

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie, Lehrstuhl I
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. Hermann Koepsell

Die subzelluläre Verteilung des Regulatorproteins RS1 in Nierenepithelzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Matthias Kroiß
aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2005

Referent: Prof. Dr. Hermann Koepsell

Koreferent: Prof. Dr. Manfred Scharl

Dekan: Prof. Dr. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2006

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Membranproteine werden reguliert	1
1.2.	Fehlregulationen von Membranproteinen	3
1.3.	RS1 reguliert verschiedene Transportproteine.....	4
1.4.	Zielsetzung dieser Arbeit.....	6
2.	Materialien und Methoden	8
2.1.	Materialien	8
2.1.1.	Chemikalien und Reagenzien.....	8
2.1.2.	Peptide.....	9
2.1.3.	Antikörper	10
	Kommerzielle Primärantikörper.....	10
	Antikörper-Konjugate für verschiedene Anwendungen.....	10
2.1.4.	fluoreszente Reagenzien	11
2.1.5.	Geräte und Laboreinrichtung	11
2.1.6.	Routinematerialien.....	12
2.1.7.	Mikroskopie.....	13
	Mikroskopie in der Zellkultur.....	13
	Auflichtfluoreszenzmikroskopie	13
	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	14
2.2.	Methoden.....	15
2.2.1.	Grundsätze des Arbeitens	15
2.2.2.	Sterilisation und Desinfektion	15
2.2.3.	Proteinbiochemische Methoden	15
	Proteinbestimmung nach Bradford	15
	pRS1-Expression in E. coli	16
	Kultivierung des Expressionsstamm und Induktion von pRS1	16
	Isolation von E. coli-Einschlusskörpern.....	17
	Reinigung des rekombinanten Proteins durch Ni-Affinitätschromatographie ..	18
	Dialyse.....	19
2.2.4.	Antikörpermethoden.....	19
	Erzeugung von polyklonalen Antisera in Kaninchen.....	19

Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	20
Antikörper-ELISA.....	22
Western-Blot.....	23
2.2.5. Zellkulturmethoden.....	24
Kulturroutinen.....	25
2.2.6. Transiente Transfektion von Zellen.....	26
2.2.7. Immunfluoreszenz.....	26
Präadsorption von Antikörpern.....	28
Mehrfachmarkierungen.....	28
3. Ergebnisse.....	30
3.1. Lokalisation von pRS1 in subkonfluenten LLC-PK1-Zellen.....	30
3.2. Lokalisation von pRS1 in konfluenten LLC-PK1-Zellen.....	31
3.3. Beziehung von pRS1 zum Zytoskelett.....	34
3.4. pRS1 und die vesikulären Marker Clathrin und Dynamin.....	37
3.5. pRS1 und das trans-Golgi-Netzwerk.....	39
3.6. Die intrazelluläre Verteilung von SGLT1.....	42
3.7. Brefeldin A induziert die Freisetzung von pRS1 am TGN.....	45
3.8. Inhibition des Proteasoms ändert die Lokalisation von pRS1.....	46
3.9. Inhibition des Proteasoms verhindert die konfluenzabhängige Heraufregulation von pSGLT1.....	48
4. Diskussion.....	49
4.1. Überlegungen zur Heuristik.....	49
4.1.1. Antikörper.....	49
4.1.2. Kolo­kalisation bei konfokaler Mikroskopie.....	50
4.2. Unterschiedliche Signale regeln den Transporter SGLT1.....	51
4.3. Funktion und intrazelluläre Lokalisation von pRS1.....	52
4.3.1. Die subzelluläre Verteilung von pRS1 wird konfluenzabhängig reguliert.....	53
4.3.2. pRS1 ist mit verschiedenen Kompartimenten vesikulären Transports assoziiert, darunter dem trans-Golgi-Netzwerk.....	54
4.4. Die intrazelluläre Lokalisation von SGLT1.....	57
4.5. pRS1 wird in konfluenten Zellen durch das Proteasom abgebaut.....	59
4.6. pSGLT1 wird durch pRS1 zum trans-Golgi-Netzwerk rekrutiert.....	61
4.7. Eine Rolle für pRS1 im intrazellulären Austausch von Vesikeln.....	62

4.8. Ausblick: Ein Modell mit vielen Fragezeichen.....	68
5. Zusammenfassung.....	70
6. Farbtafeln.....	71
7. Anhang.....	92
7.1. Qualitätssicherung in der Zellkultur.....	92
7.2. Übersicht über die Reinigung der Antikörper gegen pRS1.....	93
7.3. Dynamin IaK44A-EGFP- und wtDynamin Ia-EGFP-Vektor.....	95
7.4. Untersuchungen mit dominant negativem Dynamin Ia.....	96
8. Literaturverzeichnis.....	100
Danksagung	
Lebenslauf	

1. EINLEITUNG

1.1. *Membranproteine werden reguliert*

Jede einzeln lebende Zelle bedarf einer vielgestaltigen Interaktion mit ihrer Umwelt, um ihr Fließgleichgewicht aufrecht zu erhalten. Seit dem Anfang der Evolution stellt die Zellmembran nicht nur die Begrenzung einer Zelle dar, sondern repräsentiert vielmehr einen wichtigen Ort der Interaktion zwischen verschiedenen Zellen und zwischen Zellen und ihrer unbelebten Umgebung.

Zahlreiche Proteine sind an der Vermittlung dieser Interaktionen und Signalabläufe beteiligt. Einige sind mit Hilfe eines Lipidankers (z.B. *Glycosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker*, vgl. [31]) in die Membran integriert, andere binden als periphere Membranproteine an das submembranäre Zytoskelett oder Verbindungsproteine, die ihrerseits Kontakt mit der Zellmembran halten (vgl. [1]). Wieder andere besitzen hydrophobe Anteile, Transmembrandomänen, mit denen sie in der Zellmembran „schwimmend“ verankert sind („fluid-mosaic-Modell“, [158]). Gleichwohl wurde in den letzten Jahren klar, dass die umgebende Lipid-Doppelschicht aus Phospholipiden, Sphingolipiden und Cholesterol selbst Teil von Signalwegen ist. Teils werden Lipide durch Modifikation oder enzymatische Spaltung selbst zu Signalmolekülen, teils schaffen sie durch die Rekrutierung von Proteinen, etwa über hydrophile Gruppen [147], [45], [72], [140] erst die Voraussetzungen für ein rasches Ablaufen von Signalkaskaden [157], [126], [47].

Man teilt Membranproteine entsprechend ihren funktionellen Gemeinsamkeiten ein: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (heptahelikale Rezeptoren), ligandengesteuerte Ionenkanäle und Rezeptorproteinkinasen stellen die drei Prototypen von Rezeptoren dar. Von ihnen gehen komplexe Signalkaskaden aus, die durch die spezifische Bindung eines Botenstoffs

1.1. Membranproteine werden reguliert

an den Rezeptor und eine resultierende Konformationsänderung des Rezeptorproteins initiiert werden (vgl. [55]).

Kanalproteine und passive Transporter dienen dem passiven Austausch niedermolekularer Substanzen entlang elektrochemischer Gradienten. Aktive Transporter dagegen nutzen Energie in Form energiereicher Phosphate (primär aktive Transporter, Bsp.: *Natrium-Kalium-ATPase*; *P-Glykoprotein*) oder elektrochemischer Gradienten (sekundär und tertiär aktive Transporter) um ihre Substrate entgegen deren Konzentrationsgradienten als „Symport“ oder „Antiport“ über die Zellmembran zu befördern [110]. Zu den sekundär aktiven Symportern gehört der in dieser Arbeit untersuchte *Natrium-D-Glucose-Kotransporter*, *SGLT1*.

Membranproteine werden von der Zelle kontinuierlich in ihrer Funktion reguliert. So passt sie sich einer überbordenden Signalfülle an oder reguliert die Aufnahme von Stoffwechselsubstraten dem Bedarf entsprechend. Im Detail bekannt sind solche Vorgänge etwa von den β -adrenergen Rezeptoren: Bereits Sekunden nach Stimulation des Rezeptors wird dieser durch G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (*GRK*) phosphoryliert, β -Arrestin bindet und hemmt die Aktivierung des heterotrimeren G_s -Proteins [99]. Anschließend fungiert β -Arrestin als Adapterprotein, das die *Clathrin*-vermittelte Endocytose des Rezeptors vermittelt [41], [48], [83]. Eine lang wirkende Herabregulierung von β -Adrenorezeptoren findet darüber hinaus auf den Ebenen der Transkription und der mRNA-Stabilität statt [34].

Ein der Desensibilisierung entsprechender Vorgang und die nachfolgende Internalisation in Vesikel konnte auch für Kanäle und Transportproteine gezeigt werden. *Aquaporine* oder *GLUT4*-Transporter etwa liegen in submembranären Vesikeln vor, deren Einbau durch Hormone reguliert wird (Übersicht: [80], [182], [87]).

Kürzlich wurde ein als *RS1* bezeichnetes Protein beschrieben, das in die Regulation verschiedener Transportproteine, unter anderem des *Natrium-D-Glucose-Kotransporters SGLT1*, involviert ist. Seine Rolle wird in dieser Arbeit näher untersucht.

1.2. Fehlregulationen von Membranproteinen

Verschiedenen Krankheiten können auf eine fehlerhafte Regulation von Membranproteinen zurück geführt werden; diese führt zu einer inadäquaten Antwort der Zelle auf ihre Umgebung. Dabei sind in vielen Fällen gerade seltene Erkrankungen wohl verstandene Modellbeispiele, so das erstmals von Liddle beschriebene und nach ihm benannte [95] Syndrom eines Pseudohyperaldosteronismus, das durch mangelhafte Regulation eines Membranproteins, hier des amiloridsensitiven epithelialen Natriumkanals *ENaC*, hervorgerufen wird. Der aus drei Untereinheiten zusammengesetzte Kanal ist in der Niere für die Resorption von Natriumchlorid und Wasser im distalen Tubulus und Sammelrohr verantwortlich. Jede der Untereinheiten besitzt C-terminal ein sogenanntes PY-Motiv, dessen Deletion durch *Stop-* oder *frameshift-*Mutationen in der β - oder γ -Untereinheit 1994 als Ursache des Liddle-Syndroms erkannt wurde [154]. Jedoch blieb zunächst unklar, wie es durch diesen Defekt zu einer erhöhten Kanalaktivität kommt. Tatsächlich war die Beobachtung entscheidend, dass die Internalisierung von in die Membran eingebautem *ENaC* durch die mutierten Kanaluntereinheiten stark verringert wird [43], und folglich mehr Kanäle in der Membran exprimiert werden. Nachdem erkannt worden war, dass die Ubiquitinligase *Nedd4* normalerweise an das PY-Motiv bindet [162], wird heute ein Modell favorisiert, wonach normalerweise Kanäle durch Bindung von *Nedd4*, Ubiquitinierung und nachfolgend entweder Degradation durch intrazelluläre Proteolyse (Proteasom) oder Endocytose [153] und lysosomalen Abbau herabreguliert werden [163], [137].

1.3. *RS1 reguliert verschiedene Transportproteine*

Während in den letzten Jahren die Regulation einiger prototypischer Membranproteine in Teilen aufgeklärt wurde, ist das Wissen über die Regulation von Transportern noch begrenzt. Es kommen dafür neben transkriptionalen Mechanismen, sowie der Regulation von mRNA-Stabilität und Translation auch posttranskriptionale Mechanismen in Betracht. Dabei sind Veränderungen der Transportaktivität durch direkte Regulation des in die Membran eingebauten Protein ebenso vorstellbar wie die Regulation der Menge an Transporterprotein in der Membran durch regulierte Internalisierung oder Eingriffe in den Transport des Transporters vom *Golgi*-Komplex in die Zellmembran. Für den insulin sensitiven Glucosetransporter *GLUT4* konnten zahlreiche intrazelluläre Lokalisationen beschrieben werden, die die Hypothese einer solch komplexen posttranslationalen Regulation unterstützen ([151] und Referenzen darin).

In dieser Arbeit untersuche ich einige Aspekte der Regulation des *Natrium-D-Glucose-Kotransporters SGLT1* durch das intrazelluläre Regulatorprotein *RS1*.

Der durch Phlorizin hemmbare *Natrium-D-Glucose-Kotransporter (SGLT1)* ist im proximalen Tubulus der Niere und im Dünndarm für die spezifische Resorption von D-Glucose im Sinne eines sekundär aktiven Symports „zuständig“. Mit seiner Stöchiometrie von 2 Natrium-Ionen je Glucose-Molekül entzieht er dem Lumen des Nierentubulus jenen Zucker, der von dem stromaufwärts lokalisierten weniger affinen *SGLT2* nicht resorbiert wird. Die Rolle des kürzlich klonierten Transporters *NaGLT1* im Nierentubulus ist weniger klar [68].

Die Aktivität von *SGLT1* begrenzt die „Nierenschwelle“ für Glucose; er erscheint wegen seiner zentralen Rolle für den Glucosestoffwechsel als Erfolg versprechendes Zielprotein für eine antidiabetische Therapie [181] und die kodierende Gensequenz wurde 1987 von Hediger kloniert [54].

RS1 (humanes Gen: *RSC1A1*) ist ein 67-68 kDa großes Polypeptid, das in die Regulation einiger Transporter involviert ist. Diese besitzen untereinander keine strukturellen Gemeinsamkeiten; so werden neben *hSGLT1* auch die *Organischen-Kationen-Transporter* *hOCT2*, *rOCT1* und *rOCT2* von *hRS1* reguliert. Andere Transporter wie *hPEPT1* oder *hGLUT1* bleiben unbeeinflusst [179], [180].

RS1 wurde aus dem Schwein, dem Kaninchen und dem Menschen kloniert und wird von einem intronlosen Gen codiert, das im Genom in einer Kopie vorkommt. Zwischen den drei Spezies besteht eine Homologie der Aminosäuresequenz von etwa 70% [89], [131]. *RS1* besitzt in allen drei Spezies Konsensus-Sequenzen für *Proteinkinase C*, *Caseinkinase II* sowie eine *ubiquitin-assoziierte (UBA-) Domäne*.

In Koinjektionsexperimenten von *RS1-cRNA* mit jener von *SGLT1* in *Xenopus laevis*-Oozyten ließ sich eine Veränderung der maximalen Transportrate V_{max} von *SGLT1* gegenüber dem radioaktiven Glucose-Analog α -Methyl-Glucose (*AMG*) nachweisen [179], [89], [180], die mit einer Abnahme von *SGLT1*-Protein in der Membran und einer Abnahme der Oberfläche der Oozyten einher [175]. Damit rückte eine Rolle von *RS1* bei der Internalisierung aus der und dem Einbau von *SGLT1* in die Plasmamembran in den Mittelpunkt des Interesses. Vor kurzem wurde gezeigt, dass diese rasche Herabregulation von *SGLT1* durch *RS1* von *Dynamin* abhängig und durch die Stimulation von *Proteinkinase C* kurzfristig stimulierbar ist. Diese Effekte bleiben auch bestehen, wenn die Transkription in den Oozyten durch *Actinomycin D* gehemmt wird [180].

Ein Einfluss von *RS1* konnte auch auf die Langzeitregulation von *SGLT1* demonstriert werden. Von den in diesen Experimenten verwendeten LLC-PK₁-Zellen ist bekannt, dass sie im differenzierten Zustand, also nach Ausbildung eines zusammenhängenden Zellraums, entsprechend den Charakteristika des S3-Segments des proximalen Nierentubulus

1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

SGLT1 neben *Trehalase* und γ -*Glutamyl-Transpeptidase* endogen exprimiert [4], [185], [81], [102].

Korn und Kühlkamp [82] wiesen nach, dass in *RS1* überexprimierenden konfluenten LLC-PK₁-Zellen die Menge der *SGLT1*-mRNA ab-, in einer *RS1-antisense*-Zelllinie hingegen zunahm. Dieser Effekt konnte direkt auf eine veränderte Transkription zurück geführt werden; die mRNA-Stabilität blieb unbeeinflusst. In diesem Zusammenhang zeigten Experimente von Kühlkamp [84], dass zumindest Fragmente von *RS1* im Zellkern undifferenzierter LLC-PK₁-Zellen vorhanden ist.

Kürzlich wurde *RS1* in einem *yeast-two-hybrid-screen* und mittels Immunpräzipitation als Interaktionspartner des neu beschriebenen *IRIP*-Proteins (für *ischemia-reperfusion inducible protein*) identifiziert [70]. Ähnlich *RS1* inhibierte Überexpression von *IRIP* die Aufnahme unterschiedlicher Substanzen durch nicht verwandte Transportproteine in HeLa-Zellen. Analog der Wirkung von *RS1* konnte dies auf die Verringerung der V_{\max} zurückgeführt werden. Damit besteht die Möglichkeit, dass es sich bei *RS1* und *IRIP* um Mitglieder desselben neuen, durch unterschiedliche Stimuli ausgelösten Signalwegs handelt.

1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

In meiner Arbeit untersuchte ich zunächst, ob sich die im *Western-Blot* gezeigte Anwesenheit von *RS1* oder seinen Fragmenten im Zellkern subkonfluenter LLC-PK₁-Zellen Immunfluoreszenzmikroskopie unabhängig beweisen lässt. Anschließend überprüfte ich die Hypothese, dass Konfluenz in LLC-PK₁-Zellen mit einer verringerten Menge von *pRS1* im Zellkern einhergeht. Damit wäre eine Korrelation zwischen steigender Transkription von *SGLT1* bei gleichzeitiger Absenz von *RS1* im Zellkern hergestellt und die Hypothese einer direkten Repressionswirkung von *RS1* im Kern erhärtet. Gleichzeitig sollte versucht werden, die subzelluläre Verteilung von *pRS1* in nativen Zellen zu beschreiben und daraus

Schlüsse über den Weg der posttranslationalen Regulation von *pSGLT1* zu ziehen. Nachdem in einer neueren Arbeit gezeigt worden war, dass *Dynamín* für die Kurzzeitregulation des *SGLT1*-vermittelten Transports durch *RS1* erforderlich ist [180], sollte insbesondere durch eine eventuelle Kolo-kalisation von *Dynamín* und *RS1* untersucht werden, an welchem intrazellulären Ort diese erfolgt. Schließlich kommt dafür nicht nur die Zellmembran selbst, sondern etwa auch der *Golgi*-Komplex in Frage [71], [22]. Außerdem sollte versucht werden, Hinweise auf die Regulation von *RS1* selbst durch übergeordnete Signalwege zu sammeln.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. *Materialien*

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

So weit nicht anders beschrieben, wurden die eingesetzten Chemikalien in p.A.-Qualität von BD Biosciences (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Geschützte Warennamen (Warenzeichen) sind nicht gesondert kenntlich gemacht. Im Einzelnen wurden verwendet:

Produkt	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	BD Biosciences, Heidelberg
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Bacto-Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto-Tryptone	BD Biosciences, Heidelberg
BenchMark prestained Western-Blot-Marker	Invitrogen, Karlsruhe
Bradfordreagenz	Biorad PerBio, München
Brefeldin A Stammlösung: 2 mg/ml in Methanol	Calbiochem Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Colchicin Stammlösung: 10 mM in Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Complete Mini Protease Inhibitor Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Dulbecco´s Modified Eagles Medium	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
DAKO Fluorescent Mounting Medium	DAKO Diagnostika, Hamburg
Dulbecco´s PBS	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

Produkt	Hersteller
ECL-Reagenz	Pharmacia Amersham Biosciences, Freiburg
Isopropyl- β -D-Galactosid	Ambion, Austin, TX, USA
FuGene 6 Transfection Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim
MagicMark Western Standard	Invitrogen, Karlsruhe
MG132 (Benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Leu-Aldehyd) Stammlösung: 10 mM in DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Muramyldipeptid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
SulfoLink Kit	Pierce, Perbio Science, Bonn
Triton-X-114	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Biochrom, Berlin

2.1.2. Peptide

Das für die Erzeugung des Antikörpers $\alpha pRS1$ -Pept verwendete Peptid wurde von Prof. Palm, Biozentrum der Universität Würzburg, synthetisiert und lag als Lyophilisat vor. Es wurde aus der Mitte des *pRS1*-Proteins ausgewählt (Aminosäuren 461-477, Sequenz DKENVPRSRESVNESSC). Ein diesem Peptid homologer Antikörper gegen *mRS1* zeigt in einer *mRS1*-Knockout-Maus keine Reaktion in Immunhistologie und Westernblot [120]. Das C-terminal angefügte Cystein diente der Kopplung an Trägerproteine und Säulenmatrix.

2.1.3. *Antikörper*

Kommerzielle Primärantikörper

Antikörper (Nummer)	Antigen	Wirt	Bezugsquelle	Immun- fluoreszenz
mouse anti bovine brain Clathrin (MAB1011)	bovines Clathrin	Maus	Chemicon International, Hofheim	1:200, 4° C, über Nacht oder RT, 4 h
Dynamin II (C 18) (sc-6400)	humanes Dynamin II	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:50, 4° C, über Nacht oder RT, 1 h
sheep anti human TGN 46 (YSRTAHP500)	humanes TGN46	Schaf	Diagnostic International, Schriesheim	1:125, 4° C, über Nacht
TUB 2.1 (T4026)	bovines β -Tubulin	Maus monoklonal	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen	1:200, 4° C, über Nacht oder RT, 1 h

Antikörper-Konjugate für verschiedene Anwendungen

Bestellnummer	Antigen	Wirt, Fragment	Bezugsquelle	Fluorophor/ Konjugat- enzym
A-21430	Kaninchen IgG (H+L)	Ziege F(ab') ₂	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	Alexa Fluor 555
111-227-003	Kaninchen IgG (H+L)	Ziege F(ab)	Dianova GmbH, Hamburg	Cy 2
115-225-006	Maus IgG (H+L)	Ziege F(ab') ₂	Dianova GmbH, Hamburg	Cy 2
A-11055	Ziege IgG (H+L)	Esel	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	Alexa Fluor 488

Bestellnummer	Antigen	Wirt, Fragment	Bezugsquelle	Fluorophor/ Konjugat- enzym
713-225-147	Schaf IgG	Esel	Dianova GmbH, Hamburg	Cy 2
A3937	Kaninchen IgG (H+L)	Ziege F(ab') ₂	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen	Alkalische Phos- phatase
A0545	Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen	Meerettich- Peroxidase

2.1.4. fluoreszente Reagenzien

Reagenz (Bestell- nummer)	Bindungs- partner	Herkunft	Hersteller	Fluorophor
Alexa Fluor 488 phalloidin (A-12379)	F-Actin	Amanita phalloides	Molecular Probes, Leiden, Nieder- lande	Alexa Fluor 488
DAPI*)	Doppelstrang- DNA	-/-	Molecular Probes, Leiden, Nieder- lande	-/-

*) 4',6'-diamidino-2-phenylindol

2.1.5. Geräte und Laboreinrichtung

Produkt	Hersteller
Autoklaven Varioklav Typ 400 und 400E	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
CO ₂ -Inkubatoren	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau
Eingangsverstärker UV-Zelle Monitor UV-M	Pharmacia, Amersham Biosciences, Freiburg
Electrophoresis Power Supply EPS 500/400	Pharmacia, Amersham Biosciences, Freiburg
Electrophoresis Transfer Kit Novablot 2117-250	Pharmacia, Amersham Biosciences, Freiburg

2.1. *Materialien*

Produkt	Hersteller
ELISA-Reader Multiscan Plus	Titertek, Frankfurt
Fraction Collector FRAC 100	Pharmacia, Amersham Biosciences, Freiburg
Peristaltic Pump P1	Pharmacia, Amersham Biosciences, Freiburg
Photometer Ultrospec III	Pharmacia, Amersham Biosciences, Freiburg
Säulen und Verbindungsteile für die Flüssigkeitssäulenchromatographie	Pharmacia, Amersham Biosciences, Freiburg
Schreiber Servogor 120	BBC Goertz Metrawatt, Stuttgart
Schüttelinkubator Model G25	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Sterilisierschrank ST 6200	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau
Tischzentrifuge Z 160 M	Hermle Labortechnik, Wehingen
Vertical Flow (Bakterienkultur) SterilGard	The Baker Co. Labotect, Göttingen
Vertical Flow (Zellkultur)	Prettl, Bempflingen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach Anpassung durch die Werkstatt des Insituts
Wasserbad Thermomix 1420	B. Braun, Melsungen
Zentrifuge J-21C (Rotor JA 20)	Sorvall, Kendro Laboratory Products, Hanau
Zentrifuge Superspeed RC2-B (Rotor GSA)	Sorvall, Kendro Laboratory Products, Hanau

2.1.6. **Routinematerialien**

Produkt	Hersteller
Dialyseschlauch, 6 mm	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Diapositivfilm Fuji Sensia 400	Weber, Würzburg
Diapositivfilm Kodak Elite Chrome 400	Weber, Würzburg
ECL-Film Kodak X-OMAT DS	Hartenstein, Würzburg

Produkt	Hersteller
Kulturschalen und Kulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kunststoff-Einwegmaterial	Eppendorf, Hamburg Greiner Bio-One, Frickenhausen Sarstedt, Nimbrecht Nunc, Merck Eurolab, Bruchsal
Lab-tek II Chambered Coverglass	Nunc, Wiesbaden
Nitrocellulosemembran Hybond ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
Objektträger, Deckgläschen	Hartenstein, Würzburg
Schwarzweißnegativfilm Kodak T-MAX 400	Weber, Würzburg
Sterilfilter FP 030/0,20 CA-S	Schleicher und Schüll, Dassel
Transwell Clear Tissue Culture Treated Polyester Membrane	Corning, Shiphol-Rijk, Niederlande

2.1.7. Mikroskopie

Mikroskopie in der Zellkultur

Zur Beobachtung des Kulturerfolgs und zur Überprüfung eventueller Zellpathologien benutzte ich ein Mikroskop vom Typ Diavert, Leitz (Wetzlar), das mit Phasenkontrasteinrichtung einschließlich Grünfilter und folgenden Leitz-Objektiven (N.A.: numerische Apertur, Ph: Phasenkontrast) ausgerüstet war: 2,5× (N.A. 0,08), 10× (0,25, Ph), 20× (0,32, Ph), 40× (0,40 Ph).

Auflichtfluoreszenzmikroskopie

Für konventionelle Auflichtfluoreszenzaufnahmen nutzte ich ein teilcodiertes, teilmotorisiertes Axioplan 2-Stativ (Carl Zeiss, Jena) mit integriertem Kleinbildfotomodul Axiophot 2. Für einige Mikrofotographien nutzte ich eine CCD-Kamera RT-Spot von Diagnostic Instruments (Visitron, Puchheim), die Bildakquisition wurde durch die MetaView-Software 6.2r4 von Universal Imaging (Visitron, Puchheim) gesteuert.

Filterset	Anregung	Strahlen- teiler	Emission	Fluorophore
Zeiss 09	BP 450-490	510	LP 515	FITC Cy2 Alexa Fluor 488
Zeiss 15	BP 546/12	580	LP 590	Cy3 Alexa Fluor 555 FM 4/64
AHF Analystechnik, Pfrondorf F31-000	BP 360/50	400	460/50	DAPI

Tabelle 2.1: Fluoreszenzfilter für die konventionelle Auflichtfluoreszenz

Das Mikroskop verfügte über folgende Objektive (alle Plan Neofluar, alle ohne Phasenkontrasting): 2,5× (N.A. 0,075), 5× (0,15), 10× (0,3), 20× (0,5), 40× (0,75), 100× (1,3, Ölimmersion). Die eingebauten Reflektormodule FL waren mit den in Tabelle 2.1 aufgeführten Filtersätzen ausgerüstet (BP: Bandpass, LP: Langpass, alle Angaben Wellenlänge in Nanometer).

konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Für die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (vgl. [150]) wurde ein LSM 510 verwendet, das auf dem voll motorisierten Inversmikroskop Axiovert 100 M montiert war (Carl Zeiss, Jena). Zur Verwendung kamen die Objektive Plan Neofluar 40x (N.A. 1,3, Ölimmersion) und Plan Apochromat 63x (N.A. 1,4, Ölimmersion). Das Mikroskop verfügte über folgende Laser (Beispielfluorochrom, Exzitationswellenlänge, Emissionsfiltereinstellungen und max. Ausgangsleistung in Klammern): UV-Laser für blaue Fluorochrome (z.B. DAPI, Ex 364 nm, BP 385-470 nm, 80 mW) von Coherent (Santa Clara, CA, USA), Argon-Laser für grüne Fluorochrome (z.B. Cy2, AlexaFluor 488, Ex 488 nm, LP 505, 25 mW) und Helium-Neon für rote Fluorochrome (z.B. Cy3, AlexaFluor 555, Ex 543 nm, BP 560-615 nm oder

LP 560, 1 mW) von LASOS Laser-Fertigung, Jena. Zur Mikroskopsteuerung und Bildverarbeitung diente die LSM 510-Software, Version 2.5 SP 2 von Carl Zeiss, Jena.

2.2. Methoden

2.2.1. Grundsätze des Arbeitens

Mangels allgemein verbindlicher Regelwerke für die naturwissenschaftliche Grundlagenforschung sei zu den Grundsätzen des Arbeitens sinngemäß auf die „OECD Principles of Good Laboratory Practice“ verwiesen [119]. So weit nicht anders vermerkt, wurden alle Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Lösungsmittel diente entmineralisiertes Wasser (Reinstwasseranlage). Abweichende Lösungsmittel sind angegeben.

2.2.2. Sterilisation und Desinfektion

Thermostabile Lösungen wurden vor ihrer Verwendung durch Dampfsterilisation, hitzebeständige Geräte und Utensilien durch Heißluftsterilisation entkeimt. Thermolabile Lösungen sterilisierte ich durch Filtration (Porendurchmesser 0,12 µm), hitzelabile Materialien im Bereich der Zellkultur durch Bestrahlung mit UVC-Licht.

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration eignete sich aufgrund des einfachen Prinzips die von Bradford [18] angegebene Methode: Die Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine verschiebt dessen Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm, so dass die hier gemessene Absorption der eingesetzten Proteinmenge proportional ist. 2 Minuten nach Zugabe von 100 µl der Proteinprobe zu 900 µl 1:5 verdünntem Bradford-Reagenz ließ sich die enthaltene Proteinmenge durch Vergleich der OD₅₉₅ mit einer BSA-Eichgeraden graphisch ermitteln.

pRS1-Expression in E. coli

In früheren Untersuchungen hatte Marc Valentin [174] die Aminosäuren 1-615 von *pRS1* als Fusionsprotein mit C-terminalem His₆-Tag in den Expressionsvektor pET22b(+) (Merck Biosciences) kloniert und im *E. coli*-Stamm BL21[DE3] (Merck Biosciences) exprimiert. Das verwendete Plasmid kodiert für eine β -Lactamase, so dass durch Zugabe von 100 μ l Ampicillin-Stammlösung je 100 ml Medium Selektionsbedingungen hergestellt werden konnten. Wie Valentin zeigte, wird das Protein im Zytosol von *E. coli* in so genannten Einschlusskörpern (*inclusion-bodies*, *IB*) abgelagert, Protein-Granula, die nur durch hohe Harnstoffkonzentrationen in Lösung gebracht werden können [146].

Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml Ampicillin in 70% Ethanol

Kultivierung des Expressionsstamm und Induktion von pRS1

Ein aufgetautes Aliquot des als Kryokultur gelagerten, von Valentin erzeugten *E. coli*-Klons wurde auf einer Petri-Schale mit LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte die Überimpfung je einer Kolonie in 5 ml LB-Medium und die Inkubation dieser Vorkultur über Nacht bei 37°C und 250 rpm auf einem Schüttler. Für die Hauptkultur überführte ich die Vorkulturen jeweils 1:100 in 250 ml LB-Medium. In den dazu verwendeten 1000 ml-Kulturflaschen inkubierte ich sie bis zum Erreichen einer OD₅₈₀ von 0,6 auf dem Schüttler bei 37°C und 250 rpm. Üblicherweise wurde diese Dichte nach etwa 8 Stunden erreicht. Durch die Zugabe des nicht metabolisierbaren *Isopropylthiogalactosid* (*IPTG*) in einer Endkonzentration von 4 mM zur Kultur wurde die unter der Kontrolle des lac-Operators stehende T7-RNA-Polymerase induziert. Nach 4 weiteren Stunden bei 37°C konnten die Bakterien bei 4°C und 2.000 g im GSA-Rotor abzentrifugiert werden. Für die weitere Verwendung lagerte ich das Pellet bei -20°C.

Kryokultur: Kryokulturen erhielt ich durch Kultivierung des *E. coli*-Stamms in der gewünschten Menge LB-Medium (100 μ g/ml Ampicillin) für 3 Stun-

den bei 37°C und 250 rpm. Zugabe von Glycerin zu einer Endkonzentration von 15% (v/v) ermöglichte die Lagerung der Aliquots bei -70 °C.

LB-Medium: 1% (w/v) Bacto-Tryptone, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 170 mM NaCl pH 7,0; Sterilisation durch Autoklavieren; anschließend Zugabe von Ampicillin 50 µg/ml

LB-Agar Durch Zugabe von 1,4% (w/v) Agar zum LB-Medium erhält man den LB-Agar.

Isolation von E. coli-Einschlusskörpern [141]

Eine Ultraschallfraktionierung erlaubte zugleich die Fragmentierung der Zellmembran und die Scherung der DNA, so dass sie die anschließende Zentrifugation nicht beeinflusste: Nach Aufnehmen der Bakterien in Beschallungspuffer frore ich die Suspension zunächst für 2 Stunden bei -70°C ein und überführte sie nach dem Auftauen in 30 ml-COREX®-Gläser. Die Beschallung selbst erfolgte für 3 Minuten bei maximaler Geräteleistung (400 Watt) im Braun Labsonic 1510. Nun wurden schwer lösliche bakterielle Proteine und damit auch die enthaltenen Einschlusskörper bei 10.000 g für 10 Minuten im JA-20 Rotor bei 4°C von den im Überstand enthaltenen solublen Proteinen abzentrifugiert. Anschließend wurden schwer lösliche endogene *E. coli*-Proteine aus den Pellets durch die optimierte Harnstoffkonzentration im IB-Waschpuffer in Lösung gebracht (je Pellet 25 ml Puffer, Inkubation für eine Stunde bei 4°C) und schließlich durch 10-minütige Zentrifugation im JA-20-Rotor bei 20.000 g und 4°C von den weiter unlöslichen Einschlusskörpern abgetrennt. Diese nahm ich in je 40 ml IB-Aufschlusspuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur auf, bevor im letzten Schritt verbliebene Verunreinigungen durch Membrananteile und unlösliche *E. coli*-Proteine von den nun gelösten Einschlusskörpern abgetrennt wurden (JA-20, 25.000 g, 15 min, 8°C). Eine unspezifische Proteolyse der Einschlusskörper verhinderte ich durch Zu-

gabe einer Tablette Protease-Inhibitor-Mix zu je 20 ml Überstand. Die weitere Verarbeitung und Lagerung erfolgte bei 4°C.

Beschallungspuffer: 4,7 mM NaH₂PO₄, 45,2 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH 7,8

Waschpuffer: 2 M Harnstoff, 100 mM TrisHCl, pH 8,0

IB-Aufschlusspuffer: 8 M Harnstoff, 100 mM TrisHCl, 100 mM β-Mercaptoethanol,
pH 8,0

Reinigung des rekombinanten Proteins durch Nickel-Affinitätschromatographie

Während der erste Aufreinigungsschritt die Ablagerung des rekombinanten Proteins in Einschlusskörpern nutzte, machte ich mir im folgenden die Fähigkeit der zu diesem Zweck C-terminal angefügten Histidin-Reste zu Nutze, mit Nickel-Ionen koordinative Bindungen ein zu gehen [67]. Dazu äquilibrierte ich zunächst die verwendete Nickel-NTA-Agarose (15 ml) mit Bindungspuffer. Etwa 40 mg Protein (Proteinbestimmung; etwa 10-15 ml Überstand) wurden dann mit der Nickel-NTA-Agarose über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert und anschließend in eine geeignete Säule von 2,2 cm Außendurchmesser gepackt. Später nutzte ich zur Beladung der Säule eine Kreislaufpumpe. Ungebundene Proteine konnten nun mit 200 ml Bindungspuffer eluiert werden (Flussrate: 1 ml/min), bevor die Säule mit 10 ml Waschpuffer (Flussrate: 0,08 ml/min) von einem Teil der unspezifisch gebundenen Proteine befreit wurde. Das im Elutionspuffer enthaltene Imidazol konkurrierte mit den Histidin-Resten des rekombinant erzeugten *pRS1*-Proteins um die Nickel-Bindungsstellen der Säule, so dass dieses bei einer Flussrate von 0,08 ml/min spezifisch aufgereinigt wurde. Der an die Durchflusszelle ($\lambda=254$ nm) angeschlossene Schreiber ermöglichte die Eingrenzung des Konzentrationsgipfels unter den gesammelten Elutionsfraktionen von je 0,5 ml. Die Gipfel fraktionen fasste ich zusammen und bestimmte die Proteinkonzentration nach Bradford. Hernach regenerierte ich die Säule mit dem der Nickel-

NTA-Agarose beigefügten Regenerierungspuffer bevor ich sie wieder mit Bindungspuffer äquilibrierte.

Bindungspuffer: 3 M Harnstoff, 100 mM TrisHCl, 5 mM β -Mercaptoethanol, pH 8,0

Waschpuffer: 3 M Harnstoff, 100 mM TrisHCl, 5 mM β -Mercaptoethanol, 0,8 mM Imidazol, pH 8,0

Elutionspuffer: 3 M Harnstoff, 100 mM TrisHCl, 5 mM β -Mercaptoethanol, 60 mM Imidazol, pH 8,0

Dialyse

Um das Protein zur Immunisierung von Kaninchen, in der Affinitätsreinigung der erzeugten Antikörper und im ELISA einsetzen zu können, musste der Elutionspuffer durch isosmolaren und harnstofffreien PBS-Puffer ausgetauscht werden. Ein Aliquot von 10 ml Proteinlösung wurde dazu drei Mal über 24 Stunden gegen jeweils 1 Liter PBS bei 4°C dialysiert.

PBS: 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 20 mM Natriumphosphat, pH 7,4

2.2.4. Antikörpermethoden

Erzeugung von polyklonalen Antiseren in Kaninchen

Die Grundimmunisierung von Kaninchen führte Dr. Karbach in unserem Labor durch, ebenso die Abnahme eines Präimmunserums zur Prüfung auf kreuzreagierende Antikörper. Dazu wurden jeweils 100 μ g Protein in 1 ml PBS stabil mit 250 μ l PAO-Mix (inkomplettes Freundsches Adjuvans) emulgiert und nach sorgfältiger Aspiration subscapulär injiziert. Der Erstimmunisierung, für die der Injektionsemulsion zusätzlich 100 μ g Muramyldipeptid zugesetzt wurde (komplettes Freundsches Adjuvans), folgten in vierwöchigen Abständen vier intramuskuläre Boosterinjektionen. Das gleiche Injektionsschema fand für die Erzeu-

gung des Peptidantikörpers Anwendung. Je Injektion wurden dafür 250-500 µg an Ovalbumin gekoppelten Peptids eingesetzt.

Die Blutentnahme erfolgte aus der durch Xylolapplikation hyperämisierten Ohrvene (V. marginalis dorsalis) des Kaninchens in sterile 30 ml Corex-Gläser, die nach Gerinnung des Blutes (eine Stunde Raumtemperatur) im JA-20 Rotor bei 7000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert wurden. Das klare Serum konnte dann aliquotiert und bei -70°C gelagert werden.

PAO-Mix: 4 ml JET-P.A.O.-Vollsyntheseöl, 0,9 ml Tween 81, 0,3 ml Tween 80

Affinitätsreinigung von Antikörpern

Die Reinigung der Antiseren wurde durch Kopplung des Antigens über eine Disulfidbindung an die Säulenmatrix des SulfoLink-Kits durchgeführt.

Reduktion von Disulfidbindungen und Koppelung an die Säulenmatrix

Um im rekombinanten Protein enthaltene Disulfidbrücken zu spalten bzw. sicherzustellen dass das C-terminale Cystein des synthetischen Peptids in reduzierten Zustand vorlag, wurden diese Gruppen in einem ersten Schritt reduziert. Dazu wurden 10 mg Reductacryl in 500 µl Wasser aufgenommen und mit 20 µl wässriger Natriumborhydridlösung (100 mg/ml) 15 Minuten bei Raumtemperatur reduziert. Anschließend pufferte ich überschüssiges Natriumborhydrid durch Zugabe von 100 µl 1 M Essigsäure, zentrifugierte die Suspension kurz und verwarf den Überstand. Durch mehrmaliges Spülen mit Wasser und Anzentrifugieren entfernte ich restliche Essigsäure und stellte das Reductacryl mit 1 M Tris-Puffer pH 9,5 auf pH 7,5 ein. 5 mg in 2 ml Probenpuffer gelöstes Peptid bzw. 1 mg Protein wurden nun mit dem reduzierten Reductacryl bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert, dann zentrifugiert und der Überstand mit dem reduzierten Protein respektive Peptid asserviert. Nachdem die SulfoLink-Säule (Säulenvolumen: 2 ml) auf Raumtemperatur er-

wärmt, der Lagerungspuffer (Hersteller) entfernt und die Säule mit 12 ml Kopplungspuffer äquilibriert wurde, trug ich das reduzierte Protein bzw. Peptid auf und ließ es vollständig in die Säulenmatrix einlaufen. Anschließend ließ ich die Säule für 15 Minuten auf einem Schüttler und weitere 30 Minuten ruhig bei Raumtemperatur inkubieren. Nun wurde die Protein- bzw. Peptidlösung auslaufen lassen und mit 6 ml Kopplungspuffer gespült. Dabei war das Eindringen von Luftblasen das Gel unbedingt zu vermeiden, indem die untere Öffnung nach der oberen geöffnet wurde. Verbliebene SH-Gruppen der Säulenmatrix wurden nun mit 15,8 mg L-Cystein in 2 ml Kopplungspuffer abgesättigt. Die Vorgehensweise und Inkubation entsprach der für die Beladung mit den Polypeptiden. Anschließend wusch ich die Säule mit dem achtfachen Säulenvolumen Waschlösung und dem sechsfachen Säulenvolumen 0,05% Natriumazidlösung, legte eine Filterscheibe auf das Gel auf und überschichtete sie mit weiteren 2 ml Natriumazidlösung zur Lagerung bei 4°C.

Probenpuffer: 100 mM Natriumphosphat, 5 mM EDTA-Natrium, pH 6,0

Kopplungspuffer: 50 mM Tris, 5 mM EDTA-Natrium, pH 8,5

Waschlösung: 1,0 M NaCl

Reinigung des Antiserums

Nachdem die mit dem Polypeptid gekoppelte Säule auf Umgebungstemperatur gebracht wurde, ließ ich die Natriumazidlösung auslaufen und spülte mit dem dreifachen Säulenvolumen PBS. Ich schloss den Auslauf der Säule und gab 1-2 ml Serum zusammen mit 0,2 ml Probenpuffer auf die Säule, ließ das Serum in die Gel-Matrix einlaufen und inkubierte die Säule eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend folgte ein sorgfältiges Waschen der Säule (16 ml PBS). 16 Reaktionsgefäße mit jeweils 25 µl 1 M Tris (pH 9,5) wurden vorbereitet, in die anschließend die Antikörper in Fraktionen von 0,5 ml mit 100 mM Glycin-Puffer (pH 2,5) eluiert wurden. So erhielt ich ohne weiteres neutralen pH. Sofort anschließend versetzte ich die Eluate mit der gleichen Menge Glycerin und frohr sie bei -20°C ein.

Für die Lagerung bei +4°C setzte ich als Konservierungsmittel 0,01% (w/v) Thimerosal aus einer Stammlösung zu.

Antikörper-ELISA

Die hochtitrigsten Fraktionen der Aufreinigung identifizierte ich mit einem Antikörper-ELISA [40]. Dazu wählte ich die Fraktionen um den erwarteten Konzentrationsgipfel aus und führte in der Regel Präimmenserum und Vollserum zum Vergleich mit. Durch Inkubation der ELISA-Platte mit einer Lösung von 10 µg/ml rekombinantem *pRS1*-Protein bzw. 50 µg/ml Peptid in Beschichtungspuffer (100 µl je Vertiefung) über Nacht bei 4°C beschichtete ich sie mit dem jeweiligen Antigen. Anschließend wurden die verbliebenen unspezifischen Bindungsstellen der Vertiefungen mit je 150 µl Blockpuffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur abgesättigt und die Platte für 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Hernach konnten die Antikörpereluate an die in den Vertiefungen gebundenen Antigene adsorbiert werden. Dazu stellte ich Verdünnungsreihen her, indem ich zunächst in die Vertiefungen 2 bis 12 einer jeden Zeile der ELISA-Platte 100 µl Blockpuffer vorlegte; die Antikörpereluate wurden sodann jeweils in Blockpuffer auf die höchste gewünschte Konzentration diluiert, bei meinen Versuchen also 1:400 oder 1:800. Die erste Vertiefung einer Zeile von Vertiefungen erhielt davon jeweils 200 µl, bevor durch Abziehen von 100 µl Lösung aus der vorhergehenden und sorgfältiges Auf- und Abpipettieren mit dem bereits vorgelegten Inhalt der folgenden Vertiefung ein Konzentrationsverhältnis von je 1:2 hergestellt wurde. In der 12. Vertiefung beließ ich als Negativkontrolle den vorgelegten Blockpuffer. Die Absorption der Seren erfolgte bei Raumtemperatur in 2 Stunden oder bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen der ELISA-Platte für je 5 Minuten in Waschpuffer inkubierte ich sie mit je 100 µl einer Lösung des Alkalische-Phosphatase-Konjugats (1:250 in Blockpuffer) für 4 Stunden bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligen Waschen und Äquilibrierung mit 100 µl Äquilibrierungspuffer pro Vertiefung für 5 Minuten bei Raum-

temperatur schloss sich die Nachweisreaktion an. Dazu ließ ich die Platte für exakt eine Stunde mit 100 µl Substratlösung pro Vertiefung bei Raumtemperatur inkubieren. Die Reaktion wurde durch Hinzugabe von 50 µl Stopplösung (Komplexierung von Magnesiumionen) abgebrochen und die Differenz der optischen Dichte bei 405 und 450 nm mit einem ELISA-Reader bestimmt, die wiederum der umgesetzten Substratmenge und damit der Konzentration des Erstantikörpers proportional war. An Stelle der Angabe des Titers als Schnittpunkt der Titergeraden mit dem Kontrollwert bevorzugt unser Labor der geringeren Fehleranfälligkeit wegen die Angabe des Titers bei einer $\Delta OD_{450-405}$ von 0,5, also im linearen Bereich der Titerkurve. Die Gipfelfraktionen der Antikörperreinigung fasste ich zuzusammen.

Beschichtungspuffer: 100 mM Natriumcarbonat, 100 mM Natriumhydrogencarbonat,

pH 9,6

Blockpuffer: PBS, jedoch 200 mM Natriumchlorid, 0,5% BSA, 0,1% Natriumazid

Waschpuffer: PBS, jedoch 200 mM Natriumchlorid, 0,05% Tween 20

Äquilibrierpuffer: 150 mM Natriumchlorid, 100 mM Tris, pH 9,8

Substratlösung: Äquilibrierpuffer mit, unmittelbar vor Gebrauch zugesetzt:

5 mM Magnesiumchlorid, 1 mg/ml Substrat aus Stammlösung

Stopplösung: 100 mM EDTA, pH 8,0

Western-Blot [86]

Die Überprüfung der Spezifität der erzeugten Antikörper gegen *pRS1* und *pSGLT1* erfolgte im Western-Blot (vgl. a. [12]). Ich verwendete für die gezeigten Western-Blots 6%ige Sammel- und 10%ige Polyacrylamid-Trenngele. Die Proben wurden in modifiziertem Laemmli-Puffer für 45 Minuten bei 37°C denaturiert; anschließend folgte die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei einer angelegten Elektrophoresespannung von 80 V im Sammelgel und 120 V im Trenngel. Als Molekulargewichtsmarker wurden der vorgefärb-

2.2. Methoden

te BenchMark-Proteinstandard und der MagicMark Western-Standard mitgeführt. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel zum Blotten unmittelbar auf die HyBond-Nitrocellulose-Membran aufgelegt, beidseits gefolgt von je drei in Blotpuffer getränkten Whatman-Papieren. Der Proteintransfer in Richtung der Anode auf die Membran erfolgte bei $1,3 \text{ mA/cm}^2$ zwischen den Graphit-Elektroden der Blot-Apparatur für zwei Stunden. Die Nitrocellulosemembran wurde anschließend für eine Stunde in Blockpuffer blockiert, bevor sie mit dem jeweils in Blockpuffer verdünnten Primärantikörper (1:1000 für die Antikörper $\alpha pRS1\text{-Prot}$, $\alpha pRS1\text{-Pept}$ und $\alpha rbSGLT1$) für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert wurde.

Anschließend wurde der Blot drei Mal für je 15 Minuten in Blockpuffer gewaschen, bevor sich die Reaktion mit dem Sekundärantikörper anschloss (Merrettichperoxidase-Konjugat, 1:5000 in Blockpuffer, eine Stunde bei Raumtemperatur). Es folgten erneut drei Waschschritte, bevor die Mischung der beiden ECL (enhanced chemiluminescence)-Reagenzien für eine Minute zum Blot gegeben und anschließend der ECL-Film für zehn bis 45 Minuten aufgelegt wurde. Die Entwicklung und Fixierung geschah mit Standardfilmentwickler und -fixierlösung.

mod. Laemmli-Puffer: 10% (w/v) Glycin, 2% (w/v) SDS, 0,001% Bromphenolblau
46,3 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 53,7 mM Natriumdihydrogenphosphat

TBS-T: 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 50 mM Tris, pH 8,0
0,5% Tween 20

Blockpuffer: 2% Magermilchpulver in TBS-T

2.2.5. Zellkulturmethoden

Die LLC-PK₁-Zelllinie (ATCC-Nummer CL-101) entstammt der Schweineniere und entspricht in ihren Charakteristika dem Segment 3 des proximalen Tubulus [69], [124], [51]. HEK293 (*human embryonic kidney*)-Zellen (ATCC-Nummer CRL-1573) werden allgemein weiterhin als durch Adenovirus Typ 5 transformierte Zellen der embryonalen Niere [49] betrachtet, wenn auch in neueren Untersuchungen neuronale Marker gefunden wurden [149].

Kulturroutinen

Die Zellen wurden bei 5% CO₂ und 37°C in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) kultiviert, dem aufgrund geringer Lagerstabilität Glutamin sowie Antibiotika (1 mg/ml Streptomycinsulfat, 100 U/ml Penicillin G) und dekompementiertes fötales Rinderserum (*fetal calf serum, FCS*) frisch zugesetzt wurden. Das Kulturmedium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Zum Passagieren der konfluent gewachsenen Zellkulturen wurde das Medium entfernt und die Kultur mit Ablösepuffer überschichtet, der durch Komplexierung von Calcium die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte löste (20 Minuten bei 37°C); für einzelne Zwecke (vgl. Abschnitt „Qualitätssicherung“, S. 92) setzte ich gebrauchsfertig gelieferte Trypsinlösung ein. Nach Zentrifugierung der abgelösten Zellen wurden sie in Kulturmedium resuspendiert, ein Aliquot der Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau gemischt und die Zelldichte mittels eines Hämozytometers nach Neubauer bestimmt, bevor 10 000 Zellen/cm², für Versuche auf Transwell-Clear-Filtern 20 000 Zellen/cm², in ein neues Kulturgefäß ausgesät wurden. Bei diesen Zelldichten wurde Konfluenz nach etwa 120 Stunden erreicht.

Subkonfluente Zellen kultivierte ich für immunzytochemische Versuche auf 18x18 mm- oder runden (Durchmesser 10mm) Deckgläschen, die mit Silikonpaste in 6- bzw. 24-well-Schalen waagrecht eingeklebt werden. Eine vorhergehende Beschichtung mit Poly-L-Lysin

oder Gelatine (vgl. [108]) war nach entsprechenden Vorversuchen entbehrlich. Sterilität und eine sehr gute Haftung der LLC-PK₁-Zellen wurde bereits durch vorsichtiges beidseitiges Abflammen der Deckgläschen erzielt. Da LLC-PK₁-Zellen bei Konfluenz einen typischen transepithelialen Substrat- und Wassertransport aufnehmen, der zur Ablösung des Zellrasens von üblichen Kulturmatrizes führt (so genannte „Dombildung“), mussten Konfluenzversuche auf mikroporösen Filtern (Transwell Clear TCT Polyester-Membran) stattfinden, die einen solchen Transport zulassen (vgl. Abschnitt 2.2.7, S. 27).

Dekomplementierung: Die Inaktivierung von Komplementbestandteilen des Serums er-

folgt durch Inkubation bei 56°C über 30 Minuten im Wasserbad

Ablösepuffer: Ca²⁺- und Mg²⁺-freie *Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)*

ergänzt um 28 mM NaHCO₃, 0,5 mM EDTA, 10 mM HEPES, pH

7,4

2.2.6. Transiente Transfektion von Zellen

Zur transienten Transfektion von LLC-PK₁-Zellen ließ ich die Zellen in einer Vertiefung einer *six-well-plate* über 24 Stunden zu 30-50% Konfluenz wachsen. Nun gab ich 9 µl Fu-gene-Transfektionsreagenz für fünf Minuten zu 290 µl serumfreiem *DMEM*, bevor diese Mischung tropfenweise zu 5 µg der gewünschten DNA gegeben und für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach einem Medienwechsel wurde anschließend die DNA-Lipid-Suspension zur Kultur gegeben. Nach acht Stunden Inkubationsdauer saugte ich den Transfektionsansatz ab und gab neues Medium hinzu. Ich kultivierte die Zellen über Nacht und setzte die Zellen für Experimente ein. In gleicher Weise ließ sich auch die Transfektion mit auf Transwell Clear TCT Polyester-Filtern zur Konfluenz gewachsenen Zellen durchführen (Transfektion nach ca. 300 Stunden, also vier Tage nach Konfluenz), allerdings war die Ausbeute an transfizierten Zellen deutlich niedriger.

2.2.7. Immunfluoreszenz

Nach zahlreichen Optimierungen (vgl. [36], [161], [183], [20], [74]) erwies sich zum immunzytochemischen Nachweise von *RS1* und *SGLT1* in LLC-PK₁ und HEK293-Zellen das folgende Protokoll als effektiv; Filterkulturen erforderten dabei die Zugabe der Waschlösungen und Fixantien in das obere und untere Kulturkompartiment.

Zunächst wusch ich das Kulturmedium sorgfältig zweimal mit Waschpuffer aus und überschichtete die Zellen anschließend für 12 Minuten mit 4%igem Paraformaldehyd. Im Vergleich zu ebenfalls untersuchten denaturierenden Aceton- oder Methanolfixierungen wurde die Antigenität des Zielproteins durch dieses quervernetzende Fixans bedeutend besser erhalten, außerdem ist es einfach und bei Raumtemperatur anzuwenden. Nach weiteren zwei Waschschritten von je 5 Minuten wurden durch Zugabe von 1 M Glycin in 1,0 M Trispuffer (pH 8,0) für 10 Minuten zu einer Endkonzentration von 40 mM freie Aldehydgruppen zu Schiffschen Basen kondensiert (Quenching, vgl. [2]); dadurch wurden Hintergrundsignale durch kovalente Bindung von Antikörpern vermieden. Eine Blockierung mit *BSA* war nach meiner Erfahrung eher nachteilig und unterblieb üblicherweise (vgl. Abschnitt „Mehrfachmarkierungen“, S. 29). Nach weiterem Waschen (2 Mal für je 5 Minuten) permeabilisierte ich die Zellen mit einer Lösung von 0,25% Triton X-110 in Waschpuffer für 10 Minuten. Das Detergens wurde dann ausgiebig abgespült.

Bezeichnung (Serum/Name)	Antigen	Lösungsmittel	Verdünnung Inkubation
<i>αpRS1-Prot</i> (75-II)	<i>pRS1</i> ₁₋₆₁₅ , siehe 2.2.4, S. 19	Waschpuffer	1:50 4° C, über Nacht oder RT, 1 h
<i>αpRS1-Pept</i> (N5/V)	<i>pRS1</i> ₄₆₁₋₄₇₇ siehe 2.1.2, S. 9	Waschpuffer mit 0,25% Triton-X-110	1:25 RT, 1 h

α rbSGLT1 (QIS30)	rbSGLT1 ₂₄₃₋₂₇₂	Waschpuffer mit 0,25% Gelatine, 0,5% BSA	1:400 4° C, über Nacht
-----------------------------	----------------------------	--	---------------------------

Tabelle 2.2: Aus Kaninchen gewonnene polyklonale Primärantikörper gegen pRS1 und pSGLT1 bzw. hSGLT1 und ihr Einsatz in der Immunfluoreszenz

Anschließend wurden die Zellen mit den jeweiligen Primärantikörpern überschichtet, auf Filterkulturen ein passend geschnittenes Stück Laborfilm aufgelegt (bessere Verteilung des Antikörpers, geringere Mengen, kaum Austrocknung). Lösungsmittel, Verdünnung, Inkubationsdauer und -temperatur sind der Tabelle 2.2 zu entnehmen. Nach Abwaschen des Primärantikörpers (3 Mal für je 5 Minuten) inkubierte ich die Zellen dann mit dem jeweils passenden Sekundärantikörper (vgl. Abschnitt 2.1.3, S. 10). Zum Abschluss des Protokolls wusch ich sehr gründlich (6 Mal für je 5 Minuten), bevor die Deckgläser den Kulturgefäßen entnommen, Filter mit einem Skalpell aus der Halterung entfernt und unter Zusatz von 1-2 µl DAPI-Stocklösung je Tropfen *Mounting-Medium* eingedeckt wurden.

Waschpuffer: 5 mM 3-(N-morpholino)Propansulfonsäure (MOPS), 100 mM Natriumchlorid, 3 mM Kaliumchlorid, 2 mM Calciumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid

4% Paraformaldehyd: Paraformaldehyd ließ sich durch Titrieren des Lösungspuffers (Waschpuffer, 10-fach konzentriert vorgelegt) mit 5 N Natronlauge in Lösung bringen. Anschließend wird mit 32%iger Salzsäure der pH 7,4 eingestellt.

Präadsorption von Antikörpern

Zur Spezifitätskontrolle der verwendeten Antikörper setzte ich die Präadsorption mit dem antigenen Peptid bzw. Protein ein. Dazu inkubierte ich den Antikörper in der gewünschten Verdünnung für 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad mit 100 µg/ml des Peptids bzw. Prote-

ins. Unmittelbar anschließend verwendete ich ihn entsprechend dem unblockierten Antikörper im angegebenen immunzytochemischen Protokoll.

Mehrfachmarkierungen

Um weitere Antigene (*Clathrin*, *Dynamin II*, β -*Tubulin*, *TGN46*) zusammen mit *pRS1* in einer Zelle gemeinsam darzustellen, führte ich zunächst das oben dargestellte Protokoll mit dem jeweiligen Primärantikörper (vgl. Abschnitt 2.1.3, S. 10) und einem passenden Sekundärantikörper durch, bevor sich entsprechende Schritte mit α *pRS1-Prot* wiederholten. Als Kontrollen für eventuelle Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper mit den vorher eingesetzten Primärantikörpern aus anderen Spezies wurden Präparate erstellt, bei denen der jeweils „falsche“ Sekundärantikörper den eingesetzten Primärantikörpern folgt.

Zur Markierung des *Actin*-Zytoskeletts benutzte ich ein fluoreszenzmarkiertes Derivat von Phalloidin, einem Gift aus *Amanita phalloides*, dem Knollenblätterpilz (vgl. Abschnitt 2.1.4, S. 11). Dafür inkubierte ich die Zellen mit dem *Alexa-Fluor-488*-Konjugat von *Phalloidin* in 1% *BSA* in Waschpuffer für 20 Minuten. Das übrige Protokoll lief dann wie oben geschildert ab.

3. ERGEBNISSE

3.1. Lokalisation von *pRS1* in subkonfluenten LLC-PK₁-Zellen

In subkonfluenten LLC-PK₁-Zellen ließen sich drei distinkte Lokalisationen des Proteins *pRS1* unterscheiden (Abbildung 3.1):

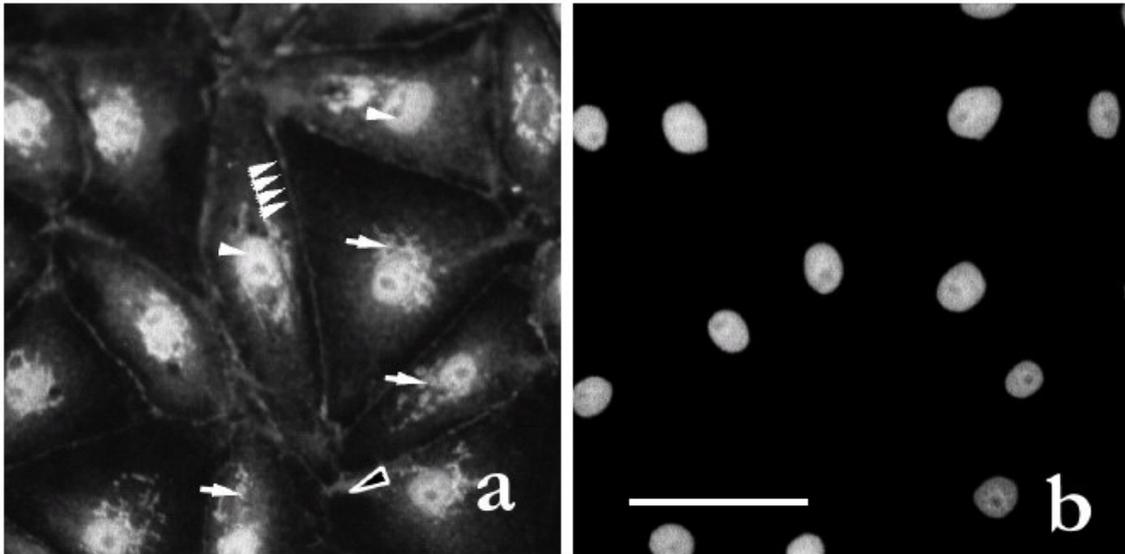


Abbildung 3.1: Verteilung von *pRS1* in subkonfluenten LLC-PK₁-Zellen

LLC-PK₁-Zellen wurden in einer Dichte von 20 000/cm² ausgesät, nach 24 Stunden mit Triton X-114 permeabilisiert und mit dem Antikörper $\alpha pRS1$ -Prot untersucht. Sekundärrantikörper war ein Ziege-anti-Kaninchen IgG F(ab')₂-Fragment konjugiert an Alexa Fluor 555. a) Die auf Deckgläsern kultivierten Zellen zeigten *pRS1* an der Zellmembran (Reihe von Pfeilspitzen), im Zellkern (weiße Pfeilspitze), in einem perinukleären Kompartiment (weißer Pfeil) und in Vesikeln im Zytosol, oftmals straßenförmig auf die Zellkontakte zu laufend (leere Pfeilspitze). b) Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI. Balken: 50 μ m. Vertiefende Darstellungen sind in Abbildung 6.1, S. 73 wiedergegeben. *Aufnahmen mit ZEISS Axioplan 2, Plan Neofluar 40x, auf Kodak T-MAX 400 Pro*

Zum einen wurde die ganze Zirkumferenz der Zellen, entsprechend der Plasmamembran (vgl. Abschnitt 3.3, S. 34), bandförmig markiert. Diese Färbung war kontinuierlich und nicht etwa grobdispers punktiert, was auf eine spezifische Anreicherung in bestimmten Membrananteilen hinweisen würde. Zweitens befand sich ein großer Anteil der *pRS1*-Moleküle im Zellkern. Drittens fand ich im Zytosol mehrere Signale: Zum einen scharf begrenzte, tubulovesikuläre Strukturen mit hoher Signalintensität in der Umgebung des Zellkerns. Zum anderen kleine Vesikel unterhalb der Membran und im gesamten Zytosol, teil-

weise akzentuiert im Bereich von Zellkontakten (leere Pfeilspitze in Abbildung 3.1 a). In Abbildung 6.2, S. 75 ist diese Verteilung konfokalmikroskopisch dargestellt, wobei alle Abbildungen einzeln in derselben Zelle aufgenommen wurden: Bilder 1 a) bis c) zeigen eine Übersicht, in d) erkennt man zahlreiche Vesikel unterhalb der kontinuierlich angefärbten Zellmembran. Das perinukleäre Kompartiment ist in e) dieser Synopse wiedergegeben. Diese Verteilung von *pRS1* zeigte sich mit beiden von mir erzeugten Antikörpern, allerdings mit *α pRS1-Pept* insgesamt schwächer (Abbildung 3.2) und mit undeutlicherem Membransignal.

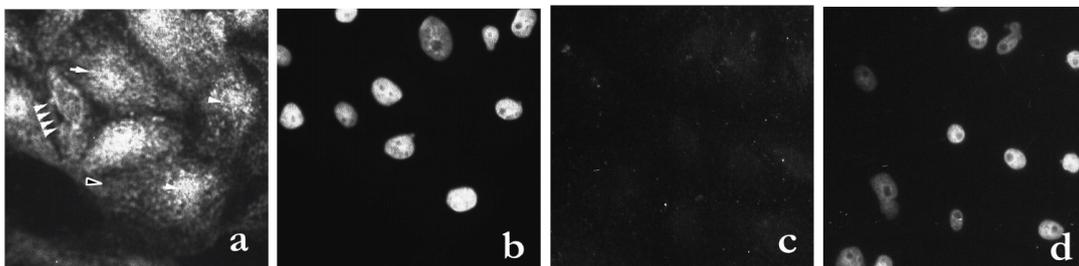


Abbildung 3.2: Untersuchung subkonfluenter LLC-PK₁-Zellen mit *α pRS1-Pept*

Mit *α pRS1-Pept* in der beschriebenen Weise (Abbildung 3.1) untersuchte LLC-PK₁-Zellen zeigten die gleichen Signale wie mit *α pRS1-Prot*, jedoch weniger deutlich: *pRS1* befand sich an der Zellmembran (Reihe von weißen Pfeilspitzen), im Zellkern (weiße Pfeilspitze), in einem perinukleären Kompartiment (weißer Pfeil) und in zytosolischen Vesikeln (leere Pfeilspitze). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (b und d). Präadsorption des Antikörpers mit dem Antigen (c) führte zu praktisch vollständigem Verschwinden der Anfärbung. *Aufnahmen mit ZEISS Axioplan 2, Plan Neofluar 40x, auf Kodak T-MAX 400 Pro*

Die Versuche führte ich in gleicher Weise mit stabil und transient mit *pRS1* transfizierten Zellen ebenso durch wie mit einer Zelllinie, in der die Menge von *pRS1* durch stabile Transfektion mit einem *antisense*-Konstrukt vermindert war. Hier ließen sich optisch keine signifikanten Änderungen der Proteinmenge in subkonfluenten Zellen feststellen, wenngleich dies im Westernblot deutlich gezeigt worden war [82].

3.2. Lokalisation von *pRS1* in konfluenten LLC-PK₁-Zellen

Mit Erreichen der Konfluenz exprimieren LLC-PK₁-Zellen eine Anzahl für ihre Ausdifferenzierung typischer Proteine, darunter auch *SGLT1* (vgl. Abschnitt 1.3, S. 1, Abschnitt

4.2, S. 51). Dass Überexpression von *pRS1* in konfluenten Zellen zu einer geringeren Transkription von *SGLT1* führt [82], könnte mit einer physiologischen Abnahme von *pRS1* im Zellkern bei Erreichen der Konfluenz zusammenhängen, die dann die Transkription von *SGLT1* und eventuell anderen Proteinen ermöglicht.

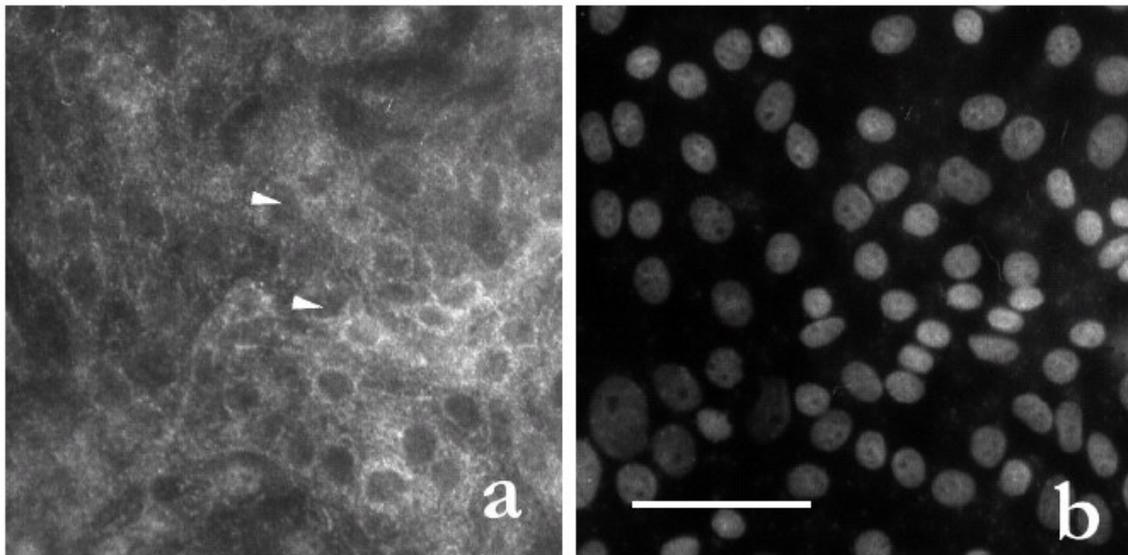


Abbildung 3.3: Verteilung von *pRS1* in konfluenten LLC-PK₁-Zellen

LLC-PK₁-Zellen wurden in einer Dichte von 20 000/cm² auf Transwell Clear Polyester-Membranen ausgesät. Am fünften Tag wurde Konfluenz erreicht, acht weitere Tage später wurden die Zellen permeabilisiert und mit dem Antikörper α *pRS1*-Prot gefolgt von einem Ziege-anti-Kaninchen AlexaFluor555-Konjugat untersucht. a) Ich fand insgesamt eine deutliche Reduzierung der Menge von *pRS1*. Das Bild zeigt eine von *pRS1* freie Zellmembran, auch im Zellkern (weiße Pfeilspitze) befanden sich zu diesem Zeitpunkt keine detektierbaren Mengen des Proteins. Es zeigte sich nur mehr in intrazellulären Vesikeln, die sich perinukleär akzentuiert darstellten. b) Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI. Balken: 50µm. Vertiefende Darstellungen sind in Abbildung 6.3, S. 77 wiedergegeben. *Aufnahmen mit ZEISS Axioplan 2, Plan Neofluar 40x, auf Kodak T-MAX 400 Pro*

Ich konnte nun zeigen, dass dies der Fall ist: Die gesamte Menge an *pRS1*-Protein war nach Konfluenz drastisch reduziert, die Mehrzahl der Zellkerne zeigte keine Akkumulation von *pRS1* mehr und an der Membran war *pRS1* nicht mehr nachzuweisen (Abbildung 3.3). Nur im Zytosol fand ich noch eine diskrete punktförmige Verteilung, um den Kern herum tubulovesikuläre Strukturen, wie sie aus den subkonfluenten Zellen bekannt sind (Abbildung 6.3, Bild e-g, S. 77).

Um diese konfluenzabhängig regulierte Kernlokalisierung zu quantifizieren, untersuchte ich die Kerne der Zellen 18, 72, 120, 216 und 312 Stunden nach Beginn der Kultur. Die Zellen wurden auf Transwell Clear-Filtern kultiviert und wurden unter den gewählten Bedingungen nach etwa 120 Stunden konfluent. Die Filterkultur änderte die intrazelluläre Distribution von *pRS1* nicht *per se* (Abbildung 6.1, Bild c, S. 73).

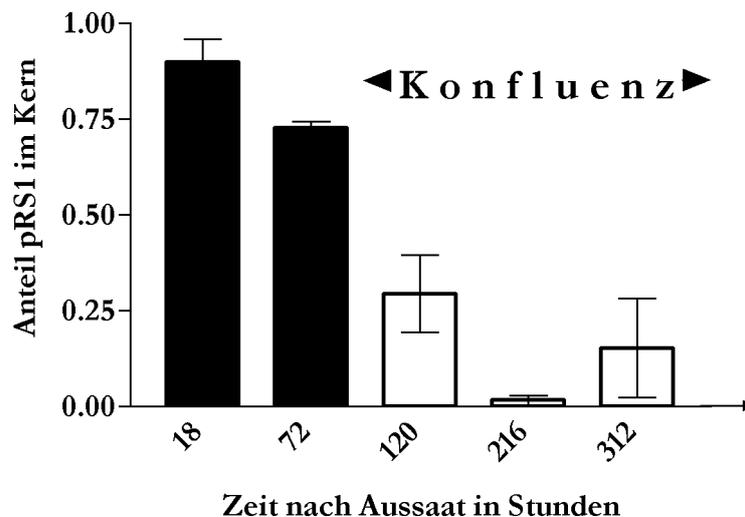


Abbildung 3.4 Der Anteil von LLC-PK₁-Zellen, in denen *pRS1* im Zellkern vorliegt, ist von der Konfluenz abhängig

Wildtyp-LLC-PK₁-Zellen wurden in einer Dichte von 20000/cm² auf Costar Transwell Clear-Filtern ausgesät und bis zu acht Tage nach Erreichen der Konfluenz (312 Stunden) kultiviert. Immunfluoreszenzmikroskopisch wurde der Anteil der Zellen ermittelt, die *pRS1* im Zellkern besitzen. Dazu wurden in je drei (216 Stunden: zwei) unabhängigen Versuchen je 731 bis 6250 Zellen beurteilt. Die Graphik zeigt, dass mit Zunehmen der Konfluenz *pRS1* in immer weniger Zellkernen vorhanden war, am Ende des Versuchs nahm dieser Anteil wieder geringfügig zu.

Ich beurteilte aus je drei (216 Stunden: zwei) von einander unabhängigen Versuchen je Präparat 731 bis 6250 Zellen. Eine Kernanreicherung diagnostizierte ich, wenn eine Anfärbung des Kerns sichtbar wurde, die deutlich über derjenigen des umgebenden Zytoplasmas lag. Das Ergebnis der Versuche zeigt Abbildung 3.4, S. 33. Der relative Anteil der Zellen mit Lokalisation von *pRS1* im Kern sank demnach drastisch von $0,90 \pm 0,06$ bei 18 Stunden alten Zellen über $0,73 \pm 0,02$ (72 Stunden) auf $0,30 \pm 0,18$ bei Erreichen der Konfluenz (120 Stunden). Anschließend zeigte sich erneut eine drastische Abnahme der Kernlokalisierung 4

3.3. Beziehung von *pRS1* zum Zytoskelett

Tage nach Konfluenz (216 Stunden) auf praktisch Null ($0,02 \pm 0,02$), bevor später wieder mehr Kerne spezifisch angefärbt waren ($0,15 \pm 0,13$ nach 312 Stunden).

3.3. Beziehung von *pRS1* zum Zytoskelett

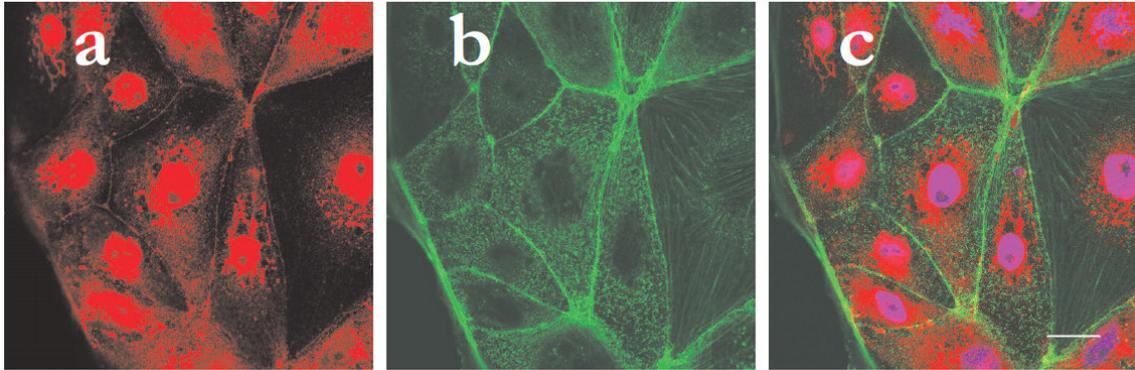


Abbildung 3.5: Nur teilweise überlappende Lokalisation von *pRS1* mit *Actin*
Subkonfluente LLC-PK1-Zellen wurden mit Alexa Fluor 488-konjugiertem Phalloidin inkubiert (grün) und anschließend wie beschrieben mit dem Antikörper $\alpha pRS1$ -Prot (rot) untersucht. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI. In konfokalmikroskopischen Aufnahmen fand sich das beschriebene Bild mit *pRS1* (a). *Actin*-Stressfasern stellten sich innerhalb der Zelle dar, daneben ein kräftiges submembranäres *Actin*-Band (b). Es fand sich nur eine teilweise Überlappung von *pRS1* und *Actin*-Signalen. Ergänzend siehe Abbildung 6.4, S. 79. Konfokale Aufnahmen mit ZEISS LSM 510, Plan Aplanochromat 63x, Pinhole 110 μm

Auf Grund seiner Rolle in der Organisation der Zelle könnte das Zytoskelett bei allen in Abschnitt 3.1, S. 30 geschilderten Lokalisationen von *pRS1* in subkonfluenten LLC-PK₁-Zellen eine Rolle spielen. Bei meinen Untersuchungen ließ ich mich von folgenden Überlegungen leiten:

- a) Da *Actin* in die Organisation der Zellmembran (vgl. [159], [1]) und an Endocytose-Vorgängen beteiligt ist [133], [88], [15], [140], [114], könnte eine Kolo-kalisierung von *pRS1* und *Actin* Hinweise auf die Verankerung von *RS1* im Bereich der Membran und auf eine mögliche Interaktion von *RS1* mit *Actin* bei der kürzlich gezeigten [180] *Dynamamin*-abhängigen Regulation von Membranproteinen liefern.
- b) Für das perinukleäre Kompartiment könnte eine Assoziation mit Microtubuli Hinweise auf seine Zugehörigkeit zum Golgi-Komplex geben [170].

- c) Microtubuli könnten auch in die Organisation der vesikulären Komponente des *pRS1*-Signals involviert sein.

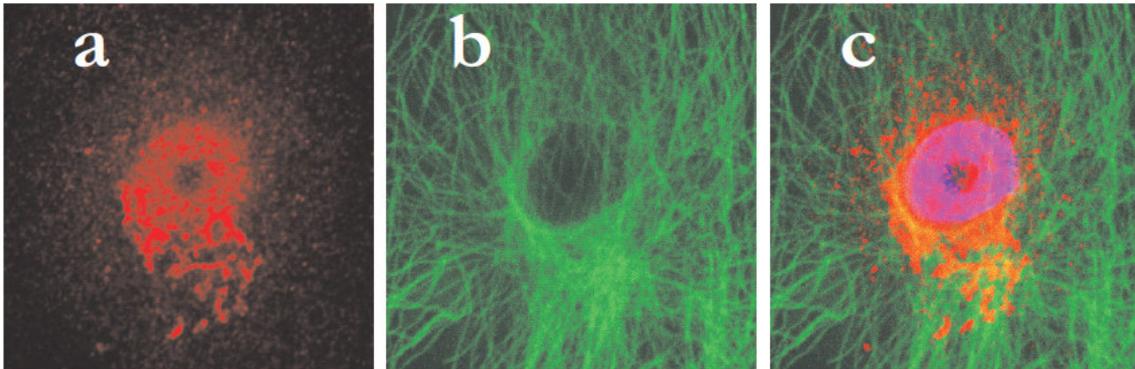


Abbildung 3.6: Perinukleäre Kolokalisation von *pRS1* mit Microtubuli

Subkonfluente LLC-PK₁-Zellen wurden mit einem Maus-Antikörper gegen β -Tubulin inkubiert, anschließend mit einem Ziege-anti-Maus Cy2-Konjugat. *pRS1* wurde wie beschrieben visualisiert. Dieses konfokalmikroskopische Bild zeigt die perinukleäre Kolokalisation von *pRS1* (a, rot) mit Microtubuli (b, grün, Überlagerung in c, Kernfärbung mit DAPI blau). *pRS1* enthaltende Tubulovesikel akkumulierten im Bereich des *MTOC* (*microtubule organizing centre*) besonders stark. Vertiefende Darstellungen sind in Abbildung 6.5, S. 81 wiedergegeben. *Konfokale Aufnahmen mit ZEISS LSM 510, Plan Aplanochromat 63x, Pinhole 135 μ m*

Die Anfärbung der Zellen mit Phalloidin, einem *Actin* bindenden zyklischen Peptid, zeigte die sich durch die ganze Zelle erstreckenden Stressfasern und die den Epithelzellen Form gebenden *Actin*-Bänder entlang der Zellmembran (Abbildung 3.5b). Der Vergleich mit der Verteilung von *pRS1* (Abbildung 3.5a) bestätigte, dass die lineare Anordnung des Proteins entlang der durch das *Actin*-Skelett markierten Zellgrenzen stattfindet. Allerdings konnte ich in konfokal aufgenommenen Bildern keine strenge Kolokalisation des Proteins mit *Actin* finden. Es handelte sich offenbar lediglich um eine ähnliche Verteilung. Bei sorgfältiger Analyse der konfokalen Aufnahmen am Bildschirm fand sich zudem kein Hinweis auf eine Interaktion von Vesikeln mit *pRS1* und *Actin*-Filamenten unterhalb der Zellmembran. Eine Interaktion kann letztlich nur durch funktionelle Versuche erhellt werden. An den fokalen Adhäsionspunkten mit Verdichtungen des *Actin*-Skeletts (Abbildung 6.4, Bild 3 e, S. 79) waren die beiden Proteine gelegentlich, aber nicht regelhaft innerhalb der optischen Schnittebene kolokalisiert. Dies ließ keinen Schluss auf eine direkte Interaktion von *pRS1*

3.3. Beziehung von *pRS1* zum Zytoskelett

mit dem *Actin*-Skelett zu. Gegen die Kolokalisation beider Proteine spricht auch, dass entlang der Stressfasern keine deutliche Markierung von *pRS1* stattfand.

Nach Markierung der Microtubuli mit einem Antikörper gegen β -*Tubulin* (Abbildung 3.6b, siehe auch Abbildung 6.5, S. 81), zeigte sich das typische Muster des *Tubulin*-Zytoskeletts, das sich, von den Zentrosomen ausgehend, in Richtung auf die Ränder der Zellen erstreckt. Dabei fächert es sich, von dichten Bündeln in der Gegend des Zentrosoms ausgehend, radialstrahlförmig in ein ausladendes Netzwerk auf. *pRS1* tragende Tubulovesikel stellten sich eng assoziiert mit den Bündeln der Microtubuli im perinukleären Raum, mithin also im Bereich des *MTOC* (*microtubule organizing center*) dar.

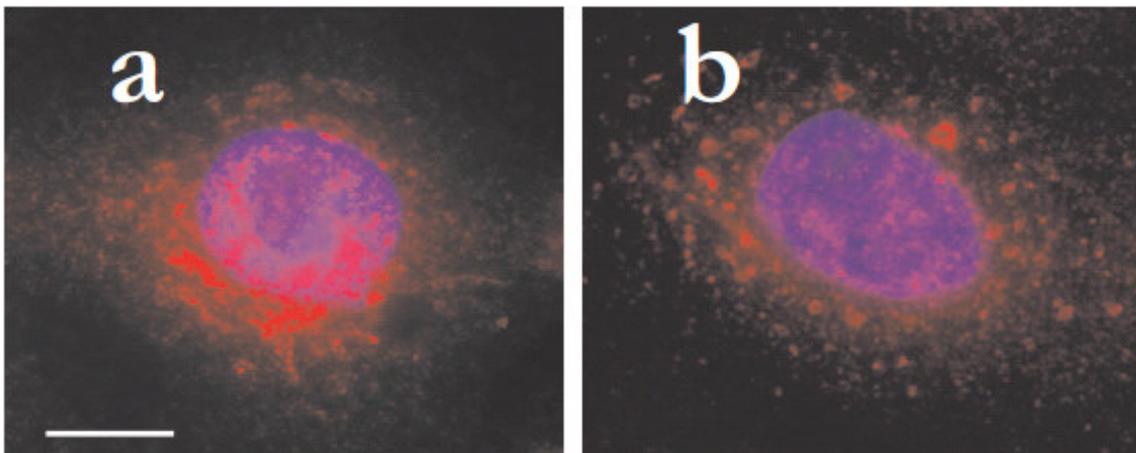


Abbildung 3.7: Behandlung mit Colchicin führt am perinukleären, *pRS1*-positiven Kompartiment zu Strukturverlust

Subkonfluente, auf Deckgläschen kultivierte LLC-PK₁-Zellen wurden für 2 Stunden mit 10 μ M Colchicin behandelt, anschließend fixiert, permeabilisiert und mit α *pRS1*-Prot inkubiert, gefolgt von anti-Kaninchen AlexaFluor 555-IgG-F(ab')₂-Konjugat. Im Vergleich zur Kontrolle (a, 0,1% Ethanol) zeigte sich in b) ein deutlich aufgelöstes Feld perinukleärer *pRS1*-positiver Tubulovesikel. In parallelen Experimenten wurde gezeigt, dass unter diesen Bedingungen die meisten Microtubuli depolymerisiert sind. Die Daten verdeutlichen, dass die Integrität dieses perinukleären Kompartiments von Microtubuli abhängt. *Aufnahmen mit ZEISS Axioplan 2, Plan Neofluar 40x, RT-Spot- CCD-Kamera (Diagnostic Instruments).*

Um die Frage zu klären, ob diese apparente Kolokalisation funktionelle Relevanz besitzt, nutzte ich den sekundären Pflanzenmetaboliten *Colchicin*, der zur Depolymerisation von Microtubuli führt [169]. Es zeigte sich, dass eine Inkubation subkonfluenter LLC-PK₁-Zellen mit 10 μ M *Colchicin* für zwei Stunden – unter diesen Bedingungen waren Microtu-

buli weitestgehend zerstört – zum Verlust der kompakten Packung der perinukleären, *pRS1*-positiven Tubulovesikel führte. Diese wurden über weite Teile des Zytoplasmas verstreut (Abbildung 3.7).

Eine solche Assoziation von Tubulovesikeln mit Microtubuli und dem *MTOC* wies auf den *Golgi*-Komplex hin [170]. Eine Zuordnung der zytosolischen Vesikel zu Microtubuli hingegen war auf Grund der hohen Vesikeldichte nur schwer möglich, allerdings erkannte ich in günstig getroffenen konfokalen Aufnahmen nahe der Plasmamembran *pRS1* tragende Vesikel, die sich entlang von Microtubuli auf dem Weg von der oder zur Membran zu befinden schienen (Abbildung 6.5, Bild 3e, S. 81). Weder meine gezeigten konfokalen Aufnahmen noch der Einsatz von *Colchicin* erlaubten allerdings eine sichere Aussage, ob die kleinen *pRS1* positive Vesikel ebenfalls mit dem Microtubulus-Skelett in Verbindung stehen (vgl. Abschnitt 4.1.2, S. 50).

3.4. *pRS1* und die vesikulären Marker *Clathrin* und *Dynamamin*

Dynamamin, von dem zahlreiche Isoformen mit differentieller Funktion bekannt sind [21], und *Clathrin* sind wichtige Funktions- bzw. Strukturproteine bei der Bildung von Vesikeln an zellulären Organellen und der Plasmamembran. Da die posttranskriptionelle Regulation von *SGLT1* als *Dynamamin*-abhängig beschrieben wurde [180], untersuchte ich die Lokalisation von *Clathrin* und *Dynamamin* in Bezug auf die von *pRS1*.

Die subzelluläre Verteilung von *Clathrin* in LLC-PK₁-Zellen spiegelt die vielfältigen Funktionen des Proteins in intrazellulären Transport- und Sortiermechanismen wider (vgl. [145]): *Clathrin* fand sich in den untersuchten Kulturen ähnlich wie in der Literatur beschrieben (vgl. [21] mit Abbildung 6.6, S. 83): Es zeigte sich entlang der Plasmamembran eine gesprenkelte, diskontinuierliche Verteilung der *Clathrin*-Immunoreaktivität (Abbildung 6.6, Bild 3 b, weiße Pfeilspitze, S. 83), daneben nahm sie entsprechend der bedeutenden

Rolle von *Clathrin* bei vesikulären Transportmechanismen weite Teile des Zytosols ein. Perinukleär zeigte sich eine kräftige Anfärbung mit dem *Clathrin*-Antikörper (Abbildung 3.8b, leere Pfeilspitze).

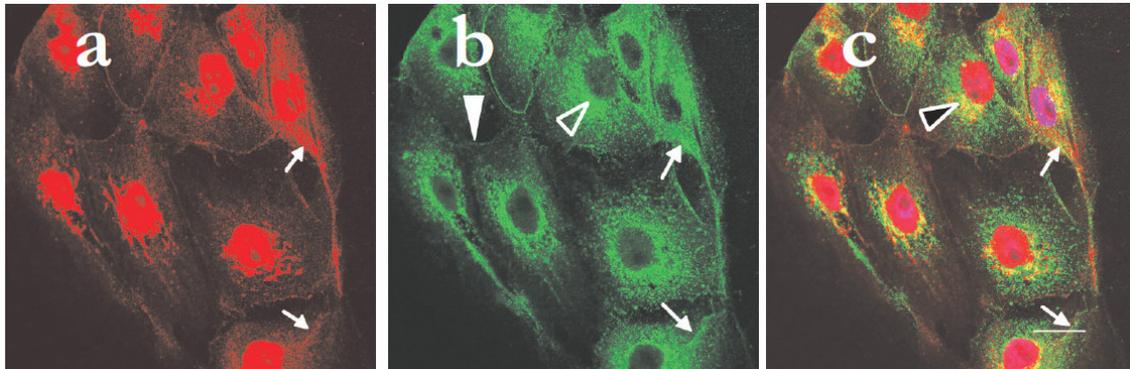


Abbildung 3.8: Kolokalisation von *pRS1* und *Clathrin* besonders perinukleär
Die Verteilung des vesikulären Markerproteins *Clathrin* (grün, b) wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen bovines *Clathrin* untersucht, der mit einem Ziege-anti-Maus-F(ab)₂-Cy2-Konjugat visualisiert wurde. Anschließend wurde für *pRS1* (rot, a) gefärbt. Konfokalmikroskopische Aufnahmen wiesen für *Clathrin* ein punktuelleres Muster an der Zellmembran nach (b, weiße Pfeilspitze), zudem zeigten sie insbesondere perinukleär eine Kolokalisation von *pRS1* mit *Clathrin* (b, c, leere Pfeilspitze), die in c) gelb zur Darstellung kommt. Die *pRS1* tragenden Vesikel, die auf die "Ecken" zwischen mehreren Zellen hin zu laufen schienen, kolokalisierten teilweise mit *Clathrin* (a-c, weißer Pfeil). Vertiefende Darstellungen sind in Abbildung 6.6, S. 83 wiedergegeben. Balken 20µm. *Konfokale Aufnahmen mit Leica TCS SP2, Plan Apo 40x, Pinhole 110 µm*

Unter Hinzunahme des *pRS1*-Signals detektierte ich *Clathrin* enthaltende Vesikel unmittelbar unterhalb der durchgehend von *pRS1* besetzten Membran. Nur selten allerdings kolokalisierten beide Signale vollständig, etwa in den auf die Zellgrenzen zulaufenden Vesikelstraßen (Abbildung 6.6, Bild 3 b und d, weißer Pfeil, S. 83). Perinukleär zeigte sich ein anderes Bild: Die *Clathrin*-Signale überlappten deutlich mit der Kontur des *pRS1* enthaltenden Kompartiments (Abbildung 6.6, Bild 3 b, d und e, leere Pfeilspitze, S. 83). Auf Grund der dichten Anordnung von *Clathrin* in diesem Bereich waren Summeneffekte innerhalb der konfokalen Schnittebene nicht auszuschließen (vgl. Abschnitt 4.1.2, S. 50).

Eine der von *Clathrin* sehr ähnliche Verteilung zeigte sich bei Untersuchung von LLC-PK₁-Zellen mit einem Antikörper gegen das ubiquitär exprimierte *Dynamin II* [29] (Abbildung 3.9). Es zeigte sich das andernorts beschriebene Fluoreszenzmuster [21], [107]

auch in dieser Zelllinie: *Dynamain II* ließ sich in einem punktförmigen Muster entlang der Plasmamembran (Abbildung 3.9a, weiße Pfeilspitze), dispers in weiten Teilen des Zytoplasmas und in einer perinukleären Lokalisation nachweisen (Abbildung 3.9a).

An der Plasmamembran zeigte sich keine vollständige Kollokalisierung von *Dynamain II* und *pRS1* (Abbildung 3.9c, weiße Pfeilspitze). Im Zytoplasma war eine Zuordnung angesichts des dichten *Dynamain II*-Signals kaum möglich, perinukleär zeigte sich jedoch eine deutliche Kollokalisierung von *Dynamain II* und *pRS1* im Bereich der mit $\alpha pRS1$ -Prot markierten Tubulovesikel. Diese war hier noch deutlicher als mit *Clathrin* (Abbildung 3.9c und Abbildung 6.7, Bild 3c, leere Pfeilspitze, S. 85).

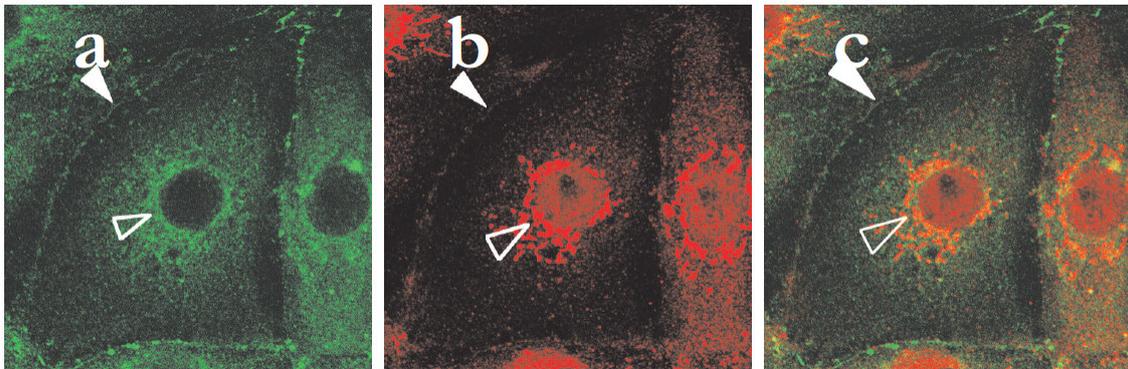


Abbildung 3.9: Perinukleäre Kollokalisierung von *pRS1* und *Dynamain II*

Subkonfluente LLC-PK₁-Zellen wurden mit einem Ziegen-Antikörper gegen humanes *Dynamain II* sowie einem Esel-anti-Ziege AlexaFluor488-Konjugat inkubiert (grün, a), anschließend wurde *pRS1* mit αpRS -Prot detektiert wie beschrieben (rot, b). Es zeigte sich eine deutliche Kollokalisierung der beiden Proteine perinukleär (leere Pfeilspitze), ähnlich wie zuvor mit *Clathrin* dargestellt (Abbildung 3.8, S. 38). Eine Kollokalisierung an der Membran war nicht sicher auszumachen. Ergänzende Abbildungen siehe Abbildung 6.7, S.85. *Konfokale Aufnahmen mit Leica TCS SP2, Plan Apo 40x, Pinhole 110 μ m*

Zusammenfassend fand sich also für die beiden Markerproteine *Clathrin* und *Dynamain II* eine deutliche und funktionell interessante Kollokalisierung mit *pRS1* perinukleär, weniger an der Plasmamembran.

3.5. *pRS1* und das trans-Golgi-Netzwerk

Die perinukleäre Kollokalisierung mit *Clathrin* und *Dynamain II* legte die Vermutung nahe, dass *pRS1* funktionell in den Transport von Vesikeln eingeschaltet ist. Ich überlegte daher,

3.5. *pRS1* und das *trans*-Golgi-Netzwerk

dass es sich bei dem perinukleär gelegenen, kompakten, tubulovesikulären Netzwerk, das eine ausgeprägte Assoziation mit Microtubuli bzw. dem *MTOC*, *Clathrin* und *Dynamin* zeigt, am ehesten um einen Teil des Golgi-Komplex handeln könnte. Der Golgi-Apparat als Ganzes nimmt jedoch in der Zelle sehr verschiedene Funktionen wahr [10], [75], [1], [178]; manche Autoren halten selbst seine Abgrenzung von anderen Organellen für problematisch [25]. Ich verglich daher die gesammelten Daten mit Literaturangaben und fand es wahrscheinlich, dass es sich um das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) handeln könnte [21]. Bereits 1990 wurde für diesen Teil des Golgi-Komplexes ein Strukturprotein aus der Ratte beschrieben, das als Markerprotein weite Verbreitung gefunden hat: *TGN38* [101], [6], [184], [61]. Für Kolokalisationsstudien in der porcinen LLC-PK₁-Zelllinie fand ich in der Literatur einerseits keine bekannte Kreuzreaktivität von *TGN38*-Antikörpern mit dem Orthologen aus dem Schwein, andererseits in der BLAST-Datenbank [115] kein Homolog von *TGN38* im Schwein. Daher benutzte ich einen gut bekannten Antikörper gegen das humane Homolog, *TGN46* [73], [136] und untersuchte die humane HEK293-Zelllinie, in denen sich mit *αpRS1-Prot* ein blockierbares Signal nachweisen ließ (Abbildung 3.10).

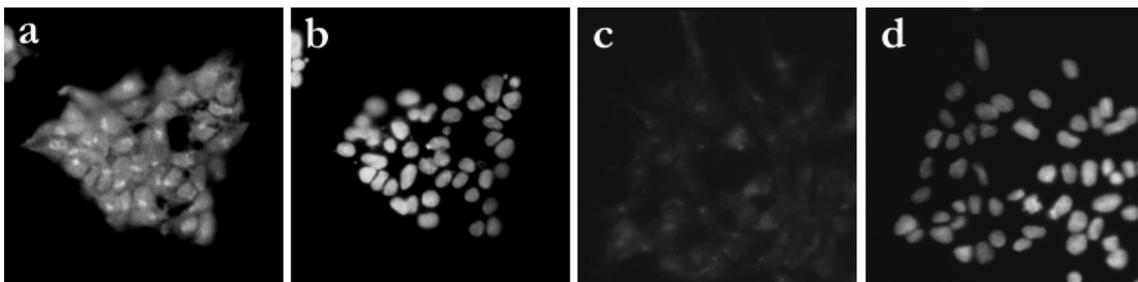


Abbildung 3.10: *αpRS1-Prot* zeigt in HEK293-Zellen ein spezifisches Signal. Permeabilisierte, subkonfluente HEK293-Zellen wurden mit *αpRS1-Prot* und einem Ziege-anti-Kaninchen-AlexaFluor 555-Konjugat wie beschrieben inkubiert (a). In c) fand eine Vorinkubation des Antikörpers mit rekombinantem *pRS1* statt. In b) und d) DAPI-Färbung der Kerne. Es zeigte sich in HEK293-Zellen ein nukleäres, perinukleäres und intrazelluläres *pRS1*-Signal ähnlich wie in LLC-PK₁-Zellen, das durch Vorinkubation mit rekombinantem Protein aufgehoben wird. *Aufnahmen mit ZEISS Axioplan 2, Plan Neofluar 40x, auf Kodak T-MAX 400 Pro*

Meine Untersuchungen zeigten, dass *TGN46* in diesen Zellen vorwiegend perinukleär lokalisiert ist. Einzelne Signale, die ich innerhalb des Zytosols detektierte (Abbildung 6.7, Bild

4, S. 85), können durch die in der Literatur beschriebene Zirkulation von *TGN38/46* innerhalb der Zelle zwischen *trans*-Golgi-Netzwerk und der Zellmembran erklärt werden [46].

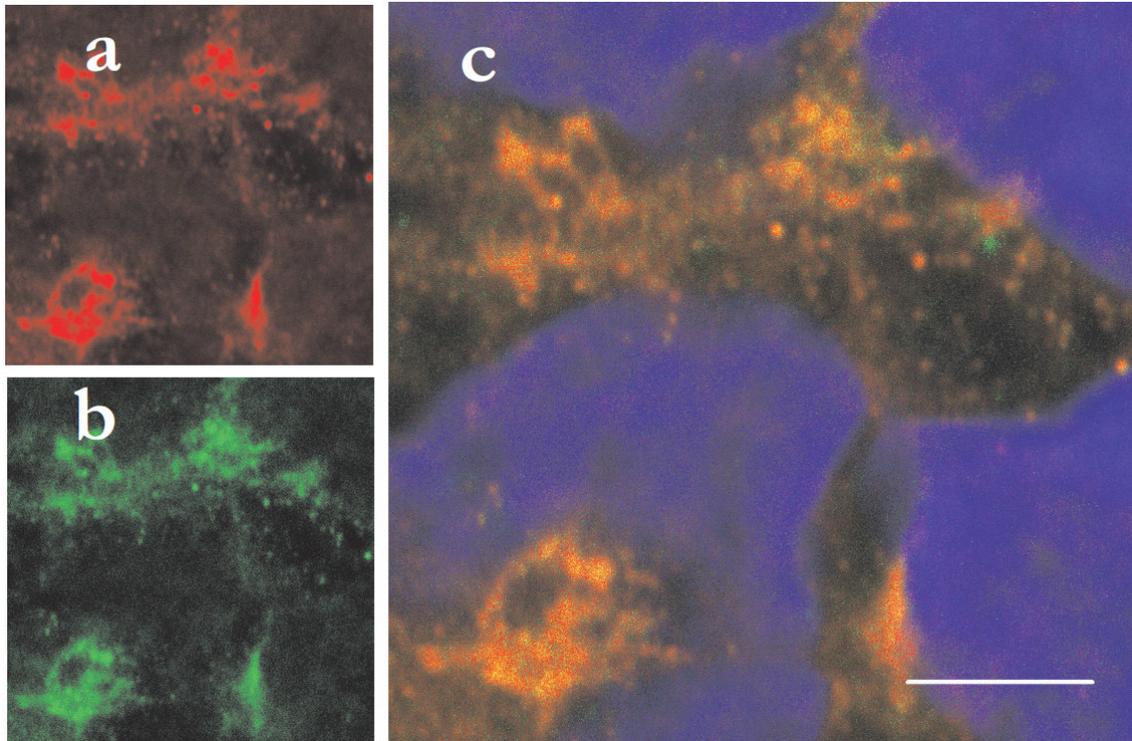


Abbildung 3.11: *pRS1* ist am *trans*-Golgi-Netzwerk lokalisiert

Permeabilisierte HEK293-Zellen wurden mit einem Schaf-Antikörper gegen *TGN46*, ein Markerprotein des *trans*-Golgi-Netzwerks, und anschließend mit einem Esel-anti-Schaf-Cy2-Konjugat inkubiert. *pRS1* (rot, a) wurde wie in Abbildung 3.10 nachgewiesen. In der konfokalmikroskopischen Aufnahme zeigt sich das *TGN* in HEK293-Zellen als perinukleäres tubulovesikuläres Kompartiment (grün, b). Die Überlagerung des *pRS1*- und *TGN46*-Signals (c) zeigt eine deutliche Kolo-kalisation der beiden Proteine in verschiedenen großen Vesikeln und gewundenen Tubuli. Mit DAPI gefärbte Zellkerne. Balken 5µm. *Konfokale Aufnahmen mit ZEISS LSM 510, Plan Apochromat 63x, Pinhole 135 µm*

Interessanterweise fand sich in der Doppelmarkierung mit *pRS1* und *TGN46* eine praktisch vollständige Kolo-kalisierung im beschriebenen perinukleären Kompartiment (Abbildung 3.11c und Abbildung 6.7, Bild 4 c, leere Pfeilspitze, S. 85). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es sich bei dem perinukleären Kompartiment in der Tat um das *trans*-Golgi-Netzwerk handelt.

3.6. Die intrazelluläre Verteilung von SGLT1

Dr. Kipp vom Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund stellte kürzlich einen Antikörper gegen den *Natrium-D-Glucose-Kotransporter 1* des Kaninchens, *rbSGLT1*, vor, der eine ausgeprägte Kreuzreaktivität zu dem des Menschen aufweist. Die Gruppe um Kipp verwendete für ihre Experimente die aus einem Kolon-Karzinom abgeleitete Zelllinie CaCo2 [44], [139], die typische Differenzierungseigenschaften von Dünndarmepithelien besitzt [14], [23], [13]. Mit dem als *QIS30* bezeichneten Antikörper war in nicht permeabilisierten Zellen eine punktförmige Verteilung von *SGLT1* gezeigt worden [77], nach Permeabilisierung stellte sich das Protein jedoch in großen, über das Zytosol verstreuten Vesikeln mit teils tubulären Formationen dar. Wie konventionelle und konfokale Aufnahmen gezeigt hatten, sind diese wie Perlen auf einer Schnur entlang von Microtubulus-Filamenten angeordnet.

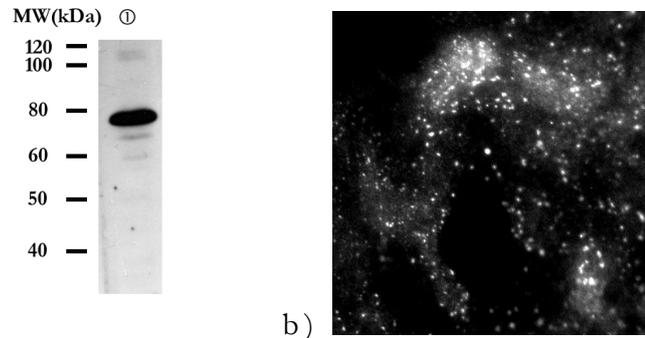


Abbildung 3.12 Der Antikörper $\alpha_{rbSGLT1}$ (QIS30) reagiert spezifisch mit einem 75 kDa-Protein in humanen HEK293-Zellen und detektiert ein membranständiges Protein in LLC-PK₁-Zellen

a) 20 μ g Protein aus HEK293-Zell-Lysat wurden im SDS-PAGE aufgetrennt, nach dem Blotten die jeweilige Bande aus der Nitrozellulose-Membran ausgeschnitten und mit 1 ml 1:4000 verdünntem *QIS30*-Antikörper inkubiert. b) In nicht permeabilisierten konfluenten LLC-PK₁-Zellen zeigt dieser Antikörper ein punktförmiges Muster von in die Membran inseriertem *pSGLT1*. Aufnahmen mit ZEISS Axioplan 2, Plan Neofluar 40x, RT-Spot-CCD-Kamera (Diagnostic Instruments).

Handelt es sich bei diesen Vesikeln um die gleiche Vesikelpopulation, in der auch *pRS1* vorkommt? Um diese Frage zu adressieren, übertrug ich die von Kipps Arbeitsgruppe vor-

gelegten Experimente auf die humanen HEK293- und die aus der Schweineleiere stammenden LLC-PK₁-Zellen. In HEK293-Zellen konnte ich *hSGLT1* mit *QIS30* im Western-Blot nachweisen (Abbildung 3.12 a), in konfluenten, nicht permeabilisierten konfluenten LLC-PK₁-Zellen zeigte sich *pSGLT1* in Form eines grob dispersen Signals in der Membran (Abbildung 3.12 b).

Die weiteren Ergebnisse sind in Abbildung 6.8, S. 87, dargestellt und vergleichbar mit den von Kipp beschriebenen: *SGLT1* befand sich in intrazellulären Vesikeln subkonfluenter HEK293- und LLC-PK₁-Zellen. Diese stellten sich teils länglich, teils sphärisch und über das ganze Zytosol verstreut dar. Dabei besaßen sie in der konfokalen Mikroskopie einen Durchmesser von $1,01 \pm 0,22 \mu\text{m}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=103$, bei länglichen Vesikeln kleinster Durchmesser). Zum Vergleich: *RS1* tragende Vesikel in LLC-PK₁-Zellen waren etwa 0,3 bis 0,7 μm groß. Außerdem zeichnete sich bei Untersuchung mit *QIS30* unscharf ein perinukleäres tubulovesikuläres Kompartiment ab (Abbildung 6.8, Bild 1 a und c, leere Pfeilspitzen, S. 87). Für Teile dieses Kompartiments ließ sich in HEK293-Zellen eine Kolokalisation mit dem *trans*-Golgi-Netzwerk-Marker *TGN46* zeigen (ebd., Bild 3 c, leere Pfeilspitze).

Um das Verhältnis von *pRS1* und *pSGLT1* an diesem Kompartiment näher zu untersuchen, stellte ich *pSGLT1* auch zusammen mit *Clathrin* und *Dynamin II* dar. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.9, S. 89 zusammengefasst: Es zeigte sich zwar eine deutliche Überlappung des Signals von *pSGLT1* mit *Dynamin II*, jedoch nur eine geringe mit *Clathrin*. Aus funktionellen Studien ist bekannt, dass die durch *RS1* bewirkte Herabregulation von *SGLT1* von *Dynamin* abhängig ist. Diese Daten erlauben die Interpretation, dass dieser Prozess eher am *TGN* als an der Plasmamembran stattfindet und *SGLT1* möglicherweise nicht über *Clathrin* vermittelten Vesikeltransport dort reguliert wird.

In konfluent gewachsenen LLC-PK₁-Zellen zeigten die mit *QIS30* angefärbten Vesikel gegenüber subkonfluenten Zellen keine grundsätzlich unterschiedliche Verteilung, jedoch war die Proteinmenge deutlich erhöht. Die Vesikel erschienen vermehrt tubulär. Sowohl in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie als auch in konventionell fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen war in beiden Zelllinien eine Assoziation der Tubulovesikel mit Mikrotubuli nachzuweisen, besonders gut in der Zellperipherie (Abbildung 6.8, Bild 2 c und f, weiße Pfeilspitzen, S. 87). Eine Behandlung mit 10 μM *Colchicin* über zwei Stunden, wie für *pRS1* dargestellt, führte zum Verlust der länglichen Form der Tubulovesikel und deren Ausrichtung (Abbildung 3.13).

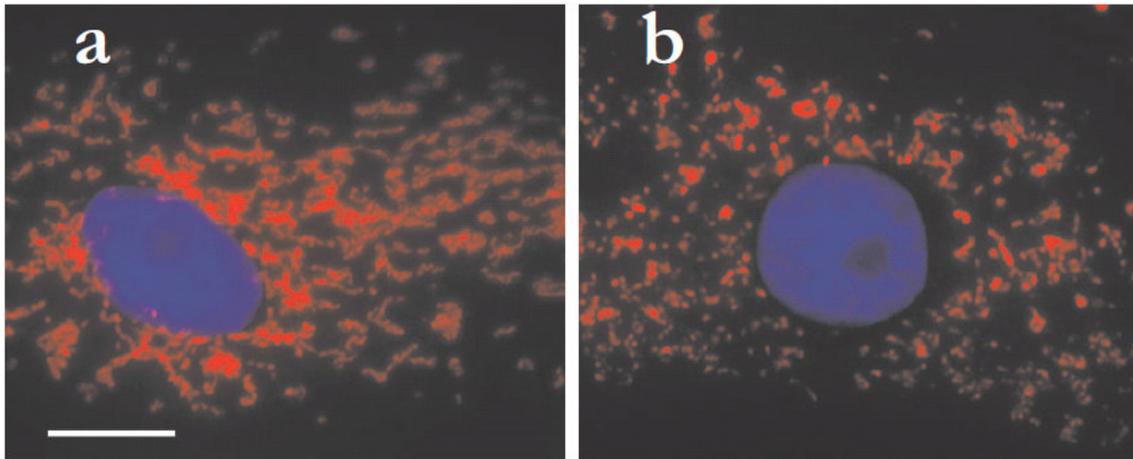


Abbildung 3.13: Behandlung von LLC-PK₁-Zellen mit Colchicin führt zum Verlust der longitudinalen Form der *SGLT1* tragenden Tubulovesikel

Subkonfluente, auf Deckgläschen kultivierte LLC-PK₁-Zellen wurden für 2 Stunden mit 10 μM Colchicin behandelt, anschließend fixiert, permeabilisiert und mit *QIS30*-Antikörper inkubiert, gefolgt von anti-Kaninchen AlexaFluor 555-IgG-F(ab')₂-Konjugat. Färbung der Zellkerne mit DAPI. Im Vergleich zur Kontrolle (a, 0,1% Ethanol) zeigte sich das Verschwinden der länglichen Struktur von *SGLT1* enthaltenden Tubulovesikel. Diese Daten bestätigen, dass die *SGLT1* enthaltenden Tubulovesikel Microtubuli zur Erhaltung ihrer intakten Organisation benötigen. *Aufnahmen mit ZEISS Axioplan 2, Plan Neofluar 40x, RT-Spot- CCD-Kamera (Diagnostic Instruments).*

Aus den geschilderten Experimenten ergibt sich, dass die beiden Vesikelpopulationen (*pSGLT1* vs. *pRS1*) nicht identisch sind: Erstens sind die *pSGLT1* tragenden Vesikel deutlich größer, zweitens in allen Bereichen der Zelle entlang von Microtubuli ausgerichtet. *pRS1* enthaltende Vesikel lassen sich dagegen nur im Bereich des *MTOC* den Microtubuli

zuordnen (vgl. Abschnitt 3.3, S. 34). Eine Darstellung der beiden Proteine *pSGLT1* und *pRS1* in einer Zelle gelang leider nicht. Da beide Primärantikörper aus dem Kaninchen stammen, wäre vor Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper die Absättigung aller Bindungsstellen am IgG-Molekül des zuerst eingesetzten Primärantikörpers erforderlich. Entprechende Versuche zeigten jedoch, dass sich auch bei Verwendung von fluoreszenzmarkierten F(ab')₂- bzw. F(ab)-Fragmenten eine Kreuzreaktion der beiden Sekundärantikörper nicht völlig unterdrücken lässt.

3.7. *Brefeldin A induziert die Freisetzung von pRS1 am TGN*

Das *TGN* spielt eine wichtige Rolle bei der Sortierung von Proteinen in unterschiedliche Kompartimente der Zelle wie Lysosomen oder Endosomen. Für diesen Vorgang sind Adapterproteine von überragender Bedeutung [78]; sie rekrutieren entsprechend den zu transportierenden Proteinen Gerüstproteine wie *Clathrin* und erlauben so ihren zielgerichteten Transport innerhalb der Zelle.

An der Rekrutierung von Gerüstproteinen sind dabei maßgeblich *Guanin-Nucleotid-Austausch-Faktoren (GEF)* beteiligt. Ihre experimentelle Inhibition durch einen Metaboliten aus *Penicillium brefeldianum*, *Brefeldin A (BFA)*, war bei der Aufklärung der Transportvorgänge im Golgi-Apparat von großer Bedeutung [39]. BFA-Behandlung von Zellen führt zur Dissoziation der Adapter-Gerüstproteinkomplexe von der Membran des *TGN* [134]. Im Hinblick auf die vermutete Rolle von *pRS1* bei der Regulation von Membranproteinen und deren *Dynamin*-Abhängigkeit untersuchte ich daher den Effekt von *BFA* auf die intrazelluläre Verteilung von *pRS1* und *pSGLT1* in LLC-PK₁-Zellen. Dazu wurden subkonfluente Kulturen auf Deckgläschen für unterschiedliche Zeiträume mit 2 µg/ml *Brefeldin A* inkubiert, anschließend mit *αpRS1-Prot* bzw. *QIS30* angefärbt und die Verteilung von *pRS1* bzw. *pSGLT1* mit Kontrollen verglichen. Dabei zeigte sich bereits nach ei-

ner Minute ein weitgehender Verlust von *pRS1* vom *TGN*, nach 5 bis 10 Minuten lag das Protein verstreut im gesamten Zytosol vor. Für *pSGLT1* beobachtete ich nach diesen Zeiträumen das Auftreten von dünnen Ausstülpungen der *pSGLT1*-positiven Kompartimente, die zum Teil ausgedehnt ramifiziert erschienen.

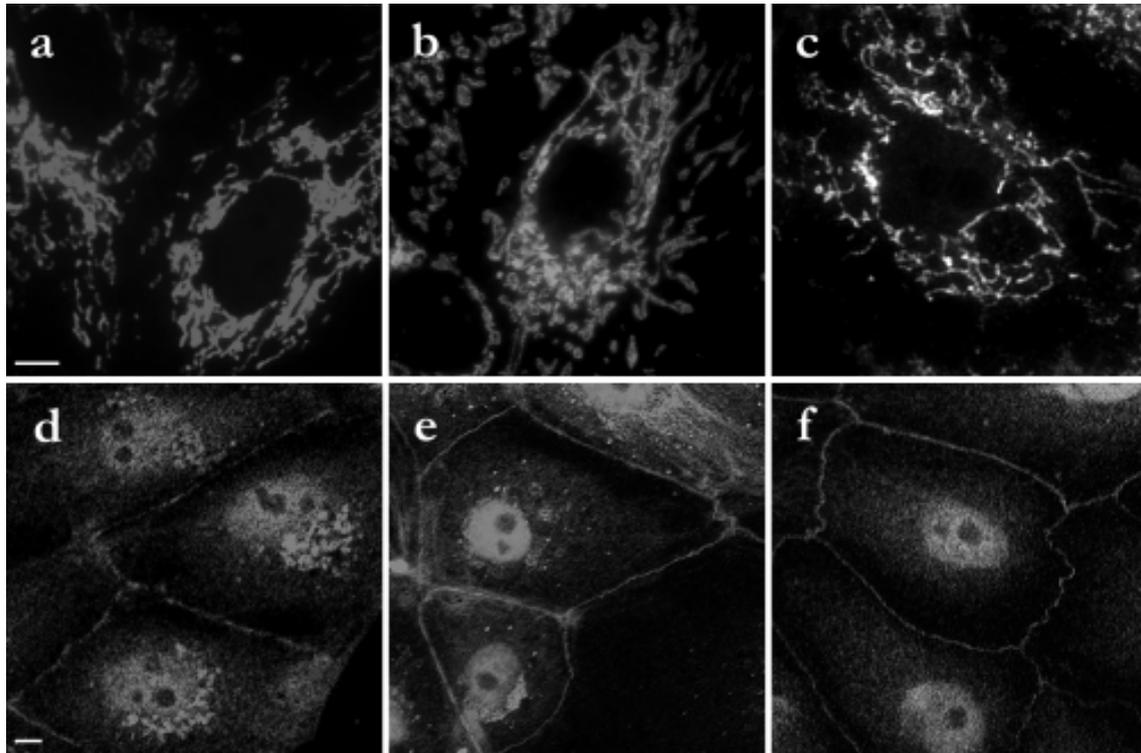


Abbildung 3.14 Brefeldin A (BFA) führt zum Verlust von *pRS1* am *TGN* und zur Umverteilung von *pSGLT1* in ramifizierte Tubuli

Subkonfluente, auf Deckgläschen kultivierte LLC-PK₁-Zellen wurden für eine (b, e) und fünf (c, f) Minuten mit 2 µg/ml *Brefeldin A* behandelt, anschließend mit α *pRS1*-Prot bzw. *QIS30* immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Kontrolle mit 0,1% Methanol (a, d). Es zeigte sich eine rasche, innerhalb von 5 Minuten komplette Freisetzung von *pRS1* vom *TGN*. *pSGLT1* wurde in ramifizierte, von putativen Endosomen und dem *TGN* ausgehende Tubuli umverteilt. Die Daten legen eine Rolle von *pRS1* als Adapter-/Gerüstprotein am *TGN* nahe. *Aufnahmen mit ZEISS Axioplan 2, Plan Neofluar 40x, RT-Spot- CCD-Kamera (Diagnostic Instruments).*

Diese Beobachtungen weisen auf die Möglichkeit hin, dass es sich bei *pRS1* um einen Bestandteil von Adapter-Gerüstprotein-Komplexen am *TGN* handelt, während *SGLT1* membrangebunden umverteilt wird, wie dies ähnlich für den *Transferrin-Rezeptor* bei Behandlung mit *BFA* gezeigt wurde [96].

3.8. *Inhibition des Proteasoms ändert die Lokalisation von pRS1*

Bisher habe ich gezeigt, dass *pRS1* in LLC-PK₁-Zellen konfluenzabhängig stark herunterreguliert wird und dass sich seine intrazelluläre Verteilung vor und nach Konfluenz unterscheidet. Nachdem sich auch experimentelle Überexpression von *pRS1* in konfluenten LLC-PK₁-Zellen nicht in einer deutlichen Veränderung seiner Menge und Verteilung niederschlug (Abbildung 6.3, S.77) und da andererseits zahlreiche an der Regulation des Zellzyklus beteiligte Proteine, Signaltransduktionsmoleküle und Transkriptionsfaktoren nach Markierung mit Polyubiquitin durch das 26S-Proteasom abgebaut werden (für Übersichten vgl. [8], [26]), untersuchte ich den Effekt einer Hemmung des Proteasoms auf die Verteilung von *pRS1* und *pSGLT1* in konfluenten LLC-PK₁-Zellen. Insbesondere hielt ich es für möglich, dass der Verlust der Kernlokalisierung von *pRS1* bei Konfluenz auf einen proteasomalen Abbau, evt. im Nucleus selbst, zurückzuführen ist (vgl. [50], [164], [125], [132], [142], [19]).

In meinem Versuchsansatz ließ ich LLC-PK₁-Zellen zur Konfluenz wachsen (216 Stunden), bevor ich das *Leupeptin*-Analog *MG132* (*Benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Leu-Aldehyd*, [53], [143]) für 24 Stunden in einer Konzentration von 10µM hinzugab und anschließend *pRS1* wie beschrieben nachwies. Das Ergebnis zeigt Abbildung 6.10, S. 91: Während unbehandelte, konfluente LLC-PK₁-Zellen nur wenig *pRS1* besaßen, nahm dessen Menge bei Hemmung des Proteasoms drastisch zu. Außerdem ändert sich seine intrazelluläre Verteilung (Abbildung 6.10, Bild 1, S. 91): Neben dem auch ohne Hemmung des Proteasoms (Abbildung 6.3, Bild e-g, S. 77) erkennbaren perinukleären (*TGN*-) Signal (Abbildung 6.10, Bild 1 d, leere Pfeilspitze, S. 91) wurde *pRS1* nun auch im Kern, im Zytosol an intrazellulären Vesikeln und sogar an der Zellmembran (ebd., weiße Pfeilspitze) detektiert. Mithin war also eine Verteilung wie vor Konfluenz der Zellen hergestellt.

3.9. *Inhibition des Proteasoms verhindert die konfluenzabhängige
Heraufregulation von pSGLT1*

**3.9. *Inhibition des Proteasoms verhindert die konfluenzabhängige
Heraufregulation von pSGLT1***

Es lag nahe, zu untersuchen, wie sich die Hemmung des Proteasoms auf Menge und Verteilung von *pSGLT1* auswirkt. Den Versuch führte ich analog zu dem oben geschilderten durch. Im Ergebnis fand ich nicht etwa eine Zunahme der Menge von *pSGLT1*, wie es zu erwarten gewesen wäre, wenn *pSGLT1* durch das Proteasom abgebaut würde, sondern vielmehr eine Abnahme des Transporters. Er befand sich vielmehr nur noch perinukleär, putativ also im *trans*-Golgi-Netzwerk (Abbildung 6.10, Bild 2 a, leere Pfeilspitze, S. 91).

Führt also die Akkumulation von *pRS1* bei Hemmung des Proteasoms zur Herunterregulation von *pSGLT1*? Ich untersuchte diese Frage mittels einer LLC-PK₁-Zelllinie, in der die Expression von *pRS1* durch eine *antisense*-Strategie stark vermindert ist [82]. Auch hier ließ ich die Zellen zur Konfluenz (120 Stunden nach Aussaat, da die *antisense*-Kulturen rasch altern und sich vom Kultursubstrat ablösen) wachsen, hemmte das Proteasom für 24 Stunden und untersuchte die Verteilung von *pSGLT1* in diesen Zellen (Abbildung 6.10, Bild 3, S. 91). In der Mehrzahl der Fälle war die Zelle wieder angefüllt von *pSGLT1*-positiven Tubulovesikeln. Wenn auch vielfach perinukleär etwas akzentuiert, fanden sie sich doch über das ganze Zytosol verteilt. Das Bild ähnelte jenem in konfluenten LLC-PK₁-Zellen, deren Proteasom nicht gehemmt wurde. Eine Ausschaltung oder zumindest deutliche Reduktion von *pRS1* konnte also die durch eine Proteasomhemmung bewirkte Umverteilung von *pSGLT1* rückgängig machen.

4. DISKUSSION

In dieser Arbeit konnte ich mittels Immunfluoreszenzmikroskopie zeigen, dass in subkonfluenten LLC-PK₁-Zellen *pRS1* – oder zumindest Bruchstücke davon (siehe unten) – im Kern vorkommt, seine Menge dort jedoch mit zunehmender Konfluenz rasch abnimmt. In Kolokalisationsstudien mit zellulären Markerproteinen stellte ich eine teilweise Kolokalisation von *pRS1* mit Microtubuli, *Clathrin* und *Dynamin II* in einem tubulovesikulären perinukleären Kompartiment fest und zeigte, dass HEK293-Zellen dort ein Markerprotein des *trans*-Golgi-Netzwerks exprimieren. Behandlung der Zellen mit *Brefeldin A* führte zum Verschwinden von *pRS1* vom TGN. Hemmung des Proteasoms in konfluenten LLC-PK₁-Zellen führte zur Zunahme der Menge von *pRS1* und einer Änderung seiner Verteilung. Hingegen nahm gegenläufig die Menge von *SGLT1* in der Zelle ab.

4.1. Überlegungen zur Heuristik

Im Folgenden sollen kurz die eingesetzten Methoden erörtert werden.

4.1.1. Antikörper

In meinen Untersuchungen griff ich überwiegend auf den polyklonalen, gegen das fast vollständige Protein *pRS1* gerichteten Antikörper $\alpha pRS1$ -Prot zurück. Gegenüber $\alpha pRS1$ -Pept erzeugte er dank einer höheren Anzahl an Epitopen eine kräftigere Darstellung des Antigens. Die Identität der Aminosäuresequenzen von *pRS1* und *hRS1* von 73% ließ eine relativ spezifische Kreuzreaktion von $\alpha pRS1$ -Prot mit dem humanen Ortholog – Paraloge wurden im humanen Genomprojekt nicht gefunden – erwarten. Entsprechend konnte eine Kreuzreaktion von $\alpha pRS1$ -Prot mit *hRS1* in der Nierenzelllinie HEK293 gezeigt werden (Abbildung 3.10, S.40, vgl. Abschnitt 2.2.5, S. 25). *Ex post* folgte aus der Übereinstimmung der mit $\alpha pRS1$ -Prot erzielten Signale in HEK293- und LLC-PK₁-Zellen und ihrer Blo-

ckierbarkeit, dass mit diesem Antikörper das humane Ortholog von *pRS1* erkannt wird. Zusammen mit den gezeigten und weiteren (Leyerer, unveröffentlichte Daten) Untersuchungen im Western-Blot legte dies eine hohe Spezifität des eingesetzten Antikörpers nahe. Offen blieb indes, ob es sich bei allen Signalen um das vollständige Protein handelt. Da aber auch *αpRS1-Pept* die beschriebene Verteilung zeigte, lag zumindest der von diesem Antikörper erkannte „Mittelteil“ des Proteins (Aminosäuren 461-477) dort jeweils vor.

Für die Darstellung von *Tubulin*, *Clathrin* und *Dynamin* in den porcinen LLC-PK1-Zellen verwendete ich kreuzreagierende Antikörper gegen die strukturell sehr ähnlichen Orthologen aus Rind bzw. Mensch. Auf die Reaktivität und Spezifität des Antikörpers *QIS30* gegen *SGLT1* wurde bereits ausführlich eingegangen (Abschnitt 3.6, S. 42).

4.1.2. Kolokalisation bei konfokaler Mikroskopie

In einem ersten Schritt untersuchte ich alle Experimente unter dem konventionellen Auflichtfluoreszenzmikroskop, um einen Eindruck von der Verteilung der einzelnen Zielproteine zu gewinnen. In der Kompromissfindung zwischen Darstellung einer repräsentativer Verteilung einerseits und einer möglichst geringen optischen Schicht andererseits in der konfokalen Mikroskopie wählte ich in der Regel ein „*Pinhole*“ entsprechend einer Schichtdicke zwischen 1,0 und 1,8 μm . Auf diese Weise war ein Signal A, das mittig in der optischen Ebene lag, maximal 0,5 μm bis 0,9 μm in vertikaler Richtung von einem als kolokalisiert dargestellten Signal B entfernt. Dies erschien gerechtfertigt, da ein optimal getroffener Microtubulus sich in der Immunfluoreszenz in einer Breite von bis zu 0,3 μm darstellt und typische *RS1*-positive Vesikel in LLC-PK1-Zellen außerhalb des *TGN* einen Durchmesser von 0,3 μm bis 0,7 μm besaßen. Durch Teilvolumeneffekte konnten jedoch auch nur teilweise in der konfokalen Ebene befindliche Vesikel zu einer apparenten Kolokalisierung beitragen. Nach wie vor bleibt daher die Elektronenmikroskopie der Goldstandard.

4.2. *Unterschiedliche Signale regeln den Transporter SGLT1*

Die Regulation des physiologisch und pathophysiologisch [171] bedeutsamen Natrium-abhängigen Glucose-Transports wurde mehrfach in LLC-PK₁-Zellen untersucht. Zuerst zeigten Mullin [113] und Rabito [128] in diesen Zellen einen endogenen, *Phlorizin*-hemmbaren Glucose-Transport. Die Gruppe um Julia E. Lever identifizierte ein 75-kDa-Protein, das diesen Transport mediiert und identifizierte den Transporter als *SGLT1* [185], [117], [187]. In den folgenden Jahren wurden einige Regulationsmechanismen von *SGLT1* in diesen Zellen näher untersucht.

Demnach steigern *Hexamethylen-Bisacetamid (HMBA)* und Hemmstoffe des *cAMP*-Abbaus den *SGLT1*-medierten Glucose-Transport [3], [4], [90] auf Grund einer erhöhten Stabilität des 3,9 kb-Transkripts von *SGLT1* [122] durch Bindung von *SG-URBP*, einem *cAMP*-abhängig phosphorylierten Faktor, an eine 3' nicht translatierte, *Uridin*-reiche Region des *SGLT1*-Transkripts [123], [93].

Es ist beschrieben worden, dass *Proteinkinase C* nur in subkonfluenten, nicht aber in konfluenten LLC-PK₁-Zellen aktiv ist [155]. Die Menge von *SGLT1*-mRNA ließ sich in konfluenten Zellen durch Behandlung mit dem Phorbolster *TPA (Phorbol-12-O-Tetradecanoat-13-Acetat)* verringern. Umgekehrt verhinderte die Inhibition der *PKC* durch *H-7 (1-5-Isoquinolinsulfonyl-2-Methylpiperazinhydrochlorid)* den Abfall der *SGLT1*-mRNA beim Passagieren. Aus unserem Labor stammende Daten widersprechen jedoch diesen und anderen Literaturangaben [35] zur Aktivität der *PKC* in LLC-PK₁-Zellen: Leyerer et al. (Manuskript eingereicht) demonstrierten mit zunehmender Differenzierung der Zellen eine höhere Aktivität der *Proteinkinase C*.

In der humanen intestinalen Zelllinie HT-29-D4 hingegen wurde ein *PKC*-abhängiger posttranslatinaler Signalweg beschrieben. Stimulation der *PKC* führte in undifferenzierten Zellen zur Aufnahme der Transportaktivität, ihre Hemmung verminderte sie [37]. Immu-

4.3. *Funktion und intrazelluläre Lokalisation von pRS1*

nogold-EM-Aufnahmen zeigten eine Translokation intrazellulärer Vesikel an die Membran und eine Zunahme des *SGLT1*-Membransignals selbst. Unterschiede in der Regulation von *SGLT1* durch *PKC*-Stimuli können durch Speziesunterschiede erklärt werden (vgl. [64]).

Einen Einfluss auf die Regulation des *SGLT1*-abhängigen Transports in LLC-PK₁-Zellen hat auch die Glucose-Konzentration: Moran [111], [112] beobachtete zuerst, dass bei einer niedrigen Glucose-Konzentration von 5 mM der Natrium-abhängige Glucosetransport in LLC-PK₁-Zellen am höchsten ist. Dies konnte auf eine höhere Konzentration der *SGLT1*- (und *GLUT1*-) mRNA zurückgeführt werden [117], die sowohl bei höheren, als auch niedrigeren Glucose-Konzentrationen absank. Experimente in experimentell diabetischen Ratten führten zu der Vermutung, dass eine physiologische Rolle in einer Notbremse bei stark erhöhten Glucose-Konzentrationen im Tubuluslumen zu suchen ist (vgl. [186]), während für das Verhalten bei niedrigen Konzentrationen keine einheitliche Meinung besteht.

Andere Studien in Tiermodellsystemen beleuchteten den Einfluss von Diät [156], [7] und ontogenetischer Entwicklung auf die Expression von *SGLT1* (für eine Übersicht siehe [42]).

4.3. *Funktion und intrazelluläre Lokalisation von pRS1*

Für das Regulatorprotein *RS1* wurde gezeigt, dass es – neben verschiedenen anderen Transportern – das Modellprotein *SGLT1* auf unterschiedlicher Ebene reguliert (vgl. Abschnitt 1.3, S. 4). Korn, Köhlkamp et. al. [82] demonstrierten, dass seine Menge an der Zellmembran in LLC-PK₁-Zellen konfluenzabhängig abnimmt, während der *SGLT1*-medierte Transport ansteigt. Stabile Überexpression von *RS1* verminderte diese Heraufregulation, umgekehrt war sie in einer *pRS1-antisense*-Zelllinie verstärkt; dies konnte auf Änderungen der Transkription von *SGLT1* zurückgeführt werden. Köhlkamp [85] demonstrierte in der Folge die Anwesenheit von *pRS1* im Zellkern subkonfluenter LLC-PK₁-Zellen

mittels Western-Blot und fluoreszierenden *pRS1*-Fusionsproteinen. In dieser Arbeit versuchte ich durch Nutzung der Immunfluoreszenzmikroskopie, die intrazelluläre Lokalisation von *pRS1* und *pSGLT1* genauer als in Zellfraktionierungsexperimenten darzustellen und Rückschlüsse auf mögliche Funktionen zu ziehen.

4.3.1. Die subzelluläre Verteilung von *pRS1* wird konfluenzabhängig reguliert

Meine Ergebnisse bestätigten und erweiterten die dargestellten Befunde: In subkonfluenten Zellen gelang der Nachweis, dass sich *pRS1* an der Membran befindet (1), zugleich aber erkannte ich multiple kleine Vesikel im Zytoplasma verstreut (2) und ein umfangreiches perinukleäres Feld von Tubulovesikeln, die einer eigenen Organisation zu unterliegen schienen (3). Zudem färbte sich der Zellkern außerordentlich kräftig (4). Schwierig war es, frei in den Zellen vorkommende *pRS1*-Moleküle von Vesikeln einerseits und Hintergrundsignalen andererseits zu differenzieren. Verglichen mit subkonfluenten war in konfluenten Zellen die Menge an *pRS1* insgesamt deutlich reduziert und es fand sich kein *pRS1* mehr an der Membran. Die Zellkerne erschienen wie ausgestanzt in einem Vesikel enthaltenden Zytoplasma. Konfokale Aufnahmen zeigten das perinukleäre Kompartiment klar abgrenzbar. Betrachtet man die Dynamik des Kerntransports, so nahm der Anteil an Zellen mit *pRS1* im Kern kontinuierlich mit der Kulturdauer ab. Dies ist konsistent mit der Überlegung, dass Zellinseln zusammen wachsen und sich zu differenzieren beginnen, bis schließlich nur mehr wenige Zellteilungen stattfinden und die Zellen ihren endgültigen Phänotyp ausgeprägt haben. Die leichte Zunahme der Kernlokalisierung acht Tage nach Konfluenz lässt sich zwanglos mit dem beginnenden Absterben von Zellen und ihrem Ersatz durch jugendliche erklären. Nach Zellfraktionierung hatte Kühlkamp [85] im Zellkern mittels Western-Blot neben dem gesamten Protein auch Fragmente identifiziert. Da sich *pRS1* in meinen

4.3. Funktion und intrazelluläre Lokalisation von *pRS1*

Untersuchungen auch mit $\alpha pRS1$ -Pept im Zellkern nachweisen ließ, muss dort zumindest der diesem Peptid entsprechende Mittelteil von *pRS1* vorhanden sein.

Diese Daten erlauben die Annahme, dass *pRS1* selbst mit der DNA, einem Transkriptionsfaktor oder einem anderen Kernprotein interagiert, und nicht etwa den Kerntransport eines Transkriptionsfaktor induziert. Bisher wurde noch nicht untersucht, ob *pRS1* mit DNA interagiert. Da *pRS1* in der Immunfluoreszenzmikroskopie den ganzen Zellkern mit Ausnahme der Nucleoli homogen ausfüllte, liegt entweder ein Teil des *pRS1* nicht an DNA (oder Kernproteine) gebunden vor, oder steuert ein gleichmäßig im Kern verteiltes Protein. Möglich wäre auch, dass nur ein Teil von *pRS1*, etwa durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung, aktiviert ist, während der Hauptteil von *pRS1* „in Reserve“ gehalten wird.

4.3.2. *pRS1* ist mit verschiedenen Kompartimenten vesikulären Transports assoziiert, darunter dem trans-Golgi-Netzwerk

An der Zellmembran, an der *pRS1* ja zuerst beschrieben worden war, bildete sich fluoreszenzmikroskopisch eine kontinuierliche Linie ab, die die Zellgrenzen nachzeichnete. In der Darstellung zusammen mit *Actin* folgte *pRS1* dem Verlauf der unter der Membran angebrachten *Actin*-Bänder. Da sich jedoch keine komplette Kollokalisierung von *pRS1* und *Actin* nachweisen ließ, erscheint eine etwaige Verankerung von *pRS1* am *Actin*-Zytoskelett unwahrscheinlich. Eher wird *pRS1* durch integrale Membranproteine an die Plasmamembran rekrutiert. Diese Hypothese steht auch im Einklang mit meinem Befund, dass *pRS1* an intrazellulären Vesikeln vorkommt, die ich teils unmittelbar unterhalb der Membran einzeln oder in Gruppen fand, zum Teil im Bereich der fokalen Adhäsionskontakte akkumuliert. Auch hier konnte ich jedoch keinen Zusammenhang mit den untersuchten Zytoskelettkomponenten finden. Ob daher bei Membranfusionsprozessen *pRS1* tragender

Vesikel in der Zellperipherie kurze *Actin*-Filamenten im Zusammenspiel von *Arp2/3*, *WASP* und *WIP* [114], [15] eine Rolle spielen, müssen funktionelle Studien zeigen.

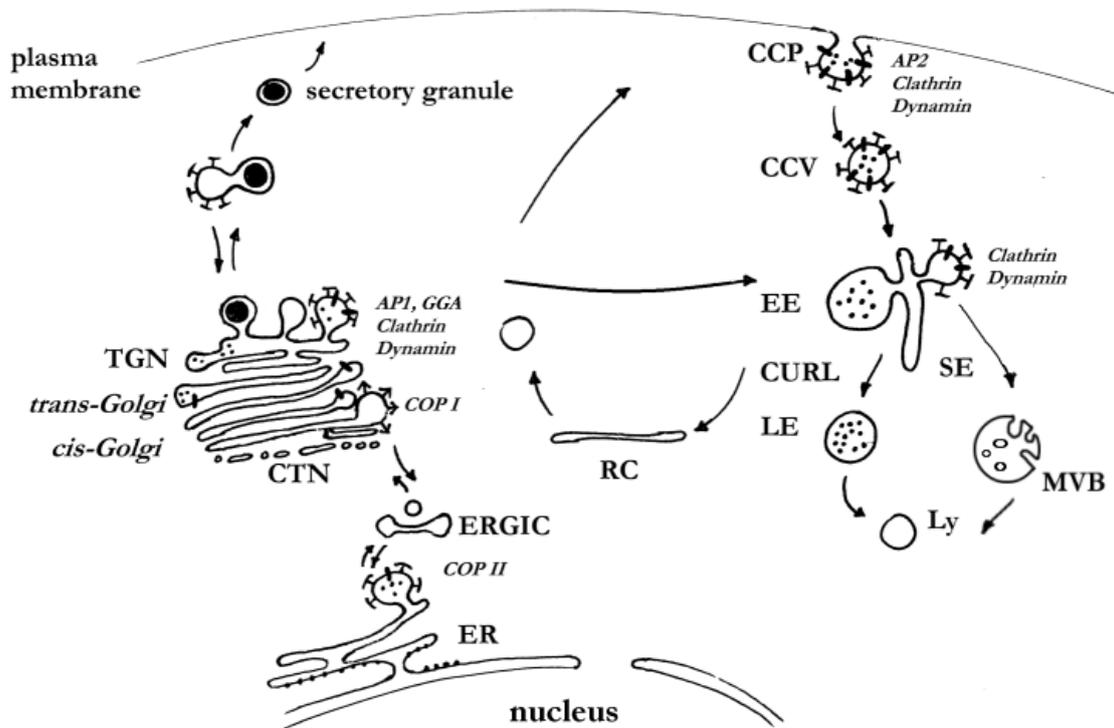


Abbildung 4.1 Vesikuläre Transportwege der Zelle (nach [91], mit Angaben von [165], [176], [178], [5] und in [10])

AP: adapter protein, GGA: Golgi-localized gamma-ear containing ADP ribosylation factor-binding protein, COP: coatomer protein, CCP: clathrin coated pit; CCV: Clathrin coated vesicle; EE: early endosome; SE: sorting endosome; CURL: compartment of un coupling of receptor and ligand; LE: late endosome; MVB: multivesicular body; Ly: lysosome; RC: recycling compartment; CTN: cis-tubular network; ER: endoplasmic reticulum; ERGIC: ER/Golgi intermediate compartment; TGN: *trans*-Golgi-network

Um in die Plasmamembran oder membranumgrenzte Organellen integrierte Proteine spezifisch in Vesikel zu „verpacken“, rekrutieren diese Adapterproteine. Diese differieren je nach Kompartiment: An der Plasmamembran übernimmt *AP-2* diese Rolle, im *trans*-Golgi-Netzwerk und an Endosomen *AP-3* und *AP-1* sowie *GGA*s (*Golgi-localized gamma-ear containing ADP ribosylation factor-binding proteins*, vgl. [135], [62], [106], Abbildung 4.1). Nach einem gängigen Modell interagieren diese Adapterproteine anschließend mit einem Gerüstprotein wie *Clathrin*. Dieser Prozess steht am Beginn der Vesikel-

bildung; anschließend kommt es zur Abschnürung der Vesikel, die in nicht-neuronalen Zellen von *Dynamamin II*-Isoformen mediiert wird [148].

In meinen Studien fand ich keine Kolokalisation von *Clathrin* mit *pRS1* an der Plasmamembran, allenfalls im Bereich der auf die fokalen Adhäsionskontakte zu laufenden Vesikelstraßen. Auch für *Dynamamin II* ergab sich weder an der Membran noch an den intrazellulären, kleinen Vesikeln ein mit *pRS1* überlappendes Signal.

Ein besonders wichtiges Ergebnis meiner Arbeit zeigte sich jedoch bei der genauen Untersuchung des perinukleären, *pRS1* enthaltenden tubulovesikulären Netzwerks. In Kolokalisationsuntersuchungen mit *Dynamamin II* und *Clathrin* zeigte sich dort eine teilweise Kolokalisation beider Funktionsproteine mit *pRS1*, die man stellenweise als saumartige Umrandung des *pRS1* enthaltenden Kompartiments erkennen konnte. Zudem fand ich das Kompartiment im Bereich des *MTOC*, des *microtubule organizing centre*, wie die Gegenfärbung mit dem β -*Tubulin*-Antikörper zeigte. Diese Daten führten zu der Vermutung, dass es sich um das *trans*-Golgi-Netzwerk handeln könnte (vgl. Darstellung in Abschnitt 3.5., S. 39, zu *Dynamamin II*: [71], [107], [22], zu *Clathrin*: [10], [92], zu *Microtubul*: [170]).

Die in Abbildung 3.11, S. 41 gezeigten Aufnahmen demonstrieren eine nahezu vollständige Kolokalisation der beiden Proteine. Ich fand *TGN46* zwar auch im Zytosol verstreut (Abbildung 6.7, Bild 4b, S.85), dies aber ist in guter Übereinstimmung mit seiner Rezirkulation innerhalb der Zelle: So wurde durch Inkubation lebender, mit einem *Tac-TGN38*-Fusionsprotein transfizierter Zellen mit einem anti-*Tac*-Antikörper gezeigt, dass *TGN38* mit einer Halbwertszeit von knapp einer Stunde über die Plasmamembran recycelt [46] (siehe auch [6], [129], [178]).

Interessante Hinweise auf die Funktion von *pRS1* am *TGN* ergab die Inkubation subkonfluenter LLC-PK₁-Zellen mit *Brefeldin A*. Die auffälligsten Folgen einer solchen Behandlung sind der Verlust von Gerüstproteinen vom Golgi-Apparat und die Ausbildung

dünnen Schläuche an verschiedenen intrazellulären Kompartimenten [79]. Innerhalb von Minuten beobachtete ich einen deutlichen Verlust von *pRS1* am perinukleären Kompartiment. Demnach ist die Lokalisation von *pRS1* am TGN von *Guanin-Nucleotid-Austauschfaktoren* (*GEF*) abhängig, die durch *BFA* gehemmt werden.

Es stellte sich nun die Frage, wie diese Befunde zu *pRS1* mit der subzellulären Verteilung von *pSGLT1* korrelieren.

4.4. Die intrazelluläre Lokalisation von *SGLT1*

Daher untersuchte ich die Lokalisation von *pSGLT1* und *hSGLT1* in LLC-PK₁- und HEK293-Zellen. Mit dem Antikörper *QIS30* stellt sich in permeabilisierten Zellen die Plasmamembran nicht dar, wie von Kipp et al. beschrieben [77]. Intrazellulär zeigte sich in beiden untersuchten Zelllinien eine lose, perinukleär akzentuierte Verteilung großer Tubulovesikel mit einem kurzen Durchmesser von $\sim 1 \mu\text{m}$. Die Mehrzahl dieser Vesikel war in Caco-2-Zellen in einer Kombination von *free-flow*-Electrophorese und *pulse-chase*-Experimenten den frühen Endosomen zugeordnet worden [77]. Dies steht nicht in Widerspruch zu meinem Befund, dass ein Teil des *hSGLT1* in nativen, subkonfluenten HEK293-Zellen mit *TGN46* kolokalisiert (Abbildung 6.8, S. 87). Zum einen ist, wie Kipp richtig bemerkt [77], in der Immunfluoreszenz eine bedeutende Fraktion der Vesikel perinukleär angeordnet, zudem erlaubt die *free-flow*-Electrophorese nur eine sehr ungenaue Trennung der einzelnen Kompartimente und schließt keineswegs eine Population im *trans*-Golgi-Network aus (H. Kipp, persönliche Mitteilung). Demnach ist das *trans*-Golgi-Netzwerk bis dato der einzige Ort innerhalb der Zelle, an dem beide untersuchte Proteine, *RS1* und *SGLT1*, gemeinsam vorkommen. Bemerkenswerterweise zeigte sich in Kolokalisationsexperimenten von *pSGLT1* mit *Clathrin* in LLC-PK₁-Zellen praktisch keine Kolokalisation, während diese mit *Dynamain II* nachweisbar war. Dabei ist aber zu berücksichtigen, dass ich

in den gezeigten Experimenten keine zusätzliche Markierung des *TGN* durchführen konnte, so dass die Kolokalisation von *pSGLT1* mit *Dynamin II* auch teilweise auch an Endosomen stattfinden kann.

Mein Befund, dass *pSGLT1* in Bereichen des *TGN* vorkommt, die frei von *Clathrin* sind aber wahrscheinlich *Dynamin II* enthalten, kann in zweierlei Hinsicht interpretiert werden: Entweder wird *pSGLT1* in Vesikeln vom *TGN* abgeschnürt, die andere Gerüstproteine als *Clathrin* benutzen. Oder die im Bereich des *TGN* gefundenen *pSGLT1*-Moleküle sind nicht für vesikulären Transport bestimmt, sondern halten sich dort für eine gewisse Zeitspanne auf. Dies könnte eventuell nach ihrer Biosynthese der Fall sein oder im Laufe einer intrazellulären Rezirkulation vorkommen. Jedenfalls gibt die Kolokalisation mit *Dynamin II* einen ersten Hinweis darauf, dass die *Dynamin*-Abhängigkeit der in *Xenopus*-Oozyten beobachteten posttranskriptionalen Herunterregulation von *SGLT1* auf Ebene des *TGN* und/oder der Endosomen stattfindet. Darauf weisen auch jüngste Experimente von Veyhl et al. (Manuskript eingereicht) hin. Die Autoren zeigten zunächst, dass der durch Expression von *hSGLT1* und *hOCT2* (*Organic Cation Transporter 2*) in *Xenopus*-Oozyten mediierte Transport der Modellsubstanzen *AMG* (*alpha-Methylglucopyranosid*) bzw. *TEA* (*Tetraethylammonium*) durch Injektion von verschiedenen Präparationen rekombinanten *hRS1*-Proteins innerhalb von 30 Minuten reduziert wurde. Eine bei Koinjektion der *cRNA* von *hRS1* mögliche zelluläre Gegenregulation wurde so ausgeschlossen. Mit diesem Werkzeug wurde anschließend gezeigt, dass die Inhibitoren der *Clathrin*-vermittelten Endozytose *Imipramin* und *Chlorpromazin* sowie der *Caveolin*-abhängigen Endozytose *Filipin* die *hRS1*-medierte Regulation der untersuchten Transporter nicht beeinflussten. *Botulinumtoxin B*, das die Fusion intrazellulärer Vesikel mit der Membran durch Spaltung von *Synaptobrevin* verhindert, führte allein zu einer verminderten Transporteraktivität, die aber durch Koinjektion von *hRS1*-Protein nicht verstärkt wurde. Diese Daten lassen auf einen fort-

währenden Einbau von *SGLT1* in die Plasmamembran schließen, der aber durch *RS1* nicht verändert wird. Hingegen fand nach Vorinkubation der Oozyten mit *Brefeldin A* keine Herabregulation der Transporteraktivität nach Injektion rekombinanten *hRS1*-Proteins mehr statt. Folglich spielt sich die Wirkung von *RS1* auf seine Zielproteine wahrscheinlich an intrazellulären Kompartimenten, nach meinen Ergebnissen also am *TGN*, ab.

4.5. *pRS1* wird in konfluenten Zellen durch das Proteasom abgebaut

Da sich immunfluoreszenzmikroskopisch kein Unterschied in der Lokalisation von *pRS1* zwischen *pRS1* stabil überexprimierenden (Abbildung 6.2 c, S. 75), *antisense*- (nicht gezeigt) und Wildtyp-Zellen fand, obwohl in diesen Zelllinien gegensinnige Effekte auf den *SGLT1*-abhängigen Transport gezeigt worden waren [82], führte ich ergänzend eine transiente Transfektion von LLC-PK₁-Zellen mit *pRS1* durch. Da selbst eine derart erhöhte Expression von *pRS1* nicht mit einer immunfluoreszenzmikroskopischen Änderung der Proteinmenge oder Lokalisation von *pRS1* einher ging (nicht gezeigt), vermutete ich einen schnellen Abbau von *pRS1*. Er könnte auch die drastische Reduktion von *pRS1* in konfluenten LLC-PK₁-Zellen erklären und prinzipiell lysosomal oder durch das Proteasom erfolgen. Ich untersuchte daher den Einfluss einer experimentellen Proteasomhemmung auf die intrazelluläre Verteilung von *pRS1* in konfluenten Zellen. Tatsächlich zeigte sich neben einer Erhöhung der Menge von *pRS1* insbesondere eine Wiederherstellung des Verteilungsmusters, wie sie in subkonfluente Zellen sichtbar ist: *pRS1* konnte ich sowohl im Zytosol, an intrazellulären Vesikeln und im *trans*-Golgi-Netzwerk, als auch an der Zellmembran detektieren. Dabei war die Morphe der Zelle nicht wesentlich verändert: Es blieb bei einem pflastersteinähnlichen Bild der konfluenten Zellen, die sich anhand der nun sichtbaren Membran allerdings gut von einander abgrenzen ließen.

4.5. *pRS1* wird in konfluenten Zellen durch das Proteasom abgebaut

Dieser Befund kann die Abundanz von *pRS1* in subkonfluenten Zellen und das weitgehende Verschwinden nach Konfluenz erklären: Während bei subkonfluenten Zellen die Neusynthese den Abbau von *pRS1* überwiegt, wird in konfluenten Zellen *pRS1* stärker abgebaut als neu gebildet. Zugleich bestehen offenbar auch in konfluenten Zellen an allen beschriebenen, mit *pRS1* assoziierten Kompartimenten ausreichend Bindungsstellen für das Protein, so dass die experimentelle Erhöhung der Menge von *pRS1* in konfluenten LLC-PK₁-Zellen zur Wiederherstellung des in subkonfluenten Zellen beobachteten Verteilungsmusters kommt.

Interessanterweise ist bekannt, dass die Aktivität der *Caseinkinase II (CK2)* durch Ubiquitinierung und proteasomalen Abbau der regulatorischen β -Untereinheit reguliert werden kann [188], [97]. Leyerer et al. (Manuskript eingereicht) wiesen nach, dass die *CK2*-Aktivität in subkonfluenten LLC-PK₁-Zellen hoch ist und bei Konfluenz deutlich abnimmt. In Mutationsstudien identifizierten sie eine Kernlokalisierungssequenz (Aminosäuren 349-369 in *pRS1*), die unter der Kontrolle der *CK2*-abhängigen Phosphorylierung von Serin³⁴⁸ und der *PKC*-abhängigen Phosphorylierung von Serin³⁷⁰ steht. Phosphorylierung von Serin³⁴⁸ verhindert nach diesen Daten die Phosphorylierung von Serin³⁷⁰, wodurch die Kernlokalisation aufgehoben wird.

In Übereinstimmung mit der in Abschnitt 4.2, S. 51 dargelegten Regulation von *pSGLT1* in LLC-PK₁-Zellen [155] würde demnach durch *MG132* nicht nur der Abbau von *pRS1* gehemmt, sondern auch *CK2* aktiviert und die Lokalisation von *pRS1* im Zellkern über einen im Detail unbekanntem Mechanismus bewirkt. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob *CK2*-abhängige Phosphorylierung von *pRS1* zur einer veränderten *SGLT1*-Transkription führt.

4.6. *pSGLT1* wird durch *pRS1* zum trans-Golgi-Netzwerk rekrutiert

Mit der Hemmung des Proteasoms stand nun eine Möglichkeit zur Verfügung, *pRS1* wirksam in LLC-PK₁-Zellen zu überexprimieren. Dies sollte sich – wie durch zahlreiche Veröffentlichungen gezeigt - in einer verringerten Menge und möglicherweise intrazellulären Verteilung von *pSGLT1* niederschlagen.

Tatsächlich nahmen in LLC-PK₁-Zellen nach Hemmung des Proteasoms die über das gesamte Zytosol verbreiteten, tubulovesikulären Strukturen an Zahl ab und *pSGLT1* stellte sich nur noch in einem perinukleären Kompartiment dar. Es gibt keinen Grund anzunehmen, dass es sich bei diesem Kompartiment nicht um das *trans*-Golgi-Netzwerk handelt, da dort sowohl *pRS1*, als von *pSGLT1* von mir gezeigt wurden. Für die Identität dieses Kompartiments mit dem TGN spricht auch seine Morphe, wenngleich es sich in der Darstellung mit *αpRS1-Prot* eher globulär, mit *QIS30* eher tubulovesikulär darstellte. Dies kann einerseits durch die wechselnde Gestalt des *trans*-Golgi-Netzwerks erklärt werden, zum anderen könnten beide Proteine jeweils nur in bestimmten Anteilen desselben Kompartiments vorkommen. Drittens treten Schnittebeneneffekte in der konfokalen Laserscanningmikroskopie hinzu.

Um die beschriebene Änderung der Menge und Verteilung von *pSGLT1* letztlich auf die Überexpression von *pRS1* zurück zu führen, versuchte ich fruchtlos, Zelllinien mit stabilem *siRNA-knockdown* zu generieren (Zelllinien nicht überlebensfähig). Daher experimentierte ich mit der bereits vorgestellten *pRS1-antisense*-Zelllinie. Hier sollte *pRS1* zumindest in etwas vermindertem Ausmaß transkribiert werden [82] und folglich die nach Proteasom-Hemmung beschriebenen Veränderungen ausbleiben. Da diese Zellen sich etwas leichter vom Kulturgefäß ablösten als Wildtyp-Zellen, führte ich die Versuche einen Tag nach Konfluenz durch. Unter diesen Bedingungen fanden sich (Abbildung 6.10, Bild 5, S. 91) keine wesentlichen Unterschiede in der Verteilung und Menge von *pSGLT1* gegenüber

4.7. *Eine Rolle für pRS1 im intrazellulären Austausch von Vesikeln*

Wildtyp-Zellen nach viertägiger Konfluenz (Abbildung 6.10, Bild 4, S. 91). Hemmung des Proteasoms zeigte in der Mehrzahl der stabilen *antisense-pRS1*-Zellen nicht die in Wildtyp-Zellen beobachteten Änderung von Verteilung und Menge von *pSGLT1*. Diese Daten sprechen dafür, dass die beobachteten Umverteilungsvorgänge tatsächlich am ehesten von *pRS1* und erst in zweiter Linie von anderen Proteasom-abhängig degradierten Proteinen abhängig sind. Als dritte Möglichkeit könnte die Degradationshemmung von *pRS1* zu einer durch ein anderes Protein bewirkten Umverteilung von *pSGLT1* führen.

Bei einer Halbwertszeit von *pSGLT1*-Protein um 2½ Tage [77] dürfte die beobachtete Verringerung der Menge von *pSGLT1* auf die Repression durch *pRS1* im Zellkern zurück zu führen sein (Hemmung des Proteasoms für insgesamt 24 Stunden). Zugleich zeigen die Daten, dass der Abbau von *pSGLT1* nicht proteasomal erfolgt; ein Kandidat ist der *ESCRT* (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*)-Pfad [5]. Dieser Abbauweg für Membranproteine besitzt große Bedeutung auch für die Regulation von Wachstum über membranständige Rezeptoren [168]. Die durch Hemmung des Proteasoms herbeigeführte perinukleäre Akkumulation von *pSGLT1* wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

4.7. *Eine Rolle für pRS1 im intrazellulären Austausch von Vesikeln*

Aus der Lokalisation von *pRS1* und *pSGLT1* unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen ergeben sich bedeutende Implikationen für eine Rolle von *RS1* im intrazellulären Austausch von Membranproteinen. Von vielen Gruppen wurde herausgearbeitet, dass das *trans*-Golgi-Netzwerk nicht allein eine Station auf dem Syntheseweg von Membran- und extrazellulären Proteinen ist, sondern in einem intensiven Austausch mit von der Membran und zu ihr zurück sowie zu anderen Kompartimenten zirkulierenden Transportvesikeln steht. Ein direkter Nachweis dieses Flusses von Membrananteilen gelang etwa in Experimenten mit Weizenkeimagglutinin (*WGA*). Dieses wurde von der Membran in sub-

membranäre Vesikel, anschließend in Endosomen und dann rasch in das *TGN* transferiert [178]. Auf Ebene der Endosomen konnten für unterschiedliche Membranproteine unterschiedliche retrograde Pfade definiert werden (Abbildung 4.1, S. 55) [144]: Zum *TGN* werden Proteine ausgehend vom frühen Endosom [103], [104] (*Shiga-Toxin B*) aber auch vom späten Endosom [32] sortiert. Damit steht das *TGN* als zumindest gleichwertige Sortierstation neben dem für das Modellprotein *Transferrinrezeptor (TfR)* etablierten *sorting-endosome*-abhängigen Recyclingweg, [165], [176], [177]. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass Membranproteine alternativ in den *MVB (Multivesicular Body)* und anschließend das Lysosom zur Degradation oder das *TGN* für eine neue Recyclingrunde sortiert werden [5].

Für *SGLT1* sind noch keine Daten zum Mechanismus der intrazellulären Sortierung bekannt. Die lange Halbwertszeit von *SGLT1*-Protein [77] erlaubt jedenfalls keine kurzfristige Anpassung der zellulären Transportkapazität. Physiologisch treten jedoch im Glucose-Haushalt ausgeprägte Schwankungen auf, etwa im Darm, wo zu den Mahlzeiten u.a. große Mengen an Zucker im Lumen auftreten. Deren Rückresorption limitiert die mögliche Flüssigkeitsresorption, wie die Phänomene des Kurzdarmsyndroms und die Möglichkeit zur symptomatischen Diarrhoe-Therapie mittels Glucose-basierter ORS-Lösung (*oral rehydration salts*) der WHO/UNICEF zeigen (www.rehydrate.org, [65], [24]). In der Niere determiniert die verfügbare Glucose-Transportkapazität die Nierenschwelle für Glucose (Blutglucose ± 180 mg/dl bzw. 10 mM).

In jüngerer Zeit wurde für *SGLT1* ein vesikulärer Pool gezeigt (erstmalig in nativen Zellen in [37], [77]), wie er für Transporter vom Typ der erleichterten Diffusion seit langem bekannt ist [127], [182], [87]. Die gleiche Gruppe zeigte später, dass durch das Wespengift Mastoparan die Endozytose von *SGLT1*-Protein experimentell gesteigert werden kann und sich dadurch auch seine Menge in Endosomen erhöht [76]. Die Verweildauer des Proteins

in der Plasmamembran wurde bislang jedoch nicht untersucht. Es liegt die Vermutung nahe, dass das individuelle *SGLT1*-Molekül während seiner langen Lebensdauer mehrfach zwischen Membran und intrazellulären Kompartimenten rezirkuliert und nur für einen relativ geringen Anteil seiner Lebenszeit in die Plasmamembran inseriert ist [76].

Beim Recycling von *SGLT1* könnte *RS1* eine Rolle spielen, wie die folgenden Überlegungen nahe legen: In unserer Arbeitsgruppe wurde kürzlich gezeigt (Koepsell, Gorboulev und Müller, unpublizierte Daten), dass *pRS1* mit der C-terminalen *UBA*-Domäne in der Lage ist, Tetra-*Ubiquitin* zu binden. Zahlreiche Membranproteine werden vor ihrer endozytotischen Internalisation innerhalb der Zellmembran oder später im Rahmen von Sortierprozessen am frühen Endosom (meist mono-) ubiquitiniert [59], [57], [60], [167], [58], [152], [11]. Darüber hinaus wurde gezeigt [38], dass *SGLT1* durch die E3-Ubiquitin-Ligase *Nedd4-2* herunterreguliert wird. Bereits Kühlkamp [85] postulierte daher eine Interaktion von *RS1* mit ubiquitinierten und in die Zellmembran inserierten, strukturell unterschiedlichen Membranproteinen, darunter *SGLT1*. Andererseits liegen inzwischen Daten vor (Veyhl et al., Manuskript eingereicht), wonach die Wirkung rekombinanten *hRS1* auf verschiedene in *Xenopus*-Oozyten exprimierte Transporter durch Inhibition der Endozytose nicht gebremst wird.

In dieser Arbeit vorgestellte Befunde zeigten, dass an der Plasmamembran keine ausgeprägte Kolokalisation von *pRS1* mit *Clathrin* oder *Dynamamin II* vorliegt. Dies schließt jedoch einen *Clathrin*- und *Dynamamin II*-medierten Abschnürungsprozess von *SGLT1* an der Plasmamembran nicht aus, wenn man eine im Vergleich zur Bildung von *clathrin coated pits* und *vesicles* lange Dauer der Rekrutierung von *pSGLT1* annimmt. Unter diesen Bedingungen wäre eine Kolokalisierung nur schwer nachweisbar. Zudem befinden sich in subkonfluenten Zellen nur sehr wenige *pSGLT1*-Moleküle in der Membran, so dass Interaktionen mit dem abundant an der Membran vorhandenen *pRS1* selten sein werden.

Andererseits kann eine Ubiquitinierung von Membranproteinen auch am *trans*-Golgi-Netzwerk stattfinden, da die Kopplungsenzyme nicht nur sämtlich zytosolisch sind, sondern auch gezeigt wurde, dass die E3-Ubiquitinligase *Nedd4* durch das kürzlich klonierte Protein *N4WBP5* zum *trans*-Golgi-Netzwerk rekrutiert wird [52], [30]. In der Hefe konnte sogar eine *Ubiquitin*-Ligase mit Transmembrandomäne nachgewiesen werden, die in den regulierten Transport vom Golgi-Apparat einbezogen ist [130]. In Übereinstimmung mit meinen immunfluoreszenzmikroskopischen Daten könnte *RS1* also über seine *UBA*-Domäne an monoubiquitinylierte Membranproteine wie *SGLT1* im *trans*-Golgi-Netzwerk binden, und anschließend die erforderlichen Gerüstproteine für Vesikelbildung und -abschnürung rekrutieren.

Wie erwähnt (Abschnitt 4.3.2, S. 54, Abbildung 4.1, S. 55 und Referenzen darin, [66], [78]), dienen am *trans*-Golgi-Netzwerk Adapterkomplexe der *AP*-Familie der Erkennung von „Fracht“-Proteinen. Darüber hinaus ist eine neue Klasse von Adapterproteinen im Zusammenspiel mit zahlreichen regulatorischen Proteinen an diesen Sortierungsvorgängen beteiligt, die so genannten *GGAs* (*Golgi-localized gamma-ear containing ADP ribosylation factor-binding proteins*). *GGAs* bestehen aus einer C-terminalen *GAE*-Domäne (*gamma-adaptin-ear-homology*), die akzessorische Faktoren rekrutiert [109], [27], [100], einer variablen, *Clathrin* bindenden *hinge*-Region (vgl. [16]), der *GAT*-Domäne (*GGA and TOM*), die über eine Interaktion mit dem GTP-bindenden *Arf1* (*ADP-Ribosylation Factor 1*) die Rekrutierung der *GGAs* an die TGN-Membran bewerkstelligt [28], [63] und schließlich der N-terminalen *VHS*-Domäne (*Vps27p, Hrs and STAM*). Diese bindet Membranproteine über eine kurze saure Aminosäuresequenz mit Di-Leucin-Motiv der Consensus-Sequenz *DXXLL* (*AC-LL, acidic cluster-dileucine*), wie sie in *Sortilin*, dem *Kationenunabhängigen und -abhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor* (*CI-/CD-MPR*) oder dem *low density lipoprotein receptor-related protein 3* (*LRP3*) vorkommen [116], [166]. Kürzlich wurde auch

die Bindung an den Transporter *GLUT4* gezeigt [94]. Dieselbe Sequenz wurde für die Bindung von Membranproteinen an die μ 2-Untereinheit von *AP-2* an der Membran beschrieben [17].

Ein AC-LL-Motiv kommt auch in *RS1* vor (DLALL) und ist zwischen Schwein, Mensch und Kaninchen vollständig konserviert (*pRS1* 608-612, *hRS1* 602-606, *rbRS1* 575-579). Diese Sequenz liegt innerhalb der *UBA*-Domäne von *pRS1* am Übergang der *Loop 2* zur *UBA-alpha3*-Helix (Müller und Koepsell, unpublizierte Daten), in *pRS1* kommt darüber hinaus eine weitere ähnliche Sequenz (198-202) vor: DLELL. Verglichen mit den Sequenzen in *Sortilin* und *CI-MPR* (jeweils DDSDEDLL) oder dem *LRP3* (EASDDEALL) ist Aspartat⁶⁰⁸ (für *pRS1*) die einzige saure Aminosäure der Consensus-Sequenz und kommt im Bereich des lipophilen Epitops 1 der *UBA*-Domäne zu liegen. Außerdem fehlt im Vergleich ein durch *Casein-Kinase II* (*CKII*) phosphorylierbares Serin in unmittelbarer Nähe des Motivs, wie es in den Vergleichsproteinen vorhanden ist. Serin³⁴⁸ innerhalb der *CKII*-Consensussequenz [9] wurde von Leyerer et al. (Manuskript eingereicht) als kritisch für den Kernimport identifiziert und dürfte für eine unmittelbare Auswirkung auf die DXXLL zu weit entfernt liegen. Wenn auch unbekannt ist, ob die beschriebene Sequenz in *RS1* für eine Interaktion mit *GGAs* ausreicht, erscheint es möglich, dass *pRS1* mit Adapterproteinen am *trans*-Golgi-Netzwerk (*GGAs*) einerseits und ubiquitinierten Zielproteinen wie *SGLT1* andererseits interagiert. Eine Markierung von Membranproteinen durch Mono- oder Polyubiquitinierung könnte also sowohl bei ihrer Herabregulation von der Membran, als auch in der Sortierung am *trans*-Golgi-Netzwerk eine Rolle spielen. Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass *Brefeldin A*, das die Rekrutierung von *GGAs* zum *TGN* via *Arf* inhibiert, zu einem Verlust von *pRS1* am *TGN* führte. Da ich perinukleär keine Kolo-kalisation von *SGLT1* mit *Clathrin* nachweisen konnte, ist daneben eine Retention von *SGLT1* in nicht *Clathrin* enthaltenden *TGN*-Anteilen denkbar (Abschnitt 4.4, S. 57, Abbildung 4.2, S.

67). Dafür spricht auch, dass nach Hemmung des Proteasoms $pSGLT1$ nach perinukleär umverteilt wird (vgl. Abschnitt 4.6, S. 61).

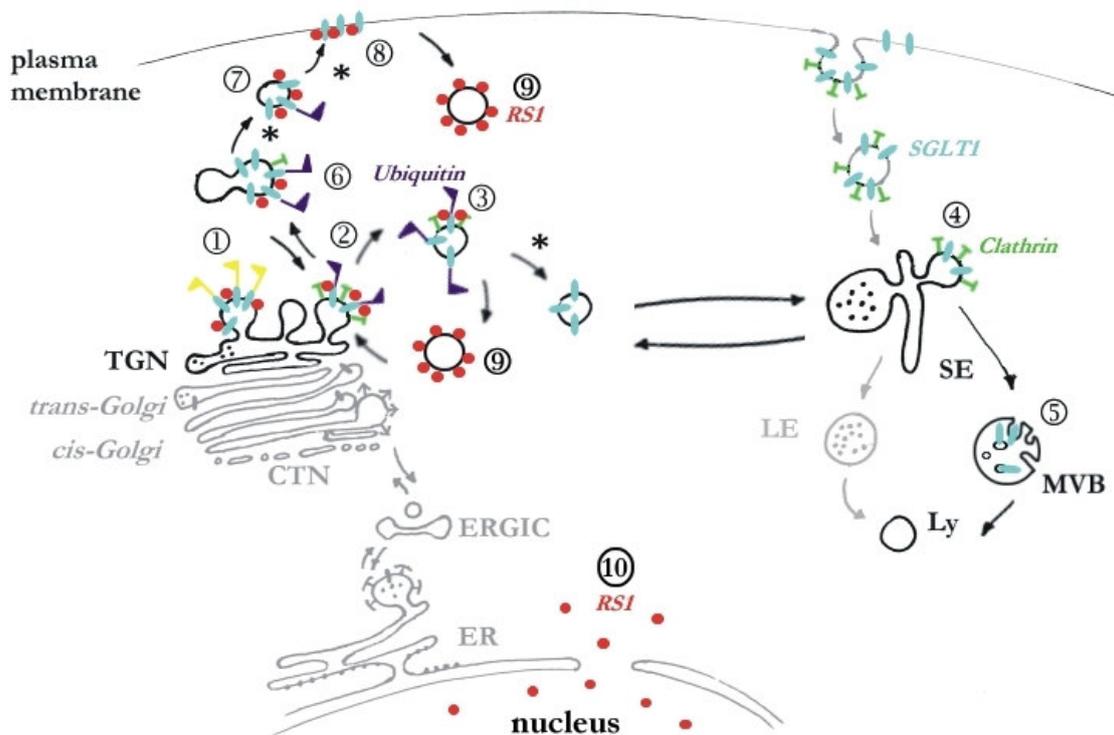


Abbildung 4.2 Funktionen von $pRS1$ in der kurz- und langfristigen Regulation von $pSGLT1$. Schemazeichnung eines hypothetischen Modells, $pRS1$ -abhängige Transportvorgänge schwarz dargestellt.

In subkonfluenten LLC-PK₁-Zellen wird neu synthetisiertes und rezirkulierendes $SGLT1$ -Protein (türkis) am *trans*-Golgi-Netzwerk posttranslational modifiziert (gelbe Fahne, evt. *Ubiquitin*) und durch $RS1$ (rot) dort retiniert (1). Alternativ wird $SGLT1$ nach *Ubiquitinierung* (lila Fahne, 2) in unterschiedliche Transportwege einsortiert: Der Transporter gelangt in Endosomen (3) und wird anschließend zur Degradation in *Multivesicular Bodies* (MVB, 5) sortiert, möglicherweise über *sorting endosomes* (4). Alternativ wird $SGLT1$ über andere Endosomen (6) zur Plasmamembran transportiert. Hier dargestellte Transportvesikel, die sowohl $SGLT1$ und $RS1$ enthalten (7) wurden in dieser Arbeit nicht nachgewiesen. Da einerseits sowohl die Plasmamembran (8), als auch kleinere Vesikel $RS1$ besitzen, andererseits im *Xenopus*-Oozytensystem keine Hinweise für eine Beteiligung von $RS1$ bei der Endozytose nachweisbar war, müssen solche Intermediate neben nur $RS1$ enthaltenden (9) angenommen werden. Deubiquitinierung von $SGLT1$ findet womöglich an verschiedenen Stellen (★) statt. Eine Langzeitregulation erfolgt durch in den Kern importiertes $pRS1$ (10). Zu den verwendeten Abkürzungen siehe Abbildung 4.1, S. 55.

Dieses Modell habe ich in Abbildung 4.2 zusammengefasst: Nach - möglicherweise $RS1$ -unabhängiger - Internalisierung von $SGLT1$ wird der Transporter in das *trans*-Golgi-Netzwerk transloziert, wo ein Teil des Pools von $SGLT1$ entweder zurück gehalten, oder aber zusammen mit neu synthetisierenden Transportern in unterschiedliche Endosomen

4.8. *Ausblick: Ein Modell mit vielen Fragezeichen*

sortiert wird. Von dort könnten die Transporter über einen weiteren Sortierschritt in *Multivesicular Bodies* degradiert werden, oder an die Membran zurück zirkulieren.

In der langfristigen Regulation von *SGLT1* führt Phosphorylierung von *pRS1* durch *Caseinkinase II* an Serin³⁴⁸ zum Kernimport, wo die Transkription von *SGLT1* unterdrückt wird. Phosphorylierung an Serin³⁷⁰ durch *PKC* in konfluenten Zellen andererseits verhindert den Kernimport. Durch die Proteinkinasen *CKII* und *PKC* sowie eine sehr feine Regulation der Menge von *pRS1* können Zellen rasch und genau auf wechselnde Transportansprüche reagieren. Mit meinem dargestellten Modell lassen sich die bisher unklaren Wege der transkriptionalen und posttranskriptionalen Regulation von *SGLT1* zwanglos in ein Modell zusammen führen, bei dem zudem die beschriebenen PKA-abhängigen Wege nicht mit den *RS1*-medierten interferieren [82].

4.8. *Ausblick: Ein Modell mit vielen Fragezeichen*

In der Zusammenschau mit früher publizierten Daten führten meine Experimente zu einem gedanklich abgerundeten und experimentell überprüfbareren Modell. Viele Aspekte sprechen für ein multifunktionales *RS1*-Protein: Demnach wäre dieses zunächst als Membranprotein entdeckte Protein viel mehr als eine *regulatory subunit* (RS): (i) in bestimmten Situationen ein Retentionssignal für bestimmte Membranproteine im *trans*-Golgi-Netzwerk, (ii) ein Repressor von *SGLT1* im Zellkern und (iii) ein regulatorisches, spezifisches Adapterprotein an der Zellmembran und in Vesikeln.

Es bleiben aber auch sehr viele Fragen offen, die teils mit biochemischen Methoden zu klären sind: Spielt die Phosphorylierung durch *Proteinkinase C*, insbesondere an Serin⁴⁰⁰, bei der Lokalisation an membranumgrenzten Kompartimenten wie dem *TGN* eine Rolle? Interagiert *RS1* über das DXXLL -Motiv mit Adapterproteinen wie *GGAs*? Befindet sich das ganze Protein im Zellkern und an der Membran oder jeweils nur ein Teil? Wie ist *RS1* an

der Membran befestigt? Wird es an integrale Membranproteine gebunden, an Strukturproteine unterhalb der Membran oder ist *RS1* acyliert? Wie interagiert *RS1* mit *IRIP* und binden noch andere Proteine an den Komplex? Und schließlich: Wird *SGLT1* als das am besten bekannte Zielprotein tatsächlich ubiquitiniert und bindet daran *RS1*? Wird *RS1* selbst ubiquitiniert und wenn ja, bilden sich Oligomere über die *UBA*-Domäne aus?

Auch fortgeschrittene mikroskopische Techniken könnten zukünftig Gewinn bringend eingesetzt werden: Um die Dynamik der Regulation von *SGLT1* durch *RS1* sichtbar machen, ließen sich *SGLT1* und *RS1* als Fusionsproteine mit photoaktivierbaren *GFP*-Derivaten [121] in lebenden Zellen exprimieren und selektiv in bestimmten Kompartimenten visualisieren. Umgekehrt könnte hierzu die FRAP-Technik (*fluorescence recovery after photobleaching*) eingesetzt werden. Mittels *FRET*-Technologie (*fluorescence resonance energy transfer*) müssten sich – neben biochemischen Ansätzen – auch Interaktionen, z.B. zwischen *SGLT1* und *RS1* oder diesem und *GGA*s sichtbar machen lassen. Zudem könnte durch Einzelmolekülmikroskopie die Dynamik der Bewegung von *SGLT1* innerhalb der Membranebene visualisiert und so eine eventuelle Lokalisationen in Membrandomänen untersucht werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit bedient sich der Immunfluoreszenzmikroskopie, um die intrazelluläre Lokalisation des mit der Plasmamembran assoziierten Regulatorproteins *RS1* und eines seiner Zielproteine, des *Natrium-D-Glucose-Kotransporters SGLT1*, in Zellkulturmodellen des Nierenepithels (LLC-PK₁- und HEK293-Zellen) zu untersuchen. Zwei polyklonale Antikörper gegen das *RS1*-Protein des Schweins (*pRS1*) wurden dafür erzeugt. In Untersuchungen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop fand sich *pRS1* an der Plasmamembran, im Zellkern, intrazellulär an Vesikeln sowie an einem perinukleären Kompartiment. Die Lokalisation des Proteins im Kern von LLC-PK₁-Zellen nahm mit zunehmender Differenzierung der Zellen ab, *pRS1* wurde in differenzierten Zellen lediglich im perinukleären Kompartiment gefunden. Dieses wurde in Kolokalisationsstudien als *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) identifiziert und dort eine Kolokalisation von *pRS1* mit *Clathrin* und *Dynamin* nachgewiesen. Durch Behandlung der Zellen mit *Brefeldin A* wurde der Verlust von *pRS1* vom TGN induziert. *SGLT1* wurde überwiegend in Endosomen nachgewiesen, die entlang von Microtubuli organisiert waren. Auch im *trans*-Golgi-Netzwerk wurde die Anwesenheit von *SGLT1* gezeigt. *pSGLT1* kolokalisierte dort mit *Dynamin* aber nicht mit *Clathrin*. Es wurde demonstriert, dass experimentelle Hemmung der Proteasoms die Menge an *pRS1* drastisch erhöht und gegenläufig die des *Natrium-D-Glucose-Kotransporter (pSGLT1)* abnimmt. Die gewonnenen Daten wurden in einem hypothetischen Modell zusammengefasst, das die gezeigten Ergebnisse mit früher gewonnenen funktionellen Experimente zu einem schlüssigen Konzept zusammenführt.

6. FARBTAFELN

Auf den folgenden Seiten wurden die immunfluoreszenzmikroskopisch erhobenen Daten in Tafeln thematisch zusammengefasst dargestellt. Dabei finden sich auf der jeweils geraden Seite links die Erläuterungen zu den auf der ungeraden Seite gegenüber gezeigten Abbildungen.

Die jeweiligen technischen Einzelheiten der Mikroskopsteuerung und Datenerfassung sind in *Kursivdruck* im Anschluss an die Erläuterungen angegeben. Die eingezeichneten Maßstabsbalken sind bei konfokal mikroskopischen Bildern aus dem Primärdatensatz ausgelesen, bei konventioneller Mikroskopie mit der eingebauten Maßstabseinblendung gemessen und in das Bild mit dem Grafikprogramm eingefügt.

Abbildung 6.1

Verteilung von pRS1 in subkonfluenten LLC-PK₁-Zellen

LLC-PK₁-Zellen wurden in einer Dichte von 20 000/cm² auf Deckgläschen (Abbildung 3.1, Seite 36, hier zum besseren Vergleich als a) und b) wiedergegeben) oder Transwell Clear Polyester-Membranen (c und d) ausgesät, nach 24 Stunden mit Triton X-114 permeabilisiert und mit dem Antikörper $\alpha pRS1$ -Prot untersucht. Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen IgG F(ab')₂-Fragment mit Alexa Fluor 555 markiert. Ich fand *pRS1* unabhängig vom Kultursubstrat an der Zellmembran, im Zellkern, in einem perinukleären Kompartiment und in Vesikeln im Zytosol.

e) Vorinkubation der Antikörperlösung mit rekombinantem *pRS1* für eine Stunde bei 37°C hob alle Signale nahezu vollständig auf. Dies bewies die Spezifität des eingesetzten Antikörpers. f) Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI.

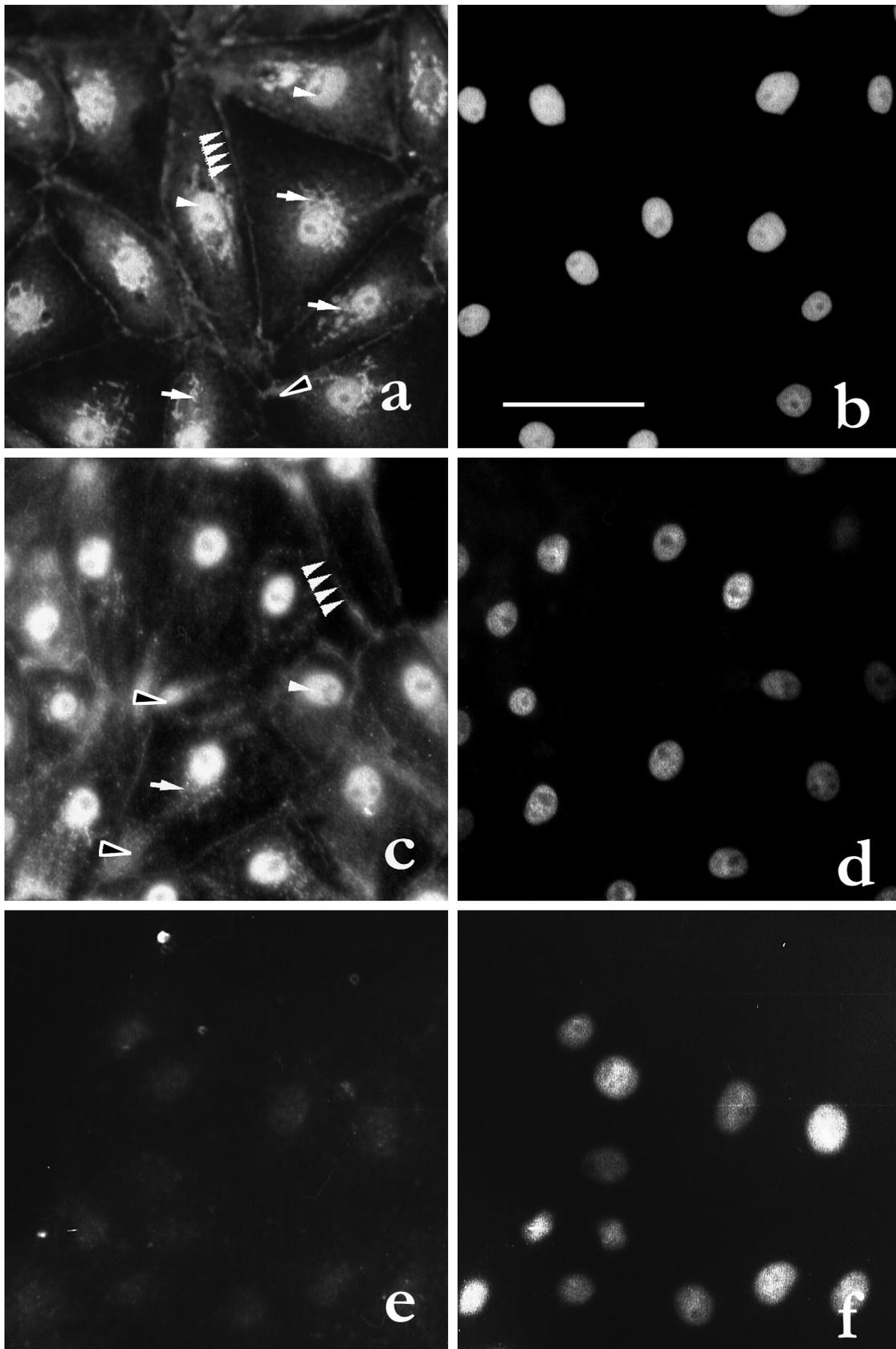


Abb. 6.1: Verteilung von pRS1 in subkonfluenten LLC-PK₁-Zellen

Abbildung 6.2

Weitere Bilder zur Verteilung von pRS1 in subkonfluenten LLC-PK₁-Zellen

Hoch auflösende Detailstudie der Verteilung von *pRS1* in subkonfluenten LLC-PK₁-Zellen. Das Präparat wurde wie in Abbildung 6.1 beschrieben mit dem Antikörper $\alpha pRS1$ -Prot untersucht, anschließend wurden die hier gezeigten Aufnahmen einzeln am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen.

- a) Übersicht über das Präparat, DAPI-Färbung der Zellkerne
- b) Übersicht über das Präparat, *pRS1* dargestellt mit $\alpha pRS1$ -Prot.
- c) Überlagerung: Es stellten sich die mit dem Antikörper $\alpha pRS1$ -Prot markierte Zellmembran, intrazelluläre Vesikel, perinukleäre Tubulovesikel und Zellkern deutlich dar (vgl. Abbildung 6.1). Balken: 20 μm
- d) Im Bereich unterhalb der Zellmembran wurden zahlreiche *pRS1* enthaltende Vesikel nachgewiesen, die sich von der Membran abzuschnüüren oder sich ihr anzulagern schienen. Kontinuierlich punktiertes Bild an der Membran selbst.
- e) Deutlich erkennt man in dieser Abbildung ein “stapelartiges” Bild von perinukleären Tubulovesikeln.

konfokale Aufnahmen mit ZEISS LSM 510, Plan Aplanachromat 63x, Pinhole 130 μm .

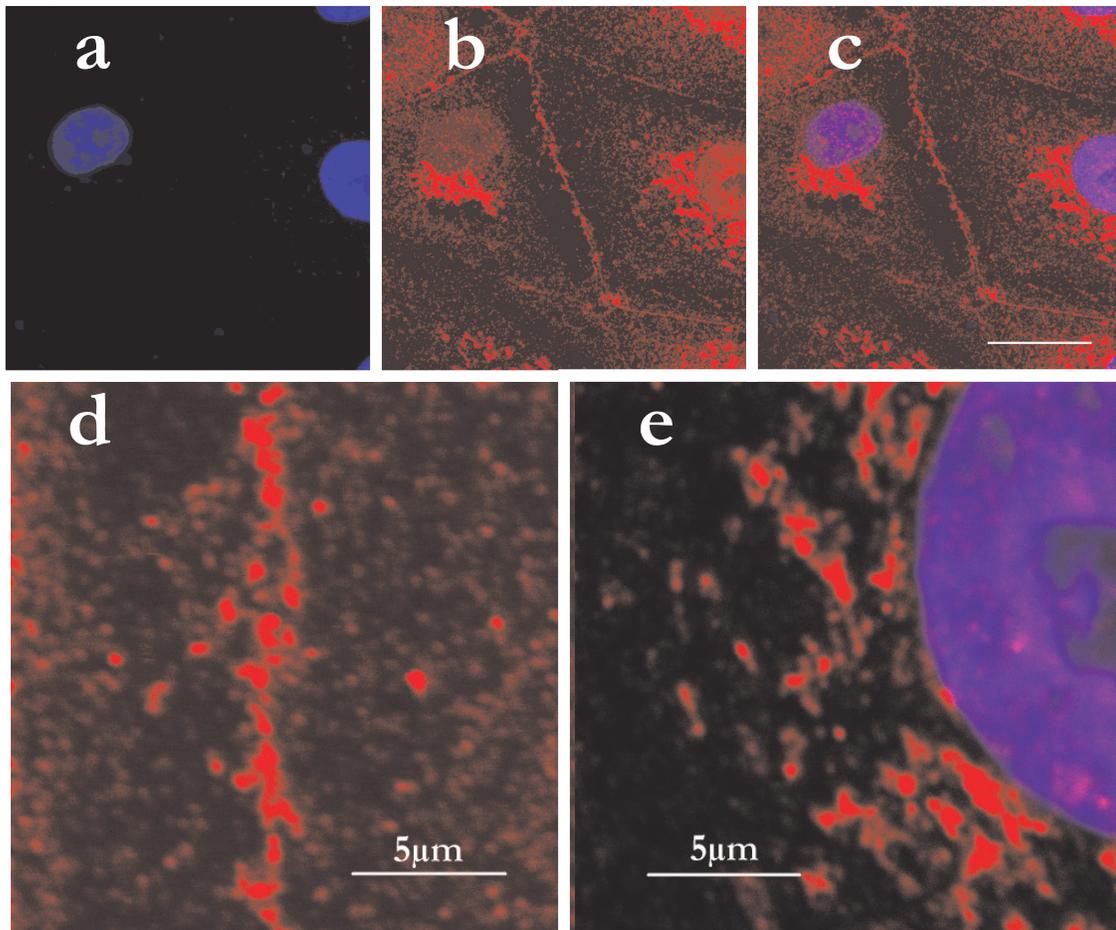


Abb. 6.2: Weitere Bilder zur Verteilung von pRS1 in subkonfluenten LLC-PK₁-Zellen

Abbildung 6.3

Verteilung von pRS1 in konfluenten LLC-PK₁-Zellen

LLC-PK₁-Zellen wurden in einer Dichte von 20 000/cm² auf Transwell Clear Polyester-Membranen ausgesät. Am fünften Tag wurde Konfluenz erreicht, acht weitere Tage später wurden die Zellen permeabilisiert und mit dem Antikörper α pRS1-Prot untersucht. Dies wurde zunächst mit Wildtyp-LLC-PK₁-Zellen durchgeführt (Abbildung 3.3, Seite 38, hier zum besseren Vergleich als a) und b) wiedergegeben). Ich fand darin nach Konfluenz eine deutlich reduzierte Proteinmenge von pRS1.

c) Bei Kultur von pRS1 stabil überexprimierenden LLC-PK₁-Zellen in der gleichen Weise, zeigte sich dasselbe Bild. Es ließ sich also auch durch Überexpression von pRS1 keine signifikante Anreicherung in bestimmten Kompartimenten nachweisen. Dies wies darauf hin, dass die Änderung der Lokalisation von pRS1 durch einen anderen Mechanismus bewirkt wird. Eine vergleichende Quantifizierung der Gesamtmenge von pRS1 war mit analoger Aufnahmetechnik nicht möglich.

d) Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI.

Aufnahmen mit ZEISS Axioplan 2, Plan Neofluar 40x, auf Kodak T-MAX 400 Pro

e) In konfluenten Wildtyp-LLC-PK₁-Zellen gelang in konfokalen Aufnahmen die Auflösung eines perinukleären pRS1 enthaltenden tubulovesikulären Kompartiments.

f) Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI.

g) Überlagerung von e) und f): Man erkennt deutlich die strikt perinukleäre Lage des pRS1 enthaltenden Kompartiments.

konfokale Aufnahmen mit ZEISS LSM 510, Plan Apochromat 63x, Pinhole 135 μ m (Abbildungen e-g)

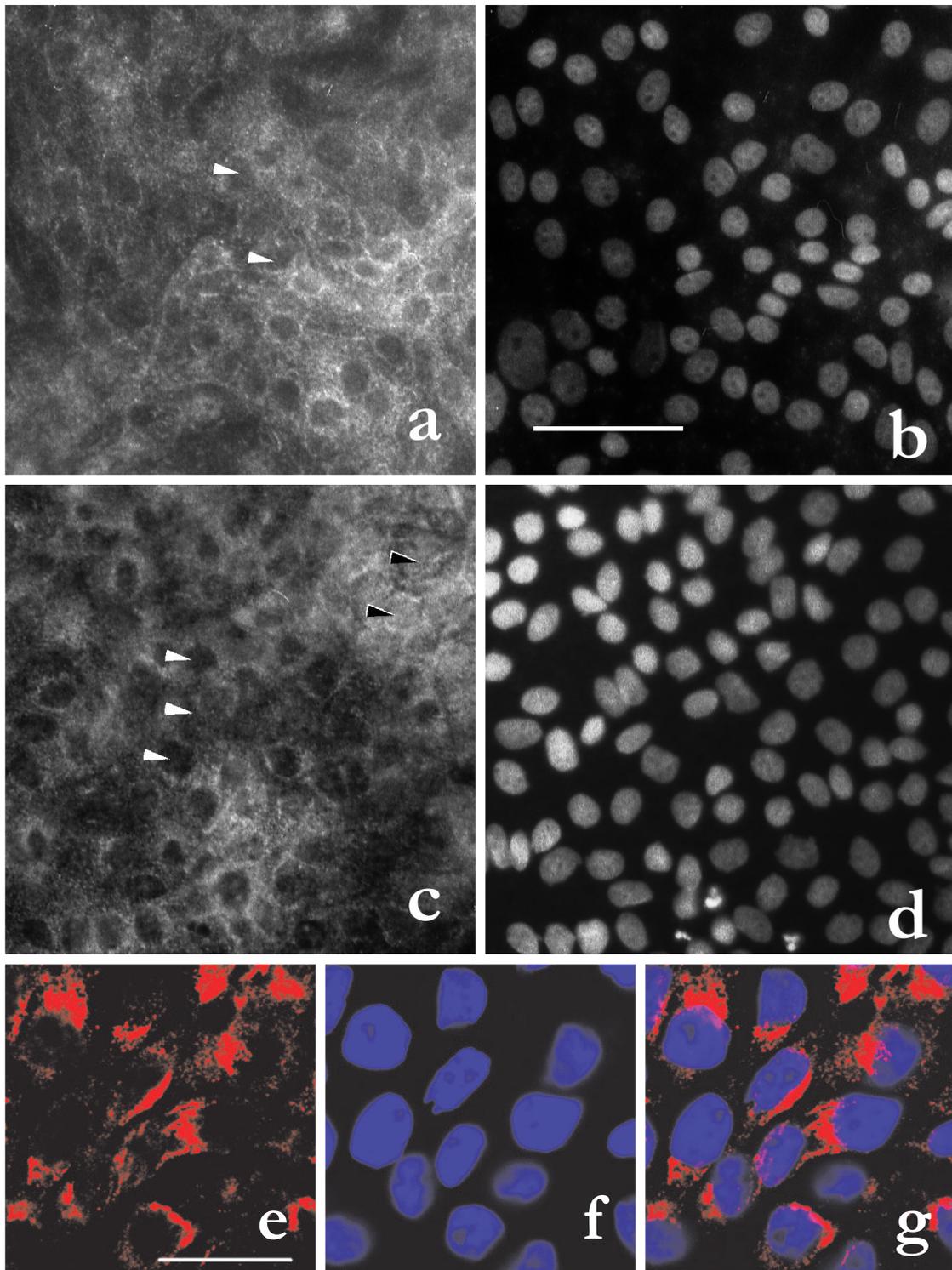


Abb. 6.3: Verteilung von pRS1 in konfluenten LLC-PK₁-Zellen

Abbildung 6.4

Nur geringe Kolokalisation von pRS1 mit Actin an der Plasmamembran

Subkonfluente LLC-PK₁-Zellen wurden mit AlexaFluor 488-konjugiertem Phalloidin inkubiert (grün) und anschließend mit dem Antikörper α pRS1-Prot (rot) untersucht. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

Bild 1: In konventionellen Mikrofotografien zeigte sich deutlich die typische Lokalisation von pRS1 (a, vgl. Abbildung 6.1 und 6.2). Actin bildete neben Stressfasern ein submembranäres Band aus (b). DAPI (c). Überlagerung aller drei Markierungen (d) zeigte eine gewisse Überlappung von Actin und pRS1 im Bereich der Zellmembran. Im Kern lokalisiertes pRS1 erscheint durch Überlagerung mit DAPI violett.

Aufnahmen mit ZEISS Axioplan 2, Plan Neofluar 40x, auf Fujichrome Sensia 400

Bild 2: Bei höherer Vergrößerung zeigte sich erneut die Verteilung von pRS1 im Bereich des Actin-Zytoskeletts unterhalb der Membran. Entlang der Stressfasern war keine Assoziation von Actin und pRS1 sichtbar. Balken: 20µm

Aufnahmen mit ZEISS Axioplan 2, Plan Neofluar 100x, auf Fujichrome Sensia 400

Bild 3: Konfokale Aufnahmen ergaben Folgendes (zur besseren Orientierung ist die Abbildung 3.5, Seite 40 in a, b und d wiedergegeben): Zwar fand sich im Bereich des submembranären Actin-Bands eine gewisse Überlappung von pRS1 und Actin vor allem im Bereich der Zellkontakte (d, gelb), entlang der Membran jedoch nur geringe Kolokalisation. In e) ist eine Ausschnittsvergrößerung aus d) zur besseren Darstellung der Situation von pRS1 und Actin an Zell-Zell-Kontakten wiedergegeben.

konfokale Aufnahmen mit ZEISS LSM 510, Plan Apochromat 63x, Pinhole je 110µm

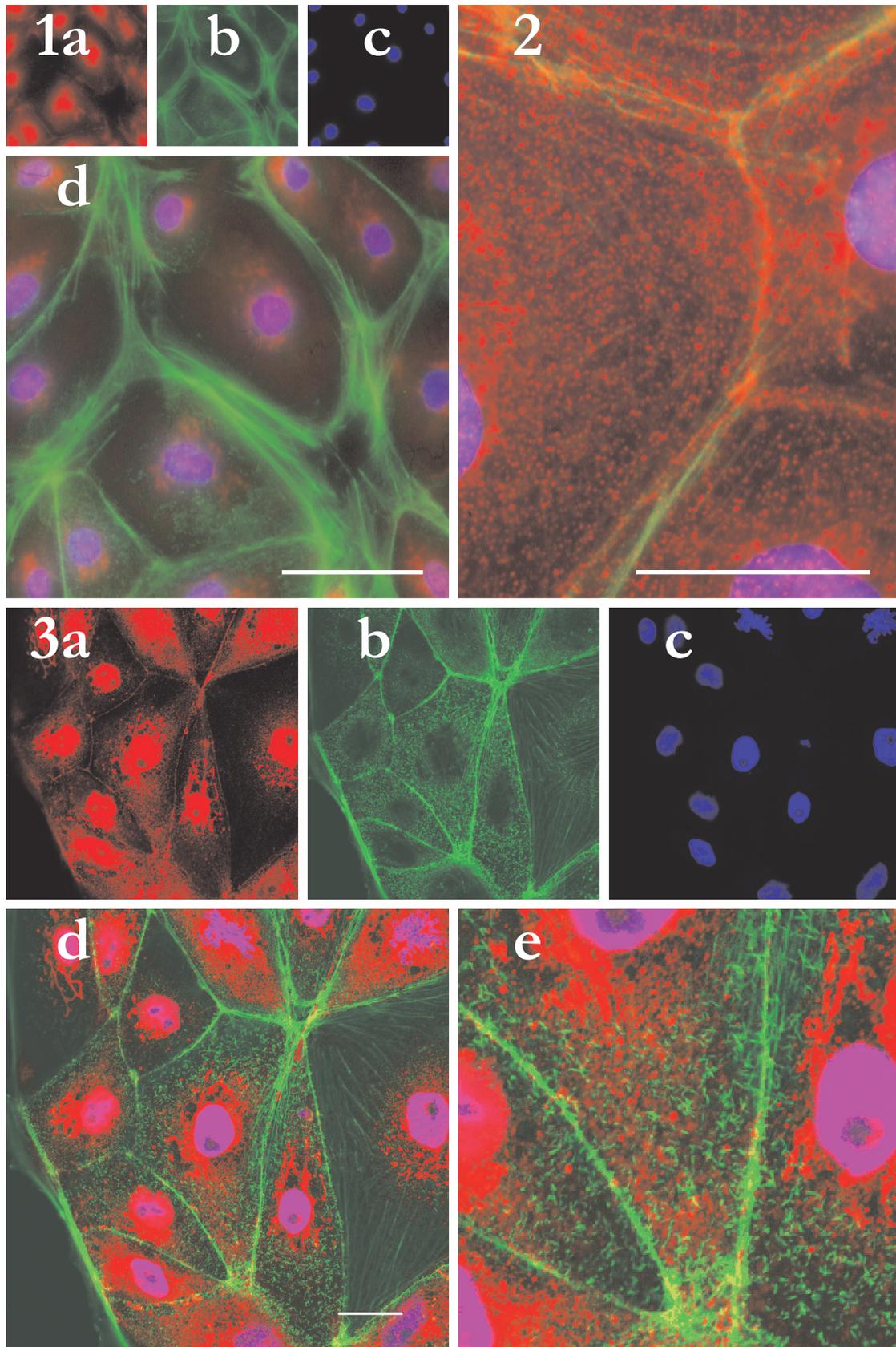


Abb. 6.4: Nur geringe Kollokalisierung von pRS1 mit Actin an der Membran

Abbildung 6.5

pRS1 kolokalisiert perinukleär mit Microtubuli

Subkonfluente LLC-PK₁-Zellen wurden mit einem Antikörper gegen β -Tubulin (grün) und anschließend mit α pRS1-Prot (rot) untersucht.

Bild 1: Die konventionelle Mikrofotografie zeigt pRS1 und die Microtubuli, die in den kleinen Bildern jeweils getrennt dargestellt wurden, mit einer deutlichen perinukleären Überlagerung. Im Bereich der Vesikelpopulationen nahe den fokalen Adhäsionspunkten fand ich keine enge Assoziation..

Bild 2: Bei höherer Vergrößerung erkennt man die Überlagerung von pRS1 mit Tubulin im perinukleären Bereich besonders gut. Balken: 20 μ m

Aufnahmen mit ZEISS Axioplan 2, Plan Neofluar 40x (1) bzw. Plan Neofluar 100x (2), auf Fujichrome Sensia 400

Bild 3: Konfokale Aufnahmen zeigten die perinukleäre Kolokalisation von pRS1 mit Microtubuli (d, gelb). Ein Vergleich der Abbildungen a) und b) bestätigte, dass die Microtubuli keinen engen Bezug zu den Vesikelpopulationen im Bereich der fokalen Adhäsionskontakte besaßen. Balken: 20 μ m. e) Ausschnittsvergrößerung aus dem Insert: Dargestellt ist die Zellmembran einer Zelle in hoher Vergrößerung. Es zeigten sich submembranäre, pRS1 tragende Vesikel, die teils mit Microtubuli kolokalisierten (leere Pfeilspitze) und sich teils in geringem Abstand von diesen (weiße Pfeilspitze) befanden.

konfokale Aufnahmen mit ZEISS LSM 510, Plan Apochromat 63x, Pinhole 110 μ m (3 a-d), 90 μ m (3 e).

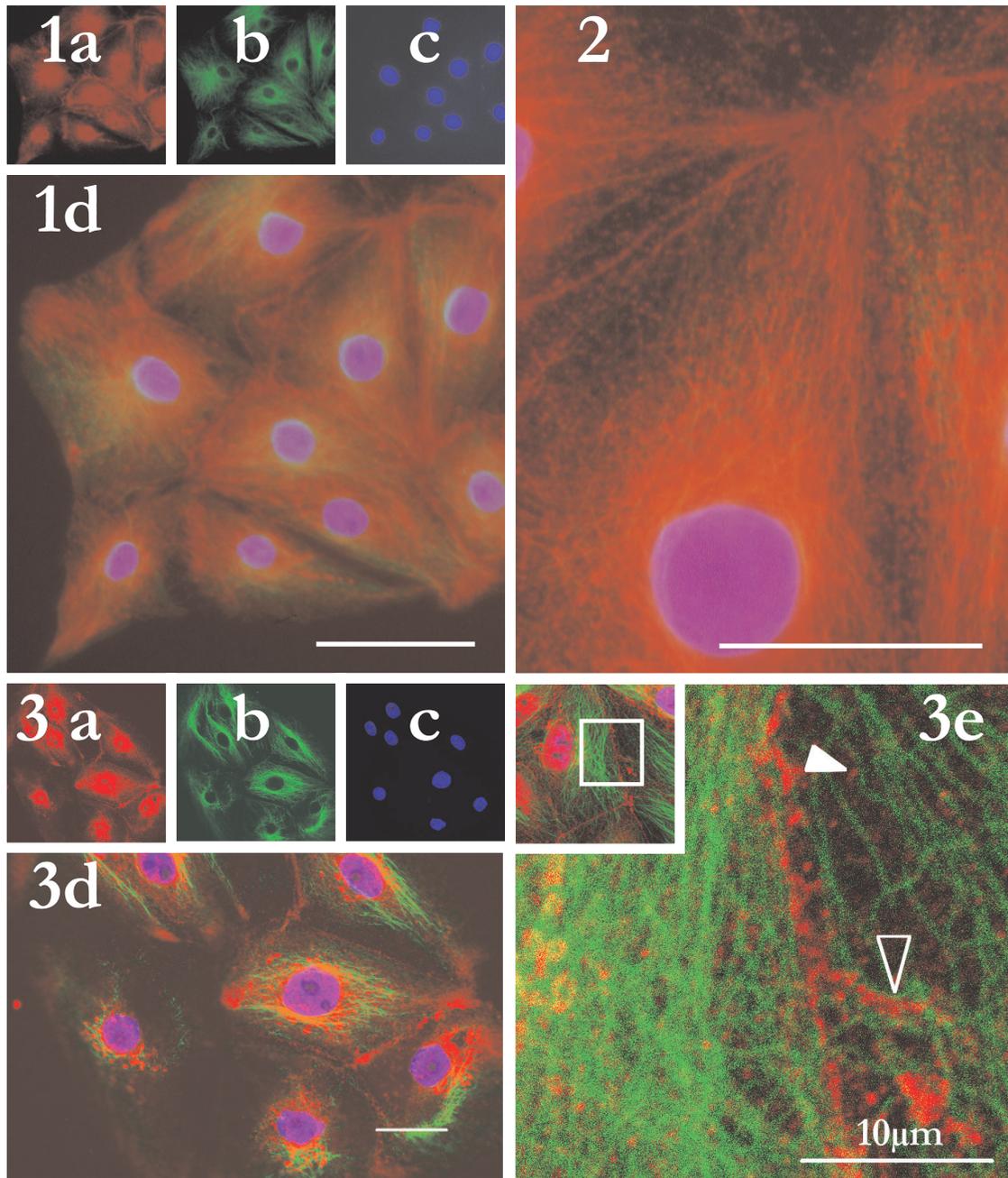


Abb. 6.5: pRS1 kolokalisiert perinukleär mit Microtubuli.

Abbildung 6.6

Die Verteilung von pRS1 in LLC-PK₁-Zellen zeigt Übereinstimmungen mit der von Clathrin

Mit einem monoklonalen Antikörper gegen bovines *Clathrin* wurde in diesen Versuchen eine eventuelle Kolokalisation von *pRS1* mit diesem Markerprotein des vesikulären Transports untersucht.

Bild 1: In konventionellen Aufnahmen (die kleinen Bilder zeigen ein anderes Präparat) erkannte man bereits in der Übersichtsvergrößerung eine deutliche Kodistribution von *pRS1* (rot) mit *Clathrin* (grün). Besonders auffällig war dabei eine apparente Kolokalisation im perinukleären Kompartiment. Balken: 20 µm

Aufnahmen mit ZEISS Axioplan 2, Plan Neofluar 40x, auf Fujichrome Sensia 400.

Bild 2: Die höhere Vergrößerung ließ dies ebenso erkennen, führte aber wegen der Signale aus unterschiedlichen Ebenen wenig weiter. Balken: 20 µm.

Aufnahmen mit ZEISS Axioplan 2, Plan Neofluar 100x, auf Fujichrome Sensia 400.

Bild 3: Konfokale Mikroskopie (a bis d) wies für *Clathrin* ein punktuelltes Muster an der Zellmembran nach (b, weiße Pfeilspitze), zudem aber demonstrierte sie insbesondere perinukleäre Kolokalisationen der beiden Zielproteine (b, leere Pfeilspitze), die gelb zur Darstellung kommen (d, leere Pfeilspitze). Man sieht auch, dass die *pRS1* tragenden Vesikel, die auf die "Ecken" zwischen mehreren Zellen zu zu laufen scheinen, teilweise mit *Clathrin* kolokalisieren (b, d, weißer Pfeil). e) zeigt, dass die *Clathrin coated vesicles* unmittelbar um den *pRS1*-positiven tubulovesikulären Apparat verteilt sind und teilweise mit ihm kolokalisieren (leere Pfeilspitze). An der Membran stellt sich *Clathrin* weniger kontinuierlich dar, als *pRS1* (weiße Pfeilspitze).

konfokale Aufnahmen mit ZEISS LSM 510, Plan Apochromat 63x, Pinhole 110 µm (a-d); e) mit Leica TCS SP2, Plan Apo 40x.

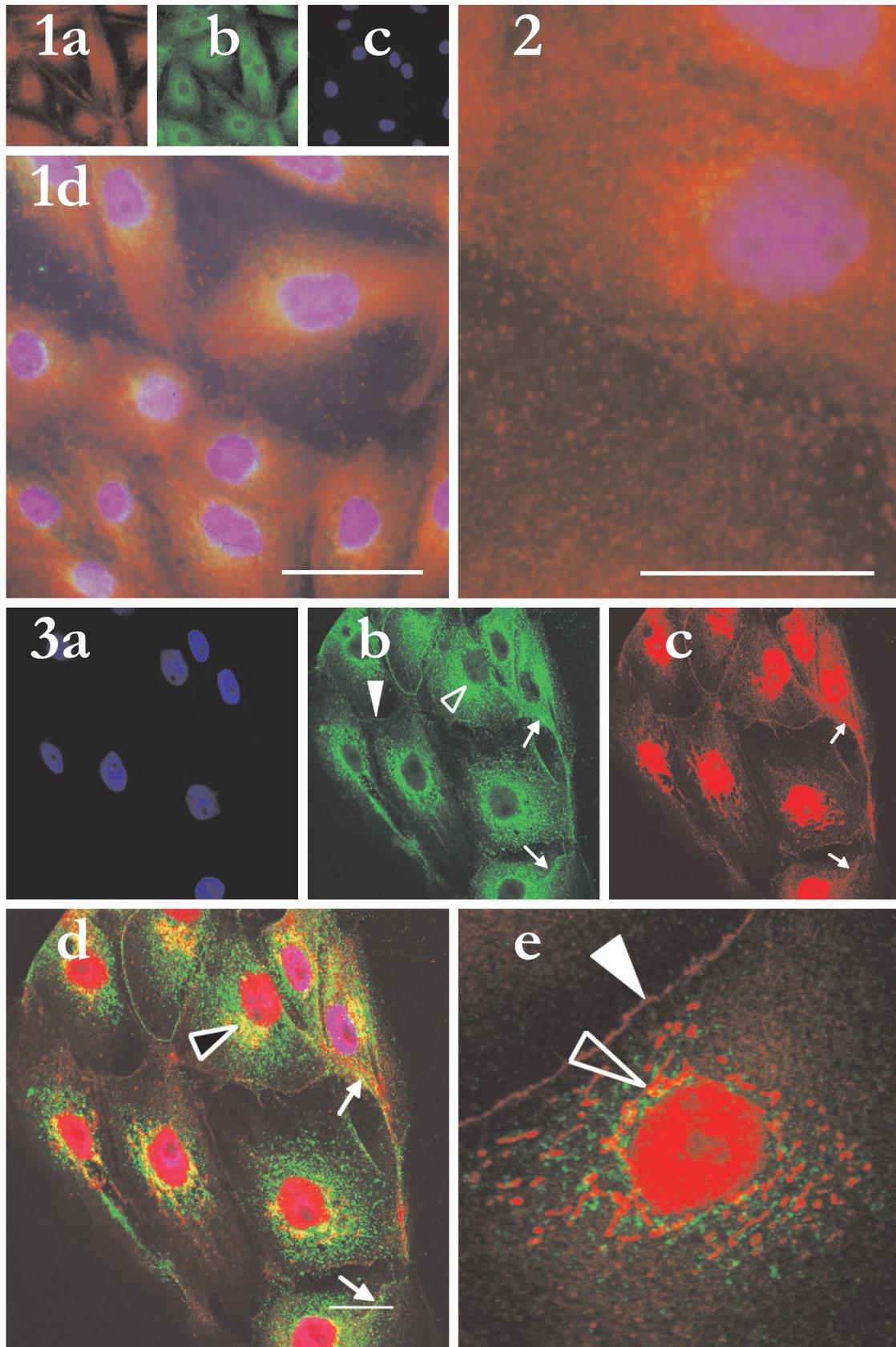


Abb. 6.6: Die Verteilung von pRS1 in LLC-PK₁-Zellen zeigt Übereinstimmungen mit der von Clathrin.

Abbildung 6.7

pRS1 kolokalisiert perinukleär mit Dynamin II

Der bei dieser Untersuchung angewandte Antikörper gegen humanes *Dynamin II* kreuzreagiert mit seinem Schweine-Orthologen in LLC-PK₁-Zellen. Es zeigte sich das in der Literatur beschriebene Verteilungsmuster (siehe Text) bereits deutlich in der konventionellen Übersichtsaufnahme.

Bild 1: Wie schon in Abbildung 6.6 mit *Clathrin*, ergab sich in der Auflichtmikroskopie der Hinweis auf eine Kolokalisation von *pRS1* (rot) mit *Dynamin II* (grün) besonders perinukleär. Balken: 20 µm

Aufnahmen mit ZEISS Axioplan 2, Plan Neofluar 40x, auf Fujichrome Sensia 400.

Bild 2: Trotz der mangelnden Tiefenschärfe im 100x-Ölimmersionsobjektiv, die sich besonders durch die diffuse Fluoreszenz von *Dynamin II* störend auswirkt, erschien eine Kolokalisation von *pRS1* und *Dynamin II* an intrazellulären Kompartimenten wahrscheinlich. Balken: 20 µm.

Aufnahmen mit ZEISS Axioplan 2, Plan Neofluar 100x, auf Fujichrome Sensia 400.

Bild 3: Konfokale Mikroskopie (a-c, siehe auch Abbildung 3.9, S. 44) zeigte ein deutliches perinukleäres Signal für *Dynamin II*, das mit *pRS1* kolokalisierte. Die Abbildung gibt sogar einen Saum von *Dynamin II* um die mit α *pRS1-Prot* markierten Tubulovesikel wieder (c, leere Pfeilspitze).

konfokale Aufnahmen mit Leica TCS SP2, Plan Apo 40x, Pinhole 110 µm.

pRS1 kolokalisiert mit TGN46

TGN46 ist ein Markerprotein des humanen *trans*-Golgi-Netzwerks. In der Abbildung grün wiedergegeben, zeigte es sich in HEK293-Zellen als perinukleäres tubulovesikuläres Kompartiment.

Bild 4: In dieser Übersichtsaufnahme sind mehrere Zellen dargestellt. Ihre Kerne färbten sich mäßig mit α *pRS1-Prot* an (a, weißer Pfeil). Deutlich wurde *pRS1* perinukleär dargestellt. In b) wurde das *trans*-Golgi-Netzwerk mit einem Antikörper gegen *TGN46* dargestellt (leere Pfeilspitze): Es zeigte sich im Wesentlichen ein Stapel perinukleärer Tubulovesikel, daneben eine leichte Färbung auch im Zytosol. Die Überlagerung (c, Kerne mit DAPI gefärbt) zeigte eine deutliche Kolokalisation von *pRS1* und *TGN46* in Kernnähe (leere Pfeilspitze). Balken: 20 µm

konfokale Aufnahmen mit ZEISS LSM 510, Plan Aplanochromat 63x, Pinhole 135 µm (a-d)

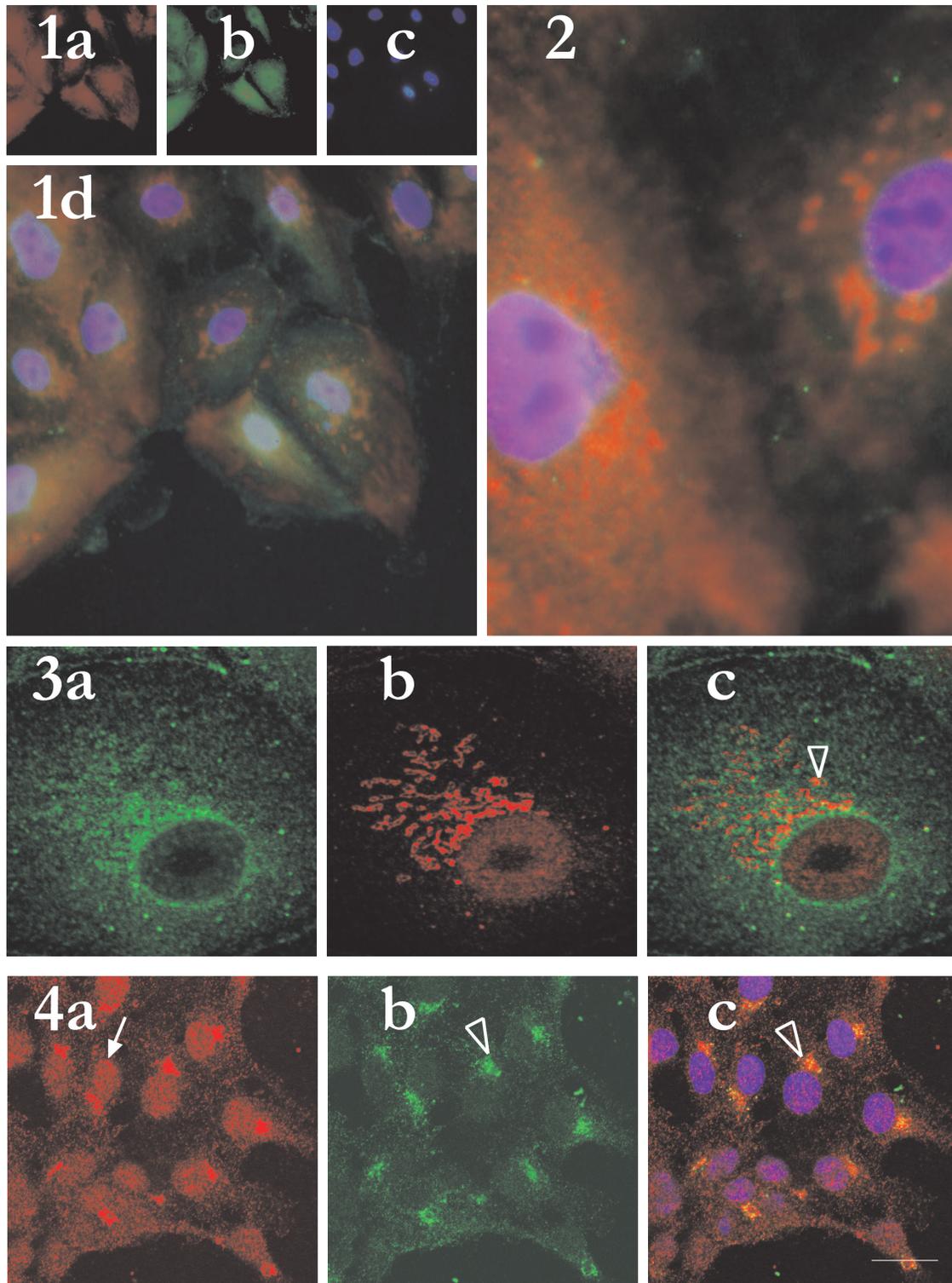


Abb. 6.7: pRS1 kolokalisiert perinukleär mit Dynamin (Bild 1-3) und TGN46 (Bild 4).

Abbildung 6.8

SGLT1 ist in Microtubulus-assoziierten Vesikeln und dem trans-Golgi-Netzwerk enthalten

Die Bilder befassen sich mit der Frage der subzellulären Lokalisation des *Natrium-D-Glucose-Kotransporter*. LLC-PK₁- und HEK293-Zellen wurden mit dem Antikörper *QIS30* gegen *SGLT1* (Dr. Helmut Kipp, Dortmund) inkubiert gefolgt von Ziege-anti-Kaninchen-F(ab')₂ gekoppelt an AlexaFluor 555. Anschließend wurden Microtubuli wie in Abbildung 6.5 beschrieben nachgewiesen.

Bild 1: LLC-PK₁-Zellen in subkonfluentem (a) und konfluentem (b) Zustand zeigten *SGLT1* in zahlreichen großen (Tubulo-) Vesikeln. Diese lagen in konfluenten Zellen sehr viel dichter und füllten das ganze Zytosol aus. Ähnlich verhielt es sich in subkonfluenten HEK293-Zellen (c): Wieder fanden sich zahlreiche *SGLT1* enthaltende Vesikel im Zytosol. Im Vergleich zwischen subkonfluenten Zellen (a und c) mit konfluenten Zellen in (b) ließ sich eine Vesikel-Population um den Zellkern subkonfluenten Zellen abgrenzen. Balken je 20 µm.

konfokale Aufnahmen mit ZEISS LSM 510, Plan Apochromat 63x, Pinhole 110 µm (a-c)

Bild 2: In diesem Versuch vollzog ich die Untersuchungen von Kipp et al. nach. Kipp et al. hatten gezeigt, dass die *SGLT1* (rot) enthaltenden Vesikel entlang von Microtubuli (grün) orientiert sind. Auch in meinen Untersuchungen waren sie an Microtubuli aufgereiht, was man auf Grund der flächenhafteren Ausbreitung des Zelltyps in LLC-PK₁-Zellen (a-c) besser erkennen konnte, als in HEK293-Zellen (d-f). Balken je 20 µm

konfokale Aufnahmen mit ZEISS LSM 510, Plan Apochromat 63x, Pinhole 135 µm (a-d), 140 µm (e-f).

Bild 3: In HEK293-Zellen stellte ich *TGN46* (grün) zusammen mit *SGLT1* (rot) dar. Es zeigte sich lediglich eine partielle Kolokalisation, die Mehrheit der *SGLT1* enthaltenden Tubulovesikel waren wahrscheinlich Endosomen. Zwar konnte ich in diesem Zelltyp keine gute Abgrenzung der Vesikelpopulationen treffen. Dennoch demonstrierte ich eine partielle Kolokalisation von *TGN46* und *pSGLT1*.

konfokale Aufnahmen mit ZEISS LSM 510, Plan Apochromat 63x, Pinhole 110 µm

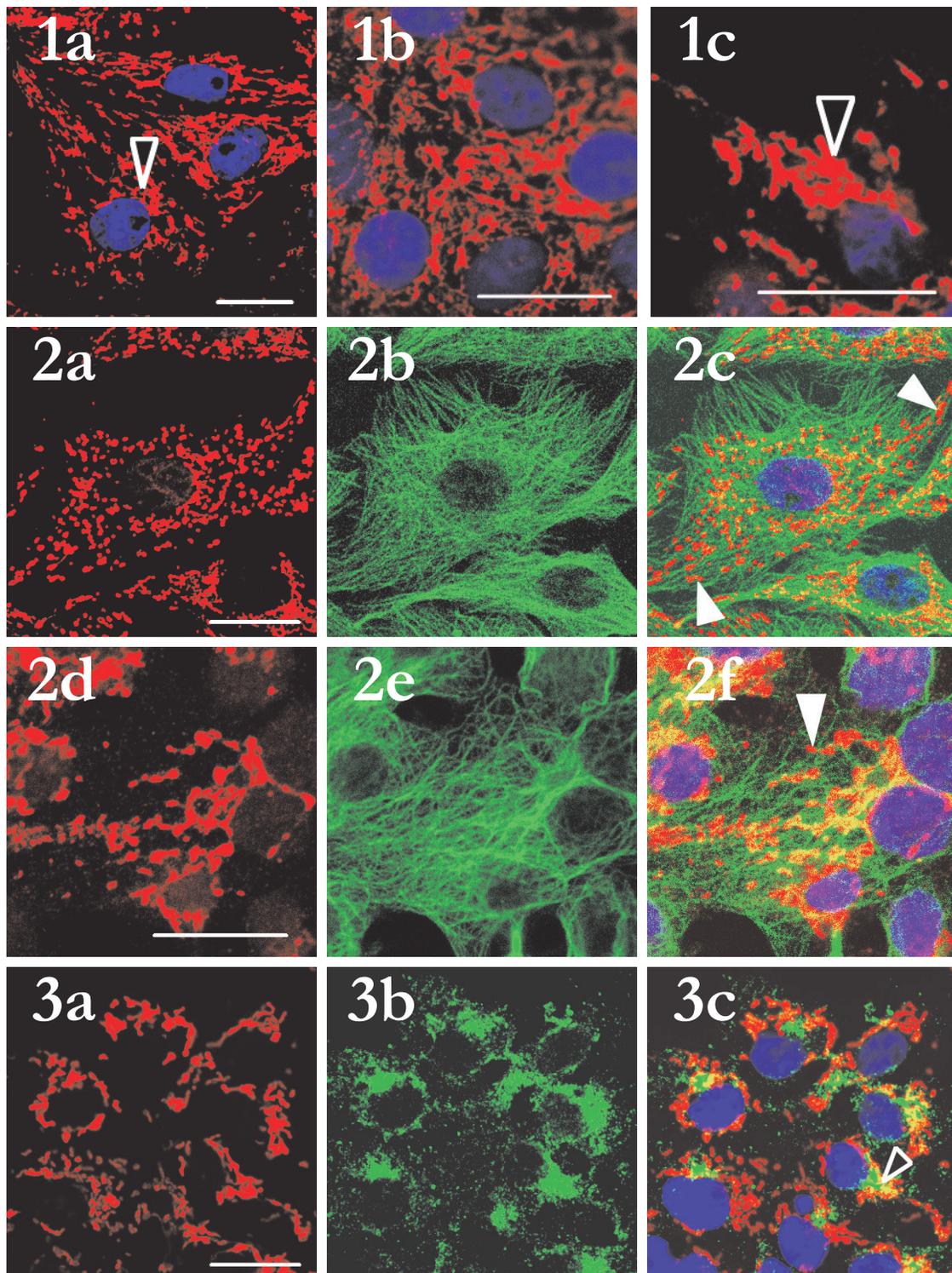


Abb. 6.8: SGLT1 ist in Microtubulus-assoziierten Vesikeln und dem trans-Golgi-Netzwerk enthalten.

Abbildung 6.9

SGLT1 kolokalisiert perinukleär mit Dynamin II aber nicht mit Clathrin

Frühere Experimente in *Xenopus*-Oozyten hatten demonstriert, dass die Herunterregulation von *SGLT1* auf der posttranskriptionalen Ebene durch dominant negatives *Dynamin* unterbunden wird. Daher untersuchte ich, ob *SGLT1* mit *Dynamin II* und/oder *Clathrin* perinukleär kolokalisiert.

Bild 1: Subkonfluente LLC-PK₁-Zellen wurden mit dem Antikörper *QIS30* gegen *SGLT1* (Sekundärantikörper: Ziege-anti-Kaninchen F(ab')₂-Fragment gekoppelt an AlexaFluor 555) und anschließend mit einem Antikörper gegen *Clathrin* inkubiert (Sekundärantikörper: Ziege-anti-Maus F(ab')₂-Fragment gekoppelt an Cy2). In der Überlagerung (c) zeigte sich eine allenfalls geringe perinukleäre Kolokalisation beider Proteine.

konfokale Aufnahmen mit ZEISS LSM 510, Plan Apochromat 63x, Pinhole 110 μm (a-c)

Bild 2: Subkonfluente LLC-PK₁-Zellen wurden mit dem Antikörper *QIS30* gegen *SGLT1* (a, rot, Sekundärantikörper: Ziege-anti-Kaninchen F(ab')₂-Fragment gekoppelt an AlexaFluor 555) und anschließend mit einem Antikörper gegen *Dynamin II* inkubiert (b, grün, Sekundärantikörper: Esel-anti-Ziege IgG gekoppelt an Cy2). Die Überlagerung (c) demonstrierte eine deutliche Kolokalisation von *SGLT1* mit *Dynamin II*, wobei eine genaue Zuordnung des *Dynamin II*-Signals zu individuellen *SGLT1* enthaltenden Tubulovesikeln nicht möglich war.

Diese Untersuchungen zeigen, dass *SGLT1* perinukleär in *Dynamin II* aber nicht *Clathrin* enthaltenden Kompartimenten vorkommt.

konfokale Aufnahmen mit ZEISS LSM 510, Plan Apochromat 63x, Pinhole 135 μm (a-d), 140 μm (e-f).

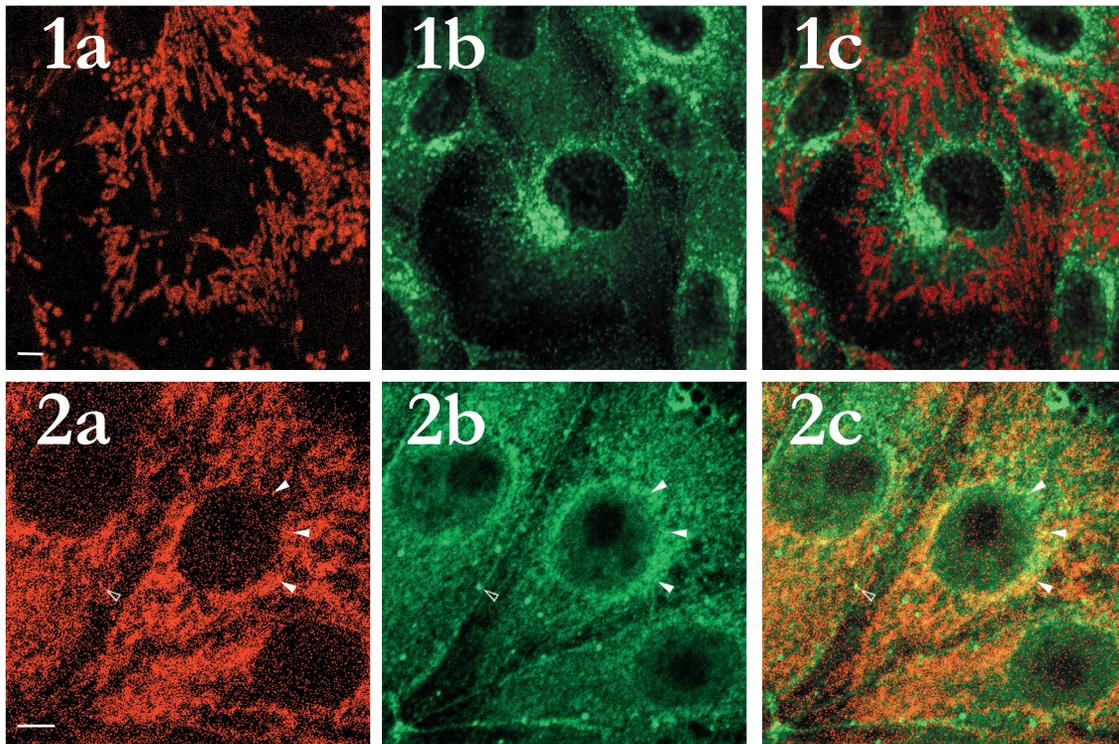


Abb. 6.10: SGLT1 kolokalisiert perinukleär mit Dynamin II aber nicht mit Clathrin

Abbildung 6.10

Hemmung des Proteasoms in konfluenten LLC-PK₁-Zellen ändert die Lokalisation von pRS1 und SGLT1

In konfluenten LLC-PK₁-Zellen untersuchte ich die Lokalisation von *pRS1* (Abbildung 1) und *pSGLT1* (Abbildungen 2 bis 5). Dazu ließ ich Wildtyp-Zellen (216 Stunden) und eine Zelllinie, in der durch eine *antisense*-Strategie die Menge von *pRS1* vermindert wurde (120 Stunden), zur Konfluenz wachsen, hemmte in den Abbildungen 1 bis 3 das Proteasom mit dem Inhibitor *MG132* in einer Konzentration von 10 µM für 24 Stunden, und wies *pRS1* bzw. *pSGLT1* immunfluoreszenzmikroskopisch nach.

Bild 1: Man erkannte in Wildtyp-LLC-PK₁-Zellen bei Hemmung des Proteasoms im Vergleich zu unbehandelten, konfluenten Zellen (Abbildung 6.3) eine deutliche Mengenerhöhung von *pRS1*. Es befand sich an der Plasmamembran (weiße Pfeilspitze), im Zytosol, im Zellkern sowie im *trans*-Golgi-Netzwerk perinukleär (leere Pfeilspitze). Ich stellte dort ein mehr vesikuläres als tubuläres Muster fest. Balken: 20 µm.

Bild 2: Die Hemmung des Proteasoms wirkte sich auch auf die Lokalisation von *pSGLT1* aus. Verglichen mit gleich lang gewachsenen konfluenten LLC-PK₁-Zellen, die vollständig mit SGLT1 enthaltenden Tubulovesikeln angefüllt waren (Bild 4), zeigten sich nach Hemmung des Proteasoms (Bild 2) nur mehr wenige dieser Vesikel in einem perinukleären Muster (leere Pfeilspitze). Balken: 20 µm

Bild 3: In *pRS1-antisense*-Zellen war dieser Effekt nicht zu beobachten. Verglichen mit derselben Zelllinie gleichen Alters (Bild 5) war in der Mehrzahl der Zellen auch bei Hemmung des Proteasoms kaum ein Unterschied festzustellen. Balken: 20 µm

Bild 4: Nachweis von *pSGLT1* in konfluenten Wildtyp-LLC-PK₁-Zellen: Es fanden sich, wie schon in Tafel 9, Bild 1b dargestellt, *pSGLT1* enthaltende Tubulovesikel im Überfluss.

Bild 5: Ein vergleichbares Muster zeigten auch konfluente *pRS1-antisense*-Zellen.

Diese Befunde stützen die Hypothese, dass die Regulation der Menge und Lokalisation von *SGLT1* durch proteasomalen Abbau von *RS1* erfolgt.

*konfokale Aufnahmen mit ZEISS LSM 510, Plan Achromat 63x, Pinhole 135 µm
(alle Bilder)*

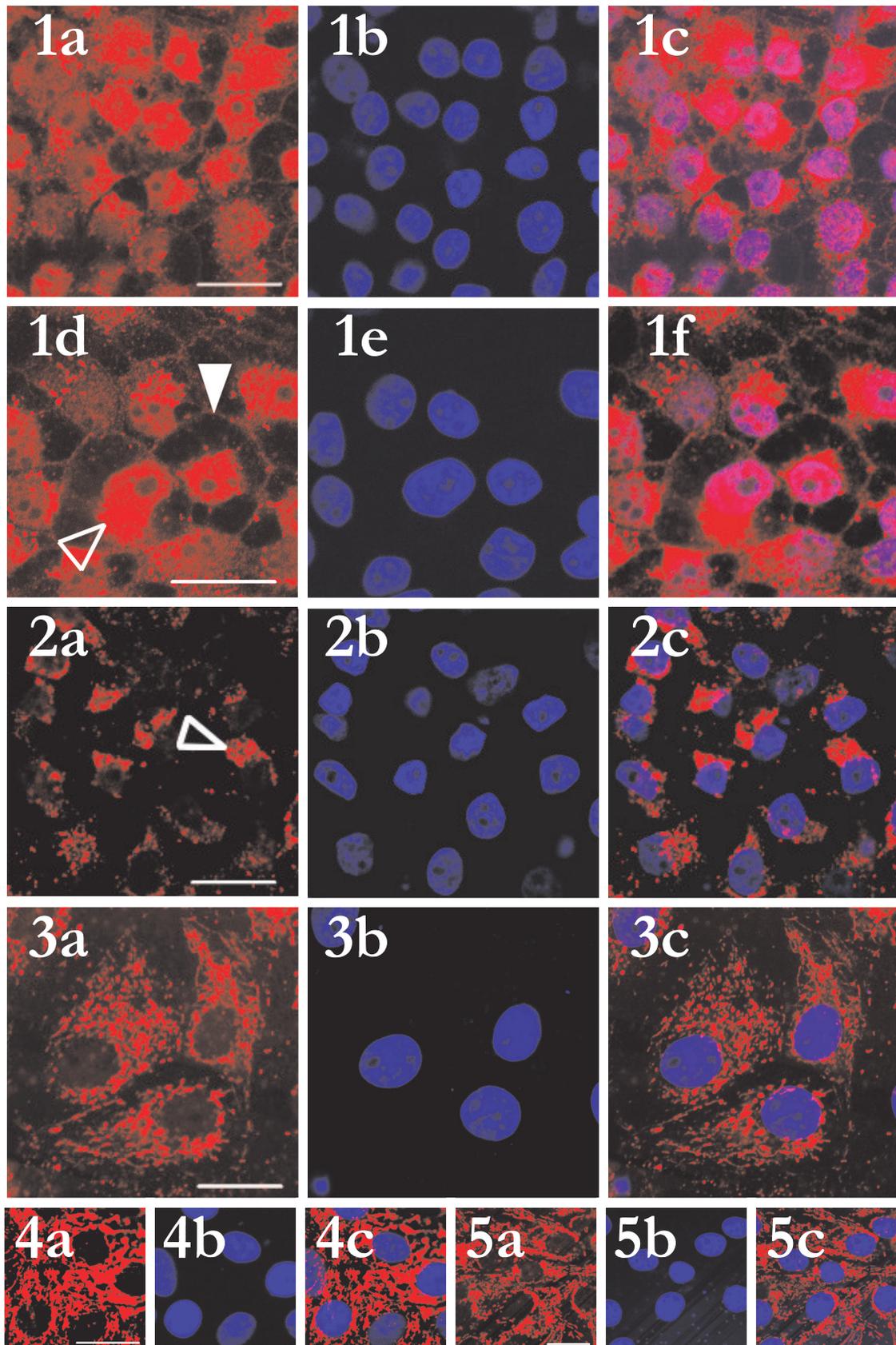


Abb. 6.10: Hemmung des Proteasoms in konfluenten LLC-PK₁-Zellen ändert die Lokalisation von pRS1 und SGLT1

7. ANHANG

Im folgenden Anhang sind einerseits zusätzliche technische Einzelheiten, andererseits vorläufige Ergebnisse zusammengestellt, die einer eingehenden weiteren Untersuchung bedürfen. Für den an der Reproduktion meiner Ergebnisse interessierten Leser können sie eine nützliche Quelle darstellen, der eilige Leser kann sie ohne Informationsverlust überschlagen.

7.1. *Qualitätssicherung in der Zellkultur*

Neben strikter Sterilität beim Arbeiten ist ein kontinuierliches Monitoring eventueller zytopathogener Kontaminationen in der Zellkultur unentbehrlich. Diese können nämlich subtile Änderungen von Metabolismus, Wachstum und Vermehrung sowie von Prozessen der Membrandynamik verursachen [138]. Während die Diagnose schwerer bakterieller Verunreinigungen am Phasenkonstrastmikroskop gelingt, stellt die Infektion mit zellwandlosen Erregern aus der Klasse der *Mollicutes* (unter anderem *Acholeplasma* und vor allem *Mycoplasma*) ein großes Problem dar, da trotz einer sorgfältigen Untersuchung von McGarrity [105] die Verbreitung dieser Organismen im Labor schwer zu kontrollieren ist. C.C. Uphoff von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), gibt die gegenwärtige Durchseuchung von Zellkulturen mit 15 bis 35% an [173]. In meiner Arbeit setzte ich daher den VenorGeM-PCR-Kit (Minerva-Biolabs, Berlin) ein, der die von Uphoff [172] aufgestellten Forderungen hinsichtlich Positiv- und Negativkontrollen erfüllt und einfach zu handhaben ist. Alle Kulturen wurden systematisch getestet, indem Proben von 500 µl des Nährmediums bei fast kompletter Konfluenz nach antibiotikafreier Kultivierung der Zellen gewonnen und durch kurzzeitiges Erhitzen im Wasserbad auf 100°C haltbar gemacht wurden. Die PCR selbst wurde in unserem Labor von Irina Schatz durchgeführt. Bei positivem Ausfall dekontaminierte ich die befallenen Kulturen mit dem Ten-

sid-Reagenz Mynox (Minerva-Biolabs, Berlin), das eine spezifische Permeabilisierung der Lipidumhüllung der Mykoplasmen bewirkt, die Zellen selbst aber nicht beeinflusst. Kritisch war dabei lediglich die sorgfältige Trypsinisierung der Kultur (vgl. Abschnitt „Kulturroutinen“, S. 25), die Vereinzelung der Zellen wurde am Phasenkontrastmikroskop überprüft. Das übrige Verfahren erfolgte entsprechend Herstelleranweisung.

7.2. Übersicht über die Reinigung der Antikörper gegen *pRS1*

Das rekombinant hergestellte und über eine Nickel-Agarose-Säule aufgereinigte *pRS1*-Protein und analog das synthetisch hergestellte Peptid wurden an SulfoLink-Säulen gekoppelt. Über diese Säulen wurden dann die aus den Kaninchen gewonnenen Antiseren aufgereinigt und durch einen Antikörper-ELISA die hochtitrigsten Fraktionen ermittelt.

Wie die Heterogenität des polyklonalen Antikörpers *α pRS1-Prot* erwarten lässt, zeigten sich flankierend zum eigentlichen Elutionsgipfel relativ hochtitrige Fraktionen; ich poolte daher vier Gipfelfraktionen von *α pRS1-Prot* gegenüber zweien für *α pRS1-Pept*. So war sichergestellt, dass weitgehend alle antigenen Domänen erkannt wurden.

Die Spezifität der selbst erzeugten Antikörper wurde im Western-Blot untersucht. Es stellt sich jeweils eine proteintypische Bande dar, die sich durch Vorinkubation mit dem jeweiligen antigenen Peptid oder Protein aufheben ließ (Abbildung 7.2, S. 94). Darüber hinaus ließ sie sich in der Immunfluoreszenz zeigen: Alle im Text beschriebenen Signale (siehe Abschnitt 3.1, S. 30) waren nach Vorinkubation des jeweiligen Antikörpers mit dem jeweiligen Antigen vollständig blockieren (siehe Abbildung 6.1, Bild e, S. 73, Abbildung 6.3, Bild 2 c, S. 77).

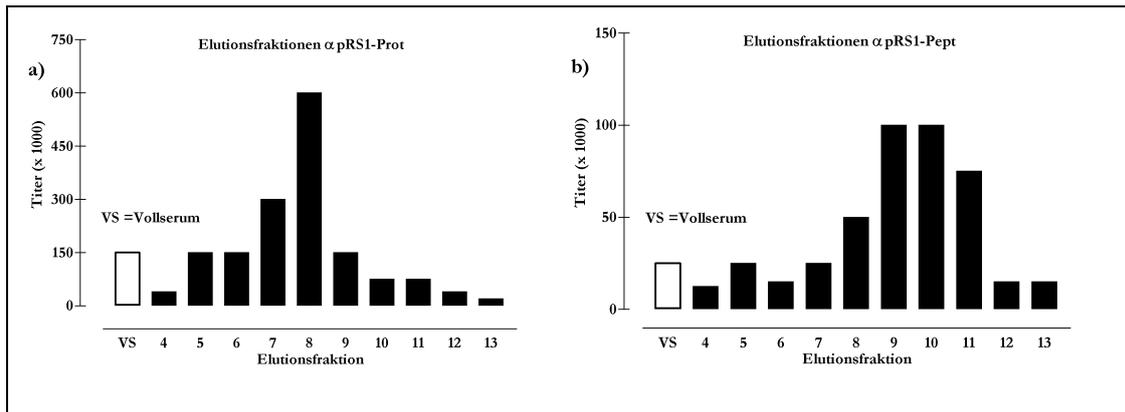


Abbildung 7.1: Verlauf der Antikörpertiter innerhalb der Aufreinigungen
a) $\alpha pRS1$ -Prot, b) $\alpha pRS1$ -Pept

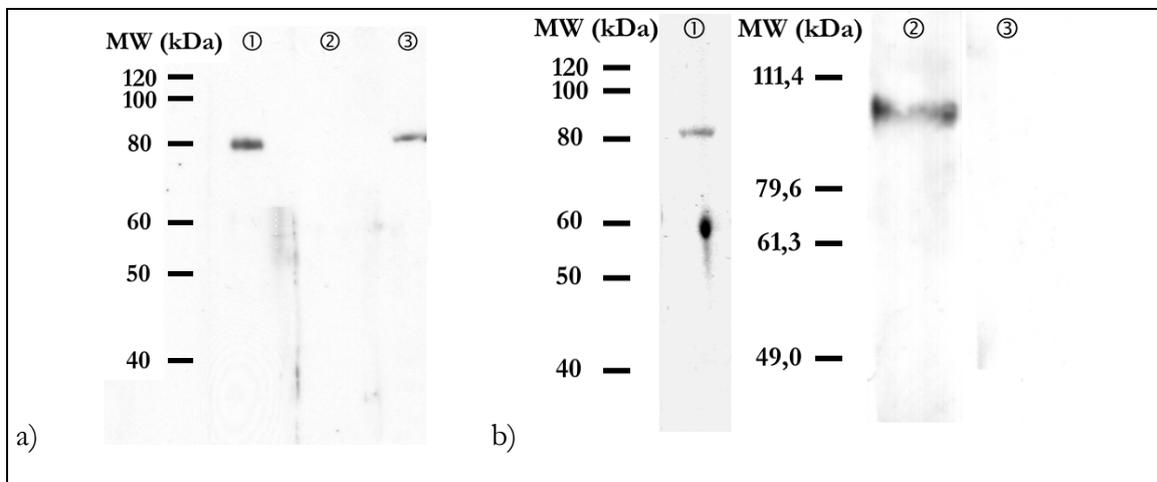


Abbildung 7.2 Die Antikörper $\alpha pRS1$ -Prot (a) und $\alpha pRS1$ -Pept (b) erkennen spezifisch rekombinantes *pRS1* und ein 80 kDa-Protein in Bürstensaummembranen (BBM) aus der Schweineiere

a) Je Spur wurden 6 ng rekombinantes *pRS1* (① und ②) bzw. 10 μ g Protein aus BBM (③) auf das Gel aufgetragen. Nach dem Blotting wurde die Nitrozellulose-Membran mit 1 ml 1:2000 verdünntem $\alpha pRS1$ -Prot inkubiert. Es zeigte sich ein Signal bei 80 kDa (① und ③), das sich durch Vorinkubation der Antikörperlösung mit 100 μ g rekombinatem *pRS1* für eine Stunde bei 37 blockieren ließ (②).

b) Die gleichen Mengen Protein aus BBM (①) bzw. rekombinantes *pRS1* (② und ③) wurden mit denselben Konzentrationen $\alpha pRS1$ -Pept untersucht. Auch dieser Antikörper erkannte ein 80 kDa-Protein in BBM ① und rekombinantes *pRS1* ②; das Signal ließ sich durch Vorinkubation mit 200 μ g Peptid-Lyophilisat blockieren (③). Das im Vergleich zu ① in ② und ③ beobachtete scheinbar größere Molekulargewicht von *pRS1* konnte auf Unterschiede im Laufverhalten der verwendeten Proteinstandards zurück geführt werden.

7.3. *Dynamin Ia^{K44A}-EGFP- und wtDynamin Ia-EGFP-Vektor*

Für funktionelle Untersuchungen der Lokalisation von *pRS1* in LLC-PK₁-Zellen verwendete ich eukaryotische Vektoren, die von Valentin Gorboulev in unserem Institut erzeugt wurden (im Folgenden mit *Dynamin Ia^{K44A}-EGFP* und *wtDynamin Ia-EGFP* abgekürzt). Sie erlauben die getrennte Transkription von *Dynamin* bzw. seiner dominant negativen Mutante und *EGFP* (*enhanced green fluorescent protein*), die die Detektion transfizierter Zellen durch ihrer Fluoreszenz lauben, ohne eventuelle funktionellen Nachteile eines Fusionsproteins in Kauf nehmen zu müssen.

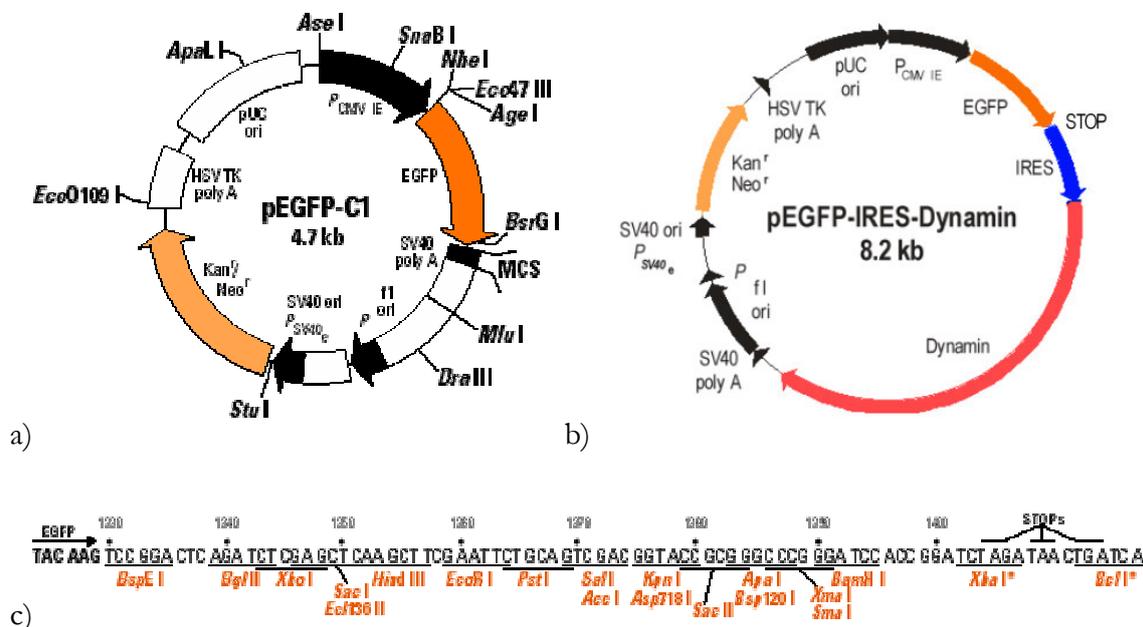


Abbildung 7.3 Schemazeichnung der Vektoren *DynaminIa^{K44A}-EGFP-* und *wtDynaminIa-EGFP*

Die Skizze a) zeigt den Vektor *pEGFP-C1*, in dessen *multiple cloning site* (MCS, c) an der Schnittstelle *BglII* ein Stopcodon für *EGFP* eingefügt wurde. In den zur Transfektion verwendeten Vektoren (b) schließt sich ein *internal ribosome entry site* („IRES“, blau) an, der die gesonderte Translation des folgenden Gens für *DynaminIa^{K44A}* bzw. *wtDynaminIa* („*Dynamin*“, rot) erlaubt. Somit konnten alle mit diesem Vektor transfizierten Zellen an Hand der EGFP-Fluoreszenz identifiziert werden.

Kurz dargestellt wurden dazu an der Multiple Cloning Site des Vektors *pEGFP-C1* (GenBank Accession Number U55763, BDBiosciences, Heidelberg) zwischen den Schnittstellen für *BglII* und *BamHI* ein Stop-Codon für *pEGFP*, ein *IRES* (*internal ribosome entry site*)-

Fragment (~560 bp) sowie Wildtyp-*Dynamain Ia* bzw. die *Dynamain Ia*^{K44A}-Mutante (3kb) aus der Ratte eingefügt. Die beiden *Dynamain*-Varianten wurden von Marc G. Caron (Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, MD, USA) im eukaryotischen *pCB1*-Expressionsvektor zur Verfügung gestellt [160]. Zusammenfassend ergibt sich das in Abbildung 7.3, S. 95 dargestellte Bild.

7.4. Untersuchungen mit dominant negativem *Dynamain Ia*

Da ich immunfluoreszenzmikroskopisch eine Kolokalisation von *pRS1* mit *Dynamain II* am *trans*-Golgi-Netzwerk fand (Abschnitt 3.4, S. 37), begann ich, in funktionellen Studien die Rolle von *Dynamain II* bei der Verteilung von *pRS1* zu untersuchen. Dazu wurden LLC-PK₁-Zellen vor (24 Stunden nach Kulturbeginn, Abbildung 7.4, Bild 1 a-c, S. 99) und nach Konfluenz (ca. 300 Stunden, ebd., Bild 1 d-f) transient mit dem Vektor *Dynamain Ia*^{K44A}-EGFP und dem Kontrollvektor (Wildtyp-*Dynamain Ia*, Abbildung 7.4, Abbildung 2, S. 99), transfiziert und anschließend die Verteilung von *pRS1* immunzytochemisch bestimmt. Die Mutation *Dynamain Ia*^{K44A} führt zum Verlust der GTP-Hydrolyse von *Dynamain* und entspricht äquivalenten Mutationen in der GTP bindenden Domäne von *ras* [56]. Diese und ähnliche *Dynamain*-Mutanten zeigen Alterationen der Endozytose in COS-7-Zellen [33], des Recyclings von GLUT4 in CHO-Zellen [118] und der Aufnahme des Gifts Ricin in den Golgi-Apparat von HeLa-Zellen [98]. Sie ähneln damit den zur Entdeckung von *Dynamain* führenden thermosensitiven *shibire*-Mutanten aus *Drosophila melanogaster*. Sofern also in LLC-PK₁-Zellen am *trans*-Golgi-Netzwerk oder der Zellmembran eine von *Dynamain* abhängige Abschnürung von *pRS1* stattfindet, sollte diese durch die *Dynamain Ia*^{K44A}-Mutante verändert werden.

Die entsprechenden immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ergaben jedoch ein anderes Bild: Weder nach Transfektion mit Wildtyp-*Dynamain* (Abbildung 7.4, Bild 2, S.

99), noch mit der dominant negativen Mutante (ebd., Bild 1) fand ich eine signifikante Änderung der Verteilung von *pRS1* gegenüber nicht transfizierten Zellen.

In ähnlichen Untersuchungen (nicht gezeigt) stellte ich *pSGLT1* in transient mit *Dynamin II^{K44A}* transfizierten LLC-PK₁-Zellen dar. Auch hier fand ich keine geänderte Lokalisation des Proteins.

Somit blieb einerseits unklar, ob die *Dynamin^{K44A}*-Mutante in LLC-PK₁-Zellen überhaupt dominant negativ wirkte. Dies müsste daher zunächst anhand einer in diesen Zellen zu validierenden Positivkontrolle gezeigt werden, da in Koexpressionsstudien in Xenopus-Oozyten überzeugend gezeigt wurde, dass die *RS1*-abhängige posttranslationale Regulation von *SGLT1* durch dominant negatives *Dynamin II* gehemmt wird [180]. Sollte eine Umverteilung von *pRS1* und/oder *pSGLT1* auch dann nicht zu zeigen sein, muss entweder in LLC-PK₁-Zellen ein Umgehungsmechanismus

Abbildung 7.4

Keine Änderung der Lokalisation von pRS1 durch dominant negatives Dynamin II

In dieser Versuchsanordnung wurden subkonfluente und konfluente LLC-PK₁-Zellen mit einem Vektor, der neben *EGFP* einen *Internal Ribosome Entry Site (IRES)* gefolgt von der dominant negativen Mutante *Dynamin I^{K44A}* (Bild 1) bzw. Wildtyp-*Dynamin Ia* (Bild 2) enthält, transient transfiziert (grün) und anschließend in der Immunfluoreszenz *pRS1* nachgewiesen. Die Aufnahmen wurden so gewählt, dass jeweils transfizierte neben nicht transfizierten Zellen zu liegen kamen.

Bild 1: Die transfizierten Zellen waren einschließlich ihrer Kerne mit *EGFP* markiert (a und d). Es zeigte sich in ihnen das schon aus früheren Versuchen bekannte Verteilungsmuster für *pRS1* in subkonfluenten (b) und konfluenten (e) Zellen. Balken: 20 µm. In c) ist ein submembranärer Ausschnitt aus b) gezeigt (Rahmen, Balken: 2,5 µm). Man erkannte mit der Membran in Verbindung stehende tubuläre Ausstülpungen, die ähnlich für dominant-negative *Dynamin I*-Mutanten beschrieben wurden (siehe Text). Allerdings waren sie nicht regelmäßig nachweisbar und kamen selten auch in nicht transfizierten Zellen vor (vgl. Tafel 5).

konfokale Aufnahmen mit ZEISS LSM 510, Plan Apochromat 63x, Pinhole 135 µm (a-f)

Bild 2: Als Kontrolle dienten mit Wildtyp-*Dynamin* transfizierte Zellen. Ich konnte auch bei sorgfältiger Untersuchung (vgl. Bild 2 mit Bild 1) keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung von *pRS1* finden.

Diese Befunde führen zunächst zu der Frage, ob *Dynamin I^{K44A}* in LLC-PK₁-Zellen überhaupt dominant negativ wirksam ist. Weitere Untersuchungen sind zur Klärung dieser Frage nötig.

konfokale Aufnahmen mit ZEISS LSM 510, Plan Apochromat 63x, Pinhole 135 µm.

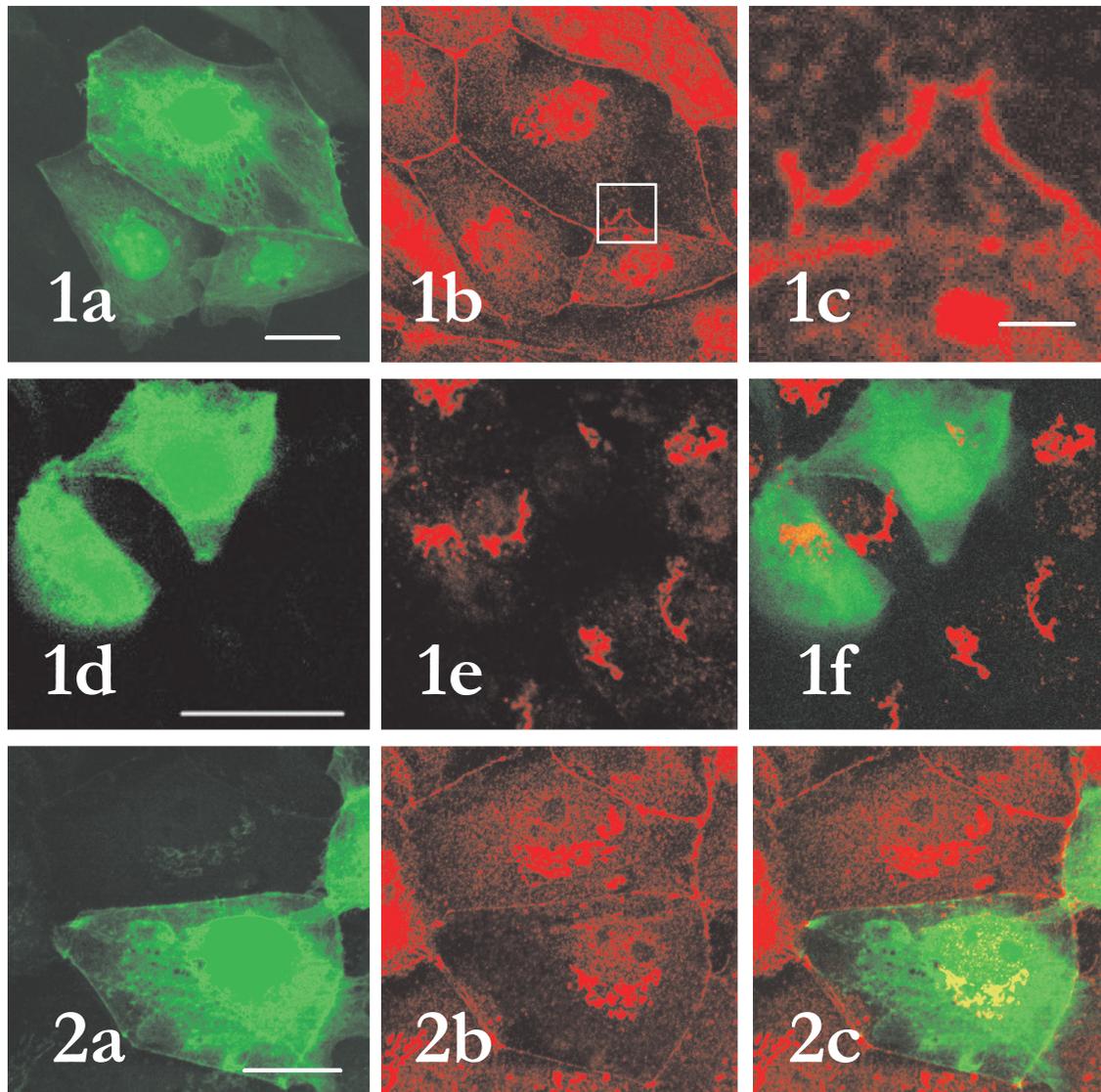


Abb. 7.4: Keine Änderung der Lokalisation von pRS1 durch dominant-negatives Dynamin.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, 2002: Molecular biology of the cell. 4 ed. New York: Garland Science
2. Allan VJ, 2000: Protein localization by fluorescence microscopy. New York: Oxford University Press
3. Amsler K, Cook JS, 1982: Development of Na⁺-dependent hexose transport in a cultured line of porcine kidney cells, *Am J Physiol* 242:C94-101
4. Amsler K, Cook JS, 1985: Linear relationship of phlorizin-binding capacity and hexose uptake during differentiation in a clone of LLC-PK1 cells, *J Cell Physiol* 122:254-258
5. Babst M, 2005: A Protein's Final ESCRT, *Traffic* 6:2-9
6. Banting G, Ponnambalam S, 1997: TGN38 and its orthologues: roles in post-TGN vesicle formation and maintenance of TGN morphology, *Biochim Biophys Acta* 1355:209-217
7. Barfull A, Garriga C, Tauler A, Planas JM, 2002: Regulation of SGLT1 expression in response to Na⁽⁺⁾ intake, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R738-R743
8. Baumeister W, Lupas A, 1997: The proteasome, *Curr Opin Struct Biol* 7:273-278
9. Baumgarten, K, 1999: Untersuchungen zu RS1, einem Regulator von Plasmamembranproteinen, Würzburg, Universität
10. Berger EG, Roth J, 1997: The Golgi apparatus. Basel; Boston: Birkhäuser
11. Bilodeau PS, Urbanowski JL, Winistorfer SC, Piper RC, 2002: The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting, *Nat Cell Biol* 4:534-539
12. Birk HW, Koepsell H, 1987: Reaction of monoclonal antibodies with plasma membrane proteins after binding on nitrocellulose: renaturation of antigenic sites and reduction of nonspecific antibody binding, *Anal Biochem* 164:12-22
13. Bissonnette P, Gagne H, Blais A, Berteloot A, 1996: 2-Deoxyglucose transport and metabolism in Caco-2 cells, *Am J Physiol* 270:G153-G162
14. Blais A, Bissonnette P, Berteloot A, 1987: Common characteristics for Na⁺-dependent sugar transport in Caco-2 cells and human fetal colon, *J Membr Biol* 99:113-125
15. Blanchoin L, Amann KJ, Higgs HN, Marchand JB, Kaiser DA, Pollard TD, 2000: Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins, *Nature* 404:1007-1011
16. Boman AL, 2001: GGA proteins: new players in the sorting game, *J Cell Sci* 114:3413-3418
17. Bonifacino JS, Traub LM, 2003: Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes, *Annu Rev Biochem* 72:395-447
18. Bradford MM, 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72:248-254
19. Brooks P, Fuertes G, Murray RZ, Bose S, Knecht E, Rechsteiner MC, Hendil KB, Tanaka K, Dyson J, Rivett J, 2000: Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells, *Biochem J* 346 Pt 1:155-61.:155-161
20. Brown D, Lydon J, McLaughlin M, Stuart-Tilley A, Tyszkowski R, Alper S, 1996: Antigen retrieval in cryostat tissue sections and cultured cells by treatment with sodium dodecyl sulfate (SDS), *Histochem Cell Biol* 105:261-267
21. Cao H, Garcia F, McNiven MA, 1998: Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells, *Mol Biol Cell* 9:2595-2609
22. Cao H, Thompson HM, Krueger EW, McNiven MA, 2000: Disruption of Golgi structure and function in mammalian cells expressing a mutant dynamin, *J Cell Sci* 113 (Pt 11):1993-2002
23. Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A, 1988: Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines, *Cancer Res* 48:1936-1942
24. Chatterjee A, Mahalanabis D, Jalan KN, Maitra TK, Agarwal SK, Bagchi DK, Indra S, 1977: Evaluation of a sucrose/electrolyte solution for oral rehydration in acute infantile diarrhoea, *Lancet* 1:1333-1335
25. Check E, 2002: Cell biology: will the real Golgi please stand up, *Nature* 416:780-781
26. Ciechanover A, 1998: The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life, *EMBO J* 17:7151-7160
27. Collins BM, Praefcke GJ, Robinson MS, Owen DJ, 2003: Structural basis for binding of accessory proteins by the appendage domain of GGAs, *Nat Struct Biol* 10:607-613
28. Collins BM, Watson PJ, Owen DJ, 2003: The structure of the GGA1-GAT domain reveals the molecular basis for ARF binding and membrane association of GGAs, *Dev Cell* 4:321-332
29. Cook TA, Urrutia R, McNiven MA, 1994: Identification of Dynamin 2, an Isoform Ubiquitously Expressed in Rat Tissues, *PNAS* 91:644-648

30. Cristillo AD, Nie L, Macri MJ, Bierer BE, 2003: Cloning and characterization of N4WBP5A, an inducible, cyclosporine-sensitive, Nedd4-binding protein in human T lymphocytes, *J Biol Chem* 278:34587-34597
31. Cross GA, 1990: Glycolipid anchoring of plasma membrane proteins, *Annu Rev Cell Biol* 6:1-39
32. Crump CM, Xiang Y, Thomas L, Gu F, Austin C, Tooze SA, Thomas G, 2001: PACS-1 binding to adaptors is required for acidic cluster motif-mediated protein traffic, *EMBO Journal* 20:2191-2201
33. Damke H, Baba T, Warnock DE, Schmid SL, 1994: Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation, *The Journal of Cell Biology* 127:915-934
34. Danner S, Lohse MJ, 1999: Regulation of beta-adrenergic receptor responsiveness modulation of receptor gene expression, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 136:183-223
35. Dawson WD, Cook JS, 1987: Parallel changes in amino acid transport and protein kinase C localization in LLC-PK1 cells treated with TPA or diacylglycerols, *J Cell Physiol* 132:104-110
36. DeBiasio R, Bright GR, Ernst LA, Waggoner AS, Taylor DL, 1987: Five-parameter fluorescence imaging: wound healing of living Swiss 3T3 cells, *J Cell Biol* 105:1613-1622
37. Delezay O, Baghdiguian S, Fantini J, 1995: The development of Na(+)-dependent glucose transport during differentiation of an intestinal epithelial cell clone is regulated by protein kinase C, *J Biol Chem* 270:12536-12541
38. Dieter M, Palmada M, Rajamanickam J, Aydin A, Busjahn A, Boehmer C, Luft FC, Lang F, 2004: Regulation of glucose transporter SGLT1 by ubiquitin ligase Nedd4-2 and kinases SGK1, SGK3, and PKB, *Obes Res* 12:862-870
39. Donaldson JG, Finazzi D, Klausner RD, 1992: Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein, *Nature* 360:350-352
40. Engvall E, Perlman P, 1971: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G, *Immunochemistry* 8:871-874
41. Ferguson SS, Downey WE, III, Colapietro AM, Barak LS, Menard L, Caron MG, 1996: Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization, *Science* 271:363-366
42. Ferraris RP, 2001: Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport, *Biochem J* 360:265-276
43. Firsov D, Schild L, Gautschi I, Merillat AM, Schneeberger E, Rossier BC, 1996: Cell surface expression of the epithelial Na channel and a mutant causing Liddle syndrome: a quantitative approach, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15370-15375
44. Fogh J, Wright WC, Loveless JD, 1977: Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors, *J Natl Cancer Inst* 58:209-214
45. Gaidarov I, Keen JH, 1999: Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits, *J Cell Biol* 146:755-764
46. Ghosh RN, Mallet WG, Soe TT, McGraw TE, Maxfield FR, 1998: An Endocytosed TGN38 Chimeric Protein Is Delivered to the TGN after Trafficking through the Endocytic Recycling Compartment in CHO Cells, *The Journal of Cell Biology* 142:923-936
47. Gomez-Mouton C, Abad JL, Mira E, Lacalle RA, Gallardo E, Jimenez-Baranda S, Illa I, Bernad A, Manes S, Martinez A, 2001: Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9642-9647
48. Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL, 1996: Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2- adrenergic receptor, *Nature* 383:447-450
49. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R, 1977: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *J Gen Virol* 36:59-74
50. Grenfell SJ, Trausch-Azar JS, Handley-Gearhart PM, Ciechanover A, Schwartz AL, 1994: Nuclear localization of the ubiquitin-activating enzyme, E1, is cell-cycle-dependent, *Biochem J* 300:701-708
51. Gstraunthaler G, Pfaller W, Kotanko P, 1985: Biochemical characterization of renal epithelial cell cultures (LLC-PK1 and MDCK), *Am J Physiol* 248:F536-F544
52. Harvey KF, Shearwin-Whyatt LM, Fotia A, Parton RG, Kumar S, 2002: N4WBP5, a potential target for ubiquitination by the Nedd4 family of proteins, is a novel Golgi-associated protein, *J Biol Chem* 277:9307-9317
53. Hayashi M, Saito Y, Kawashima S, 1992: Calpain activation is essential for membrane fusion of erythrocytes in the presence of exogenous Ca²⁺, *Biochem Biophys Res Commun* 182:939-946
54. Hediger MA, Coady MJ, Ikeda TS, Wright EM, 1987: Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co- transporter, *Nature* 330:379-381

55. Helmreich JM, 2001: The biochemistry of cell signalling. New York: Oxford University Press
56. Herskovits JS, Burgess CC, Obar RA, Vallee RB, 1993: Effects of mutant rat dynamin on endocytosis, *The Journal of Cell Biology* 122:565-578
57. Hicke L, 1997: Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins, *FASEB J* 11:1215-1226
58. Hicke L, 1999: Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels, *Trends Cell Biol* 9:107-112
59. Hicke L, Riezman H, 1996: Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis, *Cell* 84:277-287
60. Hicke L, Zanolari B, Riezman H, 1998: Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization, *J Cell Biol* 141:349-358
61. Hickinson DM, Lucocq JM, Towler MC, Clough S, James J, James SR, Downes CP, Pon-nambalam S, 1997: Association of a phosphatidylinositol-specific 3-kinase with a human trans-Golgi network resident protein, *Curr Biol* 7:987-990
62. Hinners I, Tooze SA, 2004: Changing directions: clathrin-mediated transport between the Golgi and endosomes, *J Cell Sci* 116:763-771
63. Hirsch DS, Stanley KT, Chen LX, Jacques KM, Puertollano R, Randazzo PA, 2003: Arf regulates interaction of GGA with mannose-6-phosphate receptor, *Traffic* 4:26-35
64. Hirsch JR, Loo DD, Wright EM, 1996: Regulation of Na⁺/glucose cotransporter expression by protein kinases in *Xenopus laevis* oocytes, *J Biol Chem* 271:14740-14746
65. Hirschhorn N, Kinzie JL, Sachar DB, Northrup RS, Taylor JO, Ahmad SZ, Phillips RA, 1968: Decrease in net stool output in cholera during intestinal perfusion with glucose-containing solutions, *N Engl J Med* 279:176-181
66. Hirst J, Robinson MS, 1998: Clathrin and adaptors, *Biochim Biophys Acta* 1404:173-193
67. Hochuli E, Dobeli H, Schacher A, 1987: New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues, *J Chromatogr* 411:177-184
68. Horiba N, Masuda S, Takeuchi A, Takeuchi D, Okuda M, Inui K, 2003: Cloning and Characterization of a Novel Na⁺-dependent Glucose Transporter (NaGLT1) in Rat Kidney, *J Biol Chem* 278:14669-14676
69. Hull RN, Cherry WR, Weaver GW, 1976: The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK, *In Vitro* 12:670-677
70. Jiang W, Prokopenko O, Wong L, Inouye M, Mirochnitchenko O, 2005: IRIP, a New Ischemia/Reperfusion-Inducible Protein That Participates in the Regulation of Transporter Activity, *Mol Cell Biol* 25:6496-6508
71. Jones SM, Howell KE, Henley JR, Cao H, McNiven MA, 1998: Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network, *Science* 279:573-577
72. Jost M, Simpson F, Kavran JM, Lemmon MA, Schmid SL, 1998: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation, *Curr Biol* 8:1399-1402
73. Kain R, Angata K, Kerjaschki D, Fukuda M, 1998: Molecular Cloning and Expression of a Novel Human trans-Golgi Network Glycoprotein, TGN51, That Contains Multiple Tyrosine-containing Motifs, *Journal of Biological Chemistry* 273:981-988
74. Karbach U, Kricke J, Meyer-Wentrup F, Gorboulev V, Volk C, Loffing-Cueni D, Kaissling B, Bachmann S, Koepsell H, 2000: Localization of organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney, *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F679-F687
75. Keller P, Toomre D, Diaz E, White J, Simons K, 2001: Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells, *Nat Cell Biol* 3:140-149
76. Khoursandi S, Scharlau D, Herter P, Kuhnen C, Martin D, Kinne RK, Kipp H, 2004: Different modes of sodium-D-glucose cotransporter-mediated D-glucose uptake regulation in Caco-2 cells, *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C1041-C1047
77. Kipp H, Khoursandi S, Scharlau D, Kinne RKH, 2003: More than apical: distribution of SGLT1 in Caco-2 cells, *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C737-C749
78. Kirchhausen T, 1999: Adaptors for clathrin-mediated traffic, *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:705-732
79. Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J, 1992: Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure, *J Cell Biol* 116:1071-1080
80. Knepper MA, Inoue T, 1997: Regulation of aquaporin-2 water channel trafficking by vasopressin, *Curr Opin Cell Biol* 9:560-564
81. Kong CT, Yet SF, Lever JE, 1993: Cloning and expression of a mammalian Na⁺/amino acid cotransporter with sequence similarity to Na⁺/glucose cotransporters, *J Biol Chem* 268:1509-1512
82. Korn T, Kuhlkamp T, Track C, Schatz I, Baumgarten K, Gorboulev V, Koepsell H, 2001: The plasma membrane-associated protein RS1 decreases transcription of the transporter SGLT1 in confluent LLC-PK1 cells, *J Biol Chem* 276:45330-45340

83. Krupnick JG, Benovic JL, 1998: The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:289-319
84. Kühlkamp,T, 2000: Der plasmamembranassoziierte Transportregulator RS1 bindet Ubiquitin und gelangt in den Zellkern, Würzburg, Universität
85. Kühlkamp,T, 2001: Der plasmamembranassoziierte Transportregulator RS1 bindet Ubiquitin und gelangt in den Zellkern, Würzburg, Univ.
86. Laemmli UK, 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227:680-685
87. Lalioti V, Vergarajauregui S, Sandoval IV, 2001: Targeting motifs in GLUT4 (review), *Mol Membr Biol*
88. Lamaze C, Fujimoto LM, Yin HL, Schmid SL, 1997: The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells, *J Biol Chem* 272:20332-20335
89. Lambotte S, Veyhl M, Kohler M, Morrison-Shetlar AI, Kinne RK, Schmid M, Koepsell H, 1996: The human gene of a protein that modifies Na(+)-D-glucose co-transport, *DNA Cell Biol* 15:769-777
90. Lasheras C, Scott JA, Rabito CA, 1988: Na+-sugar cotransport system as a polarization marker during organization of epithelial membrane, *Am J Physiol* 255:C745-C753
91. Le Borgne R, Hoflack B, 1998: Mechanisms of protein sorting and coat assembly: insights from the clathrin-coated vesicle pathway, *Curr Opin Cell Biol* 10:499-503
92. Le Borgne R, Hoflack B, 1998: Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells, *Biochim Biophys Acta* 1404:195-209
93. Lee WY, Loflin P, Clancey CJ, Peng H, Lever JE, 2000: Cyclic nucleotide regulation of Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) mRNA stability. Interaction of a nucleocytoplasmic protein with a regulatory domain in the 3'-untranslated region critical for stabilization, *J Biol Chem* 275:33998-34008
94. Li LV, Kandror KV, 2005: Golgi-Localized, {gamma}-Ear-Containing, Arf-Binding Protein Adaptors Mediate Insulin-Responsive Trafficking of Glucose Transporter 4 in 3T3-L1 Adipocytes, *Mol Endocrinol* 19:2145-2153
95. Liddle GW, Bledsoe T, Coppage WSJr, 1963: A familial renal disorder simulating primary aldosteronism but with negligible aldosterone secretion, *Trans Assoc Am Physicians* 76:199-213
96. Lippincott-Schwartz J, Yuan L, Tipper C, Amherdt M, Orci L, Klausner RD, 1991: Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic, *Cell* 67:601-616
97. Litchfield DW, 2003: Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death, *Biochem J* 369:1-15
98. Llorente A, Rapak A, Schmid SL, van Deurs B, Sandvig K, 1998: Expression of Mutant Dynamin Inhibits Toxicity and Transport of Endocytosed Ricin to the Golgi Apparatus, *The Journal of Cell Biology* 140:553-563
99. Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ, 1990: beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function, *Science* 248:1547-1550
100. Lui WW, Collins BM, Hirst J, Motley A, Millar C, Schu P, Owen DJ, Robinson MS, 2003: Binding partners for the COOH-terminal appendage domains of the GGAs and gamma-adaptin, *Mol Biol Cell* 14:2385-2398
101. Luzio JP, Brake B, Banting G, Howell KE, Braghetta P, Stanley KK, 1990: Identification, sequencing and expression of an integral membrane protein of the trans-Golgi network (TGN38), *Biochem J* 270:97-102
102. Mackenzie B, Panayotova-Heiermann M, Loo DD, Lever JE, Wright EM, 1994: SAAT1 is a low affinity Na⁺/glucose cotransporter and not an amino acid transporter. A reinterpretation, *J Biol Chem* 269:22488-22491
103. Mallard F, Antony C, Tenza D, Salamero J, Goud B, Johannes L, 1998: Direct Pathway from Early/Recycling Endosomes to the Golgi Apparatus Revealed through the Study of Shiga Toxin B-fragment Transport, *The Journal of Cell Biology* 143:973-990
104. Mallard F, Tang BL, Galli T, Tenza D, Saint-Pol A, Yue X, Antony C, Hong W, Goud B, Johannes L, 2002: Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform, *The Journal of Cell Biology* 156:653-664
105. McGarrity GJ, 1976: Spread and control of mycoplasmal infection of cell cultures, *In Vitro* 12:643-648
106. McMahon HT, Mills IG, 2004: COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches, *Current Opinion in Cell Biology* 16:379-391
107. McNiven MA, Cao H, Pitts KR, Yoon Y, 2000: The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places, *Trends Biochem Sci* 25:115-120
108. Meyer-Wentrup,F, 1999: Erzeugung eines polyklonalen Antikörpers zur Untersuchung der Membrantopologie und Lokalisation des Transpor-

- ters für organische Kationen, rOCT1, Würzburg, Universität
109. Miller GJ, Mattera R, Bonifacino JS, Hurley JH, 2003: Recognition of accessory protein motifs by the gamma-adaptin ear domain of GGA3, *Nat Struct Biol* 10:599-606
 110. Mitchell P, 1963: Molecule, group and electron translocation through natural membranes, *Biochem Soc Symp* 22:142-169
 111. Moran A, Turner RJ, Handler JS, 1983: Regulation of sodium-coupled glucose transport by glucose in a cultured epithelium, *J Biol Chem* 258:15087-15090
 112. Moran A, Turner RJ, Handler JS, 1984: Hexose regulation of sodium-hexose transport in LLC-PK1 epithelia: the nature of the signal, *J Membr Biol* 82:59-65
 113. Mullin JM, Weibel J, Diamond L, Kleinzeller A, 1980: Sugar transport in the LLC-PK1 renal epithelial cell line: similarity to mammalian kidney and the influence of cell density, *J Cell Physiol* 104:375-389
 114. Munn AL, 2001: Molecular requirements for the internalisation step of endocytosis: insights from yeast, *Biochim Biophys Acta* 1535:236-257
 115. National Institutes of Health, 2003: BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>
 116. Nielsen MS, Madsen P, Christensen EI, Nykjaer A, Gliemann J, Kasper D, Pohlmann R, Petersen CM, 2001: The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein, *EMBO J* 20:2180-2190
 117. Ohta T, Isselbacher KJ, Rhoads DB, 1990: Regulation of glucose transporters in LLC-PK1 cells: effects of D- glucose and monosaccharides, *Mol Cell Biol* 10:6491-6499
 118. Omata W, Shibata H, Suzuki Y, Tanaka S, Suzuki T, Takata K, Kojima I, 1997: Subcellular Distribution of GLUT4 in Chinese Hamster Ovary Cells Overexpressing Mutant Dynamin: Evidence That Dynamin Is a Regulatory GTPase in GLUT4 Endocytosis, *Biochem Biophys Res Commun* 241:401-406
 119. Organisation for economic co-operation and development, 2002: OECD Principles of Good Laboratory Practice, <http://www.oecd.org/EN/document/0,,EN-document-526-14-no-27-6553-526,00.html>
 120. Osswald, C, 2004: Fettsucht mit erhöhter D-Glukose-Absorption im Dünndarm durch Inaktivierung des Regulatorproteins RS1 bei Mäusen, Würzburg, Universität
 121. Patterson GH, Lippincott-Schwartz J, 2002: A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells, *Science* 297:1873-1877
 122. Peng H, Lever JE, 1995: Post-transcriptional regulation of Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) gene expression in LLC-PK1 cells. Increased message stability after cyclic AMP elevation or differentiation inducer treatment, *J Biol Chem* 270:20536-20542
 123. Peng H, Lever JE, 1995: Regulation of Na⁽⁺⁾-coupled glucose transport in LLC-PK1 cells. Message stabilization induced by cyclic AMP elevation is accompanied by binding of a M(r) = 48,000 protein to a uridine-rich domain in the 3'- untranslated region, *J Biol Chem* 270:23996-24003
 124. Perantoni A, Berman JJ, 1979: Properties of Wilms' tumor line (TuWi) and pig kidney line (LLC-PK1) typical of normal kidney tubular epithelium, *In Vitro* 15:446-454
 125. Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA, 1994: Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm, *Journal of Biological Chemistry* 269:7709-7718
 126. Pierini LM, Maxfield FR, 2001: Flotillas of lipid rafts fore and aft, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9471-9473
 127. Ploug T, van Deurs B, Ai H, Cushman SW, Ralston E, 1998: Analysis of GLUT4 distribution in whole skeletal muscle fibers: identification of distinct storage compartments that are recruited by insulin and muscle contractions, *J Cell Biol* 142:1429-1446
 128. Rabito CA, Ausiello DA, 1980: Na⁺-dependent sugar transport in a cultured epithelial cell line from pig kidney, *J Membr Biol* 54:31-38
 129. Reaves BJ, Roquemore EP, Luzio JP, Banting G, 1998: TGN38 cycles via the basolateral membrane of polarized Caco-2 cells, *Mol Membr Biol* 15:133-139
 130. Reggiori F, Pelham HR, 2002: A transmembrane ubiquitin ligase required to sort membrane proteins into multivesicular bodies, *Nat Cell Biol* 4:117-123
 131. Reinhardt J, Veyhl M, Wagner K, Gambaryan S, Dekel C, Akhoundova A, Korn T, Koepsell H, 1999: Cloning and characterization of the transport modifier RS1 from rabbit which was previously assumed to be specific for Na⁺-D-glucose cotransport, *Biochim Biophys Acta* 1417:131-143
 132. Reits EAJ, Benham AM, Plougastel B, Neefjes J, Trowsdale J, 1997: Dynamics of proteasome distribution in living cells, *The EMBO Journal* 16:6087-6094

133. Riezman H, Munn A, Geli MI, Hicke L, 1996: Actin-, myosin- and ubiquitin-dependent endocytosis, *Experientia* 52:1033-1041
134. Robinson MS, Kreis TE, 1992: Recruitment of coat proteins onto Golgi membranes in intact and permeabilized cells: Effects of brefeldin A and G protein activators, *Cell* 69:129-138
135. Rohn WM, Rouille Y, Waguri S, Hoflack B, 2000: Bi-directional trafficking between the trans-Golgi network and the endosomal/lysosomal system, *J Cell Sci* 113 (Pt 12):2093-2101
136. Rohrer J, Kornfeld R, 2001: Lysosomal Hydrolase Mannose 6-Phosphate Uncovering Enzyme Resides in the trans-Golgi Network, *Mol Biol Cell* 12:1623-1631
137. Rotin D, Kanelis V, Schild L, 2001: Trafficking and cell surface stability of ENaC, *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F391-F399
138. Rottem S, Barile MF, 1993: Beware of mycoplasmas, *Trends Biotechnol* 11:143-151
139. Rousset M, 1986: The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation, *Biochimie* 68:1035-1040
140. Rozelle AL, Machesky LM, Yamamoto M, Driessens MH, Insall RH, Roth MG, Luby-Phelps K, Marriott G, Hall A, Yin HL, 2000: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3, *Curr Biol* 10:311-320
141. Rudolph SA, Kuhn JE, Korn K, Braun RW, Jahn G, 1990: Prokaryotic expression of the major capsid protein of human cytomegalovirus and antigenic cross-reactions with herpes simplex virus type 1, *J Gen Virol* 71 (Pt 9):2023-2031
142. Russell SJ, Steger KA, Johnston SA, 1999: Subcellular Localization, Stoichiometry, and Protein Levels of 26 S Proteasome Subunits in Yeast, *Journal of Biological Chemistry* 274:21943-21952
143. Saito Y, Tsubuki S, Ito H, Kawashima S, 1992: Isolation and characterization of possible target proteins responsible for neurite outgrowth induced by a tripeptide aldehyde in PC12H cells, *Biochem Biophys Res Commun* 184:419-426
144. Sannerud R, Saraste J, Goud B, 2003: Retrograde traffic in the biosynthetic-secretory route: pathways and machinery, *Current Opinion in Cell Biology* 15:438-445
145. Schmid SL, 1997: Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process, *Annu Rev Biochem* 66:511-548
146. Schoner RG, Ellis LF, Schoner BE, 1992: Isolation and purification of protein granules from *Escherichia coli* cells overproducing bovine growth hormone. 1985, *Biotechnology* 24:349-352
147. Selinsky BS, 1992: Protein-lipid interactions and membrane function. In: Yeagle P, editor. *The structure of biological membranes*. London: CRC Press. p 603-651
148. Sever S, Damke H, Schmid SL, 2000: Gargates, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test, *Traffic* 1:385-392
149. Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL, 2002: Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells, *FASEB J* 16:869-871
150. Sheppard CJR, 1999: *Confocal Microscopy - Principles, Practice and Options*. In: Mason WT, editor. *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Chemistry*. London: Academic Press. p 303-309
151. Shewan AM, van Dam EM, Martin S, Luen TB, Hong W, Bryant NJ, James DE, 2003: GLUT4 recycles via a trans-Golgi network (TGN) subdomain enriched in Syntaxins 6 and 16 but not TGN38: involvement of an acidic targeting motif, *Mol Biol Cell* 14:973-986
152. Shih SC, Sloper-Mould KE, Hicke L, 2000: Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors, *EMBO J* 19:187-198
153. Shimkets RA, Lifton RP, Canessa CM, 1997: The activity of the epithelial sodium channel is regulated by clathrin-mediated endocytosis, *J Biol Chem* 272:25537-25541
154. Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, Gill JR, Jr., Ulick S, Milora RV, Findling JW, ., 1994: Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel, *Cell* 79:407-414
155. Shioda T, Ohta T, Isselbacher KJ, Rhoads DB, 1994: Differentiation-dependent expression of the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) in LLC-PK1 cells: role of protein kinase C activation and ongoing transcription, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11919-11923
156. Shirazi-Beechey SP, Hirayama BA, Wang Y, Scott D, Smith MW, Wright EM, 1991: Ontogenic development of lamb intestinal sodium-glucose cotransporter is regulated by diet, *J Physiol* 437:699-708
157. Simons K, Ikonen E, 1997: Functional rafts in cell membranes, *Nature* 387:569-572
158. Singer SJ, Nicolson GL, 1972: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* 175:720-731
159. Small J, Rottner K, Hahne P, Anderson KI, 1999: Visualising the actin cytoskeleton, *Microsc Res Tech* 47:3-17

160. Sontag JM, Fykse EM, Ushkaryov Y, Liu JP, Robinson PJ, Sudhof TC, 1994: Differential expression and regulation of multiple dynamins, *J Biol Chem* 269:4547-4554
161. Staines WA, Meister B, Melander T, Nagy JI, Hokfelt T, 1988: Three-color immunofluorescence histochemistry allowing triple labeling within a single section, *J Histochem Cytochem* 36:145-151
162. Staub O, Dho S, Henry P, Correa J, Ishikawa T, McGlade J, Rotin D, 1996: WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome, *EMBO J* 15:2371-2380
163. Staub O, Gautschi I, Ishikawa T, Breitschopf K, Ciechanover A, Schild L, Rotin D, 1997: Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination, *EMBO J* 16:6325-6336
164. Stephen AG, Trausch-Azar JS, Ciechanover A, Schwartz AL, 1996: The Ubiquitin-activating Enzyme E1 Is Phosphorylated and Localized to the Nucleus in a Cell Cycle-dependent Manner, *Journal of Biological Chemistry* 271:15608-15614
165. Stoorvogel W, Oorschot V, Geuze HJ, 1996: A novel class of clathrin-coated vesicles budding from endosomes, *J Cell Biol* 132:21-33
166. Takatsu H, Katoh Y, Shiba Y, Nakayama K, 2001: Golgi-localizing, gamma-adaptin ear homology domain, ADP-ribosylation factor-binding (GGA) proteins interact with acidic dileucine sequences within the cytoplasmic domains of sorting receptors through their Vps27p/Hrs/STAM (VHS) domains., *J Biol Chem* 276:28541-28545
167. Terrell J, Shih S, Dunn R, Hicke L, 1998: A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor, *Mol Cell* 1:193-202
168. Thompson BJ, Mathieu J, Sung HH, Loeser E, Rorth P, Cohen SM, 2005: Tumor Suppressor Properties of the ESCRT-II Complex Component Vps25 in *Drosophila*, *Dev Cell* 9:711-720
169. Thyberg J, Moskalewski S, 1985: Microtubules and the organization of the Golgi complex, *Exp Cell Res* 159:1-16
170. Thyberg J, Moskalewski S, 1999: Role of microtubules in the organization of the Golgi complex, *Exp Cell Res* 246:263-279
171. Turk E, Zabel B, Mundlos S, Dyer J, Wright EM, 1991: Glucose/galactose malabsorption caused by a defect in the Na⁺/glucose cotransporter, *Nature* 350:354-356
172. Uphoff CC, Drexler HG, 1999: Detection of mycoplasma contaminations in cell cultures by PCR analysis, *Hum Cell* 12:229-236
173. Uphoff CC, Drexler HG, 2002: Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines, *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 38:79-85
174. Valentin M, 1998: Untersuchungen zur Funktion des Na⁺-D-Glucose-Kotransporters SGLT1: Lokalisation in der Leber und Charakterisierung des regulierenden Proteins RS1, Würzburg, Universität
175. Valentin M, Kuhlkamp T, Wagner K, Krohne G, Arndt P, Baumgarten K, Weber W, Segal A, Veyhl M, Koepsell H, 2000: The transport modifier RS1 is localized at the inner side of the plasma membrane and changes membrane capacitance, *Biochim Biophys Acta* 1468:367-380
176. van Dam EM, Stoorvogel W, 2002: Dynamin-dependent transferrin receptor recycling by endosome-derived clathrin-coated vesicles, *Mol Biol Cell* 13:169-182
177. van Dam EM, Ten Broeke T, Jansen K, Spijkers P, Stoorvogel W, 2002: Endocytosed transferrin receptors recycle via distinct dynamin and PI 3-kinase dependent pathways, *J Biol Chem*
178. Vetterlein M, Ellinger A, Neumüller J, Pavelka M, 2002: Golgi apparatus and TGN during endocytosis, *Histochem Cell Biol* 117:143-150
179. Veyhl M, Spangenberg J, Puschel B, Poppe R, Dekel C, Fritzsche G, Haase W, Koepsell H, 1993: Cloning of a membrane-associated protein which modifies activity and properties of the Na⁽⁺⁾-D-glucose cotransporter, *J Biol Chem* 268:25041-25053
180. Veyhl M, Wagner CA, Gorboulev V, Schmitt BM, Lang F, Koepsell H, 2003: Downregulation of the Na⁽⁺⁾-D-glucose cotransporter SGLT1 by protein RS1 (RSC1A1) is dependent on dynamin and protein kinase C, *J Membr Biol* 196:71-81
181. Wagman AS, Nuss JM, 2001: Current therapies and emerging targets for the treatment of diabetes, *Curr Pharm Des* 7:417-450
182. Watson RT, Pessin JE, 2001: Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation, *Recent Prog Horm Res* 56:175-193
183. Wessendorf MW, Appel NM, Molitor TW, Elde RP, 1990: A method for immunofluorescent demonstration of three coexisting neurotransmitters in rat brain and spinal cord, using the fluorophores fluorescein, lissamine rhodamine, and 7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid, *J Histochem Cytochem* 38:1859-1877
184. Wong SH, Hong W, 1993: The SXYQRL sequence in the cytoplasmic domain of TGN38 plays a major role in trans-Golgi network localization, *Journal of Biological Chemistry* 268:22853-22862
185. Wu JS, Lever JE, 1989: Developmentally regulated 75-kilodalton protein expressed in LLC-PK1 cultures is a component of the renal Na⁺/glucose cotransport system, *J Cell Biochem* 40:83-89

186. Yasuda H, Kurokawa T, Fujii Y, Yamashita A, Ishibashi S, 1990: Decreased D-glucose transport across renal brush-border membrane vesicles from streptozotocin-induced diabetic rats, *Biochim Biophys Acta* 1021:114-118
187. Yet SF, Kong CT, Peng H, Lever JE, 1994: Regulation of Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) mRNA in LLC-PK1 cells, *J Cell Physiol* 158:506-512
188. Zhang C, Vilk G, Canton DA, Litchfield DW, 2002: Phosphorylation regulates the stability of the regulatory CK2beta subunit, *Oncogene* 21:3754-3764

DANKSAGUNG

Ich danke

- Professor Dr. Hermann Koepsell für die intensive Betreuung dieser Arbeit und die Möglichkeit, selbständig ein eigenes Gebiet zu erarbeiten.
- Professor Dr. Manfred Scharl für die Übernahme des Koreferats.
- Den Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie für ihre stetige Hilfsbereitschaft, ihren persönlichen Einsatz, wertvolle Diskussionen und Tipps. Besonders:

Dr. Valentin Gorboulev	Brigitte Dürner
Dr. Bernhard M. Schmitt	Irina Schatz
Dr. Maike Veyhl	Marina Leyerer
Dr. Christopher Volk	
- Dem Graphiker des Instituts, Michael Christof, für seine Hilfe bei der Vorbereitung von Graphiken.
- Meinen Eltern, meiner Großmutter Hedwig Kroiß und meinen Patenonkeln Armin und Dr. Andreas Kroiß für die fortwährende Unterstützung während meines Studiums.
- Meinen Geschwistern.
- Dr. Catherine Arvieux, Dr. Pierre Delannoy (Grenoble), Dr. Jean-Michel Philippe (Montdidier), PD Dr. Raffaele Malinverni (Neuchâtel) und Mitarbeitern für ihren klinischen Unterricht während des Praktischen Jahrs.

LEBENS LAUF

Matthias Kroiß

geboren am 24.11.1977

in Würzburg

Schulbildung

1984-1987	Grundschule Kitzingen-Siedlung
1987-1988	Grundschule Kitzingen „St. Hedwig“
1988-1997	Armin-Knab-Gymnasium Kitzingen

Wehrdienst

1997-1998	Grundwehrdienst am Bundeswehrkrankenhaus Ulm
-----------	--

Hochschulstudium

1998 bis 2004	Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit Aufenthalten am Universitätsklinikum Grenoble und am Hôpital des Cadolles, Neuchâtel (Universität Lausanne)
seit 10/2004	Stipendiat im MD/PhD-Programm der Universität Würzburg, naturwissenschaftliches Promotionsprojekt am Lehrstuhl für Biochemie des Biozentrums der Universität Würzburg

Stipendien

2000 bis 2004	Hanns-Seidel-Stiftung e.V.
seit 2000	e-fellows.net GmbH & Co KG