-Protein-Bindungsstudien, Massenspektroskopie, RNA-Interferenz, Westernblots und Aktivitätsstudien sollen darüber hinaus zur Identifikation der vesikulären Komponenten führen, die für die Interaktion mit dem Cytoskelett notwendig sind.

Schlagerworte: Proteintransport, Cytoskelett, Endosomen

Abstract

The intracellular protein transport in mammalian cells proceeds along the secretory pathway, starting from the endoplasmic reticulum along the Golgi complex to the plasma membrane. This does raise the question for the underlying transport mechanism on molecular level. For this analysis, our working group could establish two model proteins, which are both transported to the apical membrane of polar cells, but differ in topology as well as association with the lipid bilayer. The study at hand investigates the role of these differences for sorting into transport vesicles and interaction with the cytoskeleton by biomolecular and biochemical methods.

To do so, fusion proteins from fluorescent reporter proteins and the individual proteins of interest are created, a method that allows to study their inclusion into transport vesicles also in living cells. By using also components of the cytoskeleton for this, their role in intracellular transport to the apical membrane can be analyzed, too. Furthermore, protein-protein binding studies, mass spectrometry, RNA interference, western blots and kinase assays shall identify those vesicular components required for interaction with the cytoskeleton.

Keywords: protein transport, cytoskeleton, endosomes

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	7
1.1 Zum Inhalt	7
1.2 Polare Proteinsortierung	9
1.2.1 Sekretorischer Transportweg	9
1.2.2 Polare Epithelzellen	12
1.2.3 Sortiersignale	13
1.2.4 Apikale und basolaterale Transportwege	14
1.2.5 Zwei Populationen apikaler Vesikel	15
1.3 Das Cytoskelett	16
1.4 Wesentliche Proteine der vorliegenden Arbeit	19
1.4.1 Lactase-Phlorizin-Hydrolase	19
1.4.2 Saccharase-Isomaltase	21
1.4.3 Myosin Ia	23
1.4.4 Annexin A2 und S100A10	27
1.4.5 Alpha-Kinase 1	31
2 Unterschiedliche Cytoskelettbahnen leiten einzelne Vesikelpopulationen an die apikale Membran der Epithelzellen	35
2.1 Die Rolle einzelner Cytoskelettkomponenten	35
2.1.1 Konfokalmikroskopische Beobachtung	36
2.1.2 Biochemische Analysen und Aktin-Bindungsstudien	41
2.1.3 Myosin Ia	41
2.2 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Rolle des Cytoskeletts	42
3 Annexin A2 ist erforderlich für apikale Transportvorgänge in polaren Epithelzellen	43
3.1 Assoziation von Annexin A2 mit SAV nach Verlassen des TGN	43
3.2 Untersuchung der Bedeutung von Annexin A2 für den SAV-Transport	44
3.2.1 Konfokalmikroskopische Kolokalisationsstudien	44
3.2.2 Drosselung der Annexin A2-Expression durch siRNA	46
3.3 Zusammenfassung der Rolle des Annexin A2 für den SAV-Transport	49
4 Alpha-Kinase 1, eine neue Komponente im apikalen Proteintransport	51
4.1 Alpha-Kinasen	51
4.2 Untersuchung der Rolle der ALPK1 beim SAV-Transport	52
4.2.1 Assoziation der ALPK1 mit SAV	52
4.2.2 Anstieg der ALPK1-Expression während der Polarisierung	52
4.2.3 Intrazelluläre Verteilung der ALPK1	55
4.2.4 Kinase-Assays zur näheren Beleuchtung der ALPK1-Funktion	56
4.2.5 Myosin Ia wird unmittelbar durch ALPK1 phosphoryliert	57
4.2.6 Kolokalisation von ALPK1 und Myosin Ia	58
4.2.7 Effekte einer ALPK1-Beeinträchtigung	59
4.3 Zusammenhang der ALPK1 mit dem SAV-Transport	62
5 Diskussion	63
6 Zusammenfassung	71
Anhang	73
Literaturverzeichnis	81

Abkürzungsverzeichnis

ALPK1	Alpha-Kinase 1
ANXA2	Annexin A2
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BBMI	<i>brush border myosin I</i>
BDM	2,3-Butandionmonoxim
bp	Basenpaare
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Caco-2	Darmepithelzell-Linie
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
COS	Affennierenzell-Linie
CPK	Konventionelle Proteinkinasen
CytoD	Cytochalasin D
Da	Dalton
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPP IV	Dipeptidylpeptidase IV
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
F-Aktin	Aktinfilamente
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinosit
GTP	Guanosintriphosphat
LAV	LPH-tragende apikale Vesikel
LPH	Lactase-Phlorizin-Hydrolase
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i>
MDCK	<i>Madin-Darby kidney cells</i>
MMI α	Myosin I alpha
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MYO1A	Myosin Ia
N-Terminus	Amino-Terminus
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RT	Reverse Transkription
SAV	SI-tragende apikale Vesikel
SDS	Natriumdodecylsulfat
SI	Saccharase-Isomaltase
SI _c	komplex-glykosylierte Form der SI
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
TFP	Trifluorperazin
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
VSV-G	Glykoprotein des Vesikulären Stomatitisvirus
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

1. Einleitung

1.1 Zum Inhalt

Die vorliegende Arbeit faßt die Erkenntnisse zum Proteintransport der drei nachfolgend genannten Publikationen zusammen, soweit sie unter Beteiligung des Verfassers in den Jahren 2002 bis 2005 zunächst in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hassan Y. Naim sowie anschließend in jener von Prof. Dr. Ralf Jacob gewonnen werden konnten:

»Distinct cytoskeletal tracks direct individual vesicle populations to the apical membrane of epithelial cells« CURRENT BIOLOGY, 2003

»Annexin II is required for apical transport in polarized epithelial cells« JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2004

»Alpha-kinase 1, a new component in apical protein transport« JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2005

In der ersten Veröffentlichung konnte auf Grundlage zweier Modellproteine, der Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) und der Saccharase-Isomaltase (SI), nachgewiesen werden, daß diese sich - obgleich in polaren Epithelzellen beide zur apikalen Zellmembran transportiert - entlang teilweise unterschiedlicher Cytoskelett-Komponenten bewegen. In Herausarbeitung weiterer Unterschiede zwischen den jeweils gebildeten Vesikelpopulationen - bezeichnet als SI- bzw. LPH-tragende apikale Vesikel (SAV/LAV) - konnten in den folgenden Publikationen zudem einzelne Proteine identifiziert werden, die nur an den SAV, nicht aber den LAV beteiligt sind. Hierbei handelt es sich um die Proteine Myosin Ia, Annexin A2, S100A10 und Alpha-Kinase 1.

Als Einführung in das Thema wird in der Einleitung der Sekretorische Transportweg beschrieben, wobei das Augenmerk auf der Proteinsortierung während und nach der Passage des *trans*-Golgi-Netzwerks liegt. Auch das Cytoskelett im allgemeinen sowie SI, LPH und die nachfolgend identifizierten Proteine werden kurz vorgestellt. Sodann werden die wesentlichen Versuche und Ergebnisse der genannten drei Publikationen in den Kapiteln 2 - 4 dargelegt, sofern der Verfasser an diesen beteiligt war. Für den Zusammenhang bedeutsame Abbildungen ohne Eigenbeteiligung finden sich im Anhang. Eine übergreifende Diskussion in Kapitel 5 faßt schließlich die Inhalte der einzelnen Veröffentlichungen zusammen.

1.2 Polare Proteinsortierung

1.2.1 Sekretorischer Transportweg

Die große strukturelle und funktionale Komplexität der Säugetierzellen sowie ihre Spezialisierung innerhalb des Gesamtorganismus erfordern zu ihrer Errichtung und Aufrechterhaltung einen effektiven Organisationsapparat auf molekularer Ebene. Als Übersetzungsprodukt der Erbsubstanz, Hauptbestandteil der Zelle und Träger vielfältiger Funktionen vom Baustoff bis zum Boten, kommt den Proteinen auch hierbei eine herausragende Rolle zu, ihrem Namen entsprechend (*proteuo*, gr.: »ich nehme den ersten Platz ein«). Sie stellen nämlich nicht nur von jenem dezentralen Apparat gelenkte und modifizierte Zellbestandteile dar, sondern sind auch selbst Komponenten desselben.

Ein bedeutender Funktionsbereich dieser Organisation ist der zielgerichtete Transport neusynthetisierter Proteine zu ihren jeweiligen Bestimmungsorten. Neben den unterschiedlichen Organellen der Säugetierzellen zählt hierzu auch die Plasmamembran - entweder als Endstation oder zur Ausschleusung aus der Zelle hinaus. Dieser sogenannte Sekretorische Transportweg ^[168], den neben den namensgebenden freizusetzenden Proteinen auch die für die Lysosomen sowie die Plasmamembran bestimmten Eiweiße nehmen, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Die durch die Ribosomen vorgenommene Translation der von den Nukleinsäuren kodierten Proteinbaupläne in Polypeptidketten erfolgt hierbei nicht ins Cytoplasma hinein, sondern durch die Membran des Endoplasmatischen Reticulums (ER) hindurch in dessen Lumen. Veranlaßt wird dies durch eine Signalsequenz von sechs bis zwanzig hydrophoben Aminosäuren im entstehenden Polypeptidstrang^[109,180,226,227] (Abb. 1.1).

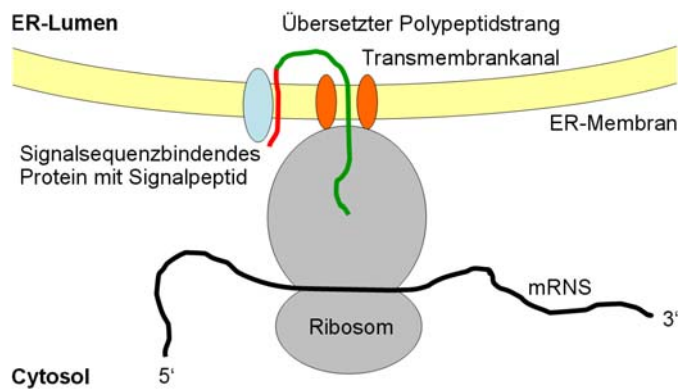


Abb. 1.1 Die Translation der mRNS erfolgt bei Proteinen des Sekretorischen Transportwegs aufgrund einer vorgeschalteten Signalsequenz in das Endoplasmatische Reticulum hinein

Im ER finden erste posttranslationelle Modifikationen am neugebildeten Polypeptid statt: Disulfidbrücken bilden sich aus, Chaperone sorgen für eine korrekte Faltung der Polypeptidkette und es erfolgt gegebenenfalls die Zusammenfügung einzelner Untereinheiten^[47,57,81,118,219,236]. Neben diesen nur im ER vorgenommenen Prozessen finden hier an den entsprechenden Signalsequenzen aber auch bereits erste Glykosylierungsschritte statt^[67].

Bei letzteren handelt es sich im ER ausschließlich um N-glykosydische Verknüpfungen^[108]. Nur korrekt gefaltete und zusammengefügte Proteine werden weitertransportiert - alle übrigen werden zusammen mit jenen, deren Zielkompartiment bereits das ER selbst ist, entweder direkt hier zurückgehalten oder aber aus dem *cis*-Golgi-Netzwerk zurückgeschleust^[73]. Ihr Abbau erfolgt nach einer Retrotranslokation zurück ins Cytosol über das Ubiquitin-Proteasom-System^[15,16,82,179].

Die nächste Station der übrigen Proteine ist der Golgi-Apparat^[177], welcher vom *cis*- bis zum *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) durchwandert wird^[70,185]. Hier erfolgen weitere Modifikationen, vor allem die terminale Glykosylierung und proteolytische Spaltungen^[155,156,159], sowie die Sortierung für den Transport zu den verschiedenen Zielorten der jeweiligen Proteine - im Falle von SI und LPH also zur Plasmamembran^[92,93,153,176,187]. Als Transportbehälter dienen hierbei sowohl kleinere membranbegrenzte Vesikel von weniger als 250 nm Durchmesser als auch größere, tubuläre Strukturen^[83]. Am Ziel angelangt, kommt es zur Exocytose, d.h. der Fusion mit der Plasmamembran und der Freisetzung der sekretorischen Proteine (*Abb. 1.2*).

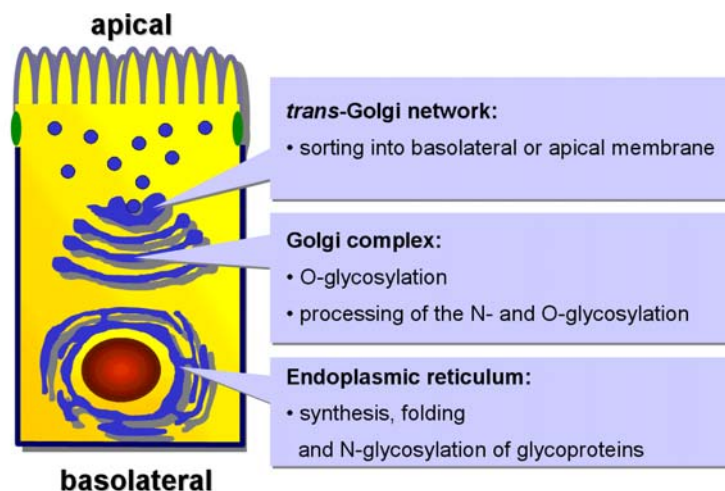


Abb. 1.2 Der Sekretorische Transportweg erfolgt vom Endoplasmatischen Reticulum über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran (*Grafik: R. Jacob*)

1.2.2 Polare Epithelzellen

Die Studien der vorliegenden Dissertation wurden u.a. anhand polarer Epithelzellen durchgeführt. Diese zeichnen sich durch die Unterteilung ihrer Plasmamembran in zwei von sogenannten *tight junctions* separierte Bereiche unterschiedlicher Zusammensetzung und Funktion aus^[85,151,190,191,208]. Die Errichtung und Aufrechterhaltung dieser Polarität durch selektiven Transport und/oder selektive Stabilisierung vor Ort ist Teil der Aufgaben des zellulären Organisationsapparates^[136]. Die Epithelzellen als solche dienen neben dem Schutz und der Abgrenzung einzelner Körperregionen insbesondere der Regulation der molekularen Bestandteile ihrer jeweiligen Gewebereiche sowie des Austausches mit der Umgebung^[116,124,189]. Ein Beispiel hierfür sind die Zellen des Darmepithels: die apikale Domäne ragt dabei ins Darmlumen hinein und reichert jene Proteine und Lipide an, die etwa zur Aufspaltung oder Aufnahme von Nahrungsbestandteilen dienen, während der übrige, basolaterale Plasmamembranbereich für den Austausch der gewonnenen Nährstoffe mit den Nachbarzellen sowie der Blutbahn zuständig ist^[7,38,41,77,92,116,141,190,225]. Die Barrierefunktion der *tight junctions* verhindert hierbei einen parazellulären Stofftransport über das gesamte Epithel, so daß ein Stoffaustausch nur noch transzellulär - und somit kontrollierbar - erfolgen kann^[3].

1.2.3 Sortiersignale

Die molekularen Mechanismen, die der Sortierung hin zur apikalen oder basolateralen Membran zugrundeliegen, werden derzeit intensiv erforscht. So konnten bereits verschiedene Sortiersignale für beide Transportwege identifiziert werden, welche im einzelnen über eine unterschiedlich starke Gewichtung verfügen^[98,142]. Eine solche Auftrennung der Proteine erfolgt anhand ihrer primären, sekundären oder tertiären Struktur im TGN oder, etwa auf dem Weg über die basolaterale Membran, in den Endosomen^[25,70,135,136,144,151,174,186,188], woraufhin sie in strukturell voneinander verschiedene Transportvesikel aufgenommen werden^[10,109,151,230]. Die Signalsequenzen wirken dabei positiv oder negativ auf die Proteine, d.h. sie sorgen entweder für die Aufnahme in einen bestimmten Transportweg oder aber halten sie zurück^[151].

Verantwortlich für den Transport zu bzw. das Festhalten an der basolateralen Membran sind etwa bestimmte cytoplasmatische Aminosäuresequenzen (z.B. YXX Φ , LL or IL)^[6,18,27,84,88,89,115,138,139,147,221], die von entsprechenden Adapterproteinen erkannt werden^[52,207], oder das Anheften dieser Proteine an das Ankyrin des dortigen Cytoskelett-Netztes^[72]. Apikale Signale hingegen wurden nicht nur im cytoplasmatischen Teil der Proteine gefunden, sondern auch im Transmembran- und extrazellulären Bereich^[29,93,122]. So fungieren etwa O-Glykane^[2,93,154,235] oder eine Membranverankerung über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) als apikales Sortiersignal^[20,58,123,125,209]. Auch N-Glykane sind offenbar in einigen Fällen beteiligt^[11,202]. Eine wichtige, wenn auch nicht hinreichende Funktion bei einem Teil der apikalen Transportsysteme nehmen darüber hinaus sphingolipid- und cholesterolreiche Membranmikrodomänen ein, sogenannte lipid rafts^[169,188,209,211], welche als Transportplattform beispielsweise für das Hämagglutinin des Influenza-Virus und GPI-verankerte Proteine beschrieben werden^[122,178,203,210], während sich basolaterale Proteine als nicht hiermit assoziiert erweisen^[21].

1.2.4 Apikale und basolaterale Transportwege

Während die Weiterleitung der basolateralen Proteine, wie etwa für das G-Protein des Vesikulären Stomatitits-Virus (VSV-G) gezeigt, vom TGN zur Plasmamembran nahezu einheitlich erfolgt^[5,6,114,126,150,188], bestehen für den apikalen Transportweg je nach Zellsorte und Polypeptid bereits mindestens zwei prinzipielle Varianten, denn neben der direkten Route, wie sie etwa die Dünndarmenzyme SI und LPH nehmen^[2,77,79,113,114,154,157,189,190,216], ist auch der indirekte, transcytotische Weg über die basolaterale Membran bekannt, über den z.B. die Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) und nach jüngsten Erkenntnissen offenbar auch GPI-verankerte Proteine transportiert werden^[28,78,79,87,106,109,137,174].

In Hepatocyten dominiert der apikale Transport mittels Transcytose^[9,10,240]. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Caco-2- und MDCK-Zellen wurden beide Wege aufgezeigt^[151]. Demzufolge besitzen polare Epithelzellen mit dem TGN sowie dem Weg über die basolaterale Membran und das endosomale Kompartiment mindestens zwei Sortierzentren, welche möglicherweise zum Teil auch ähnliche Mechanismen aufweisen^[4,50,55,106,137].

1.2.5 Zwei Populationen apikaler Vesikel

Bereits im Vorfeld der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen konnte in unserer damaligen Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß zudem auch die direkt transportierten apikalen Membranproteine LPH und SI sich auf unterschiedliche Vesikel verteilen^[97]. Diese beiden Proteine repräsentieren zwei verschiedene Sorten - letzteres ist mit cholesterol- und sphingolipid-reichen Membran-Mikrodomänen assoziiert, sogenannten *lipid rafts*^[176], ersteres nicht^[192,235,237]. Während Jacob und Naim zeigen konnten, daß beide Proteine das TGN in gemeinsamen Vesikeln verlassen - allerdings bereits innerhalb dieser infolge der *raft*-Assoziation voneinander separiert - und erst später zu verschiedenen Vesikeln aufgetrennt werden (SAV & LAV), blieb zunächst die Frage offen, ob damit auch zwei verschiedene Transportwege verbunden sind^[97].

1.3 Das Cytoskelett

Das Cytoskelett besteht aus dynamischen, filamentösen Strukturen, die sich auf drei Sorten polymerer Stränge verteilen: Aktin-Filamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente. Durch das Cytoskelett wird der Zelle nicht nur Halt verliehen, sondern es dient auch einer Reihe weiterer Funktionen, wie Transportvorgängen, der Mitose oder der Ausbildung von Zellfortsätzen. Zudem sind die Verbindungen zwischen den einzelnen Zellen bzw. zu deren Matrix auf die Intermediärfilamente (im Falle der Desmosomen und Hemidesmosomen) und Aktinfilamente (etwa bei den *tight junctions*) gestützt.

Die Aktinfilamente bestehen aus dünnen Proteinfasern von 3 - 6 nm Durchmesser. In filamentöser Form spricht man von F-Aktin, beim globulären Einzelmolekül von G-Aktin. Dieses ist asymmetrisch aufgebaut, zur Differenzierung bezeichnet man daher seine Enden als Plus- bzw. Minus-Ende.

Motorproteine der Myosin-Familie vermögen an Aktinsträngen entlangzuwandern und führen beispielsweise zu Muskelkontraktionen oder Wanderbewegungen von Zellen. Vor allem aber stabilisieren die Aktinfilamente in netzartigen Anordnungen unterhalb der Plasmamembran und in Membranausbuchtungen (Mikrovilli, Pseudopodien) die äußere Form der Zelle und halten membranständige Proteine an ihrem Platz^[206].

Die Mikrotubuli sind Röhren von 20 - 25 nm Durchmesser und werden durch 13 parallel zueinander liegende Protofilamente gebildet, die ihrerseits Ketten aus im Wechsel aneinandergereihten α - und β -Tubulin-Molekülen darstellen (Abb. 1.3). Mikrotubuli verfügen ebenfalls über ein Plus- und ein Minus-Ende und wachsen mit letzterem von einem sogenannten Mikrotubuliorganisierenden Zentrum aus. Das Wachstum erfolgt am schnellsten und bevorzugt, aber nicht ausschließlich, am Plus-Ende.

Die Mikrotubuli bilden ein Stützgerüst für die Zellform und dienen als Straßennetz für den Transport von Vesikeln und Organellen (Abb. 1.4). Zudem formen sie die Spindelfasern für die Chromosomentrennung während der Mitose aus. Auch die Bewegung von Geißeln und Wimpern wird mittels Mikrotubuli erzeugt. Die Motorproteine der Mikrotubuli sind Kinesin und Dynein. Ersteres wandert anterograd zum Plus-Ende, letzteres retrograd zum Minus-Ende^[35].

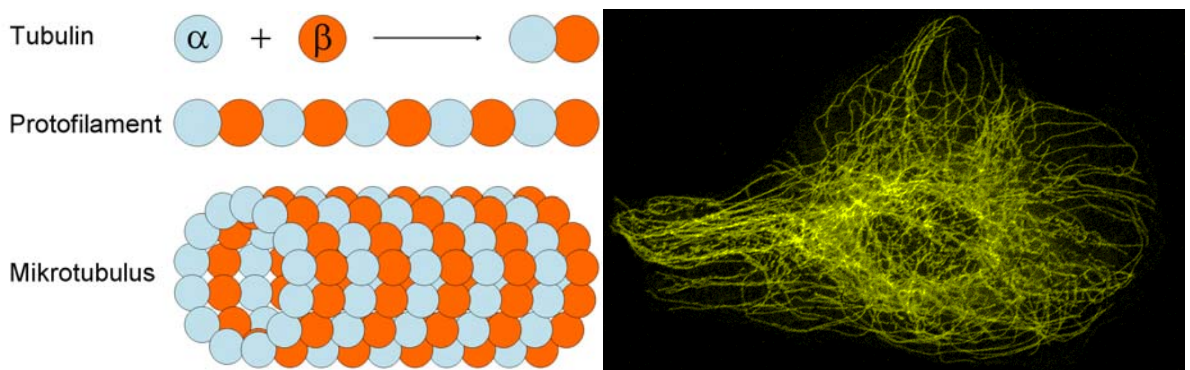


Abb. 1.3 Mikrotubuli sind Röhren aus jeweils 13 Tubulin-Protofilamenten

Abb. 1.4 Die Mikrotubuli dienen der Zelle vor allem für den Transport

Unter dem Begriff Intermediärfilamente faßt man schließlich eine Reihe von Proteinfilamenten zusammen, die alle sehr ähnliche Eigenschaften aufweisen. Ihr Durchmesser beträgt 8 - 11 nm. Sie können, da sie deutlich stabiler als Mikrotubuli und Aktinfilamente sind, am besten mechanische Zugkräfte aufnehmen. Aus diesem Grund dienen sie hauptsächlich der mechanischen Stabilisierung der Zellen, bilden also deren Stützgerüst.

Die Intermediärfilamente sind durch spezifische Proteine (Intermediärfilament-assoziierte Proteine, z.B. Desmoplakin) untereinander zu größeren Bündeln, sogenannten Tonofibrillen, verbunden. Diese Proteine dienen auch der Verbindung der Intermediärfilamente mit den anderen Elementen des Cytoskeletts. Die Intermediärfilamentproteine selbst werden in vier Sorten unterteilt: Keratine (saure wie basische), die in Epithelzellen vorkommen, Desmine (z.B. in Muskelzellen), Neurofilamente (Neuronen) und Lamine (Zellkern). Der Aufbau der Intermediärfilamente erfolgt dergestalt, daß zunächst die Monomere sich zu Dimeren aneinanderlagern und diese sodann Tetramere bilden. Acht Tetramere schließlich bilden das Intermediärfilament^[54].

1.4 Wesentliche Proteine der vorliegenden Arbeit

1.4.1 Lactase-Phlorizin-Hydrolase

Bei der Lactase-Phlorizin-Hydrolase handelt es sich um ein intestinales Glykoprotein mit einer hydrolytischen Disaccharidase-Aktivität, das sich in der Bürstensaummembran der Dünndarm-Epithelzellen findet. Ihre Aufgabe ist es, die Doppelzucker Lactose (Hauptkohlenhydrat der Säugetiermilch) sowie Phlorizin und β -Glykosylceramid in Einfachzucker aufzuspalten, so daß diese dann von den Zellen aufgenommen werden können. Die Aktivität der Lactase nimmt im Gegensatz zu anderen Disaccharidasen im Laufe der Kindheit ab, lediglich bei Kaukasiern und deren Nachkommen sowie einigen isolierten Stämmen Afrikas bleibt sie zeitlebens auf hohem Niveau erhalten und garantiert somit fortgesetzte Milchverträglichkeit^[172,231].

Das primäre Translationsprodukt der humanen LPH setzt sich aus insgesamt 1927 Aminosäuren zusammen und ist in unterschiedlichen Proteinsubdomänen organisiert. Ein kurzes amino-terminales (N-terminales) Signalpeptid, bestehend aus 19 Aminosäuren (Met¹-Gly¹⁹), leitet das Protein zur ER-Membran und wird anschließend abgespalten^[228]. Am C(arboxy)-Terminus bewirkt ein hydrophober Abschnitt von ebenfalls 19 Aminosäuren (Ala¹⁸⁸³-Leu¹⁹⁰¹), der die Lipiddoppelschicht der Membran durchspannt, die Verankerung des Proteins^[132]. Da der C-Terminus ins Cytosol und der N-Terminus ins ER-Lumen ragt, handelt es sich bei der LPH um ein Typ I-Membranprotein.

Die mannosereiche Form der pro-LPH weist ein Molekulargewicht von 215 kDa auf, die komplex-glykosylierte eines von 230 kDa; bei der fertig prozessierten LPH sind es nur noch 160 kDa^[94,158]. Neben der N- erfolgt auch eine O-Glykosylierung^[108], eine direkte Beteiligung dieser Zuckerketten an der Sortierung der LPH konnte jedoch ausgeschlossen werden.

Mit mindestens 90% der Moleküle wird die LPH überaus zuverlässig zur apikalen Membran befördert^[170].

1.4.2 Saccharase-Isomaltase

Wie die LPH, ist auch die Saccharase-Isomaltase eine membranständige Disaccharidase des Dünndarms. Beide Untereinheiten spalten die α -glykosidisch verknüpften Doppelzucker Saccharose und Maltose bzw. Isomaltose in ihre Einzelkomponenten auf^[90]. Ist die SI selbst oder ihr Transport an die Plasmamembran beeinträchtigt, so kommt es zu einer Mangelerkrankung (*congenital sucrase-isomaltase deficiency*, CSID), die sich klinisch als osmotische Diarrhö nach der Aufnahme von Di- oder Oligosacchariden manifestiert^[222].

SI ist im Gegensatz zur LPH ein Membranprotein vom Typ II, d.h. sie trägt an ihrem N-Terminus eine ER-Translokationssequenz, die gleichzeitig als Membrananker fungiert^[90]. An die 20 Aminosäuren große Membranankerdomäne schließt sich eine Serin/Threonin-reiche Stab-Domäne an, die stark O-glykosyliert ist^[93]. In der Plasmamembran angelangt, wird eine Trypsin-Spaltungsstelle zwischen der Saccharase-Untereinheit einerseits und dem Restmolekül mit der Isomaltase-Untereinheit andererseits im intestinalen Lumen durch pankreatische Sekrete gespalten^[79], woraufhin beide Untereinheiten aber dennoch über nicht-kovalente ionische Interaktionen miteinander verbunden bleiben^[159] (*Abb. 1.5*).

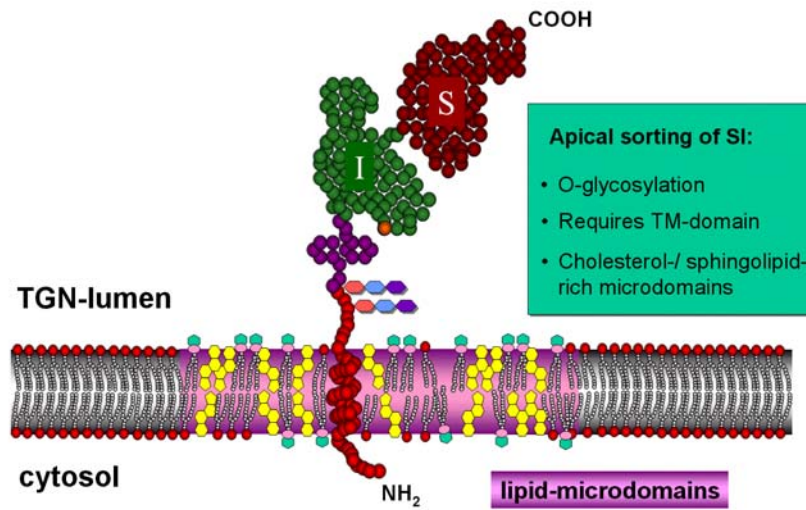


Abb. 1.5 Der Transmembranbereich der Saccharase-Isomaltase ist im Gegensatz zur LPH mit Membran-Mikrodomänen assoziiert (Grafik: R. Jacob)

Die mannosereiche Form der SI besitzt ein Molekulargewicht von 210 kDa, bei der komplex-glykosylierten Form sind es 245 kDa. Letztere wird zu mindestens 85% in die apikale Membran polarer Epithelzellen eingebaut.

Das Signal für diesen gerichteten Transport liegt in der Isomaltase-Untereinheit, wie anhand einer natürlich vorkommenden Mutation der SI gezeigt werden konnte^[53]. Konkret verantwortlich für diesen Sortiervorgang sind die O-glykosidisch verknüpften Zuckerketten der Stab-Domäne. Sie bilden die Voraussetzung dafür, daß die SI - im Gegensatz zur LPH - in die *lipid rafts* rekrutiert wird^[2].

1.4.3 Myosin Ia

Der Myosin-Familie gehören bereits über einhundert identifizierte Proteine an, die sich auf 15 Klassen verteilen. Hierbei handelt es sich um sogenannte Motorproteine, die mit Aktin interagieren und hierdurch eine Bewegung entlang dessen Filamenten (F-Aktin) ermöglichen.

Die größte Gruppe stellen die Klasse II-Myosine, auch als konventionelle Myosine bezeichnet. Diese sind unter anderem für die Muskelbewegung verantwortlich. Hierbei bindet Myosin in Abwesenheit von Adenosintriphosphat (ATP) fest an ein Aktin-Molekül des Filaments. Beim Andocken von ATP wird diese Bindung geöffnet. An der freien Kopfgruppe hydrolysiert das gebundene ATP, wodurch die Kopfdomäne des Myosins ihre Konformation ändert, in Bezug auf den Aktinstrang also ihre Position verschiebt, und erneut bindet - jetzt jedoch infolge der Kopfbewegung an ein benachbartes Aktinmolekül. Anschließend werden der Phosphatrest und das verbleibende Adenosindiphosphat aus der ATP-Bindungstasche freigesetzt, was eine neuerliche Konformationsänderung des Myosins zurück in die Ausgangsstellung bewirkt. Da aber der Myosinkopf dabei an das Aktinfilament gebunden ist, kommt es zu einer Gegeneinanderbewegung von Aktinfilament und dem Myosinfilament bzw. einem am Myosinschwanz befindlichen Transportgut^[182].

Doch obgleich neben den Gensequenzen auch die atomaren Strukturen sowohl des Aktins^[103] als auch der Myosin-Motordomäne^[183] bereits ebenso bekannt sind wie ihr Aneinanderpassen^[143], sind für die Myosine insgesamt noch viele Details zur Aktivierung der Myosin-ATPase durch F-Aktin sowie den tatsächlichen Bewegungsabläufen offen. Bei den meisten Myosinen der Klasse II zumindest erfolgt eine Regulierung der aktinaktivierten ATPase-Tätigkeit durch Ca^{2+} , wofür drei unterschiedliche Mechanismen bekannt sind: Interaktion mit dem Tropomyosin-Troponin-Komplex am F-Aktin, Bindung an eines der beiden Paare leichter Ketten des Myosins oder Aktivierung einer *myosin light-chain kinase*, welche ihrerseits dann eines dieser beiden Paare leichter Myosinketten phosphoryliert^[204].

Weniger gut untersucht sind die Myosine der Klasse I, welche die zweitgrößte Gruppe ausmachen. Diese weisen im Gegensatz zum doppelköpfigen Myosin II nur einen Kopf auf und verfügen neben der schweren Kette von 110 - 130 kDa noch über ein bis sechs leichte Ketten^[149]. Zudem sind sie mit Membranen assoziiert^[13]. Die Myosinklasse I scheint eine bedeutende Rolle zu spielen für die kortikale Oberflächenspannung von Membranen und die Ausbildung von Lamellipodien^[34,162,218], aber auch für Signalübertragungen^[66] sowie endocytotische Transportvorgänge^{m[60,102,162,181]}.

Beiden bekannten Unterklassen von Myosin I gemein ist eine lipidbindende Domäne in der C-terminal gelegenen Schwanzregion^[214]. Dieser Abschnitt ist reich an basischen Aminosäuren und bindet *in vitro* sowohl an aufgereinigte Plasmamembranen als auch Vesikel mit anionischen Phospholipiden^[1,36,145].

Eine der beiden Unterklassen weist noch zwei zusätzliche Domänen am Schwanz auf, darunter eine ATP-unabhängige Aktinbindestelle, was nahelegt, daß diese Myosine Aktinfilamente untereinander vernetzen und somit den dynamischen Status des aktinreichen Kortex bei der Zellbewegung kontrollieren^[69,167]. Tatsächlich konnte inzwischen eine Beteiligung dieser Unterklasse an der Aktin-Assemblierung nachgewiesen werden^[59,118].

Solche Zusatzdomänen jedoch weist die kürzerschwänzige zweite Unterklasse nicht auf, der auch Myosin Ib (MYO1B; vormals Myosin I alpha, MMI α) und das zu diesem zu 78% homologe Myosin Ia (MYO1A; vormals *brush border myosin I*, BBMI) angehören^[181,194,205]. Die subzelluläre Verteilung dieser Unterklasse deutet auf eine Beteiligung am Membrantransport hin. So finden sich ihre Vertreter etwa in der Zellperipherie (Myosin Ia in den Mikrovilli der Darmzellen, wo es die Aktinbündel mit der Plasmamembran verbindet, Myr 1 in der Plasmamembran von Kaninchen- Nierenzellen und Myosin Ib im Wachstumskegel von Nervenzellen) und assoziiert mit intrazellulären Membranen (Myosin Ia an Vesikeln im terminalen Netz von Darmzellen, Myosin Ib an tubulären Strukturen im Zellkörper von Neuronen sowie aber auch an Endosomen und Lysosomen, wo es die Weiterleitung internalisierter Moleküle zu den Lysosomen reguliert)^[39,119,160,181,193,220].

Hinsichtlich der Aktivierung von Klasse I-Myosinen ist für jene aus Amöben der Gattung *Acanthamoeba* bekannt, daß diese durch Phosphorylierung der schweren Kette erfolgt, ausgelöst durch eine *myosin I heavy-chain kinase* ^[24,129], die ihrerseits wiederum durch saure Phospholipide und Membranen ^[23,110] sowie kleine GTPasen aktiviert wird ^[22].

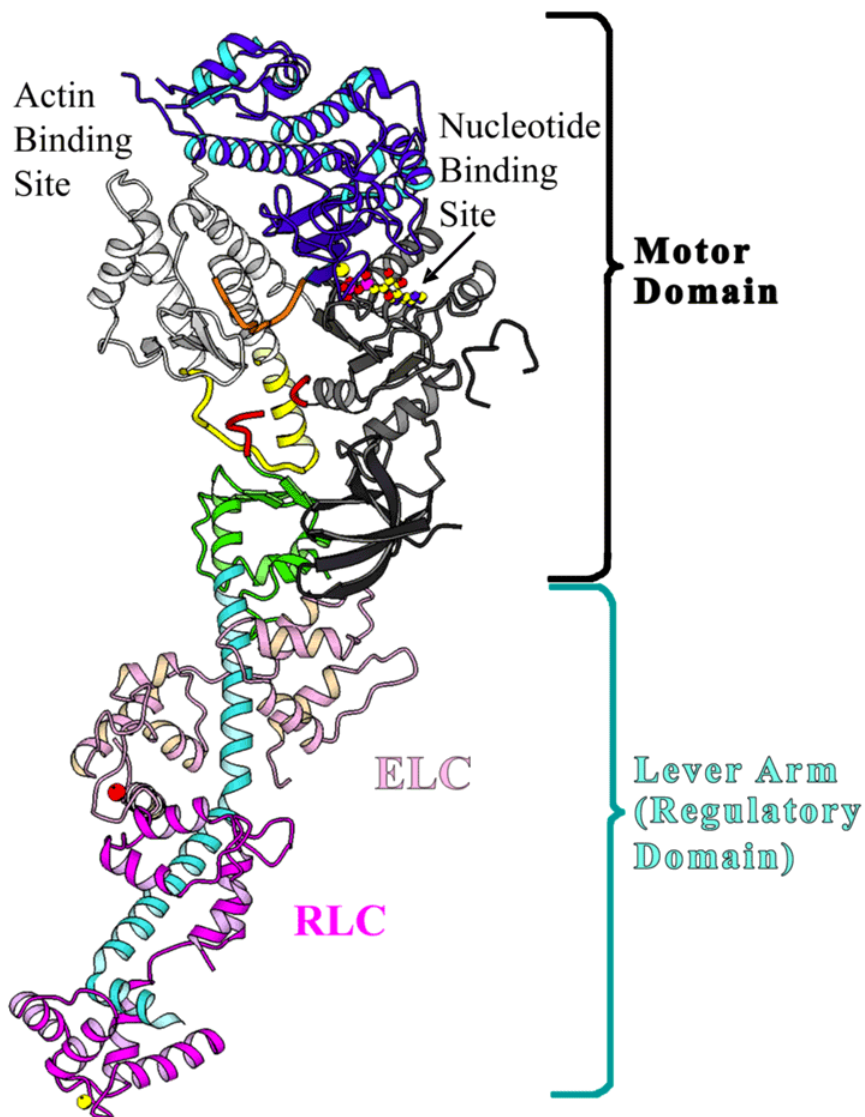


Abb. 1.6 Myosin-Kopf mit Bindestellen für Aktin und ATP
(Grafik: Houdusse et al.)

1.4.4 Annexin A2 und S100A10

Bei der Familie der Annexine (*annex*, gr.: zusammenbringen / -halten) handelt es sich um cytosolische kalzium- und phospholipidbindende Proteine, deren Molekulargewicht in so gut wie allen Fällen zwischen 30 und 40 kDa liegt^[62,146]. Ihre Funktion scheint unter anderem mit dem Vesikeltransport sowie Endo- und Exocytose-Vorgängen zusammenzuhängen^[61,184].

Der Aufbau der Annexine setzt sich aus zwei Hauptdomänen zusammen: zum einen aus dem divergenten N-terminalen Kopfbereich und zum anderen aus dem konservierten C-terminalen Proteinkern. Letzterer besteht aus zumeist vier Wiederholungen zu je 70 Aminosäuren mit untereinander 25 - 35% Sequenzidentität^[71]. Zwischen den verschiedenen Annexinen beträgt sie 45 - 55%^[213]. Jeweils in den Wiederholungen enthalten ist die sogenannte Endonexin-Falte, eine 17 Aminosäuren lange Sequenz, welche die Kalzium- und Membranbindestelle birgt^[127].

Räumlich formt sich der Annexinkern zu einer stark α -helikalen, dichtgepackten Scheibe mit einer konkaven und einer konvexen Seite^[12]. Während die konvexe Seite mit entsprechenden Bindestellen der kalziumabhängigen Bindung der Annexine an Phospholipidmembranen dient, ist die konkave Seite für Interaktionen mit den aminoterminalen Domänen und cytoplasmatischen Bindungspartnern zugänglich^[232].

Der N-Terminus hingegen variiert stark zwischen den einzelnen Annexinen: hier finden sich Schwanzdomänen von elf bis zu 196 Aminosäuren Länge, was, ohne die Gesamtstruktur des Moleküls zu beeinflussen, die funktionelle Vielfalt der ansonsten stark konservierten Annexine herbeiführt^[120]. So entscheiden häufig hier angesiedelte Bindestellen über eventuelle Proteinliganden, und auch die Zielmembranen der einzelnen Annexine sind durch den N-terminalen Bereich festgelegt. Zu letzteren gehören unter anderem die Plasmamembran und endosomale Membranen sowie Membranen des sekretorischen Apparates^[62].

Die Kalzium-Abhängigkeit und Spezifität der reversiblen Annexin-Bindung an negativ-geladene Phospholipide variiert deutlich zwischen den einzelnen Familienmitgliedern. Bindungspartner sind hier beispielsweise Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol, wobei einige Annexine, darunter auch Annexin A2, darüber hinaus auch eine Membranvesikel-Aggregation vermitteln^[62].

Dieses Annexin A2 nun weist von allen Vertretern seiner Familie die geringste Kalziumabhängigkeit auf, und sogar kalziumunabhängige Interaktionen sind bekannt, etwa die Assoziation mit der Endosomenmembran bei neutralem pH-Wert^[75,101]. Sein Molekulargewicht beträgt beim Menschen 36 kDa, die Länge 339 Aminosäuren. Die aliphatischen und aromatischen Aminosäuren der ersten zwölf Aminosäuren der α -Helix bilden eine hochspezifische Bindungsstelle für das dimere Protein S100A10, welches infolge seines Molekulargewichtes auch als p11 bekannt ist und entgegen der restlichen S100-Familie keine Kalziumionen zu binden vermag^[64,99,131]. Das resultierende nicht-kovalente Heterotetramer aus je zwei Annexin A2- und S100A10-Molekülen vermag somit zwei Membran-Oberflächen gleichzeitig zu binden^[112] (*Abb. 1.7*).

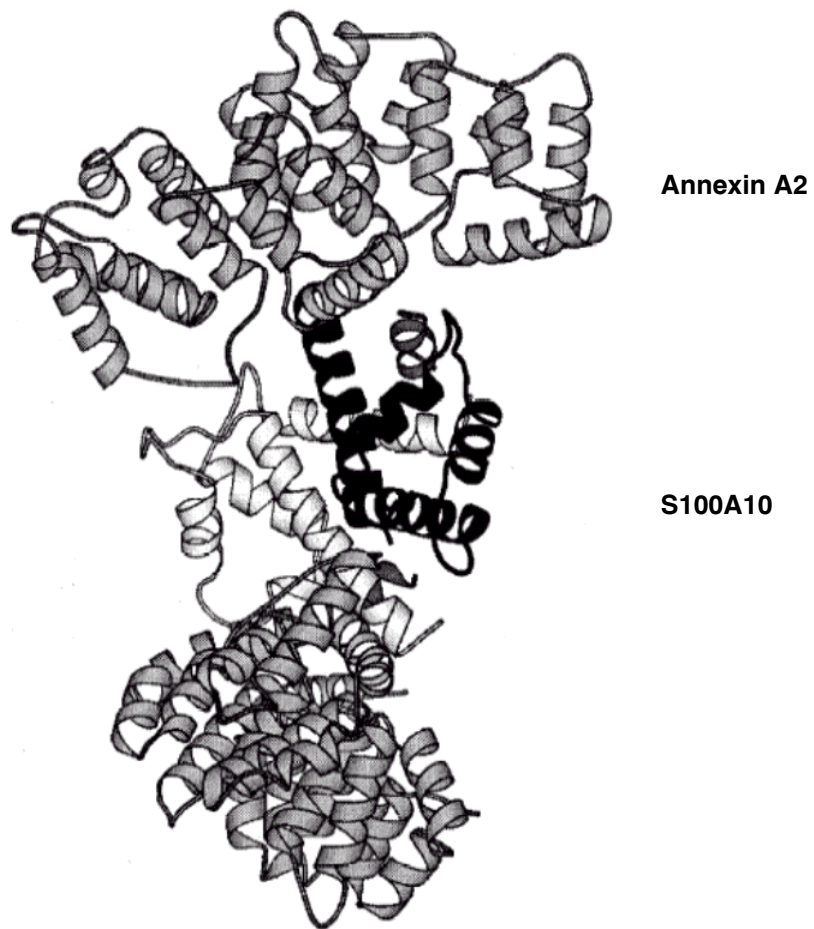


Abb. 1.7 Jeweils zwei Annexin A2- und S100A10-Moleküle bilden ein Heterotetramer, welches hierdurch zwei Membranen verbinden kann
(Grafik: Sopkova-de Oliveira Santos et al.)

Durch die Ausbildung dieses Komplexes verändern sich die Eigenschaften des Annexins^[61,229]. So sinken zum Beispiel die Kalziumanforderungen gegenüber dem Monomer. Zudem ist das Annexin A2-Heterotetramer als einziges schon bei mikromolaren Kalziumkonzentrationen in der Lage, Membranvesikel zu aggregieren^[42,175]. Des weiteren verhindert der heterotetramere Komplex die Phosphorylierung des Annexin A2 an seiner 30 Aminosäuren langen N-terminalen Domäne. Eine solche Phosphorylierung durch verschiedene in der Signaltransduktion involvierte Proteinkinasen kann die Eigenschaften des Annexin A2 beeinflussen, etwa eine Erhöhung der Kalzium-Anforderungen für die Phospholipidbindung^[121].

Ebenfalls bekannt ist eine bevorzugte Membran-Assoziation an den bereits erwähnten *lipid rafts*, also Membranmikrodomänen, die reich an Cholesterol, Glykosphingolipiden und mittels Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankerten Proteinen sind^[165].

Und schließlich ist Annexin A2 auch ein F-Aktin-bindendes Protein mit kalziumabhängiger Filamentbündelungsaktivität^[63,91], speziell beim heterotetrameren Annexin A2-S100A10-Komplex, wobei sich die F-Aktin-Bindungsstelle am C-Terminus im Proteinkern befindet^[51]. Die dortige Region zwischen den Aminosäuren 286 und 294 ist streng homolog zur Aktin-Bindedomäne von Myosin^[100].

1.4.5 Alpha-Kinase 1

Die erst vor wenigen Jahren identifizierte Familie der Alpha-Kinasen weist keine Sequenzhomologie zu den allgemein als konventionelle Proteinkinasen (CPK) bezeichneten Gruppen der Serin-/Threonin-Kinasen und Tyrosin-Kinasen auf. Dennoch aber sind sie sich in ihrer räumlichen Faltung sehr ähnlich^[234]. Beide bilden eine zweilappige Struktur aus, wobei der N-terminale Lappen primär für die Verankerung und Ausrichtung des Nukleotids sorgt, während der C-terminale Lappen hauptsächlich für Substratbindung und Einleitung der Phosphorübertragung verantwortlich ist. In der Spalte zwischen den beiden Lappen findet dann die Katalysereaktion statt^[40] (Abb. 1.8).

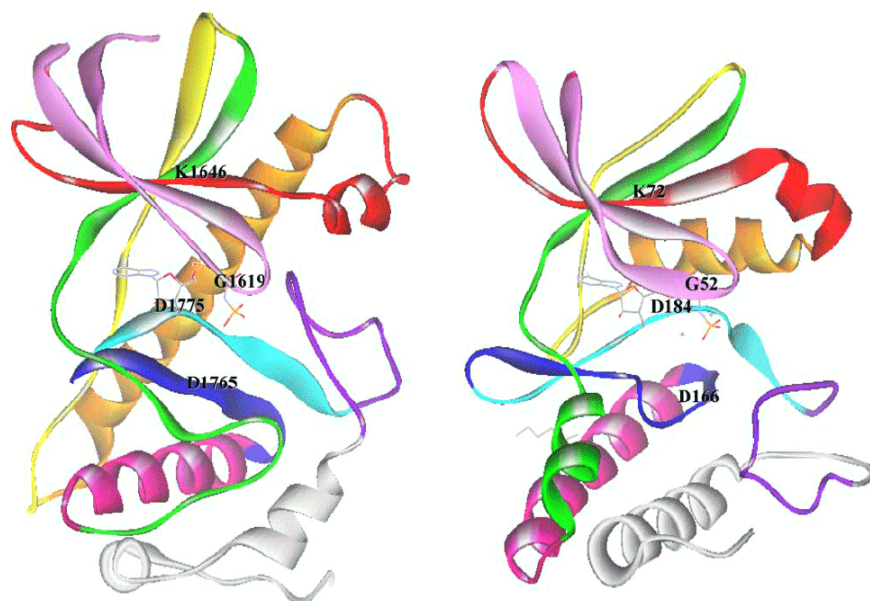


Abb. 1.8 Obgleich sich Alpha-Kinasen (*channel kinase 1*, links) und konventionelle Kinasen (Proteinkinase A, rechts) in ihrer Aminosäuresequenz deutlich voneinander unterscheiden, ähneln sie sich sehr in ihrer räumlichen Struktur sowie der Position funktional bedeutsamer Aminosäuren (Grafik: Drennan et al.)

Als erste Vertreter dieser neuen Familie wurden die *myosin heavy chain kinase A* (Abb. 1.9) aus *Dictyostelium*^[31,56] und die *elongation factor 2 kinase* entdeckt^[197]. Während letztere eine kalzium-/calmodulin-abhängige Proteinkinase für die Phosphorylierung und Inaktivierung des *elongation factor 2* ist und somit wohl eine globale Regulation der Proteinsyntheserate vornimmt^[196], spielt erstgenannte unter Beteiligung von Aktin-Filamenten eine wichtige Rolle bei der Zusammensetzung und Auflösung von Myosin-Filamenten in *Dictyostelium*^[107,130].

Ihren Namen erhielten die Alpha-Kinasen aufgrund ihrer Eigenschaft, Aminosäuren zu phosphorylieren, die sich in α -Helices befinden^[195] - im Gegensatz zu den CPK, deren Ziel-Aminosäuren stattdessen in Schleifen, Wenden und irregulären Proteinstrukturen liegen^[173]. Gefunden wurden Alpha-Kinasen außer in den Genomen von Wirbeltieren auch bei Pilzen und Protozoen, so daß ihre Entstehung entsprechend weit zurückliegt. Nicht gefunden wurden sie jedoch in den bisher sequenzierten Genomen von Bakterien, Hefen, Insekten und höheren Pflanzen^[40].

Insgesamt sind die Sequenzen der Alpha-Kinasen recht konserviert, mit einer Übereinstimmung von etwa 35% und einer Ähnlichkeit von 60% über die gesamte Familie hinweg. Letztere wird dabei in zwei Gruppen unterteilt. Während die eine die *elongation factor 2*-Kinasen sowie fünf der sechs bei *Dictyostelium* gefundenen Alpha-Kinasen umfaßt, von denen die meisten die Kinasedomäne direkt oder nahe am N-Terminus tragen, bilden alle anderen Alpha-Kinasen, darunter auch Alpha-Kinase 1, die zweite Gruppe, bei der diese Domäne zumeist direkt oder nahe am C-Terminus liegt. Insgesamt weisen die verschiedenen Alpha-Kinasen ein breites Spektrum an Domänen auf, darunter Ionenkanäle, integrin- und immunoglobulin-ähnliche Domänen, WD- und TPR-Wiederholungen sowie calmodulinbindende Domänen^[40].

Alpha-Kinase 1 besitzt ein Molekulargewicht von 139 kDa und wird in einer Reihe von Geweben exprimiert, darunter insbesondere Dünndarm, Lymphknoten, Magen und Niere^[199].

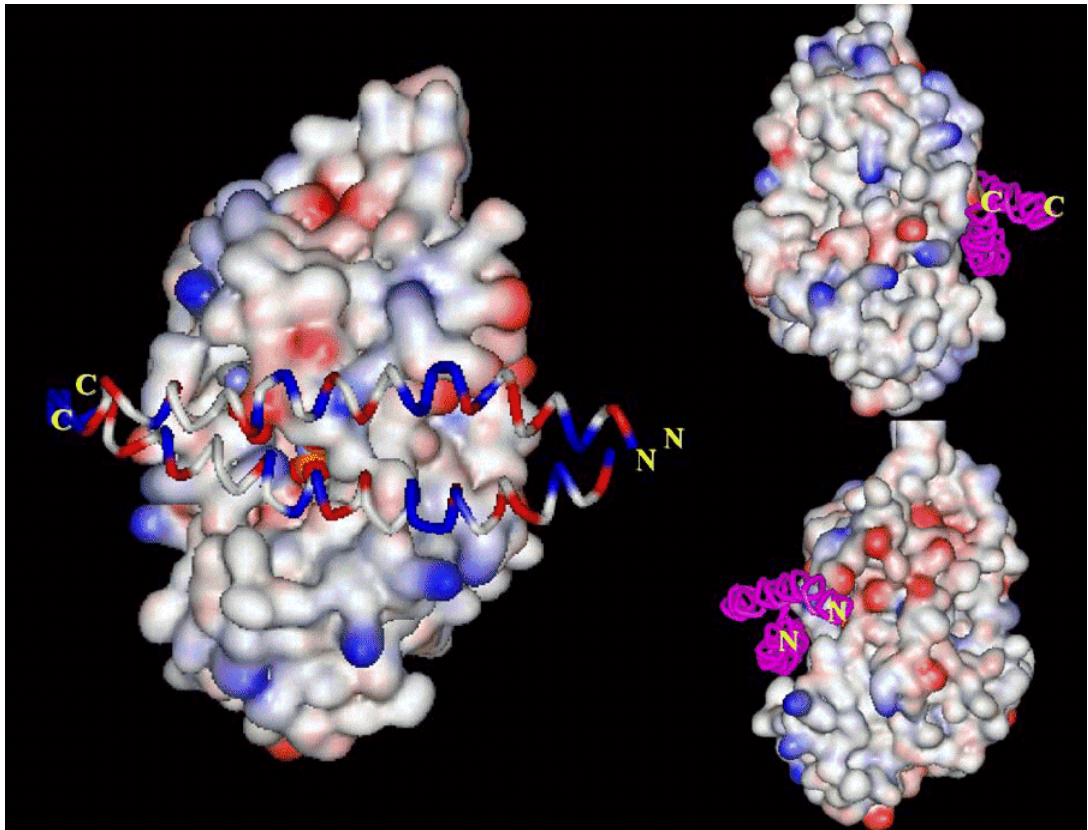


Abb. 1.9 Alpha-Kinase *myosin heavy chain kinase A* mit angelagerter Myosin-Kette (Grafik: Drennan et al.)

2. Unterschiedliche Cytoskelettbahnen leiten einzelne Vesikelpopulationen an die apikale Membran der Epithelzellen

Ausgehend von der Identifizierung zweier verschiedener apikaler Vesikelpopulationen ^[97] galt es, das Vorhandensein weiterer Unterschiede zwischen den LPH-tragenden und den SI-tragenden apikalen Vesikeln zu untersuchen ^[95].

2.1 Die Rolle einzelner Cytoskelettkomponenten

Ein Aspekt hierfür war eine mögliche Abweichung bei den jeweils beteiligten Cytoskelett-Komponenten. Um dies näher zu beleuchten, wurden zunächst COS-1-Zellen transient mit SI bzw. LPH transfiziert und das Transportverhalten in An- und Abwesenheit von Substanzen beobachtet, die einzelne dieser Elemente bzw. assoziierte Proteine beeinträchtigen. Hierbei kamen sowohl konfokalmikroskopische wie auch biochemische Analysen zum Einsatz.

2.1.1 Konfokalmikroskopische Beobachtung

Um die Bewegung der jeweiligen Vesikelpopulation entlang des Cytoskeletts in lebenden Säugetierzellen mittels konfokaler Lasermikroskopie beobachten zu können, wurden zusätzlich zu unseren Fusionsproteinen aus SI und dem abgewandelten Leuchtqualle-Eiweiß YFP bzw. LPH und CFP^[97] auch die Cytoskelett-Komponenten Tubulin und Aktin mit CFP und YFP versehen.

Neben der Beobachtung eines zunächst erfolgenden raschen Transportes sowohl der SI als auch der LPH entlang regelrechter Mikrotubuli-»Autobahnen« (*Abb. 2.1*) wurde zudem sichtbar, daß sich im Gegensatz zur LPH der Weg der SI in der Zellperipherie auch mit den dortigen Aktinfilamenten deckt (*Abb. 2.2a*).

Diese Vesikelbewegungen bestanden auch bei Kolchizingabe (zehn Minuten nach Verlassen des TGN) fort, womit eine Mikrotubulibeteiligung an der Peripherieverteilung der SI ausgeschlossen werden konnte (*Abb. 2.2b*). *Abbildung 2.2c* zeigt die Auswirkung des Kolchizins.

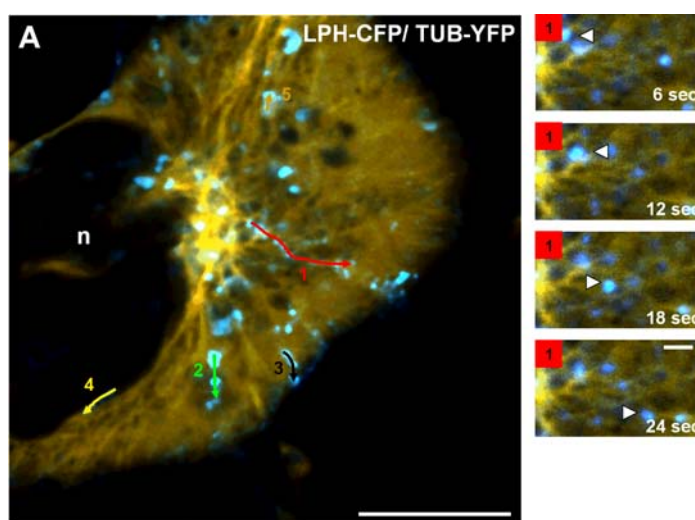


Abb. 2.1a COS-Zellen wurden mit LPH-CFP (blau) und Tubulin-YFP (gelb) transfiziert, um festzustellen, ob eine Kolokalisation vorliegt. Der Balken entspricht 18 bzw. 1,5 Mikrometern

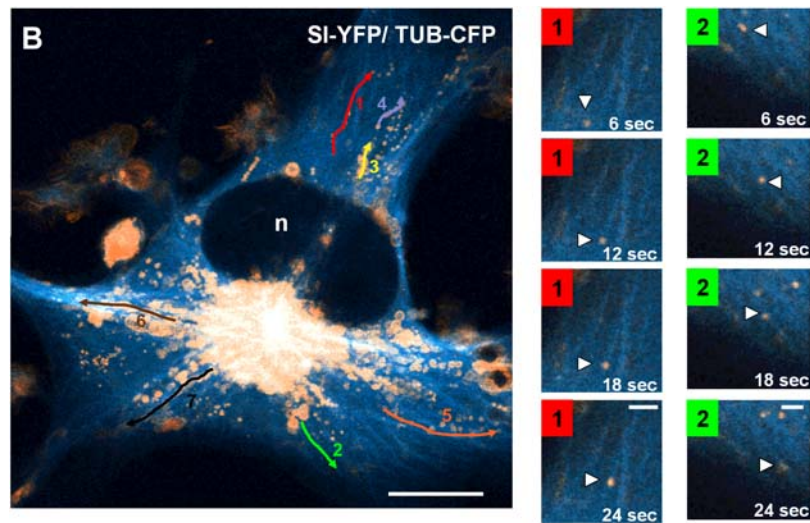


Abb. 2.1b Transfektion einer COS-Zelle mit SI-YFP (gelb) und Tubulin-CFP (blau); kofokalmikroskopische Zeitserie 48 Stunden nach Transfektion. Der Balken entspricht 15 bzw. 2 Mikrometern

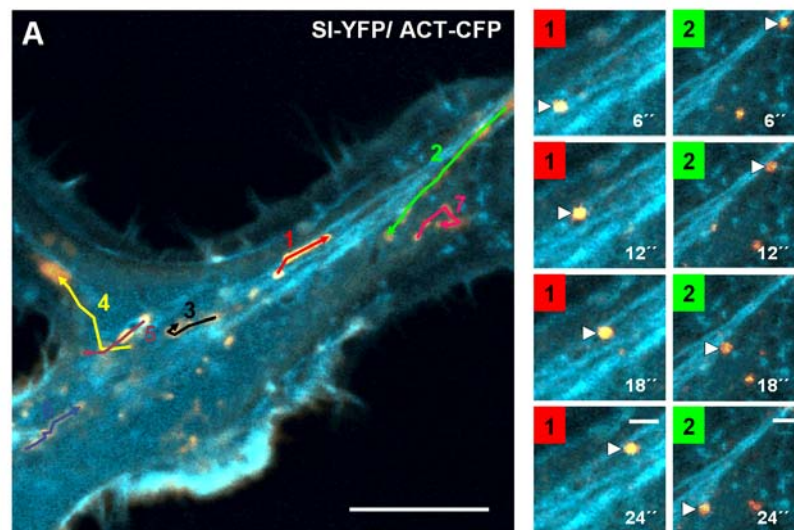


Abb. 2.2a Plasmamembrannähe Peripherie einer mit SI-YFP (gelb) und Aktin-CFP (blau) transfizierten COS-Zelle. Der Balken entspricht 10 bzw. 2 Mikrometern

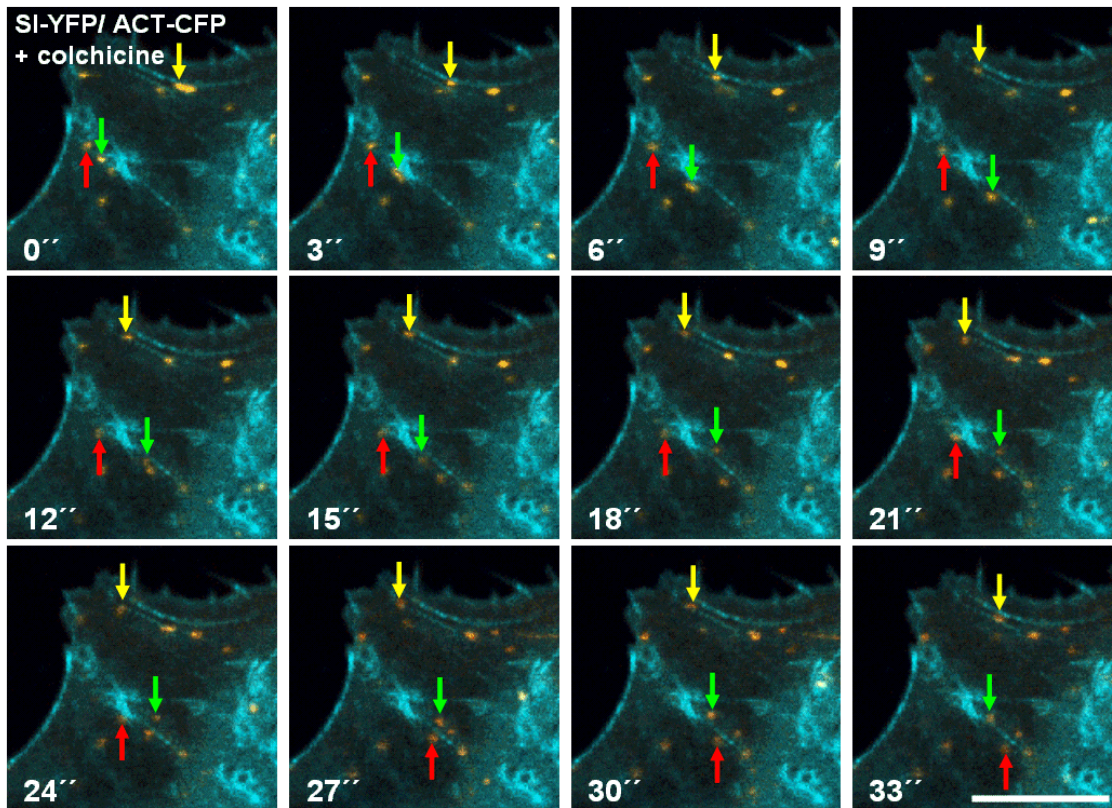


Abb. 2.2b Auch zehn Minuten nach der Zugabe von Kolchizin (zerstört die Mikrotubuli) ist die Wanderung der SI-Vesikel (gelb) in der Peripherie nicht beeinträchtigt. Der Transport erfolgt dort ausschließlich entlang der Aktinfilamente (blau). Der Balken entspricht 10 Mikrometern

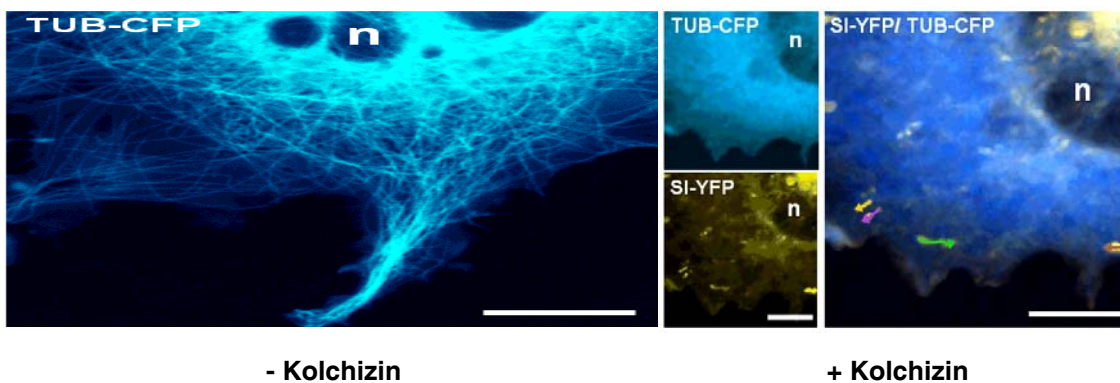


Abb. 2.2c Zehn Minuten nach der Zugabe von Kolchizin sind die Mikrotubuli (blau) zerstört. In der Zellperipherie allerdings sind nach wie vor Transportbewegungen der SI-Vesikel (gelb) zu verzeichnen - sie wandern entlang der Aktinfilamente (Abb. 2.2b). Balkenlänge: 10 Mikrometer

Bei der Auswertung der Vesikelbewegungen wurde auch die Geschwindigkeit für SAV und LAV bestimmt (*Abb. 2.3*). Der langsamere Transport der SAV entlang der mittels Fluoreszenz identifizierten Aktinfilamente gegenüber jenem entlang der Mikrotubuli unterstreicht zusätzlich, daß die SAV auf dem Weg zur Plasmamembran über zwei verschiedene Cytoskelettkomponenten wandern.

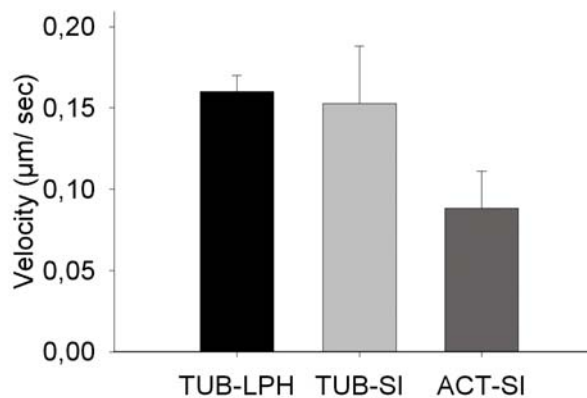


Abb. 2.3 Gemessene Geschwindigkeiten der LPH- und SI-Vesikel entlang der Mikrotubuli sowie der SI-Vesikel entlang der Aktinfilamente

Die Zugabe von Cytochalasin D (CytoD) zehn Minuten nach Verlassen des TGN, also die Depolymerisierung der Aktinfilamente^[163], wirkte sich nicht auf die LPH-tragenden Vesikel aus (*Abb. 2.4a-c*). Demgegenüber sammelten sich die SI-Vesikel im Peripherievorfeld an und zeichneten sich zudem durch eine ziellose Umherbewegung aus, die deutlich langsamer stattfand als ihr Transport vor der Zugabe des Giftes (*2.4d+e*). Entsprechend blieb die Zahl der nach zuvoriger Temperaturblockade gesammelt aus dem TGN entlassenen SI-Vesikel konstant, während die Anzahl der LPH-Vesikel zwanzig Minuten später eine deutliche Abnahme verzeichnete - entsprechend ihrer Fusion mit dem Bestimmungsort, der Plasmamembran (*Abb. 2.4c*). Der im Gegensatz zur LPH beobachtete Transport der SI entlang des Aktin-Netzwerkes in der Peripherie stützt somit die bereits zuvor von Jacob und Naim nachgewiesene Auftrennung der gemeinschaftlichen apikalen *post*-Golgi-Vesikel in separate SAV und LAV^[97].

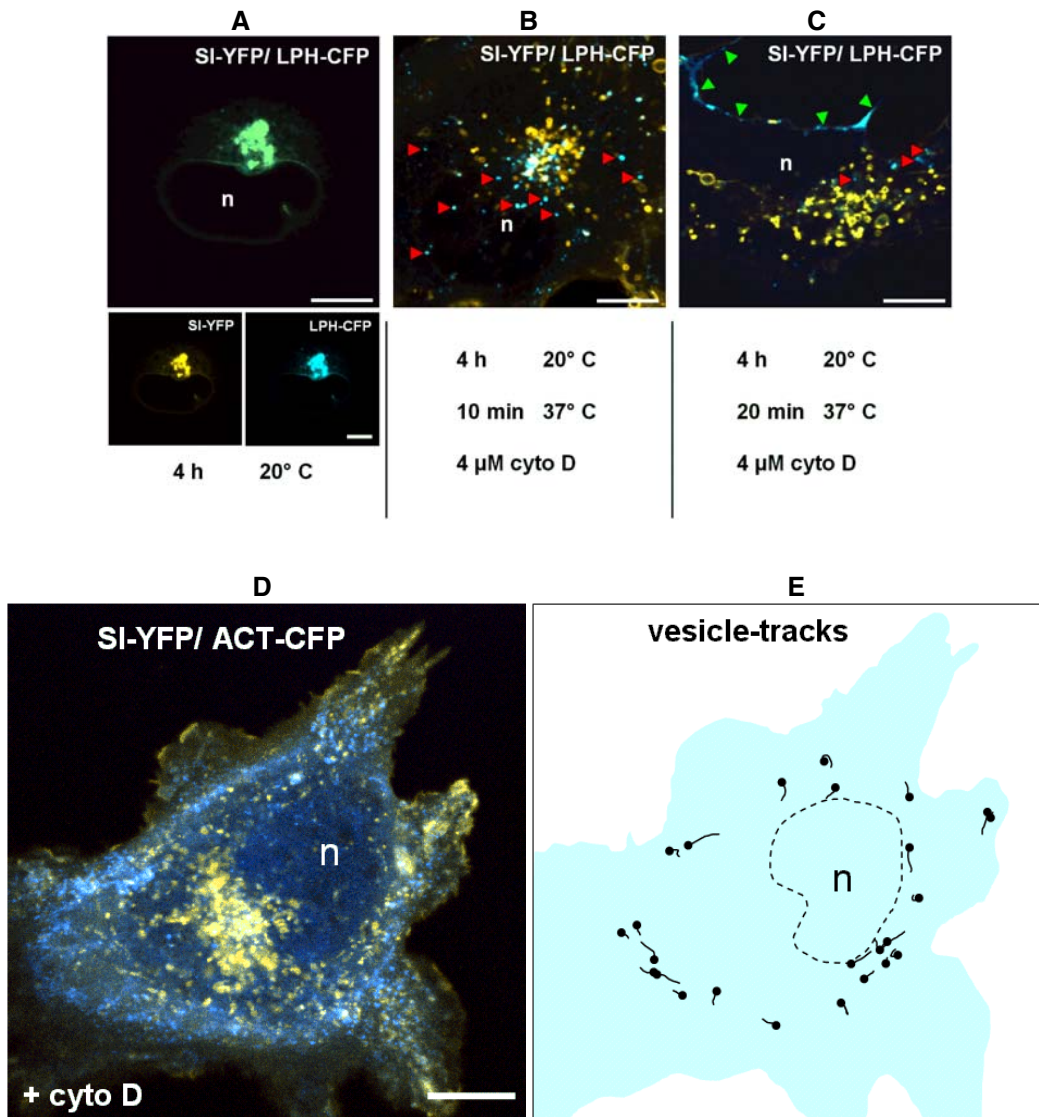


Abb. 2.4: COS-1-Zellen wurden mit SI-YFP und LPH-CFP transfiziert und für vier Stunden bei 20 °C inkubiert, um die Vesikel im Golgi-Apparat anzusammeln (A) und später nach Erhöhung der Temperatur auf 37 °C alle zugleich aus dem TGN zu entlassen (B).

Nach 20 Minuten bei gleichzeitiger Depolymerisierung der Aktinfilamente mittels CytoD ist deutlich erkennbar, daß die LPH (blau) inzwischen an der Plasmamembran angekommen ist, während sich die SI-Vesikel (gelb) innerhalb der Zelle und deutlich von der Peripherie entfernt stauen (C).

Bild D zeigt die zerstörten Aktinfilamente (blau) sowie die nicht mehr in die Zellperipherie transportierten SI-Vesikel (gelb).

Bild E zeichnet die deutlich verlangsamte und ungerichtete Bewegung der SI-Vesikel für den Zeitraum einer Minute nach.

Die roten Pfeile weisen auf LPH-CFP-tragende Vesikel, grüne auf LPH-CFP in der Plasmamembran. Der Buchstabe n kennzeichnet den Zellkern. Der Balken entspricht einer Länge von 10 Mikrometern

2.1.2 Biochemische Analysen und Aktin-Bindungsstudien

Diese mittels Konfokalmikroskopie gewonnenen Daten konnten durch biochemische Analysen bestätigt werden (*Anhang, Abb. 1*). Für die spätere Diskussion von Bedeutung ist auch, daß dabei eine eventuelle Transportbeteiligung der Aktin-Motorproteine Myosin II und V durch Zugabe von 2,3-Butandionmonoxim (BDM) ausgeschlossen wurde (*Anhang, Abb. 1a+b*); dieses hemmt deren ATPase-Einheit^[32].

Zudem vermochten weiterführende Studien unter Verwendung eines aktinbeschichteten Sensorchips^[33] zu untermauern, daß SAV in der Tat in der Lage sind, an Aktin zu binden, LAV jedoch nicht (*Anhang, Abb. 2a+b*).

2.1.3 Myosin Ia

Abgerundet wurden die Ergebnisse zur Cytoskelett-Assoziation von SAV und LAV durch die vergleichende Analyse der Proteinzusammensetzung beider Vesikelpopulationen. Diese ergab, daß unter anderem ein Protein von etwa 105 kDa einzig in den SAV vorkommt (*Anhang, Abb. 2c*), welches wir anhand seines Peptidmusters sowie der bestehenden Publikationslage und Datenbankbestände auf ein Myosin der Klasse I - entweder Ia oder Ic - eingrenzen konnten. Anschließende biochemische Analysen identifizierten es in der Tat als das Aktin-Motorprotein Myosin Ia (*Anhang, Abb. 2d*). Dessen Molekulargewicht beträgt 104 kDa^[212].

2.2 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Rolle des Cytoskeletts

Somit haben unsere Experimente deutlich gezeigt, daß SI-tragende Vesikel nach Verlassen des TGN im Gegensatz zu den LAV befähigt sind, an Aktinfilamente zu binden und an diesem Teil des Cytoskeletts entlang in der Zellperipherie hin zur Plasmamembran befördert zu werden. Untermauert wird dies durch das im Vergleich mit den LAV exklusive Vorkommen des Aktin-Motorproteins Myosin Ia in den SAV.

Hierbei scheint als biochemische Unterscheidungsgrundlage die Aufnahme der SI mittels ihrer O-Glykosylierung in *lipid rafts* eine Rolle zu spielen^[2]. Daß letztere mit der Rekrutierung von Signalkomponenten zusammenhängen, war bereits zuvor ebenso vermutet worden^[26] wie eine Verbindung zwischen ihnen und dem Aktin-Cytoskelett im Falle des *raft*-assoziierten Phosphoproteins PAG und des ERM-Proteins EBP50^[17]. Ein adaptervermittelter Zusammenhang zwischen *lipid rafts* und Aktinskelett als Mechanismus für die spezifische Bindung der SAV an die Aktinfilamente ist somit wahrscheinlich.

Daß beim zunächst noch gemeinsamen Transport beider Vesikelpopulationen Mikrotubuli eine Rolle spielen, deckt sich mit deren bereits bekanntem Einfluß auf den Oberflächentransport apikaler Marker in polaren Epithelzellen^[65]. Zudem untermauert die den LAV fehlende Aktin-Bindfähigkeit zusätzlich den Nachweis zweier unterschiedlicher Vesikelpopulationen^[97].

Als Fazit dieser Experimente läßt sich somit festhalten, daß im Gegensatz zur LPH am Transport des *raft*-assoziierten apikalen Membranproteins SI das Cytoskelettelement Aktin sowie das Motorprotein Myosin Ia direkt beteiligt sind.

3. Annexin A2 ist erforderlich für apikale Transportvorgänge in polaren Epithelzellen

Nach der Identifizierung von Myosin Ia als einem nur in den SAV, nicht aber den LAV vorhandenen Protein^[95], nahmen wir uns der Zuordnung weiterer Proteinbanden an, die ausschließlich in SAV auftreten und somit eine wichtige Rolle für diesen apikalen Transportweg spielen könnten^[96].

3.1 Assoziation von Annexin A2 mit SAV nach Verlassen des TGN

Zwei dieser Banden wurden mittels MALDI-TOF und Immunpräzipitation^[166] als Annexin A2 (ANXA2, 36 kDa) und S100A10 (p11, 11 kDa) identifiziert (*Anhang, Abb. 3a+b*). Ersteres gehört zu einer Familie, die sich durch die Konservierung eines bestimmten Strukturelementes auszeichnet, der sogenannten Annexin-Wiederholung, sowie die Bindung an Phospholipide^[62]. Je zwei Annexin A2- und S100A10-Moleküle bilden ein nicht-kovalent verbundenes Heterotetramer aus^[64]. Bereits bekannt war, daß dieser Komplex mit Membranen des endosomalen Systems interagiert und eine C-terminale Aktinbindestelle aufweist^[45,51]. Die Ausbildung des Komplexes wie auch die Membraninteraktion erfolgen kalziumunabhängig^[101]. Letzteres bestätigte sich auch für die von uns eingesetzten MDCK-Zellen (*Anhang, Abb. 3c+d*). Zudem konnte der Transportabschnitt bestimmt werden, in dem es zur Assoziation von Annexin A2 und S100A10 mit den SAV kommt: diese erfolgt erst nach Verlassen des TGN (*Anhang, Abb. 3b*).

3.2 Untersuchung der Bedeutung von Annexin A2 für den SAV-Transport

Im Anschluß an die Identifizierung des Annexin A2-Tetramers untersuchten wir auch, ob und inwiefern dieser tatsächlich beim Transport der SI-Vesikel eine Rolle spielt. Zum Einsatz kam hierbei neben Konfokalmikroskopie und Immunpräzipitation auch sogenannte *small interfering RNA* (siRNA), mit der die Synthese des Annexin A2 herunterreguliert wurde^[238].

3.2.1 Konfokalmikroskopische Kollokalisationsstudien

Um die biochemischen Erkenntnisse durch eine zweite Methode abzusichern, untersuchten wir daraufhin die Verteilung von Annexin A2, SI und LPH mittels Konfokaler Lasermikroskopie. Hierzu wurde jeweils eines der Fluoreszenzproteine CFP, YFP und DsRed mit dem C-Terminus des Annexin A2 verknüpft, so daß keine Beeinträchtigung der Komplexbildung mit S100A10 erfolgte^[238].

Die Auswertung transfizierter COS-1-Zellen, die nach Anreicherung der *post*-TGN-Vesikel fixiert wurden, ergab keine Kollokalisation zwischen LPH und Annexin A2 (*Abb. 3.1a*), wohl aber in 70% der gezählten Vesikel zwischen SI und Annexin A2 (*Abb. 3.1b*).

Zusätzlich untermauert werden konnten diese sowie die Ergebnisse der vorangegangenen Publikation^[95] durch Dreifachtransfektion von Annexin A2 und SI mit einem von uns erstellten Fusionsprotein aus CFP und Myosin Ia: In Übereinstimmung mit den übrigen Daten konnten auch Kollokalisierungen aller drei Proteine nachgewiesen werden (*Abb. 3.1c*).

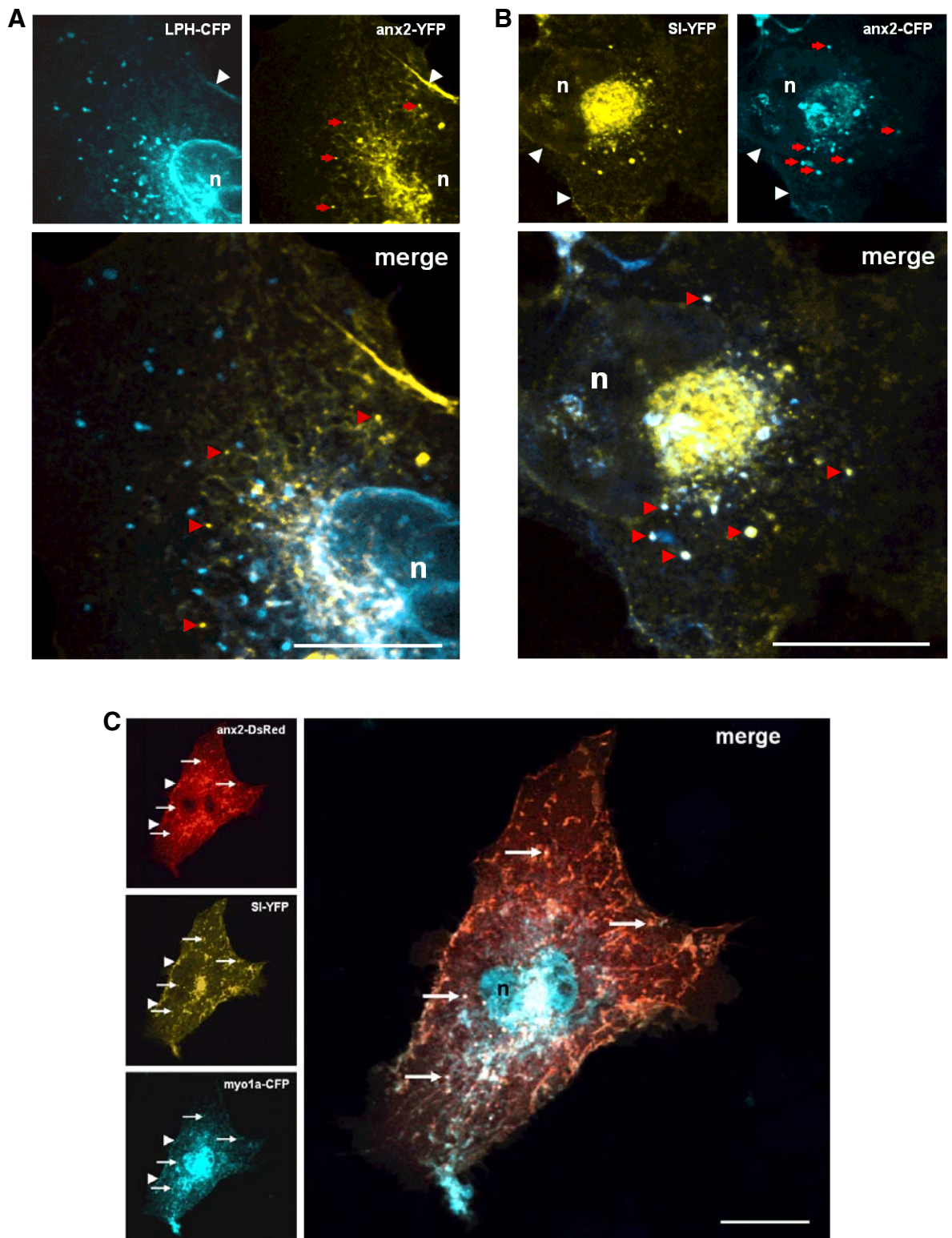


Abb. 3.1 COS-Zellen wurden für Kollokalisationsstudien mit Annexin A2-YFP und LPH-CFP kotransfiziert (A), bzw. mit Annexin A2-CFP und SI-YFP (B) sowie Annexin A2-DsRed, SI-YFP und Myosin Ia-CFP (C). Die Balken entsprechen einer Länge von 10 Mikrometern

Zudem untersuchten wir die Verteilung des Annexin A2 in polaren Zellen, indem wir eine stabile MDCK-Zell-Linie erstellten, die Annexin A2-DsRed exprimiert. Dieses fand sich in den polaren Zellen außer intrazellulär in vesikulären Strukturen auch gehäuft sowohl an der apikalen als auch insbesondere der (baso-) lateralen Plasmamembran (*Abb. 3.2a*). Dies deckt sich mit früheren Beobachtungen der Verteilung des Heterotetramers aus Annexin A2 und S100A10 in MDCK-Zellen^[74] und deutet auf eine Beteiligung nicht nur am apikalen, sondern auch an basolateralen Transportvorgängen hin.

3.2.2 Drosselung der Annexin A2-Expression durch siRNA

Eine vermutete Bindefunktion des cytoplasmatischen Annexin A2 zwischen dem Aktin-Cytoskelett und endo- oder exocytotischen Membranen^[61] überprüften wir für den Fall der SAV durch Drosselung der Annexin A2-Expression mittels siRNA (*Abb. 3.2a+b*). Eine Oberflächenpräzipitation stabiler SI-MDCK-Zellen, die mit dieser siRNA gegen Annexin A2 transfiziert worden waren, ergab eine drastische Reduktion des SI-Anteils an der apikalen Membran.

Da dies jedoch nicht mit einer Erhöhung der basolateralen SI-Verteilung einherging, läßt sich zudem sagen, daß die Rolle des Annexin A2 auf den Transportvorgang der SAV bezogen sein muß und nicht etwa auf die Sortierung (*Abb. 3.2c+d*). Stattdessen kommt es zu einer intrazellulären Ansammlung der SI-Vesikel, was auch durch zusätzliche konfokalmikroskopische Beobachtungen bestätigt wurde (*Abb. 3.2e+f*).

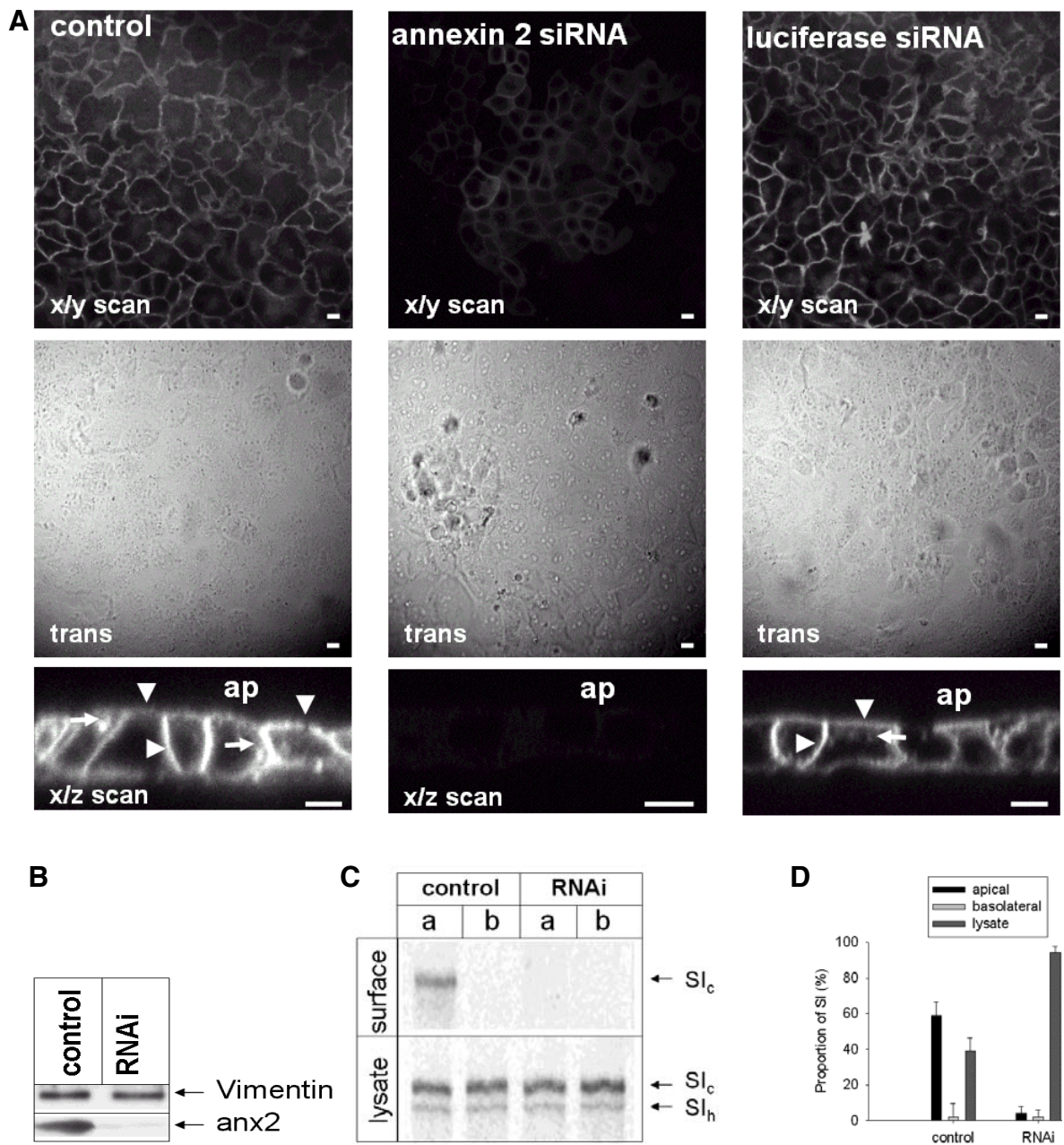


Abb. 3.2a Intrazelluläre Verteilung von Annexin A2 in polaren Epithelzellen: MDCK-Zellen wurden mit Annexin A2-DsRed transfiziert - teils zusammen mit siRNA gegen Annexin A2, teils ohne. Kontroll-siRNA gegen Luciferase zeigte keinen Einfluß auf das Annexin A2.

b Westernblot von MDCK-SI-Zellysaten, die mit siRNA gegen Annexin A2 transfiziert worden waren; eingesetzt wurden Antikörper gegen Annexin A2 und Vimentin (Kontrolle).

c/d Ausschalten des Annexin A2 durch siRNA unterbindet den Transport der SI an die Plasmamembran: MDCK-SI-Zellen wurden auf Transmembranfiltern in Gegenwart oder Anwesenheit von siRNA kultiviert und biosynthetisch mit ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert. Anschließend erfolgte eine Oberflächen-Präzipitation der SI von der apikalen (a) bzw. basolateralen (b) Membran

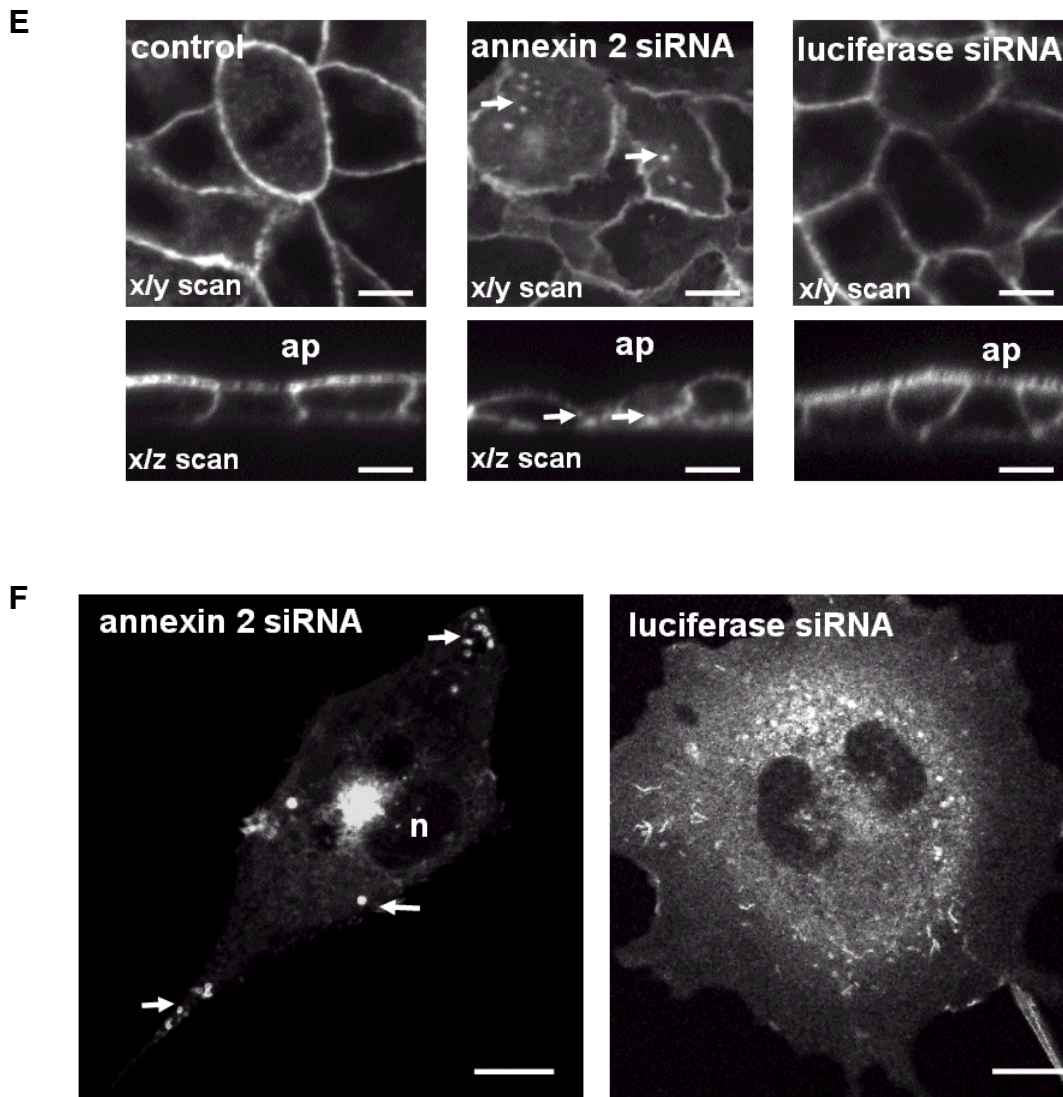


Abb. 3.2e/f Transfektion von MDCK- (E) bzw. COS-1-Zellen (F) mit SI-YFP und siRNA gegen Annexin A2. Die Pfeile zeigen die intrazelluläre Akkumulation von SI-Vesikeln nach der siRNA-Behandlung, wohingegen im Kontroll-Experiment mit Luziferase-siRNA auch membranständige SI beobachtet wird. Die Balken entsprechen einer Länge von 10 Mikrometern

3.3 Zusammenfassung der Rolle des Annexin A2 für den SAV-Transport

Wie die biochemischen und konfokalmikroskopischen Daten übereinstimmend zeigen, spielt der Heterotetramerkomplex aus Annexin A2 und S100A10 eine wichtige Rolle für den Transport der *raft*-assoziierten SI zur Oberfläche.

Diese kommt nach Verlassen des TGN, aber vor der Fusion mit der Plasmamembran zum Tragen und ist nicht von Kalzium abhängig, was sich auch mit früheren Studien bezüglich einer Assoziation mit den frühen Endosomen deckt^[101]. Tatsächlich ist auch bereits bekannt, daß dieser Tetramerkomplex in cholesterinabhängiger Weise mit *rafts* interagiert^[165], und wie kürzlich publiziert wurde ist S100A10 auch am Membrantransport des Kaliumkanals TASK-1, der epithelialen Kalziumkanäle TRPV5 und TRPV6 sowie des Natriumkanals Na(V)1.8 beteiligt^[68,164,224].

Zudem ist Annexin A2 auch nicht das einzige Protein seiner Familie, von dem eine Beteiligung am apikalen Membranverkehr bekannt ist - so steht nämlich beispielsweise Annexin XIIIb mit dem Transport von Hämagglutinin in Verbindung und ist ebenfalls mit Membranmikrodomänen assoziiert^[49,111].

Kombiniert mit der Aktinbindefähigkeit und der aus den vorgenannten Experimenten ersichtlichen Bedeutung von Annexin A2 für den SI-Transport an den Aktinfilamenten entlang, drängt sich die Vorstellung geradezu auf, daß es hierbei eine unverzichtbare Adapterrolle einnimmt.

4. Alpha-Kinase 1, eine neue Komponente im apikalen Proteintransport

Als nach Myosin Ia^[95] sowie Annexin A2 und S100A10^[96] viertes Protein, das nur mit SAV, nicht aber mit LAV präzipitierbar ist, konnte Alpha-Kinase 1 (ALPK1; vormals Lymphozyt-Alpha-Kinase, LAK) als eine weitere Komponente im apikalen Proteintransport identifiziert werden^[80].

4.1 Alpha-Kinasen

Die Familie der Alpha-Kinasen verfügt über keine Nähe zu den konventionellen Kinasen, weist aber eine ähnliche Faltung und Position der Schlüssel-Aminosäuren auf; im Gegensatz zu diesen sind sie jedoch in der Lage, Aminosäuren in α -Helices zu phosphorylieren^[40], was ihnen ihren Namen verlieh. Neben ALPK1 gehört dieser Familie beispielsweise auch die *myosin heavy chain kinase* aus *Dictyostelium* an^[56,128,171]. Exprimiert wird ALPK1 in verschiedenen Geweben, darunter Dünndarm, Lymphknoten, Magen und Niere^[199].

4.2 Untersuchung der Rolle der ALPK1 beim SAV-Transport

Neben der Identifizierung von ALPK1 als Kopräzipitat der SAV suchten wir auch nach einem von ihr phosphorylierten Protein und gingen zudem der Frage nach, ob es sie betreffende Veränderungen im Zuge der Polarisierung von Epithelzellen gibt. Daher kamen hierbei neben Westernblot, Immunpräzipitation, Konfokalmikroskopie und siRNA auch quantitative PCR-Analysen und Kinase-Assays zum Einsatz^[199].

4.2.1 Assoziation der ALPK1 mit SAV

Zwei separate MALDI-TOF-Analysen der deutlichen 140 kDa-Proteinbande, die zwar bei der Präzipitation von SAV, nicht aber bei LAV auftritt (*Abb. 4.1a*), deuteten auf Alpha-Kinase 1 hin, welche ein Molekulargewicht von 139 kDa aufweist. Dies konnte durch einen Westernblot mit einem polyklonalen ALPK1-Antikörper bestätigt werden (*Abb. 4.1b*).

4.2.2 Anstieg der ALPK1-Expression während der Polarisierung

Sowohl per Westernblot als auch RT-PCR konnten wir zeigen, daß ALPK1 auch in den von uns verwendeten polaren Epithelzell-Linien Caco-2 (Darm) und MDCK (Niere) exprimiert wird (*Abb. 4.1c*). Hierbei konnten wir einen Anstieg der Expression in den ersten acht Tagen der zunehmenden Polarisierung nachweisen, und zwar auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR (*Abb. 4.2a*) ebenso wie auf Protein-Ebene im Westernblot (*Abb. 4.2b*), was zusätzlich eine Rolle der ALPK1 für den polaren Transport unterstützt.

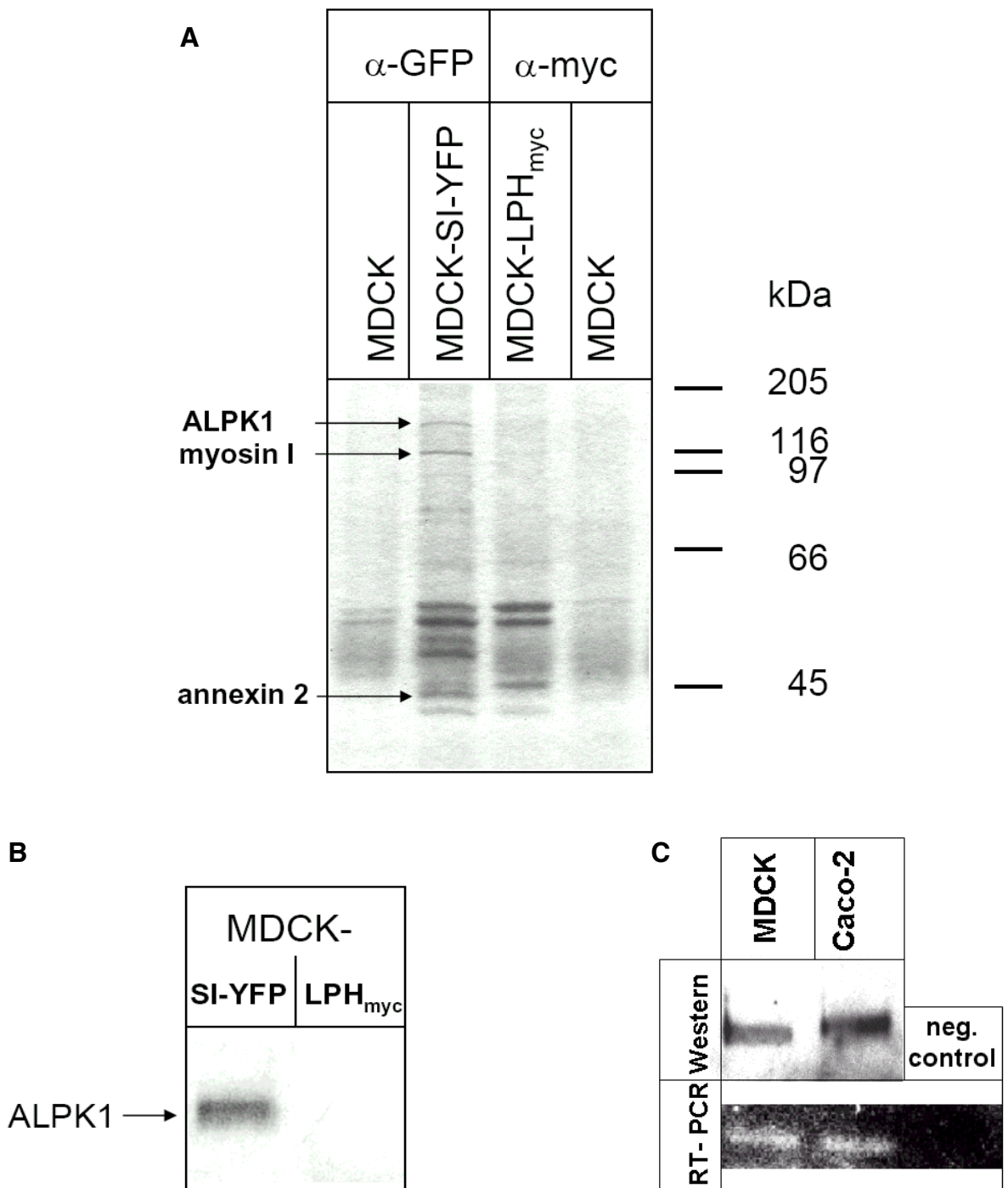


Abb. 4.1 Vesikelassoziation und ALPK1-Expression:

A) Wie bereits bei der Identifikation von Myosin Ia und Annexin A2 wurden Vesikel aus MDCK-, MDCK-SI-YFP- und MDCK-LPH_{myc}-Zellen isoliert und deren enthaltene bzw. assoziierte Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

B) Westernblot: Zugabe eines Antikörpers gegen Alpha-Kinase 1 zu den aufgetrennten Vesikelproteinen

c) Nachweis der ALPK1-Expression in den von uns eingesetzten polaren Epithelzell-Linien MDCK und Caco-2 sowohl auf DNS-Ebene per RT-PCR als auch auf Protein-Ebene per Westernblot

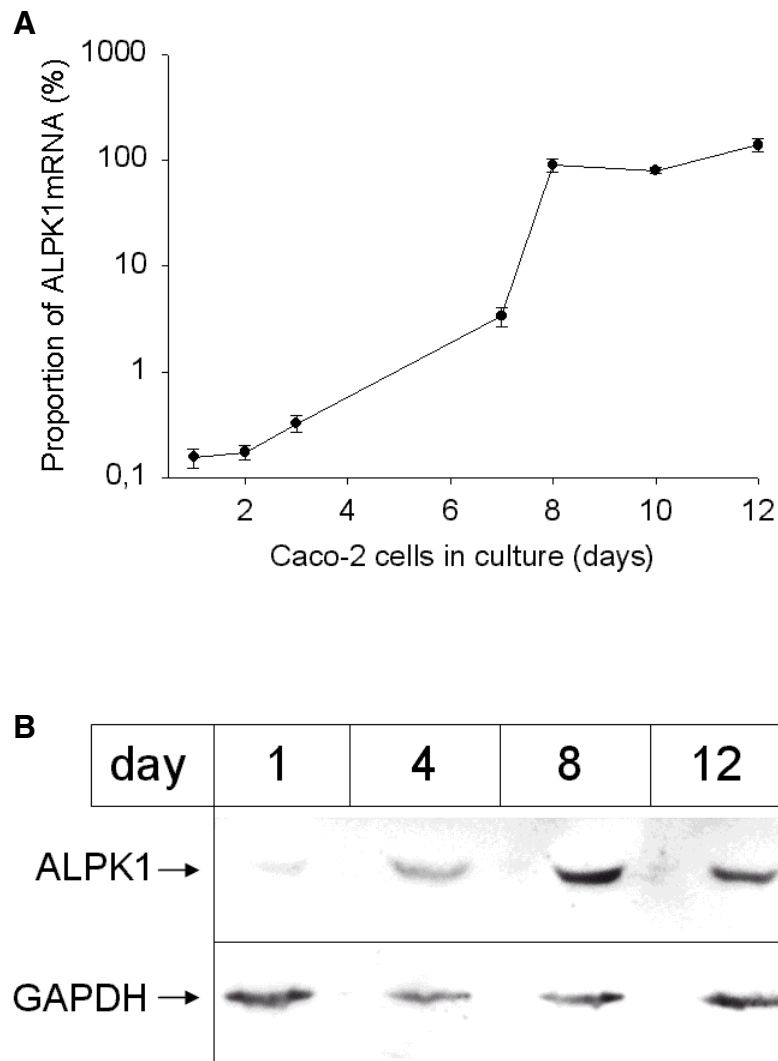


Abb. 4.2 Anstieg der ALPK1-Expression im Zuge der Epitheldifferenzierung: Caco-2-Zellen wurden für unterschiedlich lange Zeit kultiviert und anschließend die Expression der Alpha-Kinase 1 sowohl auf Ebene der mRNA mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR (A) als auch auf Proteinebene im Westernblot analysiert (B)

4.2.3 Intrazelluläre Verteilung der ALPK1

Für konfokalmikroskopische Studien ihrer intrazellulären Verteilung wurde jeweils ein Fusionsprotein aus ALPK1 und CFP sowie dem *trans*-Golgi-Marker Galaktosyltransferase und YFP erstellt. Eine Kotransfektion beider Konstrukte in COS-1-Zellen zeigt die ALPK1 in Vesikeln über das Cytosol verteilt sowie zudem in Kernnähe auch kolokalisiert mit dem GT-YFP (Abb. 4.3a). Bei Kotransfektion von ALPK1-CFP und SI-YFP zeigt sich in Bestätigung der biochemischen Daten ebenfalls eine Kolokalisation (Abb. 4.3b), die *post*-Golgi-Vesikel der SI tragen auch Alpha-Kinase 1.

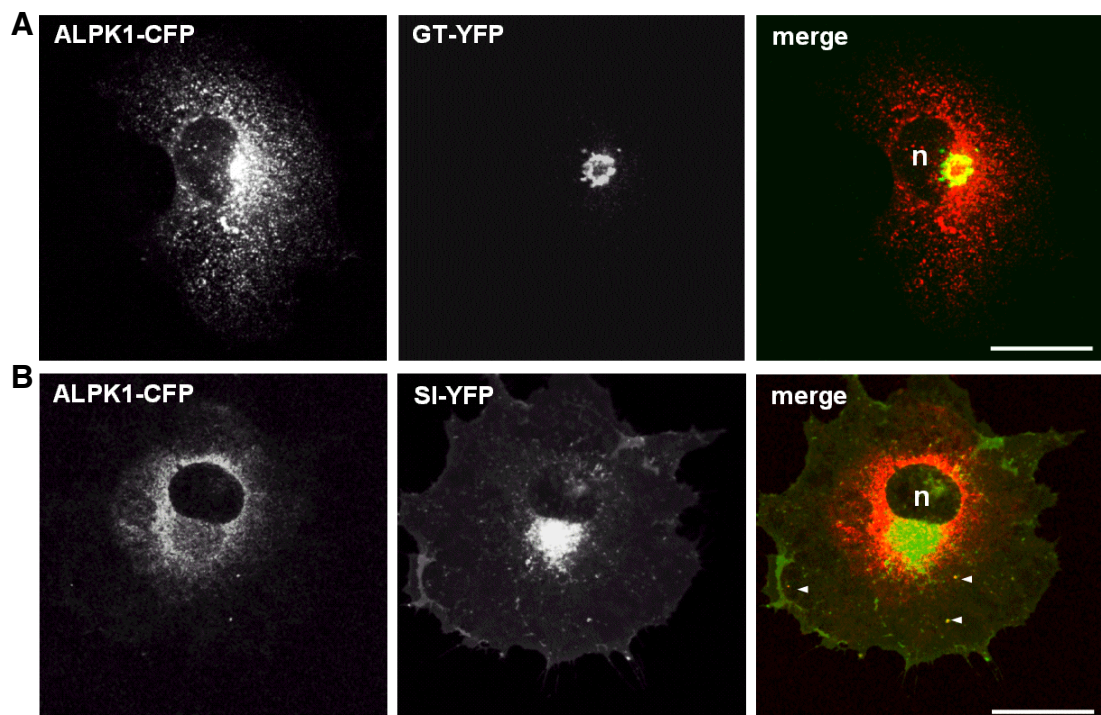


Abb. 4.3 Subzelluläre Verteilung der Alpha-Kinase 1:

COS-Zellen wurden mit ALPK1-CFP und Galaktosyltransferase (GT-YFP, A) bzw. SI-YFP (B) kotransfiziert. Die Pfeile zeigen auf Transportvesikel, die sowohl ALPK1 als auch SI tragen. n: Zellkern, Balken: 10 Mikrometer

4.2.4 Kinase-Assays zur näheren Beleuchtung der ALPK1-Funktion

Um in Erfahrung zu bringen, welche Rolle diese Kinase zumindest im Fall des Saccharase-Isomaltase-Transports spielt, untersuchten wir ihre Wirkung bei aufgereinigten SAV. Kinase-Assays mit radioaktiv markiertem γ - ^{32}P -ATP zeigten in anschließender Auftrennung mittels SDS-PAGE die Überführung des ^{32}P -Isotops in eine stärkere 105 kDa-Proteinbande sowie drei schwächere Banden von 50, 25 und 16 kDa (*Anhang, Abb. 4a+b*). In Übereinstimmung mit den von uns zuvor gewonnenen Erkenntnissen^[95,96], erwies sich diese 105 kDa-Bande im Westernblot wiederum als Myosin Ia.

In weiterführenden Experimenten wurde das Maximum der ^{32}P -Aufnahme als bei 20 Minuten nach Verlassen des TGN liegend ermittelt (*Anhang, Abb. 4c*) und die Phosphorylierung des Myosin Ia durch anschließende Dephosphorylierung mittels λ -Phosphatase überprüft (*Anhang, Abb. 4d*). Hervorzuheben ist dabei, daß Staurosporin als Inhibitor konventioneller Kinasen nicht in der Lage war, die Phosphorylierung signifikant zu beeinträchtigen (*Anhang, Abb. 4e+f*) - denn Staurosporin-Insensitivität ist als ein Kennzeichen der ALPK1-homologen Alpha-Kinasen eEF-2-Kinase und TRPM7/ChaK1 bekannt^[197,198].

4.2.5 Myosin Ia wird unmittelbar durch ALPK1 phosphoryliert

Um sicherzustellen, daß ohne Beteiligung weiterer Komponenten es tatsächlich die Alpha-Kinase 1 ist, die unmittelbar Myosin Ia zu phosphorylieren vermag, wurde von uns ein weiterer Kinase-Assay einzig mit aufgereinigtem Myosin Ia-YFP^[96] und ALPK1-CFP durchgeführt. Während jede Komponente für sich genommen zu keiner Phosphorylierung führt, gelang bei gemeinsamer Inkubation mit γ -³²P-ATP der Nachweis einer radioaktiven Bande mit dem Molekulargewicht von Myosin Ia-YFP (Abb. 4.4).

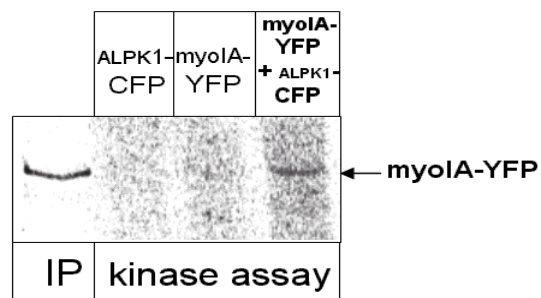


Abb. 4.4 Kinase-Assay:

Aufgereinigte Alpha-Kinase 1-CFP- und Myosin Ia-YFP-Proteine wurden einzeln sowie kombiniert einem Kinase-Assay mit γ -³²P-ATP unterzogen. Links zum Vergleich durch ³⁵S-Methionin markiertes Myosin Ia-YFP

4.2.6 Kolokalisation von ALPK1 und Myosin Ia

Auch wenn sich somit ALPK1 *in vitro* durchaus als in der Lage erwiesen hatte, Myosin Ia zu phosphorylieren, so galt es nun zu untersuchen, ob es dazu auch *in vivo* kommen kann. Hierfür wurden COS-1-Zellen mit Myosin Ia-YFP und ALPK1-CFP kotransfiziert. Tatsächlich zeigte sich eine Kolokalisation beider Proteine in vesikulären Strukturen (Abb. 4.5).

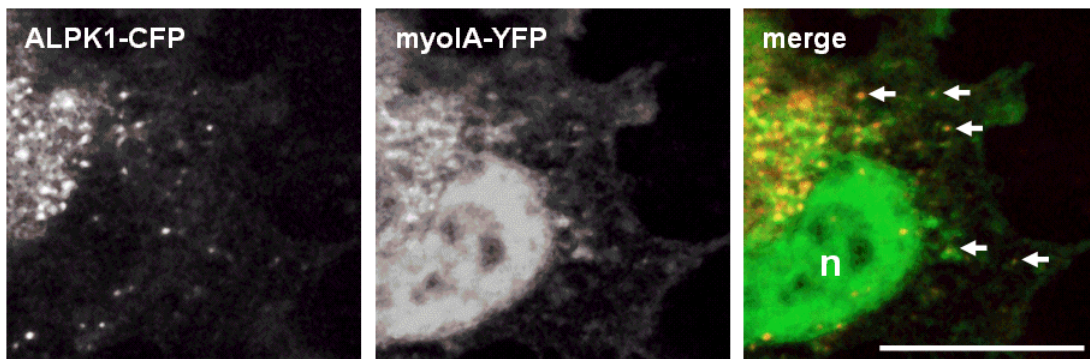


Abb. 4.5 Kolokalisation von Alpha-Kinase 1 und Myosin Ia:

COS-Zellen wurden mit ALPK1-CFP und Myosin Ia-YFP kotransfiziert. Die Pfeile zeigen auf Transportvesikel, die sowohl Alpha-Kinase 1 als auch Myosin Ia tragen. n: Zellkern, Balken: 10 Mikrometer

4.2.7 Effekte einer ALPK1-Beeinträchtigung

Wenn also ALPK1 tatsächlich eine wesentliche Rolle beim SAV-Transport spielen sollte, so müßten sich *in vivo* ihre Inhibierung oder eine weitgehende Unterbindung ihrer Expression mittels siRNA auf den Anteil erfolgreich an die Apikalmembran transportierter SI auswirken. Versuche mit der Zugabe von TFP bzw. Staurosporin auch zu lebenden Zellen führten, analog zu den Resultaten im Kinase-Assay, nur im Falle des Calmodulin-Inhibitors auch zu einer Verringerung des apikalen SI-Anteils (*Anhang, Abb. 5*).

In einem zweiten Versuch reduzierten wir die ALPK1-Menge durch siRNA sowohl auf mRNA- (*Abb. 4.6a*) als auch Protein-Ebene (*Abb. 4.6b*) um etwa 80%. Hierbei wurde der Anteil der SI, der die Apikalmembran erreichte, beträchtlich reduziert, obgleich noch immer ein deutlicher Anteil ans Ziel gelangte (*Abb. 4.6c*). Letzteres könnte den immerhin noch vorhandenen 20% ALPK1 zuzuschreiben sein. Da ein Einfluß auf den geringen basolateralen SI-Anteil ausblieb, wirkt sich die ALPK1 einzig auf den Transport, nicht aber auf den Sortiermechanismus aus.

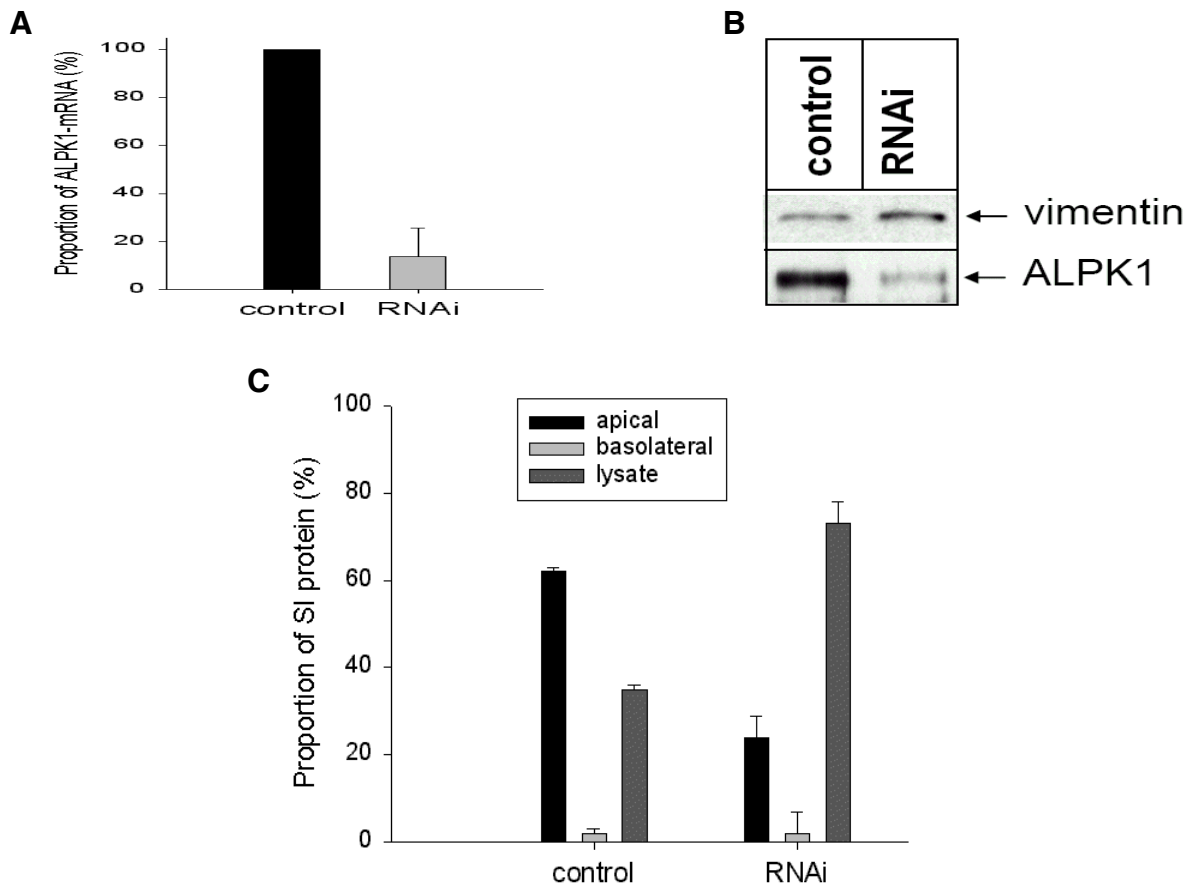


Abb. 4.6 Drosselung der ALPK1-Expression durch siRNA:

A/B: Caco-2-Zellen wurden mit siRNA gegen Alpha-Kinase 1 bzw. gegen Luziferase (als Kontrolle) transfiziert. Anschließend wurde die Menge an ALPK1 sowohl per quantitativer RT-PCR auf mRNA-Ebene bestimmt (A) als auch per Westernblot mit Antikörpern gegen Myosin Ia bzw. Vimentin (Kontrolle) auf Protein-Ebene untersucht (B).

C: Caco-2-Zellen wurden auf Transmembranfiltern in Gegenwart bzw. Abwesenheit von siRNA gegen Alpha-Kinase 1 kultiviert und mittels ^{35}S -Methionin biosynthetisch markiert. Anschließend erfolgte eine Oberflächenpräzipitation mit Antikörpern gegen SI an der apikalen bzw. an der basolateralen Membran. Die Präzipitate wurden einer SDS-PAGE unterzogen und per *Phosphoimaging* quantitativ ausgewertet

Abschließend wurde untersucht, ob sich die ALPK1-Reduktion mittels siRNA auch auf die Myosin Ia-Phosphorylierung der SAV auswirkt. Hierfür wurden diese Vesikel sowohl aus Zellen isoliert, die mit ALPK1-siRNA behandelt worden waren, als auch aus Kontrollzellen. Und tatsächlich fand sich in der 105 kDa-Bande siRNA-behandelter Zellen nach dem Kinase-Assay weniger ^{32}P als in der Kontrolle (Abb. 4.7). Somit besteht also definitiv ein Zusammenhang zwischen der ALPK1-Menge und dem Phosphorylierungsgrad des Myosin Ia der SAV.

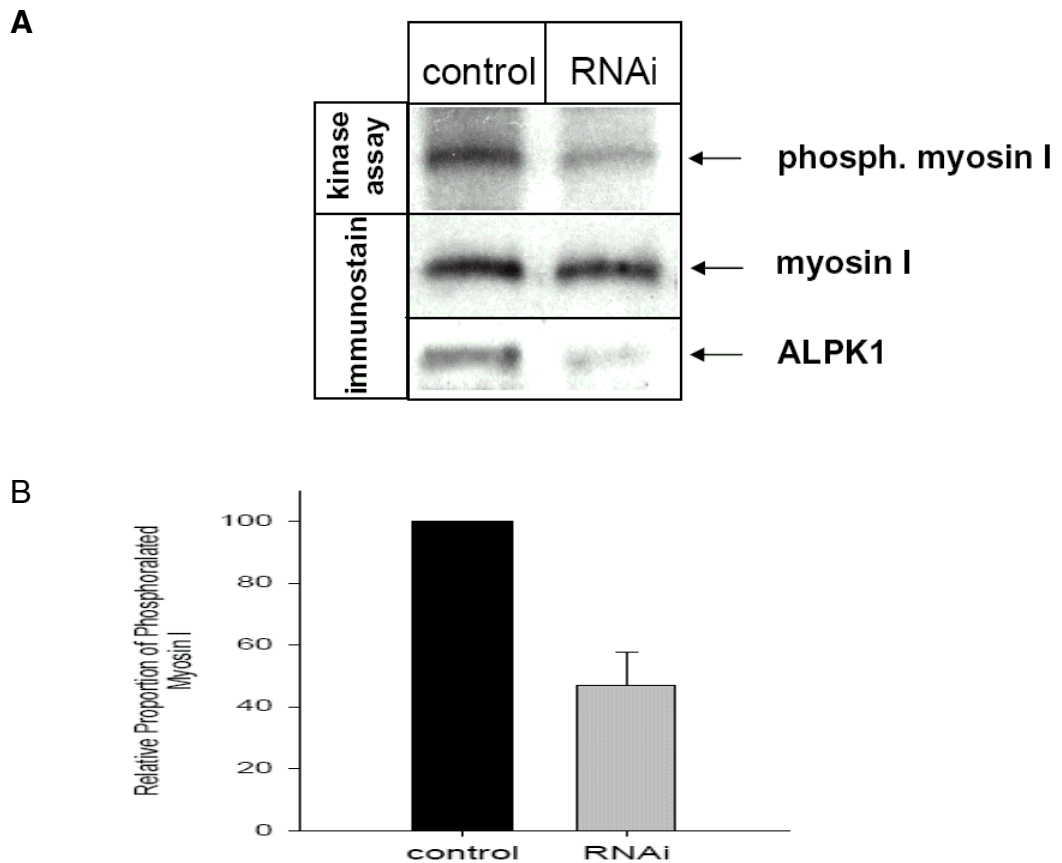


Abb. 4.7 Kinase-Assay ALPK1-siRNA-behandelter Vesikel:

A: MDCK-SI-YFP-Zellen wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von siRNA gegen Alpha-Kinase 1 kultiviert. Anschließend wurden die SI-Vesikel isoliert und einem Kinase-Assay mit $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ bzw. einem Westernblot mit Antikörpern gegen Myosin Ia und Alpha-Kinase 1 unterzogen.

B: Quantitativer Anteil des phosphorylierten Myosin Ia beim Einsatz von siRNA gegen Alpha-Kinase 1 gegenüber unbehandelten Kontrollen

4.3 Zusammenhang der ALPK1 mit dem SAV-Transport

Zusammengefaßt ist der SAV-Transport also abhängig von einer mit diesen Vesikeln präzipitierbaren, nicht-konventionellen, staurosporin-insensitiven Kinase, die Myosin Ia phosphoryliert, dabei zwanzig Minuten nach Verlassen des TGN durch die Vesikel das Maximum erreicht und als Alpha-Kinase 1 identifiziert werden konnte.

Diese Erkenntnis wird unterstützt durch aktuelle Veröffentlichungen, die jüngst eine neue Alpha-Kinase in Golgi-ähnlichen Strukturen von *Dictyostelium* nachgewiesen haben, welche wie ALPK1 durch eine katalytische Domäne am C-Terminus charakterisiert ist^[14], und herausgefunden haben, daß die Alpha-Kinase TRPM7/ChK1 Annexin I phosphoryliert, ein cytosolisches Verbindungsmolekül, das ebenfalls mit dem Proteintransport zusammenhängt^[37].

5. Diskussion

Die Ergebnisse der dieser Dissertation zugrundeliegenden Publikationen zeigen auf, daß nicht nur eine Auftrennung von apikaler und basolateraler Fracht in separate Vesikel erfolgt^[105], sondern sogar innerhalb der Gruppe apikal beförderter Vesikel mindestens zwei unterschiedliche Transportwege bestehen. Dies unterstützt und erweitert die vorangegangene Entdeckung zweier unterschiedlicher apikaler Vesikelpopulationen durch Jacob und Naim in unserer damaligen Arbeitsgruppe^[97].

Dabei war gezeigt worden, daß entgegen der Aufteilung apikaler und basolateraler Proteine, die noch innerhalb des TGN erfolgt^[105], die beiden apikalen Vesikelpopulationen das TGN zunächst noch in gemeinsamen Transportbehältern verlassen. In diesen besteht jedoch bereits eine deutliche Separation der *raft*-assoziierten SI von der LPH. Das deckt sich mit früheren Beobachtungen ähnlicher Verteilungsmuster *raft*-assoziiierter apikaler und nicht-*raft*-assoziiierter basolateraler Proteine in der Plasmamembran unpolarer Zellen^[76].

Ein prinzipiell ähnlicher Vorgang der Auftrennung war zuvor auch schon für anterograde und retrograde Fracht während des Transports vom ER zum Golgi-Apparat beschrieben worden^[134].

Daß die Einbettung der SI in *lipid rafts* hierfür sowie für ihre Auftrennung in eine eigenständige Vesikelpopulation verantwortlich ist, konnte durch Zerstörung dieser Mikrodomänen bewiesen werden. Dies entspricht Vergleichen zwischen apikalem Hämagglutinin und basolateralem VSV-G mit derselben Methode, wobei die Reduktion der Mikrodomänen auch den *post*-Golgi-Transport des Hämagglutinins zur Zelloberfläche beeinträchtigte^[104].

Wie von uns nun gezeigt wurde, bewegen sich die gemeinsamen Transportbehälter mit SI und LPH nach Verlassen des TGN zunächst entlang der schnellen Mikrotubuli-»Autobahnen« in Richtung Zellperipherie, woraufhin dann die spätestens ab diesem Zeitpunkt reinen SAV auf Aktin-Trassen überwechseln^[95] (*Abb. 5.1*).

Die entsprechenden biochemischen und konfokalmikroskopischen Resultate unserer Studien decken sich dabei mit den Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen. So sind bestimmte *lipid rafts* etwa in der Plasmamembran ein wichtiger Kofaktor für die Rekrutierung und Aktivierung bei der Signalübertragung an das Aktin-Cytoskelett und im Vesikeltransport^[26]. Auch Verbindungen zwischen dem Aktin-Cytoskelett und dem *raft*-assoziierten Phosphoproteinkomplex aus PAG und EBP50 sind bekannt^[17]. Ein adaptervermittelter Zusammenhang zwischen *lipid rafts* und Aktinskelett als Mechanismus für die spezifische Bindung ist somit also auch für die SAV wahrscheinlich.

Unsere Identifizierung eines Aktinmotors als spezifisch mit den SAV assoziierten Proteins, des Myosins Ia^[95], untermauert dies und knüpft zudem an Studien an, die Myosin Ia als cytoplasmatisch ausgerichtetes Membranprotein von *post*-TGN-Vesikeln in Enterocyten und MDCK-Zellen beschreiben^[48,148].

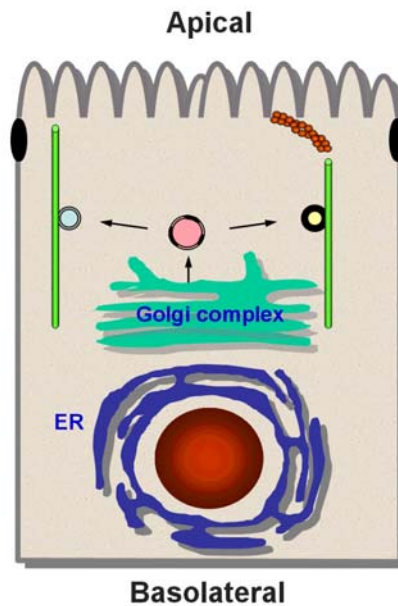


Abb. 5.1 Die beiden unterschiedlichen apikalen Vesikelpopulationen, die durch den Transport der Modellproteine Saccharase-Isomaltase und Lactase-Phlorizin-Hydrolase charakterisiert werden, verlassen das *trans*-Golgi-Netzwerk zunächst noch in gemeinsamen Transportbehältern, bis die Saccharase-Isomaltase schließlich in separate Vesikel abgeschnürt wird, deren Weg zwingend auch noch über die Bahnen des Aktin-Cytoskeletts verläuft, bevor sie an der Plasmamembran anlangen (Grafik: R. Jacob)

Eine Beteiligung anderer in Frage kommender Myosin-Familien am SI-Transport wurde von uns ausgeschlossen. Zwar deuten Experimente prinzipiell auch auf eine Beteiligung von Myosin II an *post*-Golgi-Transportprozessen^[152] bzw. von Myosin V am Organellentransport hin^[8,46], wobei etwa Myosin Vb durch Interaktion mit der GTPase Rab 11a ein zentraler Regulator der Proteinsortierung in den apikalen recycelnden Endosomen ist^[19], aber ihre Inhibierung durch BDM führte zu keiner Beeinträchtigung der SI-Beförderung an die apikale Zellmembran^[95]. Des weiteren zeichnete sich für die Organellenbewegung inzwischen auch ab, daß es neben derjenigen auf Myosin V-Basis auch noch eine zweite Transportmaschinerie entlang der Aktinstränge gibt, an der ein Motorprotein der Myosin I-Klasse (Myosin Ib) beteiligt ist^[30].

Zwar ist Myosin Ia in der apikalen Membran von Epithelzellen auch in Form helikaler Bereiche um Aktinbündel herum lokalisiert^[149], in welchem Zusammenhang es kürzlich als für das Zurückhalten der SI im Bürstensaum mitverantwortlich beschrieben worden ist^[223] (Abb. 5.2), aber Versuche mit dominant-negativen Formen von Myosin Ia haben zusätzlich auch eine Beteiligung dieses Proteins am transepithelialen Transport von basolateral über das endosomale Kompartiment nach apikal und somit der Beförderung und schließlichen Zielführung apikaler Marker belegt^[43].

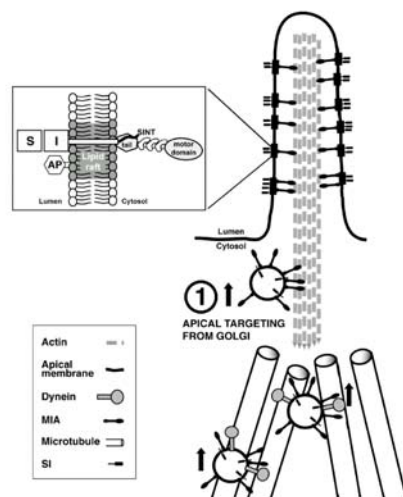


Abb. 5.2 Myosin Ia führt SI-Vesikel in die Mikrovilli der Darmepithelzellen und verankert die Saccharase-Isomaltase dort (Grafik: Tyska et al.)

Betrachtet man zudem die Rolle des Aktins im anterograden, endocytischen und postendocytischen Transport an der Apikalmembran^[133], dann liegt somit die Vermutung nahe, daß das Myosin Ia für die SAV als Motor für die Bewegung entlang der Aktinfilamente zur Plasmamembran dient, die SAV also über endosomale Sortiermechanismen hinweg zusammen mit recycelnden apikalen Proteinen (einschließlich der SI selbst) gemeinsame Aktinbahnen für ihren Weg zur Zelloberfläche nutzen^[136,140,161,188,200]. Ein Weg, der den LAV aufgrund ihrer abweichenden Protein- und Lipidzusammensetzung vorenthalten bleibt.

Auch die beiden nächsten von uns identifizierten Proteine fügen sich in dieses Bild ein, denn von Annexin A2 ist bekannt, daß es mit S100A10 ein Heterotetramer bildet und sowohl an Membranphospholipide bindet - darunter auch endosomale Vesikel^[45] - als auch eine C-terminale Aktinbindestelle aufweist^[51].

Die von uns konfokalmikroskopisch beobachtete Verteilung des Annexin A2 in polaren Epithelzellen in den kortikalen apikalen, aber auch basolateralen Bereichen sowie intrazellulär in vesikulären Strukturen stimmt mit früheren Erkenntnissen überein^[74] und deutet eine Rolle dieses Proteins auch bei basolateralen Transportvorgängen an. Daß hierbei Fusionsproteine aus Annexin A2 und GFP-Varianten bzw. DsRed die Ausbildung des Heterotetramer-Komplexes mit S100A10 nicht beeinträchtigen, war bereits zuvor gezeigt worden^[238]. Unsere Aufnahmen mittels Konfokaler *Laserscan*-Mikroskopie bestätigen somit unsere biochemischen Daten zur Kolo-kalisation von Annexin A2 mit den SAV sowie auch mit Myosin Ia bzw. deren Fehlen bei den LAV.

Die Ausbildung des Heterotetramers sowie auch die Interaktion mit endosomalen Membranen sind dabei unabhängig von Kalzium^[101], was sich in unseren entsprechenden Versuchen mit den SAV ebenfalls niederschlägt. Zudem bestätigten sich frühere Hinweise auf eine Verbindungsfunktion des Annexin A2 zwischen Aktin-Cytoskelett und endosomalen oder exocytotischen Membranen^[61], denn wir konnten zeigen, daß eine Ausschaltung des Annexin A2 durch RNS-Interferenz^[238] tatsächlich den aktinabhängigen Peripherie-Transport der SI zur Plasmamembran unterbindet^[96].

Der Zusammenhang des Annexin A2 mit der *raft*-assoziierten SI deckt sich zudem mit vorangegangenen Beschreibungen einer cholesterolabhängigen Interaktion zwischen dem Annexin A2/S100A10-Komplex und *lipid rafts*^[165]. Während rund die Hälfte des zellulären Annexin A2 nämlich normalerweise extrem fest mit Membranen assoziiert ist, genügen bereits geringe Konzentrationen der cholesterolbindenden und somit diese Mikrodomänen zerstörenden Substanzen Filipin und Digitonin, um es samt einem Komplex weiterer Proteine, darunter Aktin, abzulösen^[75].

Zudem ist Annexin A2 auch nicht das einzige Protein seiner Familie, von dem eine Beteiligung am apikalen Membranverkehr bekannt ist - vielmehr ist die Verbindung des Annexin XIIIb mit dem Transport von Hämagglutinin ein weiterer Hinweis auf die Existenz unterschiedlicher apikaler Transportwege in Epithelzellen^[49,111].

Abgerundet werden diese Zusammenhänge durch den bisher letzten von uns identifizierten Vertreter jener Proteine, die sich nur in Assoziation mit SAV, nicht aber bei den LAV finden: die Alpha-Kinase 1. Daß Phosphorylierung die Funktion und Verteilung von Myosin-Motoren beeinflusst, ist anhand verschiedener Beispiele bekannt^[44,217,233,239]. Wird die Menge an Alpha-Kinase 1 in der Zelle stark reduziert, sinkt, wie wir gezeigt haben, auch der Anteil des phosphorylierten Myosin Ia in den SI-tragenden post-Golgi-Vesikeln, und weniger SI erreicht ihren Bestimmungsort in der Plasmamembran^[80]. Konfokalmikroskopische Aufnahmen unterstreichen zudem die biochemischen Daten einer Kolo-kalisation sowohl mit SI-Vesikeln als auch mit Myosin Ia^[80].

Das Vorkommen der Alpha-Kinase 1 insbesondere in Geweben mit polaren Epithelzellen, wie etwa dem Dünndarm, ist hierbei ein weiterer unterstützender Aspekt^[199]. Die festgestellte Insensitivität gegenüber Staurosporin - ein Gegensatz zu konventionellen Kinasen - stimmt überein mit anderen Alpha-Kinasen wie der eEF-2-Kinase oder TRPM7/ChaK1^[197,198].

Insgesamt ist zwar noch vergleichsweise wenig über die Alpha-Kinasen im allgemeinen und Alpha-Kinase 1 im speziellen bekannt, aber jüngste Veröffentlichungen deuten für weitere Vertreter dieser Familie ebenfalls in Richtung Transportvorgänge und den Golgi-Raum. So wurde dieses Jahr etwa eine neue Alpha-Kinase in Golgi-ähnlichen Strukturen von *Dictyostelium* nachgewiesen, die wie Alpha-Kinase 1 durch eine katalytische Domäne am C-Terminus charakterisiert ist^[14]. Und hinsichtlich der Alpha-Kinase TRPM7/ChK1 konnte gezeigt werden, daß diese Annexin I phosphoryliert - welches cytosolische Verbindungsmolekül ebenfalls mit dem Proteintransport zusammenhängt^[37].

Zusammengefaßt ist also Alpha-Kinase 1 in der Lage, das Motorprotein Myosin Ia zu regulieren, welches wiederum für den Transport derjenigen Vesikel entlang des Aktin-Cytoskeletts hin zur Plasmamembran sorgt, die beispielsweise die *raft*-assoziierte Saccharase-Isomaltase tragen; dabei ist ein Heterotetramer aus Annexin A2 und S100A10 beteiligt, welches wohl eine Verbindung zwischen Vesikelmembran und Aktin herbeiführt (*Abb. 5.3*). Dieses Heterotetramer könnte als Adapterprotein eventuell eine wichtige Funktion beim Herauslösen der SI aus den gemeinsamen *post*-Golgi-Behältern einnehmen, die sie sich zunächst noch mit nicht-*raft*-assoziierten Proteinen wie der LPH teilt.

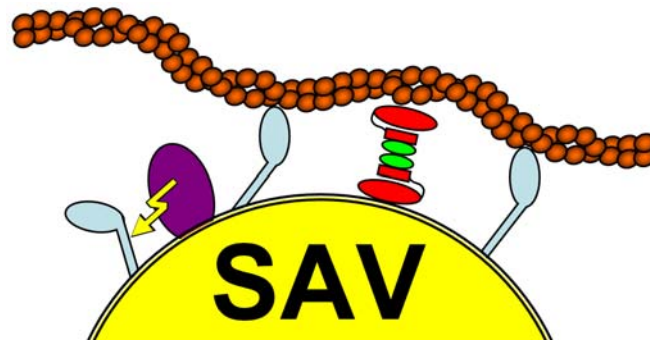


Abb. 5.3 Die Ergebnisse dieser Arbeit in einem Modell zusammenfassend könnte es sein, daß in der Zellperipherie der Kontakt der gemeinsamen, an den Mikrotubuli entlangwandernden *post*-Golgi-Vesikel mit den Aktintrassen (*braun*) dazu führt, daß die Annexin-Heterotetramere (*rot-grün*) einen Haftkontakt zwischen Aktin und den die SI umgebenden *lipid rafts* herstellen und zugleich auch Alpha-Kinase 1 (*lila*) aktiviert wird, welche Myosin Ia (*blau*) phosphoryliert, das dann zusammen mit der Haftkraft der Heterotetramere für das Herauslösen des SAV aus dem Muttervesikel sorgt

Insgesamt ergibt sich hierbei für die SAV das Bild eines Transportweges, der nach Verlassen des TGN zunächst noch mit den LAV gemeinsam verläuft, dann aber über das endosomale Kompartiment an die Plasmamembran gelangt. Dies entspräche auch den jüngsten Erkenntnissen auf dem Gebiet des Proteintransports allgemein, welche zunehmend vom klassischen Bild der Hauptsortierung im Golgi/TGN zugunsten einer starken Rolle der Endosomen abrücken^[188]. Zudem lieferte dieses Modell zugleich eine Erklärung dafür, daß Annexin A2 einerseits an diesem direkten apikalen Transportweg beteiligt ist, es andererseits aber zugleich auch Hinweise für eine Verbindung zum indirekten Transport von der basolateralen Membran aus über die Endosomen gibt^[74].

Damit trägt auch diese Arbeit bei zum gegenwärtigen Paradigmenwechsel vom TGN als wichtigstem Verteilerzentrum hin zu einer räumlichen Streuung mehrerer Sortiermechanismen, die sich vom ER über Golgi-Apparat und TGN sowie die Endosomen bis hin zur basolateralen Membran erstrecken. Wie die einzelnen Aufteilungsvorgänge nach Verlassen des TGN dann im Detail ablaufen, wird neben der Identifizierung weiterer Komponenten des SAV-Transportes künftig noch erforscht werden müssen.

6. Zusammenfassung

In Fortführung der vorangegangenen Entdeckung durch Jacob und Naim in unserer damaligen Arbeitsgruppe, daß zwei verschiedene Populationen von *post*-Golgi-Vesikeln für den Transport apikaler Membranproteine existieren^[97], konnten wir zeigen, daß diese zunächst gemeinsam durch raschen Transport entlang der Mikrotubulibahnen des Cytoskeletts zur Peripherie verbracht werden und es erst nach Verlassen des TGN zu ihrer Auftrennung kommt. In deren Zuge erfahren dann einzig diejenigen Vesikel auf ihrem Weg zur Plasmamembran eine Umlenkung auf die Aktinfilamente der Zellperipherie, die die *raft*-assoziierte SI tragen - nicht aber die LPH-tragende Population^[95].

Zudem konnten wir für vier Proteine zeigen, daß sie einzig für die SI-tragende Vesikelpopulation eine Rolle spielen, nicht aber für die LPH-Vesikel. Zwei davon sind Annexin A2 und S100A10, die zusammen ein Heterotetramer bilden, welches sowohl für die Anbindung an Membranphospholipide als auch für das Vorhandensein einer Aktinbindestelle bekannt ist. Und tatsächlich ließ sich von uns nachweisen, daß eine Drosselung der Annexin A2-Menge den aktinabhängigen Transport der SI in der Zellperipherie zur Plasmamembran unterbindet^[96].

Ein weiteres dieser Eiweiße ist Myosin Ia, ein Aktin-Motorprotein^[95], welches sich zudem als ein Ziel der Aktivierung durch Alpha-Kinase 1 erwies, dem vierten von uns einzig in der SI-tragenden apikalen Vesikelpopulation vorgefundenen Protein. Wird die Menge an Alpha-Kinase 1 in der Zelle stark reduziert, wird, wie wir gezeigt haben, auch weniger Myosin Ia in den SI-tragenden *post*-Golgi-Vesikeln phosphoryliert; als Folge davon gelangt weniger SI an ihren Bestimmungsort in der Plasmamembran^[80].

Insgesamt zeichnet dies das Bild eines apikalen Transportweges, der anders als bei der LPH nicht direkt vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran führt, sondern offenbar über das endosomale Kompartiment verläuft. Hierbei könnten zudem die von uns identifizierten Proteine eine wichtige Rolle bei der Auftrennung dieser beiden zunächst noch vereinten apikalen Vesikelpopulationen spielen.

Anhang

Ergänzende Abbildungen

Nachfolgende im Haupttext erwähnte Abbildungen aus den zugrundeliegenden Veröffentlichungen entstanden ohne Beteiligung des Verfassers.

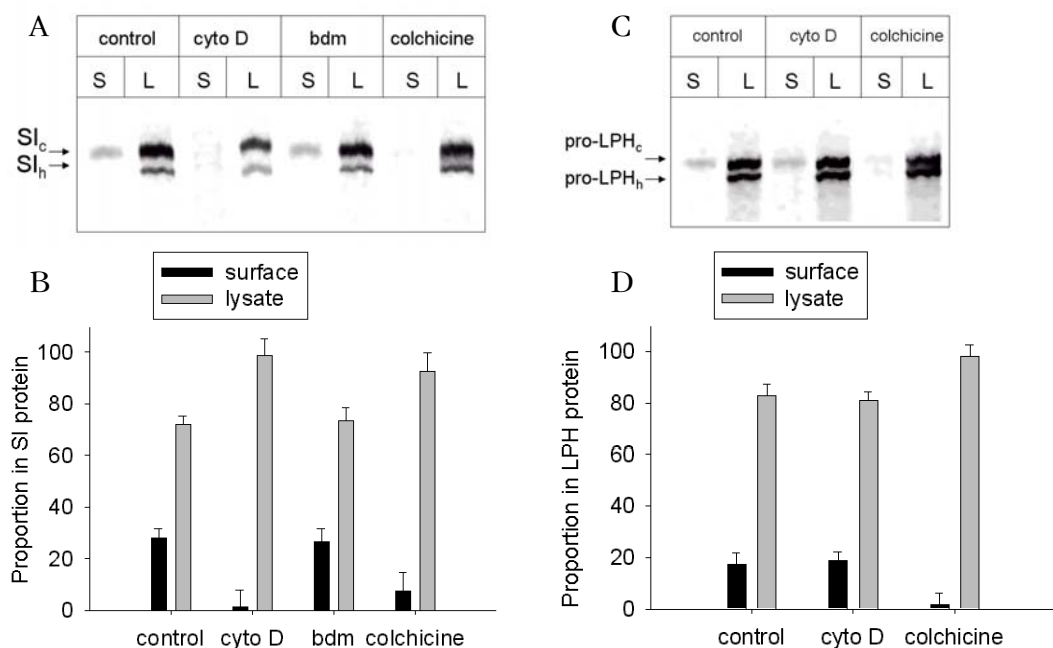


Abb. 1 a: Die komplex-glykosylierte Form der SI (SI_c) wird in der Kontrolle korrekt an die Zelloberfläche (*surface*, S) transportiert. Bei Zugabe von CytoD oder Kolchizin wird dieser Transport unterbunden, die SI findet sich ausschließlich innerhalb der Zelle (Lysat, L). BDM hingegen führt zu keiner Beeinträchtigung

b: Prozentuale Verteilung Oberfläche/Lysat für SI

c/d: Auf den Oberflächentransport der LPH hingegen hat CytoD keinen Einfluß, lediglich Kolchizin

Somit also ist der Oberflächentransport beider Proteine auf Mikrotubuli angewiesen (werden durch Kolchizin zerstört), wobei SI zusätzlich auch noch Aktinfilamente benötigt, nicht aber die LPH (CytoD depolymerisiert die Aktinfilamente). Für den Transport der SI an den Aktinfilamenten entlang kommen die Myosinklassen II und V nicht in Frage (werden durch BDM inhibiert)

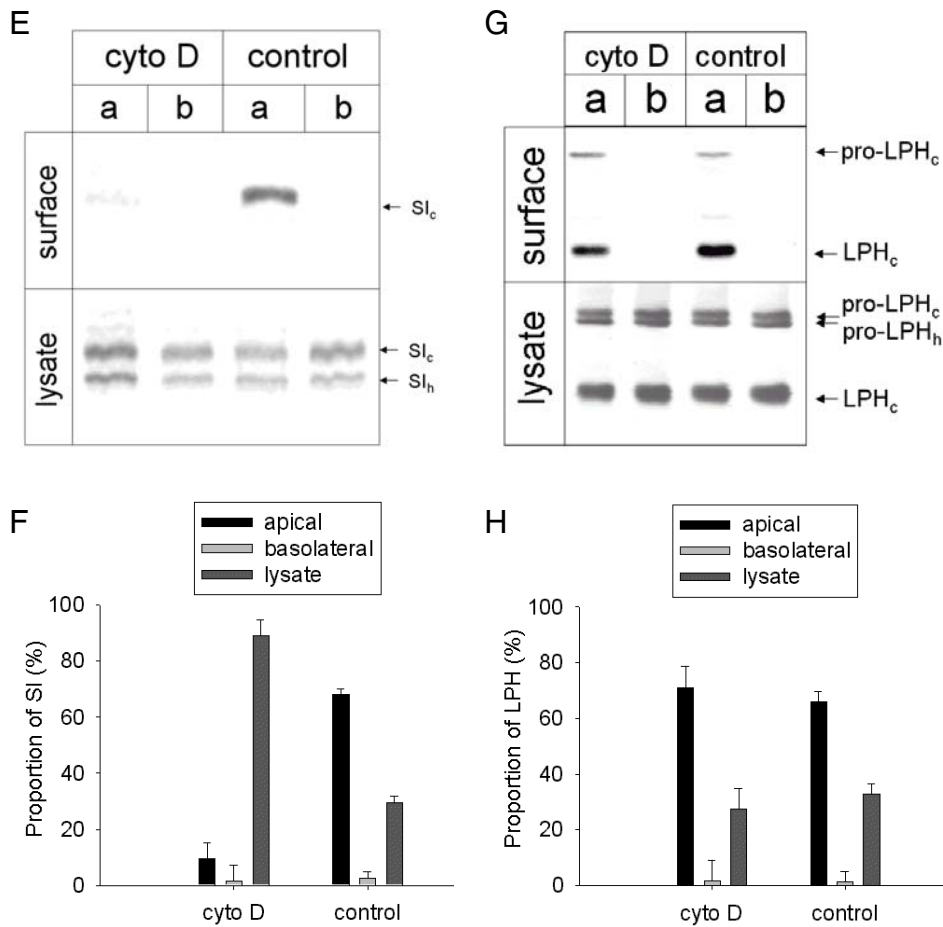


Abb. 1 e/f: Die separate Betrachtung der apikalen (a) und basolateralen (b) Zelloberfläche zeigt, daß die Zerstörung der Aktinfilamente sich tatsächlich unmittelbar auf den Transport der SI auswirkt.

Wäre stattdessen der Sortiermechanismus betroffen, hätte sich der Anteil der SI an der basolateralen Membran erhöht, was aber nicht der Fall ist

g/h: Wie bereits im vorangegangenen Experiment wirkt sich CytoD nicht auf den Oberflächentransport der LPH aus.

Auch eine signifikante Beeinflussung ihrer Sortierung findet nicht statt

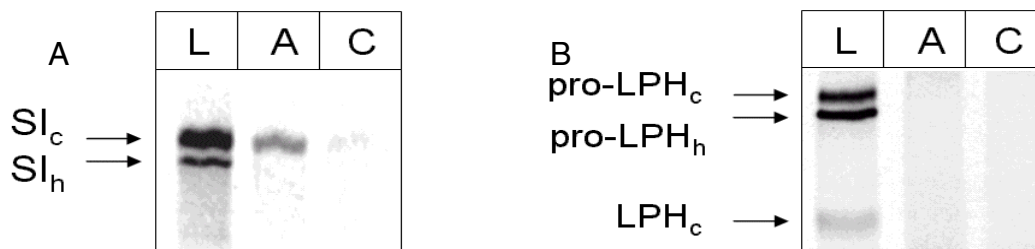


Abb. 2 a/b: Aufgereinigte SAV (a) bzw. LAV (b) wurden über einen aktinbeschichteten Sensorchip geleitet, und eventuelle nun an das Aktin gebundene Proteine sodann vom Chip heruntergewaschen

Für die anschließende Immunpräzipitation wurde neben diesen Proben (A) auch das Lysat (L) jener Zellen eingesetzt, aus denen die aufgereinigten Vesikel gewonnen worden waren. Als zusätzliche Kontrolle diente ein Sensorchip ohne Aktinbeschichtung (C)

Auch der Biosensor bestätigt somit die den LPH-Vesikeln fehlende Fähigkeit der SI-Vesikel, an Aktinfilamente zu binden

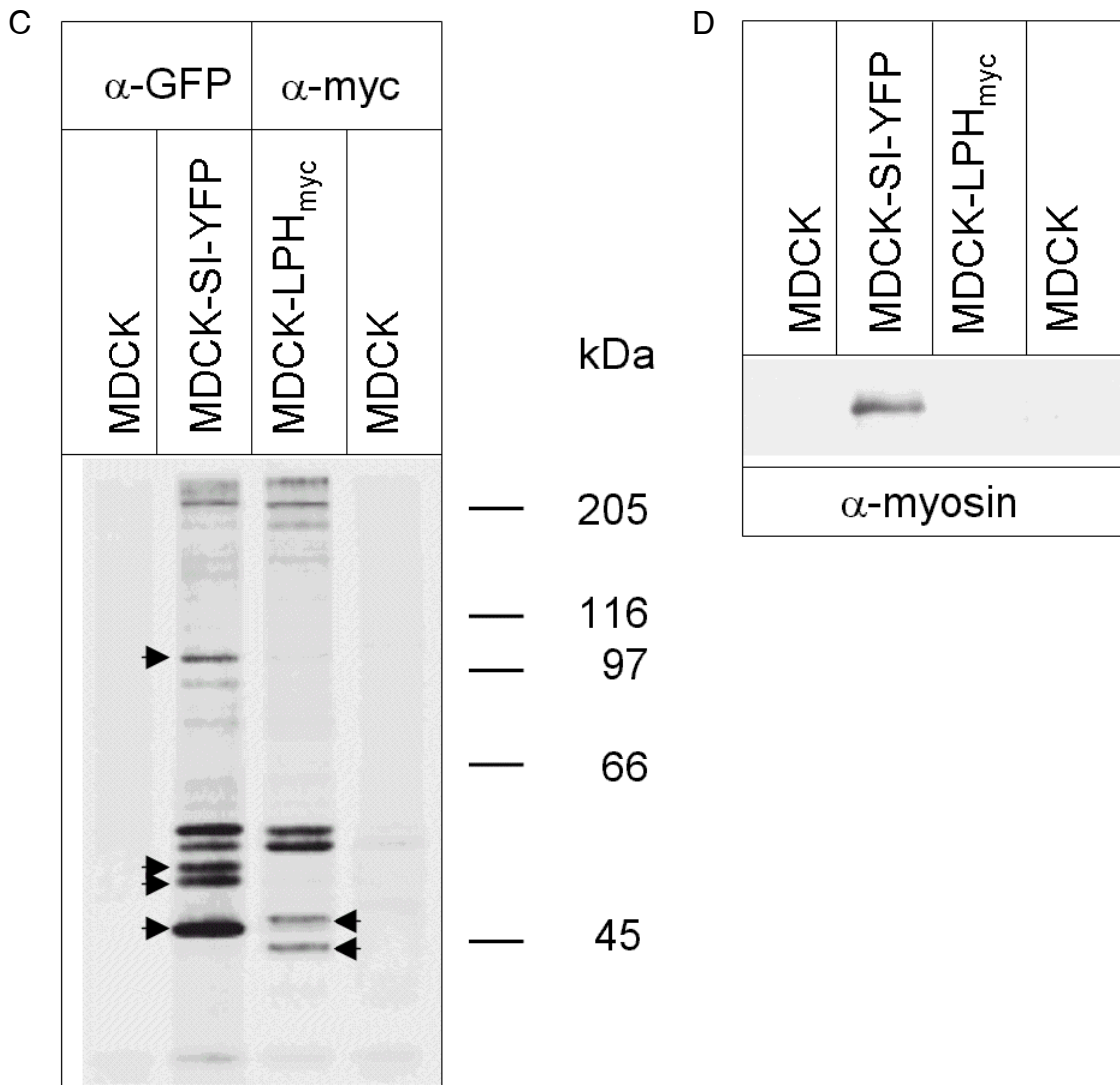


Abb. 2 c: Bei der Auftrennung aufgereinigter SAV (MDCK-SI-YFP) und LAV (MDCK-LPH_{myc}) in einem SDS-Polyacrylamidgel erhielten wir unterschiedliche Bandenmuster: neben gemeinsamen Proteinbanden finden sich auch solche, die nur für eine der beiden Vesikelpopulationen charakteristisch sind

d: Eine Massenspektrometrie der SAV-Bande auf Höhe von etwa 105 kDa lieferte uns den Hinweis auf das Aktin-Motorprotein Myosin Ia. Und tatsächlich bringt ein Westernblot mit aufgereinigten Vesikeln sowie einem Antikörper gegen Myosin Ia eine Bande von 104 kDa bei den SAV hervor, nicht aber bei den LAV oder nicht-transfizierten Kontrollzellen

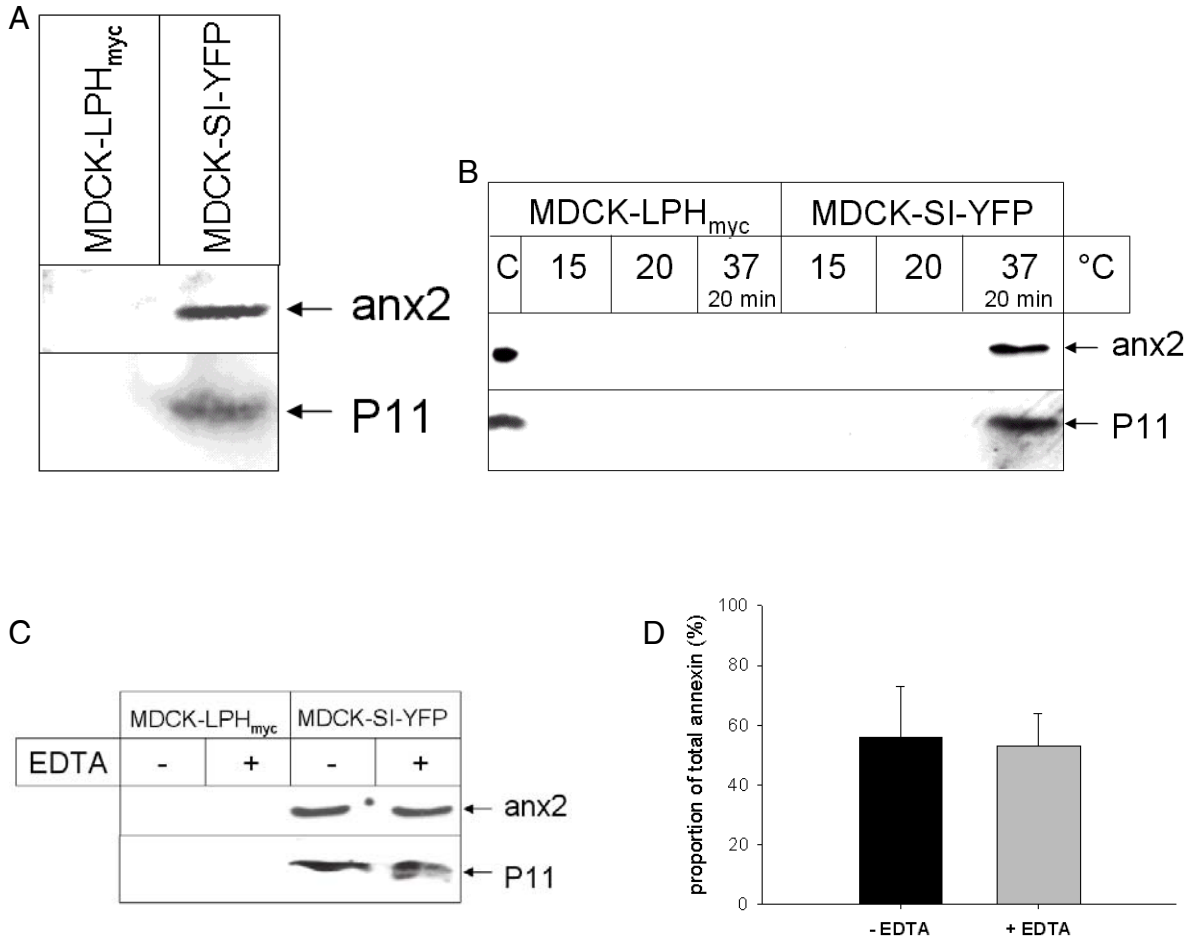


Abb. 3 a: Mittels Antikörpern gegen Annexin A2 und S100A10 (P11) konnten wir diese beiden Proteine in SAV (MDCK-SI-YFP) nachweisen. Bei den LAV (MDCK-LPH_{myc}) sind sie nicht vorhanden

b: Temperaturblockaden des sekretorischen Proteintransports im ER (15 °C) und Golgi-Apparat (20 °C) sowie anschließende Inkubation bei 37 °C zeigen, daß Annexin A2 und S100A10 erst nach Verlassen des TGN mit den SAV assoziieren

c: Auch bei Bindung der Kalziumionen durch Zugabe des Chelatbildners EDTA können Annexin A2 und S100A10 zusammen mit den SAV präzipitiert werden

d: Ebenso bleibt die Menge des mit den SAV assoziierten Annexins A2 gleich; mit und ohne EDTA beträgt der präzipitierte Anteil stets 55 - 60% des insgesamt vorhandenen Annexins A2

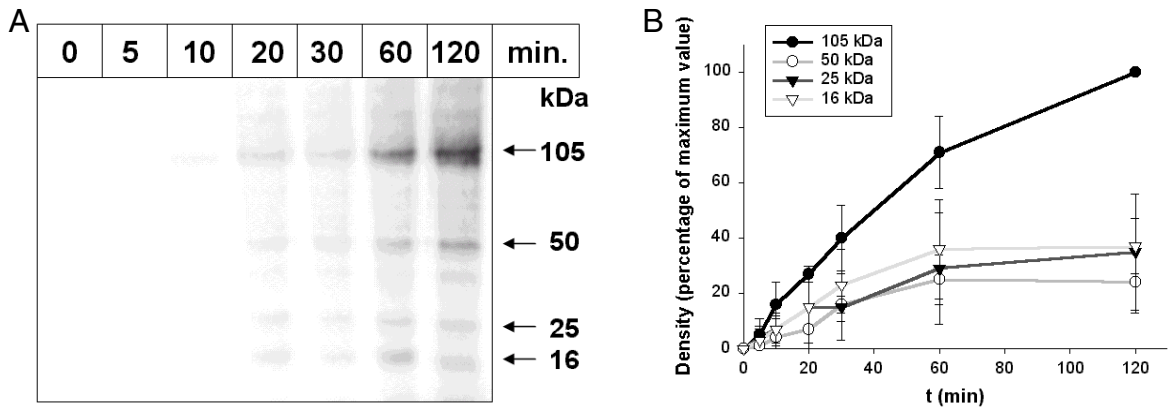
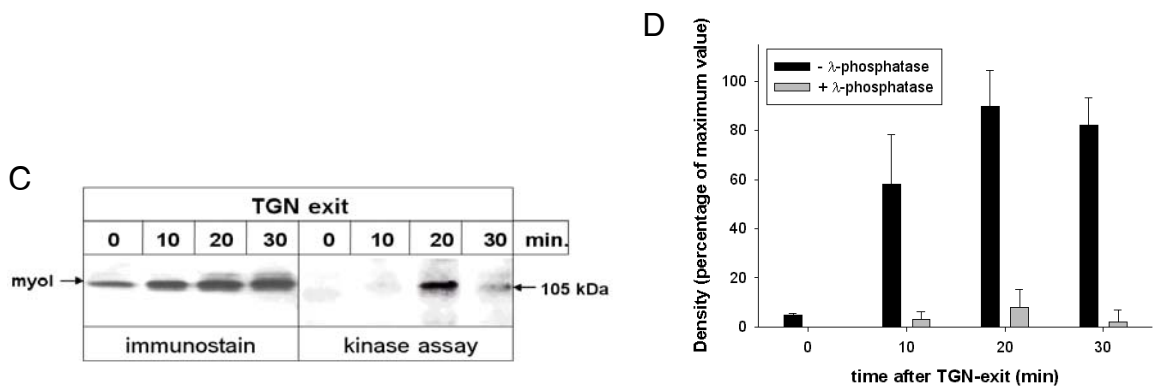


Abb. 4 a+b: Kinase-Assay aufgereinigter SAV mit unterschiedlich langen Inkubationszeiten. Nach ein bis zwei Stunden schält sich eine starke Proteinbande von etwa 105 kDa als Empfänger des radioaktiven Phosphatrests heraus - Myosin Ia. Auch treten drei schwächere Banden von etwa 50, 25 und 16 kDa hervor. Rechts daneben die Quantifizierung der Bandenintensitäten für die einzelnen Zeitwerte



c+d: Werden die SAV durch einen Temperaturblock im Golgi-Apparat festgehalten und anschließend zu verschiedenen Zeitwerten nach Verlassen des TGN aufgereinigt, so ergibt sich im Westernblot mit zunehmender Produktion und Assoziation mit den Vesikeln auch eine zunehmend starke Proteinbande

Bei der Phosphorylierung des Myosin Ia aber ergibt sich ein Maximum zwanzig Minuten nach Verlassen des TGN, was bedeutet, daß die *post*-Golgi-Vesikel der SI nach eben dieser Zeitspanne jenen Punkt erreichen, an dem das meiste Myosin Ia von seiner Kinase phosphoryliert wird. Hat der Pulk der zuvor im TGN aufgestauten Proteine diesen Punkt passiert, folgt ihm lediglich der reguläre Proteindurchsatz, die Anzahl der phosphorylierten Myosin Ia-Moleküle flacht ab

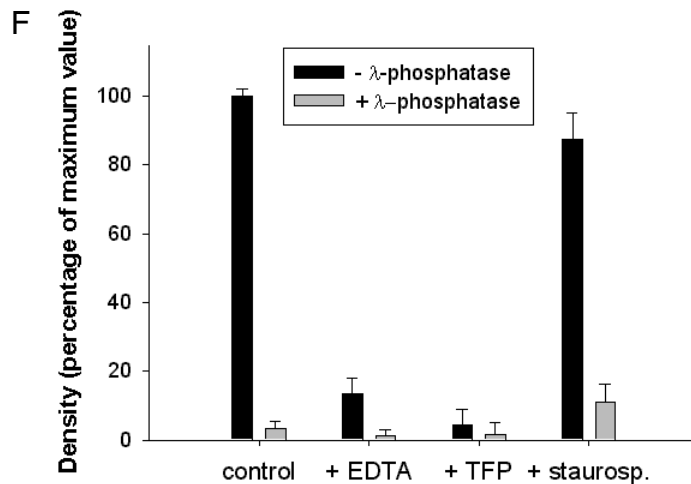
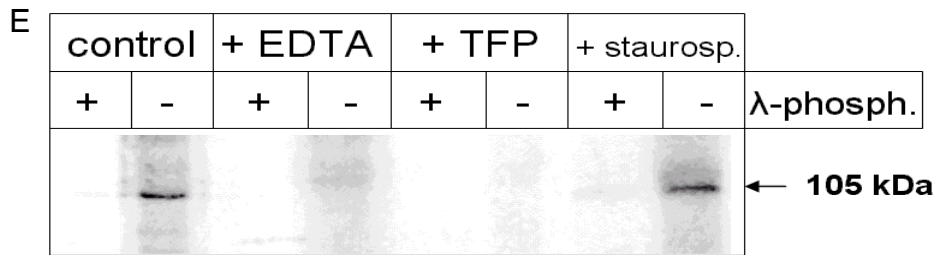


Abb. 4 e+f: Während der Chelatbildner EDTA und der Inhibitor TFP die Phosphorylierung des Myosin Ia beeinträchtigen, die Reaktion also von Kalzium und Calmodulin abhängig ist, vermag Staurosporin die Aktivität der hier verantwortlichen Kinase - anders als bei den konventionellen Kinasen - offensichtlich nicht herabzusetzen. Diese Unanfälligkeit für Staurosporin ist ein Merkmal von Alpha-Kinasen

Als Kontrolle wird λ -Phosphatase hinzugegeben, um durch die von ihr bewirkte Dephosphorylierung sicherzustellen, daß die beobachtete radioaktive Proteinbande tatsächlich auf eine Übertragung des markierten Phosphatrests zurückzuführen ist

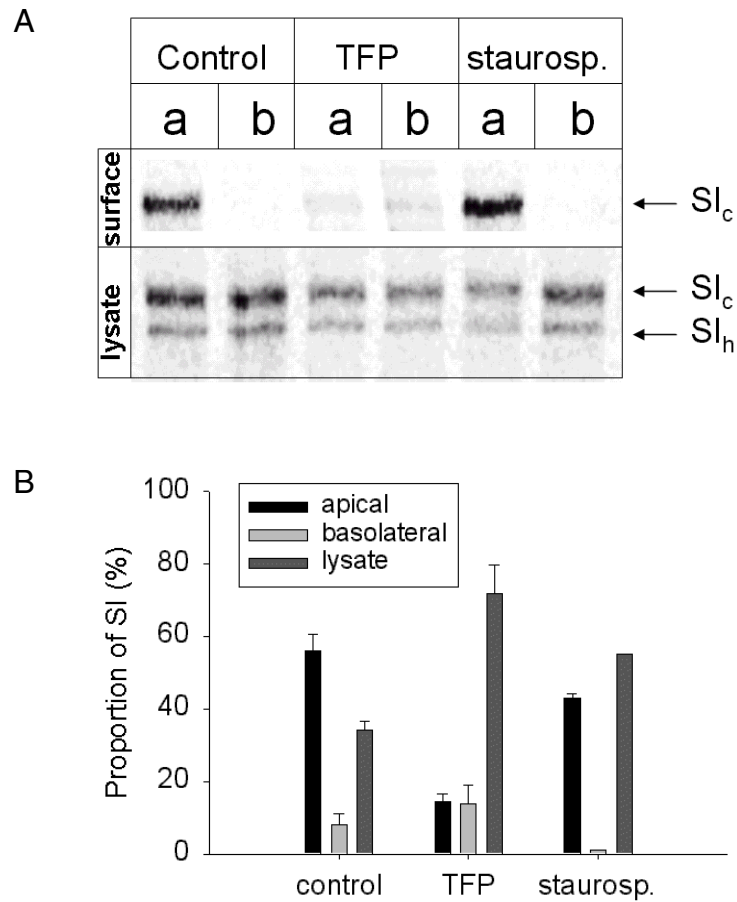


Abb. 5 a+b: Wird die Phosphorylierung des Myosin Ia durch Alpha-Kinase 1 unterbunden, indem man wie in den vorangegangenen Versuchen den Calmodulin-Inhibitor TFP hinzugibt, so wird auch der Oberflächentransport der SI massiv beeinträchtigt. Staurosporin hingegen übt - analog zu den Kinase-Assays - keinen solch starken Einfluß auf die Beförderung der SI zur apikalen Membran aus

Literaturverzeichnis

1. **Adams, R. J., and Pollard, T. D.** (1989): Binding of myosin I to membrane lipids. *Nature* 340(6234):565-8
2. **Alfalah, M., Jacob, R., Preuss, U., Zimmer, K. P., Naim, H., and Naim, H. Y.** (1999): O-linked glycans mediate apical sorting of human intestinal sucrase-isomaltase through association with lipid rafts. *Curr. Biol.* 9:593-596
3. **Anderson, J. M., Balda, M. S. and Fanning, A. S.** (1993): The structure and regulation of tight junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 772-778
4. **Apodaca, G., Bomsel, M., Arden, J., Breitfeld, P. P., Tang, K., and Mostov, K. E.** (1991): The polymeric immunoglobulin receptor. A model protein to study transcytosis. *J. Clin. Invest* 87:1877-1882
5. **Apodaca, G., Cardone, M. H., Whiteheart, S. W., DasGupta, B. R., and Mostov, K. E.** (1996): Reconstitution of transcytosis in SLO-permeabilized MDCK cells: existence of an NSF-dependent fusion mechanism with the apical surface of MDCK cells. *EMBO J.* 15:1471-1481
6. **Arzeti, B., Kosen, P. A., Kuntz, I. D., Cohen, F. E., and Mostov, K. E.** (1993): Mutational and secondary structural analysis of the basolateral sorting signal of the polymeric immunoglobulin receptor. *J. Cell Biol.* 123:1149-1160
7. **Arzeti, B., Okhrimenko, H., Reich, V., and Orzech, E.** (1998): Polarized trafficking of plasma membrane proteins: emerging roles for coats, SNAREs, GTPases and their link to the cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta* 1376:57-90
8. **Baker, J. P., and Titus, M. A.** (1998): Myosins: matching functions with motors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10(1):80-6
9. **Bartles, J. R., Feracci, H. M., Stieger, B., and Hubbard, A. L.** (1987): Biogenesis of the rat hepatocyte plasma membrane in vivo: comparison of the pathways taken by apical and basolateral proteins using subcellular fractionation. *J. Cell Biol.* 105:1241-1251
10. **Bartles, J. R., and Hubbard, A. L.** (1988): Plasma membrane protein sorting in epithelial cells: do secretory pathways hold the key? *Trends Biochem. Sci.* 13:181-184
11. **Benting, J. H., Rietveld, A. G., and Simons, K.** (1999): N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 146:313-320
12. **Benz, J., Bergner, A., Hofmann, A., Demange, P., Gottig, P., Liemann, S., Huber, R., and Voges, D.** (1996): The structure of recombinant human annexin VI in crystals and membrane-bound. *J. Mol. Biol.* 260(5):638-43
13. **Berg, J. S., Powell, B. C., and Cheney, R. E.** (2001): A millennial myosin census. *Mol. Biol. Cell* 12:780-794
14. **Betapudi, V., Mason, C., Licate, L., and Egelhoff, T. T.** (2005): Identification and Characterization of a Novel {alpha}-Kinase with a von Willebrand Factor A-like Motif Localized to the Contractile Vacuole and Golgi Complex in Dictyostelium discoideum. *Mol. Biol. Cell* 16(5):2248-62
15. **Biederer, T., Volkwein, C., and Sommer, T.** (1996): Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 15:2069-2076
16. **Bonifacio, J. S., and Weissman, A. M.** (1998): Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:19-57
17. **Brdickova, N., Brdicka, T., Andera, L., Spicka, J., Angelisova, P., Milgram, S. L., and Horejsi, V.** (2001): Interaction between two adapter proteins, PAG and EBP50: a possible link between membrane rafts and actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* 507:133-136
18. **Brewer, C. B., and Roth, M. G.** (1991): A single amino acid change in the cytoplasmic domain alters the polarized delivery of influenza virus hemagglutinin. *J. Cell Biol.* 114:413-421
19. **Brock, S. C., Goldenring, J. R., and Crowe, J. E.** (2003): Apical recycling systems regulate directional budding of respiratory syncytial virus from polarized epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(25):15143-8
20. **Brown, D. A., Crise, B., and Rose, J. K.** (1989): Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells. *Science* 245:1499-1501
21. **Brown, D. A., and Rose, J. K.** (1992): Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68:533-544
22. **Brzeska, H., Knaus, U. G., Wang, Z. Y., Bokoch, G. M., and Korn, E. D.** (1997): p21-activated kinase has substrate specificity similar to Acanthamoeba myosin I heavy chain kinase and activates Acanthamoeba myosin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(4):1092-5
23. **Brzeska, H., Lynch, T. J., and Korn, E. D.** (1990): Acanthamoeba myosin I heavy chain kinase is activated by phosphatidylserine-enhanced phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 265:3591-3594
24. **Brzeska, H., Lynch, T. J., Martin, B. M., and Korn, E. D.** (1989): The localization and sequence of the phosphorylation sites of Acanthamoeba myosins I. An improved method for locating the phosphorylated amino acid. *J. Biol. Chem.* 264:19340-19348
25. **Caplan, M. J.** (1997): Membrane polarity in epithelial cells: protein sorting and establishment of polarized domains. *Am. J. Physiol.* 272:F425-9

26. **Caroni, P.** (2001): New EMBO members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts. *EMBO J.* 20:4332-4336
27. **Casanova, J. E., Apodaca, G., and Mostov, K. E.** (1991): An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. *Cell* 66:65-75
28. **Casanova, J. E., Mishumi, Y., Ikehara, Y., Hubbard, A. L., and Mostov, K. E.** (1991): Direct apical sorting of rat liver dipeptidylpeptidase IV expressed in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 266:24428-24432
29. **Chuang, J. Z., and Sung, C. H.** (1998): The cytoplasmic tail of rhodopsin acts as a novel apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* 142(5):1245-56
30. **Cordonnier, M. N., Dauzonne, D., Louvard, D., and Coudrier, E.** (2001): Actin filaments and myosin I alpha cooperate with microtubules for the movement of lysosomes. *Mol. Biol. Cell* 12(12):4013-29
31. **Cote, G. P., Luo, X., Murphy, M. B., and Egelhoff, T. T.** (1997): Mapping of the novel protein kinase catalytic domain of Dictyostelium myosin II heavy chain kinase A. *J. Biol. Chem.* 272:6846-6849
32. **Cramer, L. P., and Mitchison, T. J.** (1995): Myosin is involved in postmitotic cell spreading. *J. Cell Biol.* 131:179-189
33. **Cullen, D. C., Brown, R. G., and Lowe, C. R.** (1987): Detection of immuno-complex formation via surface plasmon resonance on gold-coated diffraction gratings. *Biosensors* 3:211-225
34. **Dai, J., Ting-Beall, H. P., Hochmuth, R. M., Sheetz, M. P. and Titus, M. A.** (1999): Myosin I contributes to the generation of resting cortical tension. *Biophys. J.* 77:1168-1176
35. **Desai, A., and Mitchison, T. J.** (1997): Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:83-117
36. **Doberstein, S. K., and Pollard, T. D.** (1992): Localization and specificity of the phospholipid and actin binding sites on the tail of Acanthamoeba myosin IC. *J. Cell Biol.* 117(6):1241-9
37. **Dorovkov, M. V., and Ryazanov, A. G.** (2004): Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase. *J. Biol. Chem.* 279:50643-50646
38. **Dragsten, P. R., Blumenthal, R., and Handler, J. S.** (1981): Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? *Nature* 294:718-722
39. **Drenckhahn, D., and Dermietzel, R.** (1988): Organization of the actin filaments cytoskeleton in the intestinal brush-border: a quantitative and qualitative immunoelectron microscope study. *J. Cell Biol.* 107:1037-1048
40. **Drennan, D., and Ryazanov, A. G.** (2004): Alpha-kinases: analysis of the family and comparison with conventional protein kinases. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 85(1):1-32
41. **Drubin, D. G., and Nelson, W. J.** (1996): Origins of cell polarity. *Cell* 84:335-344
42. **Drust, D. S., and Creutz, C. E.** (1988): Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. *Nature* 331(6151):88-91
43. **Durrbach, A., Raposo, G., Tenza, D., Louvard, D., and Coudrier, E.** (2000): Truncated brush border myosin I affects membrane traffic in polarized epithelial cells. *Traffic* 1:411-424
44. **Egelhoff, T. T., Lee, R. J., and Spudich, J. A.** (1993): Dictyostelium myosin heavy chain phosphorylation sites regulate myosin filament assembly and localization in vivo. *Cell* 75(2):363-71
45. **Emans, N., Gorvel, J. P., Walter, C., Gerke, V., Kellner, R., Griffiths, G., and Gruenberg, J.** (1993): Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles. *J. Cell Biol.* 120:1357-1369
46. **Evans, L. L., Lee, A. J., Bridgman, P. C., and Mooseker, M. S.** (1998): Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport. *J. Cell Sci.* 111(14):2055-66
47. **Fan, H., Meng, W., Kilian, C., Grams, S., and Reutter, W.** (1997): Domain-specific N-glycosylation of the membrane glycoprotein dipeptidylpeptidase IV (CD26) influences its subcellular trafficking, biological stability, enzyme activity and protein folding. *Eur. J. Biochem.* 246:243-251
48. **Fath, K. R., and Burgess, D. R.** (1993): Golgi-derived vesicles from developing epithelial cells bind actin filaments and possess myosin-I as a cytoplasmically oriented peripheral membrane protein. *J. Cell Biol.* 120:117-127
49. **Fiedler, K., Lafont, F., Parton, R. G., and Simons, K.** (1995): Annexin XIIIb: a novel epithelial specific annexin is implicated in vesicular traffic to the apical plasma membrane. *J. Cell Biol.* 128:1043-1053
50. **Fiedler, K., and Simons, K.** (1996): Characterization of VIP36, an animal lectin homologous to leguminous lectins. *J. Cell Sci.* 109:271-276
51. **Filipenko, N. R., and Waisman, D. M.** (2001): The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin. *J. Biol. Chem.* 276:5310-5315
52. **Folsch, H., Ohno, H., Bonifacino, J. S., and Mellman, I.** (1999): A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* 99:189-198
53. **Fransen, J. A., Hauri, H. P., Ginsel, L. A., and Naim, H. Y.** (1991): Naturally occurring mutations in intestinal sucrase-isomaltase provide evidence for the existence of an intracellular sorting signal in the isomaltase subunit. *J. Cell Biol.* 115(1):45-57. Erratum (1991): *J. Cell Biol.* 115(5):1473
54. **Fuchs, E., and Cleveland, D. W.** (1998): A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279(5350): 514-9

55. **Fullekrug, J., Scheiffele, P., and Simons, K. (1999):** VIP36 localisation to the early secretory pathway. *J. Cell Sci.* 112:2813-2821
56. **Futey, L. M., Medley, Q. G., Cote, G. P., and Egelhoff, T. T. (1995):** Structural analysis of myosin heavy chain kinase A from Dictyostelium. Evidence for a highly divergent protein kinase domain, an amino-terminal coiled-coil domain, and a domain homologous to the beta-subunit of heterotrimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* 270:523-529
57. **Gallagher, P., Henneberry, J., Wilson, I., Sambrook, J., and Gething, M. J. (1988):** Addition of carbohydrate side chains at novel sites on influenza virus hemagglutinin can modulate the folding, transport, and activity of the molecule. *J. Cell Biol.* 107:2059-2073
58. **Garcia, M., Mirre, C., Quaroni, A., Reggio, H., and Le Bivic, A. (1993):** GPI-anchored proteins associate to form microdomains during their intracellular transport in Caco-2 cells. *J. Cell Sci.* 104:1281-1290
59. **Geli, M. I., Lombardi, R., Schmelzl, B., and Riezman, H. (2000):** An intact SH3 domain is required for myosin I-induced actin polymerization. *EMBO J.* 19:4281-4291
60. **Geli, M. I., and Riezman, H. (1996):** Role of type I myosins in receptor-mediated endocytosis in yeast. *Science* 272:533-535
61. **Gerke, V., and Moss, S. E. (1997):** Annexins and membrane dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* 1357:129-154
62. **Gerke, V., and Moss, S. E. (2002):** Annexins: from structure to function. *Physiol. Rev.* 82:331-371
63. **Gerke, V., and Weber, K. (1984):** Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin. *EMBO J.* 3(1):227-33
64. **Gerke, V., and Weber, K. (1985):** The regulatory chain in the p36-kd substrate complex of viral tyrosine-specific protein kinases is related in sequence to the S-100 protein of glial cells. *EMBO J.* 4(11):2917-20
65. **Gilbert, T., Le Bivic, A., Quaroni, A., and Rodriguez-Boulan, E. (1991):** Microtubular organization and its involvement in the biogenetic pathways of plasma membrane proteins in Caco-2 intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 113:275-288
66. **Gillespie, P. G., Wagner, M. C., and Hudspeth, A. J. (1993):** Identification of a 120 kd hair-bundle myosin located near stereociliary tips. *Neuron* 11:581-594
67. **Gilmore, R. (1993):** Protein translocation across the endoplasmic reticulum: a tunnel with toll booths at entry and exit. *Cell* 75:589-592
68. **Girard, C., Tinel, N., Terrenoire, C., Romey, G., Lazdunski, M., and Borsotto, M. (2002):** p11, an annexin II subunit, an auxiliary protein associated with the background K⁺ channel, TASK-1. *EMBO J.* 21:4439-4448
69. **Goodson, H., Anderson, B., Warrick, H., Pon, L., and Spudich, J. (1996):** Synthetic lethality screen identifies a novel yeast myosin I gene (*myo5*): myosin I proteins are required for polarization of the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 133:1277-1291
70. **Griffiths, G., and Simons, K. (1986):** The trans-Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* 234:438-443
71. **Haigler, H. T., Fitch, J. M., Jones, J. M., and Schlaepfer, D. D. (1989):** Two lipocortin-like proteins, endonexin II and anchorin CII, may be alternate splices of the same gene. *Trends Biochem. Sci.* 14(2):48-50
72. **Hammerton, R. W., Krzeminski, K. A., Mays, R. W., Ryan, T. A., Wollner, D. A., and Nelson, W. J. (1991):** Mechanism for regulating cells surface distribution of Na⁺/K⁺-ATPase in polarized epithelial cells. *Science* 254:847-850
73. **Hammond, C., and Helenius, A. (1994):** Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 126:41-52
74. **Harder, T., and Gerke, V. (1993):** The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin IIp11(2) complex. *J. Cell Biol.* 123:1119-1132
75. **Harder, T., Kellner, R., Parton, R. G., and Gruenberg, J. (1997):** Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. *Mol. Biol. Cell* 8(3):533-45
76. **Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., and Simons, K. (1998):** Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell Biol.* 141:929-942
77. **Hauri, H. P., and Matter, K. (1991):** Protein traffic in intestinal epithelial cells. *Semin. Cell Biol.* 2:355-364
78. **Hauri, H. P., Roth, J., Sterchi, E. E., and Lentze, M. J. (1985):** Transport to cell surface of intestinal sucrase-isomaltase is blocked in the Golgi apparatus in a patient with congenital sucrase-isomaltase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4423-4427
79. **Hauri, H. P., Sterchi, E. E., Bienz, D., Fransen, J. A., and Marxer, A. (1985):** Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 101:838-851
80. **Heine, M., Cramm-Behrens, C. I., Ansari, A., Chu, H. P., Ryazanov, A. G., Naim, H. Y., and Jacob, R. (2005):** {alpha}-Kinase 1, a New Component in Apical Protein Transport. *J. Biol. Chem.* 280(27):25637-25643
81. **High, S., Lecomte, F. J., Russell, S. J., Abell, B. M., and Oliver, J. D. (2000):** Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones? *FEBS Lett.* 476:38-41

82. **Hiller, M. M., Finger, A., Schweiger, M., and Wolf, D. H. (1996):** ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273:1725-1728
83. **Hirschberg, K., Miller, C. M., Ellenberg, J., Presley, J. F., Siggia, E. D., Phair, R. D., and Lippincott-Schwartz, J. (1998):** Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J. Cell Biol.* 143:1485-1503
84. **Honing, S., and Hunziker, W. (1995):** Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat Igp120 (lamp-1) in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 128:321-332
85. **Hopkins, C. R. (1991):** Polarity signals. *Cell* 66:827-829
86. **Houdusse, A., Kalabokis, V. N., Himmel, D., Szent-Gyorgyi, A. G., and Cohen, C. (1999):** Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head. *Cell* 97(4):459-70
87. **Hughson, E. J., and Hopkins, C. R. (1990):** Endocytic pathways in polarized Caco-2 cells: identification of an endosomal compartment accessible from both apical and basolateral surfaces. *J. Cell Biol.* 110:337-348
88. **Hunziker, W., and Fumey, C. (1994):** A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. *EMBO J.* 13:2963-2967
89. **Hunziker, W., Harter, C., Matter, K., and Mellman, I. (1991):** Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell* 66:907-920
90. **Hunziker, W., Spiess, M., Semenza, G., and Lodish, H. F. (1986):** The sucrase-isomaltase complex: primary structure, membrane-orientation and evolution of a stalked, intrinsic brush border protein. *Cell* 46(2):227-34
91. **Ikebuchi, N. W., and Waisman, D. M. (1990):** Calcium-dependent regulation of actin filament bundling by lipocortin-85. *J. Biol. Chem.* 265(6):3392-400
92. **Ikonen, E., and Simons, K. (1998):** Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9:503-509
93. **Jacob, R., Alfalah, M., Grünberg, J., Obendorf, M., and Naim, H. Y. (2000):** Structural determinants required for apical sorting of an intestinal brush-border membrane protein. *J. Biol. Chem.* 275:6566-6572
94. **Jacob, R., Brewer, C., Fransen, J. A., and Naim, H. Y. (1994):** Transport, function, and sorting of lactase-phlorizin hydrolase in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 269:2712-2721
95. **Jacob, R., Heine, M., Alfalah, M., and Naim, H. Y. (2003):** Distinct cytoskeletal tracks direct individual vesicle populations to the apical membrane of epithelial cells. *Curr. Biol.* 13(7):607-12
96. **Jacob, R., Heine, M., Eikemeyer, J., Frerker, N., Zimmer, K. P., Rescher, U., Gerke, V., and Naim, H. Y. (2004):** Annexin II is required for apical transport in polarized epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 279(5):3680-4
97. **Jacob, R., and Naim, H. Y. (2001):** Apical membrane proteins are transported in distinct vesicular carriers. *Curr. Biol.* 11:1444-1450
98. **Jacob, R., Preuss, U., Panzer, P., Alfalah, M., Quack, S., Roth, M. G., Naim, H., and Naim, H. Y. (1999):** Hierarchy of sorting signals in chimeras of intestinal lactase-phlorizin hydrolase and the influenza virus hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* 274(12):8061-7
99. **Johnsson, N., Marriott, G., and Weber, K. (1988):** p36, the major cytoplasmic substrate of src tyrosine protein kinase, binds to its p11 regulatory subunit via a short amino-terminal amphiphatic helix. *EMBO J.* 7(8):2435-42
100. **Jones, P. G., Moore, G. J., and Waisman, D. M. (1992):** A nonapeptide to the putative F-actin binding site of annexin-II tetramer inhibits its calcium-dependent activation of actin filament bundling. *J. Biol. Chem.* 267(20):13993-7
101. **Jost, M., Zeuschner, D., Seemann, J., Weber, K., and Gerke, V. (1997):** Identification and characterization of a novel type of annexin-membrane interaction: Ca²⁺ is not required for the association of annexin II with early endosomes. *J. Cell Sci.* 110:221-228
102. **Jung, G., Wu, X., and Hammer, J. A. (1996):** Dictyostelium mutants lacking multiple classic myosin I isoforms reveal combinations of shared and distinct functions. *J. Cell Biol.* 133:305-323
103. **Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F., and Holmes, K. C. (1990):** Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* 347:37-44
104. **Keller, P., and Simons, K. (1998):** Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J. Cell Biol.* 140(6):1357-67
105. **Keller, P., Toomre, D., Diaz, E., White, J., and Simons, K. (2001):** Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nat. Cell Biol.* 3:140-149
106. **Knight, A., Hughson, E., Hopkins, C. R., and Cutler, D. F. (1995):** Membrane protein trafficking through the common apical endosome compartment of polarized Caco-2 cells. *Mol. Biol. Cell* 6:597-610
107. **Kolman, M. F., Futey, L. M., and Egelhoff, T. T. (1996):** Dictyostelium myosin heavy chain kinase A regulates myosin localization during growth and development. *J. Cell Biol.* 132:101-109
108. **Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985):** Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54:631-664

109. **Kornfeld, S.**, and Mellman, I. (1989): The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5:483-525
110. **Kulesza-Lipka, D.**, Brzeska, H., Baines, I. C., and Korn, E. D. (1993): Autophosphorylation-independent activation of *Acanthamoeba* myosin I heavy chain kinase by plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 268:17995-18001
111. **Lafont, F.**, Lecat, S., Verkade, P., and Simons, K. (1998): Annexin XIIIb associates with lipid microdomains to function in apical delivery. *J. Cell Biol.* 142:1413-1427
112. **Lambert, O.**, Gerke, V., Bader, M. F., Porte, F., and Brisson, A. (1997): Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy. *J. Mol. Biol.* 272(1):42-55
113. **Le Bivic, A.**, Quaroni, A., Nichols, B., and Rodriguez-Boulan, E. (1990): Biogenetic pathways of plasma membrane proteins in Caco-2, a human intestinal epithelial cell line. *J. Cell Biol.* 111:1351-1361
114. **Le Bivic, A.**, Sambuy, Y., Mostov, K., and Rodriguez-Boulan, E. (1990): Vectorial targeting of an endogenous apical membrane sialoglycoprotein and uvomorulin in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 110:1533-1539
115. **Le Bivic, A.**, Sambuy, Y., Patzak, A., Patil, N., Chao, M., and Rodriguez-Boulan, E. (1991): An internal deletion in the cytoplasmic tail reverses the apical localization of human NGF receptor in transfected MDCK cells. *J. Cell Biol.* 115:607-618
116. **Le Gall, A. H.**, Yeaman, C., Müsch, A., and Rodriguez-Boulan, E. (1995): Epithelial cell polarity: new perspectives. *Semin. Nephrol.* 15:272-284
117. **Lee, W. L.**, Bezanilla, M., and Pollard, T. (2000): Fission yeast myosin-I, Myo1p, stimulates actin assembly by Arp2/3 complex and shares functions with WASP. *J. Cell Biol.* 151:789-799
118. **Letourneur, O.**, Sechi, S., Willette-Brown, J., Robertson, M. W., and Kinet, J. P. (1995): Glycosylation of human truncated Fc epsilon RI alpha chain is necessary for efficient folding in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 270:8249-8256
119. **Lewis, A. K.**, and Bridgman, P. C. (1996): Mammalian myosin Ia is concentrated near the plasma membrane in nerve growth cones. *Cell Motil. Cytoskeleton* 33:130-150
120. **Liemann, S.**, and Huber, R. (1997): Three-dimensional structure of annexins. *Cell Mol. Life Sci.* 53(6):516-21
121. **Liemann, S.**, and Lewit-Bentley, A. (1995): Annexins: a novel family of calcium- and membrane-binding proteins in search of a function. *Structure* 3(3):233-7
122. **Lin, S.**, Naim, H. Y., Rodriguez, A. C., and Roth, M. G. (1998): Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells. *J. Cell Biol.* 142:51-57
123. **Lisanti, M. P.**, Le Bivic, A., Sargiacomo, M., and Rodriguez-Boulan, E. (1989): Steady-state distribution and biogenesis of endogenous Madin-Darby canine kidney glycoproteins: evidence for intracellular sorting and polarized cell surface delivery. *J. Cell Biol.* 109:2117-2127
124. **Lombardi, T.**, Montesano, R., and Orci, L. (1985): Polarized plasma membrane domains in cultured endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 161:242-246
125. **Low, M. G.** (1989): The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 988:427-454
126. **Low, S. H.**, Chapin, S. J., Wimmer, C., Whiteheart, S. W., Komuves, L. G., Mostov, K. E., and Weimbs, T. (1998): The SNARE machinery is involved in apical plasma membrane trafficking in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 141:1503-1513
127. **Luecke, H.**, Chang, B. T., Mailliard, W. S., Schlaepfer, D. D., and Haigler, H. T. (1995): Crystal structure of the annexin XII hexamer and implications for bilayer insertion. *Nature* 378(6556):512-5
128. **Luo, X.**, Crawley, S. W., Steimle, P. A., Egelhoff, T. T., and Cote, G. P. (2001): Specific phosphorylation of threonine by the Dictyostelium myosin II heavy chain kinase family. *J. Biol. Chem.* 276:17836-17843
129. **Lynch, T. J.**, Brzeska, H., Baines, I. C., and Korn, E. D. (1991): Purification of myosin I and myosin I heavy chain kinase from *Acanthamoeba castellanii*. *Methods Enzymol.* 196:12-23
130. **Mahajan, R. K.**, Vaughan, K. T., Johns, J. A., and Pardee, J. D. (1989): Actin filaments mediate Dictyostelium myosin assembly in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(16):6161-5
131. **Mailliard, W. S.**, Haigler, H. T., and Schlaepfer, D. D. (1996): Calcium-dependent binding of S100C to the N-terminal domain of annexin I. *J. Biol. Chem.* 271(2):719-25
132. **Mantei, N.**, Villa, M., Enzler, T., Wacker, H., Boll, W., James, P., Hunziker, W., and Semenza, G. (1988): Complete primary structure of human and rabbit lactase-phlorizin hydrolase: implications for biosynthesis, membrane anchoring and evolution of the enzyme. *EMBO J.* 7:2705-2713
133. **Maples, C. J.**, Ruiz, W. G., and Apodaca, G. (1997): Both microtubules and actin filaments are required for efficient postendocytotic traffic of the polymeric immunoglobulin receptor in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 272:6741-6751
134. **Martinez-Menarguez, J. A.**, Geuze, H. J., Slot, J. W., and Klumperman, J. (1999): Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell.* 98(1):81-90

135. **Matlin, K. S., and Simons, K. (1984):** Sorting of an apical plasma membrane glycoprotein occurs before it reaches the cell surface in cultured epithelial cells. *J. Cell Biol.* 99:2131-2139
136. **Matter, K. (2000):** Epithelial polarity: sorting out the sorters. *Curr. Biol.* 10:R39-42
137. **Matter, K., Brauchbar, M., Bucher, K., and Hauri, H. P. (1990):** Sorting of endogenous plasma membrane proteins occurs from two sites in cultured human intestinal epithelial cells (Caco-2). *Cell* 60:429-437
138. **Matter, K., Hunziker, W., and Mellman, I. (1992):** Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* 71:741-753
139. **Matter, K., and Mellman, I. (1994):** Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:545-554
140. **Matter, K., Stieger, B., Klumperman, J., Ginsel, L., and Hauri, H. P. (1990):** Endocytosis, recycling, and lysosomal delivery of brush border hydrolases in cultured human intestinal epithelial cells (Caco-2). *J. Biol. Chem.* 265(6):3503-12
141. **Mays, R. W., Beck, K. A., and Nelson, W. J. (1994):** Organization and function of the cytoskeleton in polarized epithelial cells: a component of the protein sorting machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:16-24
142. **Mellman, I., Yamamoto, E., Whitney, J. A., Kim, M., Hunziker, W., and Matter, K. (1993):** Molecular sorting in polarized and non-polarized cells: common problems, common solutions. *J. Cell Sci. Suppl.* 17:1-7
143. **Milligan, R. A. (1996):** Protein-protein interactions in the rigor actomyosin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:21-26
144. **Misek, D. E., Bard, E., and Rodriguez-Boulán, E. (1984):** Biogenesis of epithelial cell polarity: intracellular sorting and vectorial exocytosis of an apical plasma membrane glycoprotein. *Cell* 39:537-546
145. **Miyata, H., Bowers, B., and Korn, E. D. (1989):** Plasma membrane association of *Acanthamoeba* myosin I. *J. Cell Biol.* 109(4):1519-28
146. **Mollenhauer, J. (1997):** Annexins: what are they good for? *Cell Mol. Life Sci.* 53(6):506-7
147. **Monlauzeur, L., Rajasekaran, A., Chao, M., Rodriguez-Boulán, E., and Le Bivic, A. (1995):** A cytoplasmic tyrosine is essential for the basolateral localization of mutants of the human nerve growth factor receptor in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 270:12219-12225
148. **Montes, d. O., Lezama, R. A., Mondragon, R., Castillo, A. M., and Meza, I. (1997):** Myosin I interactions with actin filaments and trans-Golgi-derived vesicles in MDCK cell monolayers. *Arch. Med. Res.* 28:321-328
149. **Mooseker, M. S., and Cheney, R. E. (1995):** Unconventional myosins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:633-75
150. **Mostov, K. (1991):** The polymeric immunoglobulin receptor. *Semin. Cell Biol.* 2:411-418
151. **Mostov, K., Apodaca G., Aroeti B., and Okamoto C. (1992):** Plasma membrane protein sorting in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* 116(3):577-83
152. **Müsch, A., Cohen, D., and Rodriguez-Boulán, E. (1997):** Myosin II is involved in the production of constitutive transport vesicles from the TGN. *J. Cell Biol.* 138(2):291-306
153. **Müsch, A., Xu, H., Shields, D., and Rodriguez-Boulán, E. (1996):** Transport of vesicular stomatitis virus G protein to the cell surface is signal mediated in polarized and nonpolarized cells. *J. Cell Biol.* 133:543-558
154. **Naim, H. Y., Joberty, G., Alfalah, M., and Jacob, R. (1999):** Temporal association of the N- and O-linked glycosylation events and their implication in the polarized sorting of intestinal brush border sucrase-isomaltase, aminopeptidase N, and dipeptidyl peptidase IV. *J. Biol. Chem.* 274:17961-17967
155. **Naim, H. Y., Lacey, S. W., Sambrook, J. F., and Gething, M. J. (1991):** Expression of a full-length cDNA coding for human intestinal lactase-phlorizin hydrolase reveals an uncleaved, enzymatically active, and transport-competent protein. *J. Biol. Chem.* 266:12313-12320
156. **Naim, H. Y., and Lentze, M. J. (1992):** Impact of O-glycosylation on the function of human intestinal lactase-phlorizin hydrolase. Characterization of glycoforms varying in enzyme activity and localization of O-glycoside addition. *J. Biol. Chem.* 267:25494-25504
157. **Naim, H. Y., Roth, J., Sterchi, E. E., Lentze, M., Milla, P., Schmitz, J., and Hauri, H. P. (1988):** Sucrase-isomaltase deficiency in humans. Different mutations disrupt intracellular transport, processing, and function of an intestinal brush border enzyme. *J. Clin. Invest.* 82:667-679
158. **Naim, H. Y., Sterchi, E. E., and Lentze, M. J. (1987):** Biosynthesis and maturation of lactase-phlorizin hydrolase in the human small intestinal epithelial cells. *Biochem. J.* 241(2):427-34
159. **Naim, H. Y., Sterchi, E. E., and Lentze, M. J. (1988):** Biosynthesis of the human sucrase-isomaltase complex. Differential O-glycosylation of the sucrase subunit correlates with its position within the enzyme complex. *J. Biol. Chem.* 263:7242-7253
160. **Neuhaus, E. M., and Soldati, T. (2000):** A myosin I is involved in membrane recycling from early endosomes. *J. Cell Biol.* 150:1013-1026
161. **Nichols, B. J., Kenworthy, A. K., Polishchuk, R. S., Lodge, R., Roberts, T. H., Hirschberg, K., Phair, R. D., and Lippincott-Schwartz, J. (2001):** Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J. Cell Biol.* 153(3):529-41

162. **Novak, K. D.**, Peterson, M. D., Reedy, M. C., and Titus, M. A. (1995): Dictyostelium myosin I double mutants exhibit conditional defects in pinocytosis. *J. Cell Biol.* 131:1205-1221
163. **O'Connor, P.**, and Burnside, B. (1981): Actin-dependent cell elongation in teleost retinal rods: requirement for actin filament assembly. *J. Cell Biol.* 89:517-524
164. **Okuse, K.**, Malik-Hall, M., Baker, M. D., Poon, W. Y., Kong, H., Chao, M. V., and Wood, J. N. (2002): Annexin II light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression. *Nature* 417:653-656
165. **Oliferenko, S.**, Paiha, K., Harder, T., Gerke, V., Schwarzler, C., Schwarz, H., Beug, H., Gunthert, U., and Huber, L. A. (1999): Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 146, 843-854
166. **Osborn, M.**, Johnsson, N., Wehland, J., and Weber, K. (1988): The submembranous location of p11 and its interaction with the p36 substrate of pp60 src kinase in situ. *Exp. Cell Res.* 175:81-96
167. **Ostap, M. E.**, and Pollard, T. D. (1996): Overlapping functions of myosin-I isoforms. *J. Cell Biol.* 133:221-224
168. **Palade, G.** (1975): Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189:347-358
169. **Palade, G. E.** (1953): An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J. Histochem. Cytochem.* 1(4):188-211
170. **Panzer, P.**, Preuss, U., Joberty, G., and Naim, H. Y. (1998): Protein domains implicated in intracellular transport and sorting of lactase-phlorizin hydrolase. *J. Biol. Chem.* 273(22):13861-9. Erratum (1999): *J. Biol. Chem.* 274(43):31114
171. **Pavur, K. S.**, Petrov, A. N., and Ryazanov, A. G. (2000): Mapping the functional domains of elongation factor-2 kinase. *Biochemistry* 39:12216-12224
172. **Phillips, T.**, Macdonald, I., and Keyser, A. (1978): Some metabolic effects of ingesting galactose, before and after a high-lactose diet. *Proc. Nutr. Soc.* 37(1):24
173. **Pinna, L. A.**, and Ruzzene, M. (1996): How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* 1314:191-225
174. **Polishchuk, R.**, Di Pentima, A., Lippincott-Schwartz, J. (2004): Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway. *Nat. Cell Biol.* 4:297-307
175. **Powell, M. A.**, and Glenney, J. R. (1987): Regulation of calpactin I phospholipid binding by calpactin I light-chain binding and phosphorylation by p60v-src. *Biochem. J.* 247(2):321-8
176. **Pralle, A.**, Keller, P., Florin, E. L., Simons, K., and Horber, J. K. (2000): Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* 148(5):997-1008
177. **Presley, J. F.**, Cole, N. B., Schroer, T. A., Hirschberg, K., Zaal, K. J., and Lippincott-Schwartz, J. (1997): ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389:81-85
178. **Puri, V.**, Watanabe, R., Dominguez, M., Sun, X., Wheatley, C. L., Marks, D. L., and Pagano, R. E. (1999): Cholesterol modulates membrane traffic along the endocytic pathway in sphingolipid-storage diseases. *Nat. Cell Biol.* 1:386-388
179. **Qu, D.**, Teckman, J. H., Omura, S., and Perlmutter, D. H. (1996): Degradation of a mutant secretory protein, alpha1-antitrypsin Z, in the endoplasmic reticulum requires proteasome activity. *J. Biol. Chem.* 271:22791-22795
180. **Rapoport, T. A.** (1991): Protein transport across the endoplasmic reticulum membrane: facts, models, mysteries. *FASEB J.* 5:2792-2798
181. **Raposo, G.**, Cordonnier, M. N., Tenza, D., Menichi, B., Durrbach, A., Louvard, D., and Coudrier, E. (1999): Association of myosin I alpha with endosomes and lysosomes in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell.* 10:1477-1494
182. **Rayment, I.**, and Holden, H. M. (1994): The three-dimensional structure of a molecular motor. *Trends Biochem. Sci.* 19(3):129-134
183. **Rayment, I.**, Rypniewski, R. W., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. M., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G., and Holden, H. M. (1993): Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 261(5117):50-8
184. **Raynal, P.**, and Pollard, H. B. (1994): Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1197(1):63-93
185. **Rindler, M. J.**, Ivanov, I. E., Plesken, H., Rodriguez-Boulan, E., and Sabatini, D. D. (1984): Viral glycoproteins destined for apical or basolateral plasma membrane domains transverse the same Golgi apparatus during their intracellular transport in Madin-Darby Canine Kidney cells. *J. Cel Biol.* 98:1304-1319
186. **Rindler, M. J.**, Ivanov, I. E., Plesken, H., and Sabatini, D. D. (1985): Polarized delivery of viral glycoproteins to the apical and basolateral plasma membranes of Madin-Darby canine kidney cells infected with temperature-sensitive viruses. *J. Cell Biol.* 100:136-151
187. **Rodriguez-Boulan, E.**, and Gonzalez, A. (1999): Glycans in post-Golgi apical targeting: sorting signals or structural props? *Trends. Cell Biol.* 9:291-294
188. **Rodriguez-Boulan, E.**, and Musch, A. (2005): Protein sorting in the Golgi complex: Shifting paradigms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1744(3):455-64

189. **Rodriguez-Boulan, E.**, and Nelson, W. J. (1989): Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* 245:718-725
190. **Rodriguez-Boulan, E.**, and Powell, S. K. (1992): Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:395-427
191. **Rodriguez-Boulan, E.**, and Sabatini, D. (1978): Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: a model system for study of epithelial polarity. *Froc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 :5071-5075
192. **Roper, K.**, Corbeil, D., and Huttner, W. B. (2000): Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nat. Cell Biol.* 2:582-592
193. **Ruppert, C.**, Godel, J., Muller, R. T., Kroschewski, R., Reinhard, J., and Bahler, M. (1995): Localization of the rat myosin I molecules myr 1 and myr 2 and in vivo targeting of their tail domains. *J. Cell Sci.* 108:3775-3786
194. **Ruppert, C.**, Kroschewski, R., and Bahler, M. (1993): Identification, characterization and cloning of myr 1, a mammalian myosin-1. *J. Cell Biol.* 120:1393-1403
195. **Ryazanov, A. G.**, Pavur, K. S., and Dorovkov, M. V. (1999): Alpha-kinases: a new class of protein kinases with a novel catalytic domain. *Curr. Biol.* 9:R43-R45
196. **Ryazanov, A. G.**, Shestakova, E. A., and Natapov, P. G. (1988): Phosphorylation of elongation factor 2 by eEF-2 kinase affects rate of translation. *Nature* 334:170-173
197. **Ryazanov, A. G.**, Ward, M. D., Mendola, C. E., Pavur, K. S., Dorovkov, M. V., Wiedmann, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Parmer, T. G., Prostko, C. R., Germino, F. J., and Hait, W. N. (1997): Identification of a new class of protein kinases represented by eukaryotic elongation factor-2 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4884-4889
198. **Ryazanova, L. V.**, Dorovkov, M. V., Ansari, A., and Ryazanov, A. G. (2004): Characterization of the protein kinase activity of TRPM7/ChaK1, a protein kinase fused to the transient receptor potential ion channel. *J. Biol. Chem.* 279:3708-3716
199. **Ryazanova, L. V.**, Pavur, K. S., Petrov, A. N., Dorovkov, M. V., and Ryazanov, A. G. (2001): Novel type of signaling molecules: protein kinases covalently linked with ion channels. *Molecular Biology* 35:271-283
200. **Sabharanjak, S.**, Sharma, P., Parton, R. G., and Mayor, S. (2002): GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev. Cell* 2:411-423
201. **Saraste, J.**, and Kuismanen, E. (1984): Pre- and post-Golgi vacuoles operate in the transport of Semliki Forest virus membrane glycoproteins to the cell surface. *Cell* 38:535-549
202. **Scheiffele, P.**, Peranen, J., and Simons, K. (1995): N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* 378:96-98
203. **Scheiffele, P.**, Roth, M. G., and Simons, K. (1997): Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J.* 16:5501-5508
204. **Sellers, J.**, and Goodson, H. V. (1995): Motor proteins 2: myosin. *Protein Profile* 2(12):1323-1423
205. **Sheer, E. H.**, Joyce, M. P., and Greene, L. A. (1993): Mammalian myosin Ia, Ib, Ig: new widely expressed genes of the myosin I family. *J. Cell Biol.* 120:1405-1416
206. **Sheterline, P.**, Clayton, J., and Sparrow J. (1995): Actin. *Protein Profile* 2(1):1-103
207. **Simmen, T.**, Honing, S., Icking, A., Tikkanen, R., and Hunziker, W. (2002): AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat. Cell Biol.* 4:154-159
208. **Simons, K.**, and Fuller, S. D. (1985): Cell surface polarity in epithelia. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1:243-288
209. **Simons, K.** and Ikonen, E. (1997): Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572
210. **Simons, M.**, Kramer, E. M., Thiele, C., Stoffel, W., and Trotter, J. (2000): Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. *J. Cell Biol.* 151:143-154
211. **Simons, K.**, and van Meer, G. (1988): Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27(17):6197-202
212. **Skowron, J. F.**, and Mooseker, M. S. (1999): Cloning and characterization of mouse brush border myosin-I in adult and embryonic intestine. *J. Exp. Zool.* 283:242-257
213. **Smith, P. D.**, and Moss, S. E. (1994): Structural evolution of the annexin supergene family. *Trends Genet.* 10(7):241-6
214. **Sokac, A. M.**, and Bement, W. M. (2000): Regulation and expression of metazoan unconventional myosins. *Int. Rev. Cyt.* 200:197-304
215. **Sopkova-de Oliveira Santos, J.**, Oling, F. K., Rety, S., Brisson, A., Smith, J. C., and Lewit-Bentley, A. (2000): S100 protein-annexin interactions: a model of the (Anx2-p11)(2) heterotetramer complex. *Biochim. Biophys. Acta.* 1498(2-3):181-91
216. **Spiess, M.** (1990): The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. *Biochemistry* 29:10009-10018
217. **Swanlung-Collins, H.**, and Collins, J. H. (1992): Phosphorylation of brush border myosin I by protein kinase C is regulated by Ca(2+)-stimulated binding of myosin I to phosphatidylserine concerted with calmodulin dissociation. *J. Biol. Chem.* 267(5):3445-54

218. **Tang, N.**, and Ostap, E. M. (2001): Motor domain-dependent localization of myo1b (myr-1). *Curr. Biol.* 11:1131-1135
219. **Tatu, U.** and Helenius, A. (1997): Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 136:555-565
220. **Temesvari, L. A.**, Bush, J. M., Peterson, M. D., Novak, K. D., Titus, M. A., and Cardelli, J. A. (1996): Examination of the endosomal and lysosomal pathway in dictyostelium discoideum myosin I mutants. *J. Cell Sci.* 109:663-673
221. **Thomas, D. C.**, Brewer, C. B., and Roth, M. G. (1993): Vesicular stomatitis virus glycoprotein contains a dominant cytoplasmic basolateral sorting signal critically dependent upon a tyrosine. *J. Biol. Chem.* 268:3313-3320
222. **Treem, W. R.** (1995): Congenital sucrase-isomaltase deficiency. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 21(1):1-14
223. **Tyska, M. J.**, and Mooseker, M. S. (2004): A role for myosin-1A in the localization of a brush border disaccharidase. *J. Cell Biol.* 165(3):395-405
224. **van de Graaf, S. F.**, Hoenderop, J. G., Gkika, D., Lamers, D., Prenen, J., Rescher, U., Gerke, V., Staub, O., Nilius, B., and Bindels, R. J. (2003): Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *EMBO J.* 22:1478-1487
225. **van't Hof, W.**, Rodriguez-Boulant, E., and Menon, A. K. (1995): Nonpolarized distribution of glycosylphosphatidylinositols in the plasma membrane of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 270:24150-24155
226. **von Heijne, G.** (1981): On the hydrophobic nature of signal sequences. *Eur. J. Biochem.* 116:419-422
227. **von Heijne, G.** (1985): Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* 184:99-105
228. **von Heijne, G.** (1986): A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690
229. **Waisman, D. M.** (1995): Annexin II tetramer: structure and function. *Mol. Cell Biochem.* 149-150:301-22
230. **Wandinger-Ness, A.**, Bennett, M. K., Antony, C., and Simons K. (1990): Distinct transport vesicles mediate the delivery of plasma membrane proteins to the apical and basolateral domains of MDCK cells. *J. Cell Biol.* 111(3):987-1000
231. **Welsh, J. D.**, Poley, J. R., Bhatia, M., and Stevenson, D. E. (1978): Intestinal disaccharidase activities in relation to age, race, and mucosal damage. *Gastroenterology* 75(5):847-55
232. **Weng, X.**, Luecke, H., Song, I. S., Kang, D. S., Kim, S. H., and Huber, R. (1993): Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution. *Protein Sci.* 2(3):448-58
233. **Wilkinson, S.**, Paterson, H. F., and Marshall, C. J. (2005): Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat. Cell Biol.* 7(3):255-61
234. **Yamaguchi, H.**, Matsushita, M., Nairn, A., and Kuriyan, J. (2001): Crystal structure of the atypical protein kinase domain of a TRP channel with phosphotransferase activity. *Mol. Cell* 7:1047-1057
235. **Yeaman, C.**, Le Gall, A. H., Baldwin, A. N., Monlauzeur, L., Le Bivic, A., and Rodriguez-Boulant, E. (1997): The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* 139:929-940
236. **Zhang, Y.**, and Dahms, N. M. (1993): Site-directed removal of N-glycosylation sites in the bovine cation-dependent mannose 6-phosphate receptor: effects on ligand binding, intracellular targeting and association with binding immunoglobulin protein. *Biochem. J.* 295:841-848
237. **Zheng, X.**, Lu, D., and Sadler, J. E. (1999): Apical sorting of bovine enteropeptidase does not involve detergent-resistant association with sphingolipid-cholesterol rafts. *J. Biol. Chem.* 274:1596-1605
238. **Zobiack, N.**, Rescher, U., Ludwig, C., Zeuschner, D., and Gerke, V. (2003): The annexin 2/S100A10 complex controls the distribution of transferrin receptor-containing recycling endosomes. *Mol. Biol. Cell* 14:4896-4908
239. **Zot, H. G.**, Doberstein, S. K., and Pollard, T. D. (1992): Myosin-I moves actin filaments on a phospholipid substrate: implications for membrane targeting. *J. Cell Biol.* 116(2):367-76
240. **Zurzolo, C.**, Le Bivic, A., Quaroni, A., Nitsch, L., and Rodriguez-Boulant, E. (1992): Modulation of transcytotic and direct targeting pathways in a polarized thyroid cell line. *EMBO J.* 11:2337-2344

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt zu haben. Dabei wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Zudem wurde diese Dissertation für keine anderen Prüfungsarbeiten eingereicht.

Eldagsen, den 11. Juli 2005

Eigenanteil

Zum Eigenanteil an den dieser Dissertation zugrundeliegenden Publikationen zählen unter anderem:

Distinct cytoskeletal tracks direct individual vesicle populations to the apical membrane of epithelial cells

Erstellung des Fusionsproteins Aktin-CFP, Vesikel-Tracking und -Geschwindigkeitsbestimmung; Datenbankrecherche zur Identifizierung von Myosin Ia; Beteiligung an den konfokalmikroskopischen Aufnahmen, Beteiligung an Cytoskelettstudien mittels Zellfixierung und Antikörpern sowie Zellgiften

Annexin II is required for apical transport in polarized epithelial cells

Erstellung des Fusionsproteins Myosin-Ia-CFP; Betreuung bei der Erstellung der eingesetzten Annexin-A2-Konstrukte sowie bei den nachfolgenden biochemischen und konfokalmikroskopischen Analysen und der Erstellung einer stabil Annexin-A2-DsRed exprimierenden MDCK-Zell-Linie; Beteiligung an den konfokalmikroskopischen Aufnahmen

Alpha-Kinase 1, a new component in apical protein transport

Durchführung der RNS-Extraktionen, RT-PCRs und quantitativen Echtzeit-PCR-Analysen sowie eines Teils der Kinase-Assays; Untersuchung der ALPK1-Expressionszunahme im Zuge der Polarisierung auch auf Protein-Ebene; siRNA-Design und -Experimente; Vesikelisolationen; Erstellung / Betreuung der Erstellung der eingesetzten Myosin-Ia-Konstrukte, anfängliche Betreuung der ALPK1-Klonierungen



Martin Heine
Diplom-Biologe

Akademischer Werdegang

Geboren am 29. November 1976 in Springe

1989 - 1996: Otto-Hahn-Gymnasium, Springe

1996 - 1997: Wehrdienst, Munster

1997 - 2001: Studium der Biologie an der Universität Hannover

1999: Vordiplom

2000: FELASA-B-Zertifikat

2000: Fortbildungslehrgang "Gentechnische Sicherheit"
(gem. § 15 Abs. 2 Satz 1 Nr. 3 GenTSV)

2001: FELASA-C-Zertifikat

2001: Diplomprüfungen (Genetik, Molekularbiologie, Spezielle Physiologie)

2001: Diplomarbeit ("Polarisierter Transport einer fluoreszierenden Form des VSVG-Proteins") am Institut für Physiologische Chemie der Tierärztlichen Hochschule Hannover

2001: Abschluß des Studiums durch Erlangung des Hochschulgrades eines Diplom-Biologen mit der Note "sehr gut"

2002 - 2005: Doktorarbeit ("Molekulare Komponenten des gerichteten Proteintransports in Säugetierzellen"), begonnen am Institut für Physiologische Chemie der Tierärztlichen Hochschule Hannover, beendet am Institut für Cytobiologie und Cytopathologie der Philipps-Universität Marburg

2003 - 2005: Veröffentlichungen:

"Distinct cytoskeletal tracks direct individual vesicle populations to the apical membrane of epithelial cells",
Current Biology 2003 (13:607-12)

"Annexin II is required for apical transport in polarized epithelial cells",
Journal of Biological Chemistry 2004 (279:3680-3684)

"Alpha-Kinase 1, a new component in apical protein transport",
Journal of Biological Chemistry 2005 (280:25637-25643)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Ralf Jacob meinen Dank aussprechen für die Betreuung dieser Doktorarbeit und die Überlassung des interessanten Themas. Hervorzuheben sind ferner insbesondere das ausgezeichnete Arbeitsklima und die Diskussionsbereitschaft. Auch danke ich Prof. Jacob dafür, daß ich ihn im Anschluß an seinen Ruf nach Marburg begleiten und somit meine Arbeit mehr oder weniger nahtlos fortsetzen konnte.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Hassan Y. Naim, in dessen Arbeitsgruppe in Hannover die vorliegende Doktorarbeit begonnen wurde und in dessen Institut ich bereits in den Jahren zuvor mein molekularbiologisch-biochemisches Handwerk erlernt habe. Entsprechend bedanken möchte ich mich für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit anfertigen und meine Doktorarbeit beginnen zu dürfen, sowie für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich zudem bei meiner langjährigen Mitstreiterin Catharina Cramm-Behrens, die mit uns nach Marburg wechselte und so nicht nur mit Organisationstalent und Überblick zum Garant einer funktionierenden neuen Arbeitsgruppe wurde, sondern auch und vor allem eine so angenehme Arbeitsatmosphäre schuf, daß auch das längste Experiment oder der x-te Mißerfolg einem den Job nie wirklich verleiden konnte. Ob Scherze oder ernste Themen, Gespräche fachlicher oder nicht-fachlicher Art, Hilfsbereitschaft oder kulinarische Genüsse - es wäre letztlich viel zu viel zu nennen, um es an dieser Stelle alles aufzuzählen. Insofern schlicht ein großes Dankeschön für eine Zusammenarbeit, die ich einfach nur als ideal bezeichnen kann.

Darüber hinaus gilt mein Dank natürlich auch noch zahlreichen weiteren Angehörigen der Arbeitsgruppen Jacob und Naim, die mir gleichfalls mit Rat, Tat und Humor das Forscherleben leichter gemacht haben - seien sie nun ebenfalls Doktoranden oder bereits Postdoc, Technische Assistenten oder Juniorprofessor, Sekretärin oder anderweitig dazugehörend: ein jeder von ihnen hat auf seine Weise zu einer überaus angenehmen Zusammenarbeit beigetragen und verbleibt mir somit in sehr guter Erinnerung, auch wenn der Platz an dieser Stelle keine namentliche Nennung erlaubt.

Abschließend danke ich meiner Familie, insbesondere Monika Heine-Kunze & Klaus Kunze, Friedrich & Maria Heine, Martha Prätzer (†) und Kerstin Paucke.