Institut für Anatomie der Medizinischen Fakultät der

Humboldt-Universität zu Berlin

Habilitationsschrift

Zur Bedeutung von Zytoskelett-Membran-Verbindungen für die gerichtete HCl-Sekretion von Parietalzellen

Zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach Anatomie und Zellbiologie

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité der Humbodt-Universität zu Berlin

Von Dr. Thomas Jöns

Aus Husum

Dekan Prof. Dr.Dr.h.c. R. Felix

2. N.N.

3. N.N.

Datum der Habilitation: 10. April 2001

Zusammenfassung

Die in der vorliegenden Habilitationsschrift zusammengefaßten Publikationen stellen Untersuchungen zu zwei Themenschwerpunkten dar:
1. Verankerungsmechanismen von Membranproteinen der basolateralen und der apikalen Plasmamembrandomäne der Parietalzellen mit dem Membranzytoskelett und
2. die regulierte Fusion von zytoplasmatischen Vesikeln mit der apikalen Plasmamembran dieser Zellen.
Die strukturell und molekular sehr unterschiedlich gestaltete apikale und basolaterale Membrandomäne der Parietalzellen sollte funktionell charakterisiert und die Mechanismen der Membranumbauvorgänge aufgeklärt werden, die nach Aktivierung der Zellen im apikalen Membrankompartiment ablaufen.
Für die strukturelle Stabilität der basolateralen Domäne spielt wahrscheinlich die Verankerung von AE2 über das Verknüpfungsprotein Ankyrin mit dem Membranzytoskelett eine wichtige Rolle.
Die apikale Membrandomäne der Parietalzellen kann in drei Kompartimente unterteilt werden. Die freie apikale Membran, die canalikuläre Membran und die Membranen der tubulären Vesikel.
Entlang der freien apikalen und der canaliculären Plasmamembran kommen wie auf der basolateralen Seite die Zytoskelett-Proteine Actin und Spectrin vor. Nach unseren Untersuchungen könnte es während der Sekretionsphase zu einer temporären Verbindung von H+,K+-ATPase Molekülen mit dem Membranzytoskelett kommen. Diese Verbindung wird wahrscheinlich durch das Verknüpfungsprotein Ezrin vermittelt.
Der Mechanismus des Fusionsvorgangs der tubulären Vesikel mit der canaliculären Membran war bisher nicht bekannt. In Parietalzellen konnten die neuronalen SNARE-Proteine Synaptobrevin 2, Syntaxin 1 und SNAP25 sowie das zur Familie der kleinen G-Proteine gehörende Protein Rab3A und die Regulatorproteine NSF und alpha/beta SNAP nachgewiesen werden. Das in Parietalzellen gefundene Verteilungsmuster der SNARE-Proteine entspricht nicht der klassischen Vorstellung einer heterotypischen Membranfusion, vielmehr entspricht diese Verteilung einer homotypischen Fusion, wie sie für Vakuolen in Hefezellen beschrieben wurde.
Die Bedeutung der SNARE-Proteine für die Fusion der tubulären Vesikel mit der canaliculären Membran und damit für die Steigerung der HCl-Sekretion konnte durch Inkubation der Zellen mit Tetanus Neurotoxin (TeNt) gezeigt werden. Die Behandlung der Parietalzellen mit TeNt führte zum vollständigen Ausbleiben der, nach Stimulation mit cAMP bei Kontrollzellen beobachteten Erhöhung, der Säuresekretion

Summary

The publications summarized here cover two topics:
1. the anchorage mechanism of membrane proteins of the basolateral and the apical plasma membrane with the membrane cytoskeleton of parietal cells
and
2. the regulated fusion of cytoplasmic vesicles with the apical plasma membrane of these cells.
It was the aim of these studies to characterize the structural and molecular differences between the apical and basolateral membrane domains in parietal cells. Moreover the mechanisms involved in membrane traffic within the apical membrane compartment following stimulation were investigated.
We found that anchorage of AE2 with the membrane cytoskeleton through the linkage protein ankyrin seems to be important for the stability of the basolateral membrane.
The apical membrane domain of parietal cells can be subdivided into three compartments. The free apical membrane, the canalicular membrane and the tubulovesicular membrane.
The cytoskeletal proteins spectrin and actin can be found at the basolateral, the free apical and the canalicular membrane. We have shown that the H+K+-ATPase molecules appear to be temporary linked to the membrane cytoskeleton during acid-secretion. This contact is most likely mediated by the linker-protein ezrin.
Until now the mechanism of fusion of the tubulovesicles with the canalicular membrane was unknown. In parietal cells the neuronal SNARE-proteins synaptobrevin 2, Syntaxin 1, SNAP25, the small G-protein rab3A, and the regulatory proteins NSF and alpha/beta-SNAP were detected. The subcellular distribution of these proteins does not support the notion of a neuron-like heterotypic fusion. Instead it shows similarity with the homotypic fusion process of vacuoles in yeast.
The importance of SNARE-proteins for the fusion of tubulovesicles with the canalicular membrane and, by consequence also for the increase of acid-secretion was shown by incubation of the cells with tetanus neurotoxin (TeNt). The measurable increase of acid secretion by parietal cells after stimulation with c-AMP was inhibited completely through an incubation with TeNt.

Schlagworte
Parietalzellen, Polarität, Membranzytoskelett, SNARE-Proteine, AE2, Ankyrin, Ezrin

Keywords
Parietal cells, polarity, membrane cytoskeleton, SNARE-proteins, AE2, ankyrin, ezrin

1 Einleitung 5
1.1 Mechanismen der polaren Differenzierung transportierender Epithelzellen 5
2 Membranzytoskelett 10
2.1 Das Membranzytoskelett der Erythrozyten 10
2.1.1 Filamentbildende Proteine 12
2.1.2 Erythrozytäre Verknüpfungsproteine 16
2.2 Epitheliale Verknüpfungsproteine 22
2.2.1 Ezrin 22
2.2.2 SAP 97 23
3 Transportproteine mit Verbindung zum Membranzytoskelett 25
3.1 HCO_3^-, Cl^--Anionenaustauscher 25
3.2 Na^+,K^+-ATPase und H^+,K^+-ATPase 27
4 Gerichtete Membranfusion in Epithelzellen 30
4.1 SNARE-Mechanismus 31
4.2 Homotypische Fusion 34
5 Ergebnisse und Diskussion 35
5.1 Die Parietalzelle als Modell für polare Differenzierung und Membranfusion 35
6 Zusammenfassung 45
7 Abkürzungen: 48
8 Literatur 51

1 Einleitung

1.1 Mechanismen der polaren Differenzierung transportierender Epithelzellen

Epithelzellen des Verdauungsrohrs, der Nierentubuli oder exokriner Drüsen besitzen zwei strukturell und molekular verschiedene Domänen der Plasmamembran, eine apikale und eine basolaterale Membrandomäne.

Bei diesen Zellen stehen resorptive Aufgaben im Vordergrund. Ionen und organische Verbindungen werden an der apikalen oder an der basolateralen Membrandomäne in die Zelle aufgenommen, um sie durch transepithelialen Transport am entgegengesetzten Zellpol wieder abzugeben. Als funktionelle Anpassung an diese Aufgaben können die Oberflächen einer oder beider Membrandomänen durch unterschiedliche strukturelle Differenzierungen wie z. B. Mikrovilli oder Mikroplicae deutlich vergrößert sein.

Die kontrollierte Aufnahme von Ionen und organischer Verbindungen durch apikal oder basolateral vorhandene Transportproteine setzt voraus, daß Epithelien eine wirksame Permeabilitätsbarriere ausbilden, die eine unkontrollierte interzelluläre Passage verhindert. An der Grenze zwischen apikaler und lateraler Membrandomäne ist daher der Interzellularspalt zwischen den Epithelzellen in einer gürtelförmigen Zone, der Zonula occludens, komplett verschlossen. Außer dem Verschluß des Interzellularspaltes bildet die Zonula occludens auch innerhalb der Lipiddoppelschicht eine Diffusionsbarriere für apikale bzw. basolaterale Membranproteine und sorgt so für die Aufrechterhaltung der Polarität.

Eine der Grundlagen für die Ausbildung der zellulären Polarität ist das differenzielle Sortieren von Proteinen und Lipiden im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und in den Endosomen (Boulan und Powell, 1992; Matter und Mellman, 1994) sowie der zielgerichtete Transport von im TGN abgschnürten Transportvesikeln zu den unterschiedlichen Zellkompartimenten (Boulan und Sabatini, 1978; Simons und Wandinger-Ness, 1990). Auch in nicht polarisierten Zellen, wie z.B. Fibroblasten, werden Proteine im TGN in verschiedene Transportvesikel sortiert. Diese werden jedoch an-

schließend nicht in bestimmte zelluläre Domänen der Plasmamembran eingebaut, sondern erscheinen gleichmäßig verteilt an der Zelloberfläche. Es muß also zusätzliche Faktoren geben, die die Polarität einer Epithelzelle aufbauen und aufrecht erhalten.

Die Entwicklung einer nicht polarisierten Zelle zu einer ausdifferenzierten Epithelzelle wird durch extrazelluläre Signale gesteuert. Die Ausbildung der zellulären Polarität (siehe Abb. 1 S. 8) beginnt mit dem direkten Kontakt der Zelle zu Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) und zu Nachbarzellen (Boulan et al., 1983; Wang et al., 1990; Hynes, 1992). Der Zell-Matrix-Kontakt wird hauptsächlich über Integrine (EZM-bindende Adhäsionsmoleküle mit α,β-Heterodimerstruktur) vermit-telt (Hynes, 1992). Die Zell-Zell-Bindung wird u. a. durch Cadherine (Ca^{2+}-abhängige Adhäsionsmoleküle) erreicht (Kemler, 1992). Die spezifischen Bindungen dieser Proteine führen zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, die den zellulären Umbau auslösen. Mit der Zellhaftung an der EZM entstehen zwei Membrandomänen: die basale und die freie luminale Membrandomäne. Durch Kontaktschluß zwischen benachbarten Zellen entstehen schließlich die freie apikale und die basolaterale adhärente Membranoberfläche (Wang et al., 1990). Schon zu einem frühen Zeitpunkt der Epithelzellentwicklung sind zahlreiche Proteine mit apikaler Bestimmung nur noch im Bereich der freien Nichtkontaktfläche vorhanden (Vega-Salas et al., 1987; Ojakian und Schwimmer, 1988). Dagegen sind viele der später ausschließlich basolateral vorkommenden Proteine weiterhin gleichmäßig über die apikale und basolaterale Membrandomäne verteilt (Nelson und Veshnock, 1986). Diese basolateral bestimmten Proteine finden sich erst dann ausschließlich an der basolateralen Domäne, wenn nach Ausbildung der Zonula occludens apikale- und basolaterale-Domäne komplett getrennt sind.

Eine Reihe von Experimenten unterstreicht die Bedeutung von Integrinen und Cadherinen für die Ausbildung der zellulären polaren Differenzierung. In L-Zell-Fibroblasten, die normalerweise keine unterschiedlich ausgebildeten Membrandomänen aufweisen, kommt es nach Transfektion mit epithelialem Cadherin (E-Cadherin) zu einer Cadherin-vermittelten Kontaktbildung zwischen den Zellen und als

Folge zur Umverteilung der endogen vorhandenen Na^+,K^+-ATPase und von Fodrin (eine Komponente des Membranzytoskeletts, siehe S. 14). Beide Proteine sind in den mit E-Cadherin transfizierten Zellen genauso verteilt wie in polarisierten Epithelzellen der Niere und des Darms (Nelson und Veshnock, 1987; Wang et al., 1990).

Eine vollständige Umkehr der Polarität kann erzeugt werden, wenn epitheliale Zysten, die sich in Suspension spontan bilden können (apikale Oberfläche außen, basale Oberfläche innen), auf eine Kollagenmatrix aufgebracht werden. Die „falsch" orientierten apikalen Proteine, die mit der neuen EZM in Kontakt kommen, werden dann internalisiert und degradiert. Es bildet sich eine neue basale Zell-EZM-Kontaktfläche aus. Die Zonula occludens wird dabei ebenfalls abgebaut, um sich an der neu entstandenen lateroapikalen Membrangrenze zu reorganisieren (Wang et al., 1990). Hierbei sind Integrine beteiligt, da sich die oben beschriebenen Umkehr der Polarität durch die Zugabe von β_1-Integrin-Antikörper wie auch durch Zusatz von Integrin-antisense-Oligonukleotiden zur Zellsuspension verhindern läßt (Oja-kian und Schwimmer, 1994).

Welche Signalkaskaden werden durch die Bindung der Adhäsionsmoleküle an extrazelluläre Komponenten im Inneren der Zelle ausgelöst? Die durch Integrine und Cadherine vermittelte Zelladhäsion führt als erstes zur Ausbildung von lokalen Netzwerken zytoskelettaler Proteine. Diese bilden die strukturelle Grundlage zur Rekrutierung von Signalproteinen, die die funktionelle Differenzierung der verschiedenen Membrandomänen steuern. (Clark und Brugge, 1995; Yamada und Miyamoto, 1995; Dedhar und Hannigan, 1996; Parsons, 1996).

Die Bindung von Integrinen an Komponenten der EZM ist ein Signal für die Tyrosin-Phosphorylierung zahlreicher Proteine, wie zum Beispiel der Fokalen Adhäsionskinase, die so aktiviert wird (Clark und Brugge, 1995; Miyamoto et al., 1995a; Dedhar und Hannigan, 1996). Diese ist selber eine Tyrosinkinase und phosphoryliert dann ihrerseits weitere Proteine, die als Ergebnis ihrer Phosphorylierung an den Membrankontaktstellen immobilisiert werden. So werden verschiedene Tyrosinkinasen wie Src, Fyn und CsK (Cobb et al., 1994; Xing et al., 1994; Miyamoto et al., 1995a; Hanks und Polte, 1997), Adaptor- und Aktivatorproteine wie Sos und Grb2, Proteine

des Ras-MAP-Kinase-Wegs und GTP-bindende Proteine der Rho-Familie mit der lateralen Zellmembran verknüpft (Miyamoto et al., 1995b).

Obwohl die molekulare Interaktion zwischen Integrinen, Fokaler-Adhäsions-kinase und weiteren Signalproteinen klar dokumentiert worden ist, bleibt deren Zusammenspiel und Bedeutung für die Ausbildung der Zellpolarität unverstanden. Das Gleiche gilt auch für die durch Cadherine vermittelten Zell-Zell-Adhäsionskontakte. Zwar kennt man eine Reihe von Proteinen wie die Tyrosin-Kinasen c-Fyn und c-Src (Tsukita et al., 1991), das Tyrosin-Kinase-Substrat p120 (Shibamoto et al., 1995; Staddon et al., 1995) und die Tyrosin-Phosphatasen PTPμ, PTP-LAR (Brady-Kalnay et al., 1995; Kypta et al., 1996), die mit Cadherin-Kontakten assozieren, ihre Funktionen in der Signalübertragung sind jedoch noch weitgehend ungeklärt.

Dagegen ist die Rolle des β-Catenins besser verstanden. Dieses Cadherin-Adaptorprotein kann bei Kontaktlösung (Aufhebung der Kontaktinhibition oder durch andere Signale) von den Cadherinen abdissozieren und in den Zellkern transloziert werden. Dort bindet es an den Transskriptionsfaktor LEF (Behrens et al., 1996; Huber et al., 1996) und stimuliert so den Eintritt der Zelle in den Zellzyklus. Der Signalweg von LEF zur Zellproliferation ist allerdings noch wenig verstanden.

Entstehung der adhäsionsvermittelten Polarisierung von Zellen

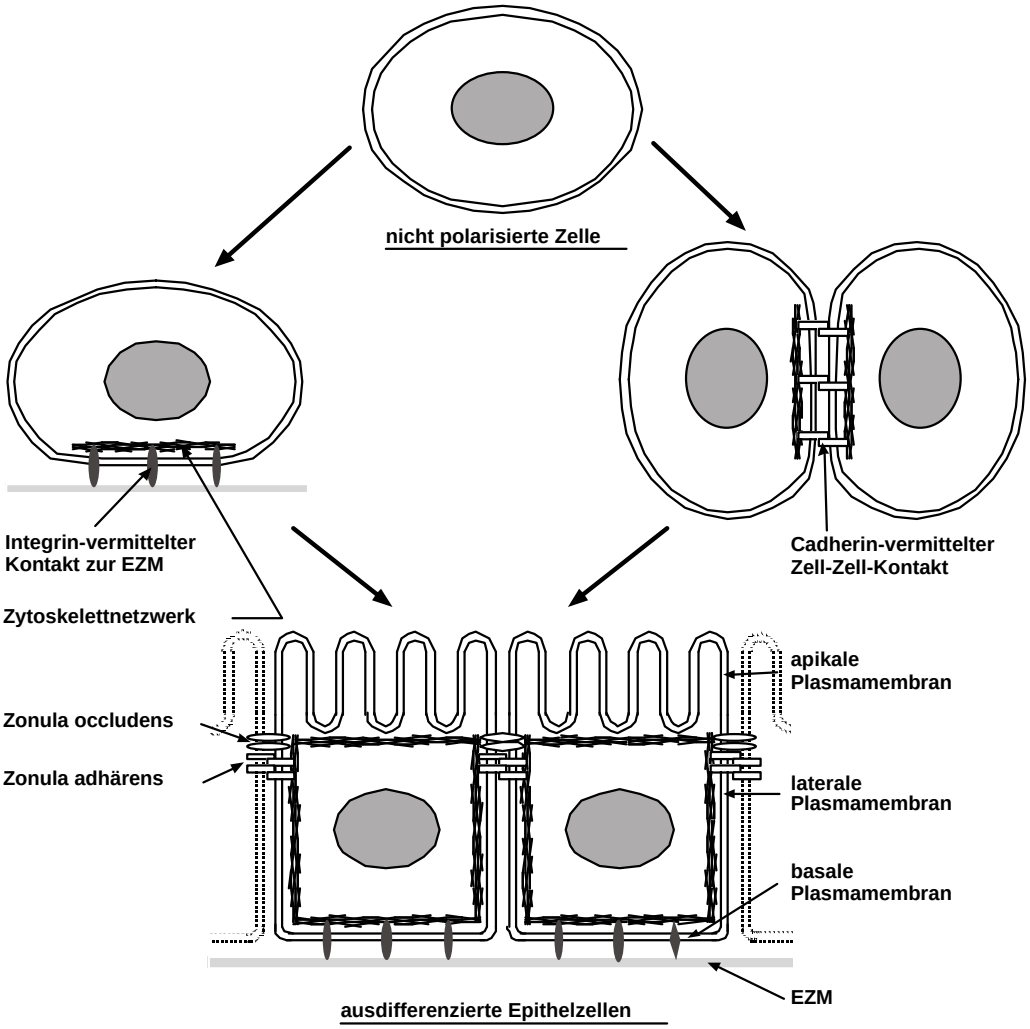


Abb. 1 Durch direkten Kontakt einer nicht polarisierten Zelle zur extrazellulären Matrix (EZM) oder zu einer Nachbarzelle kommt es an den Kontaktflächen zu strukturellen Veränderungen. Im Bereich der neu entstandenen adhärenten Membrandomäne werden Adhäsionsmoleküle angereichert. Integrine binden an Komponenten der EZM und Cadherine vermitteln den Zell-Zell-Kontakt. Die vorher nicht polarisierte Zelle hat jetzt zwei unterschiedliche Membrandomänen: die adhärente Membrandomäne und die freie luminale Membrandomäne. Entlang der Kontaktflächen bilden sich zytoskelettale Netzwerke aus, die verschiedene Adaptor- und Signalproteine rekrutieren (siehe Text). Durch Ausbildung der Zonula occludens erfolgt dann die Trennung der apikalen und basolateralen Membrandomäne der Epithelzellen (nach Yeaman et al., 1999).

2 Membranzytoskelett

In den letzten zwei Jahrzehnten hat es sich gezeigt, daß die Verankerung integraler Membranproteine an Komponenten des Zytoskeletts für die Etablierung und Aufrechterhaltung zellulärer Polarität von entscheidender Bedeutung ist. Die spezifische Interaktion mit dem direkt unter der Membran gelegenen Zytoskelett schränkt die freie laterale Beweglichkeit einzelner Proteine ein und verlängert wahrscheinlich auch deren Verweildauer in der Membran (Shahbakhti und Gratzer, 1986; Jacobson et al., 1987; Hammerton et al., 1991).

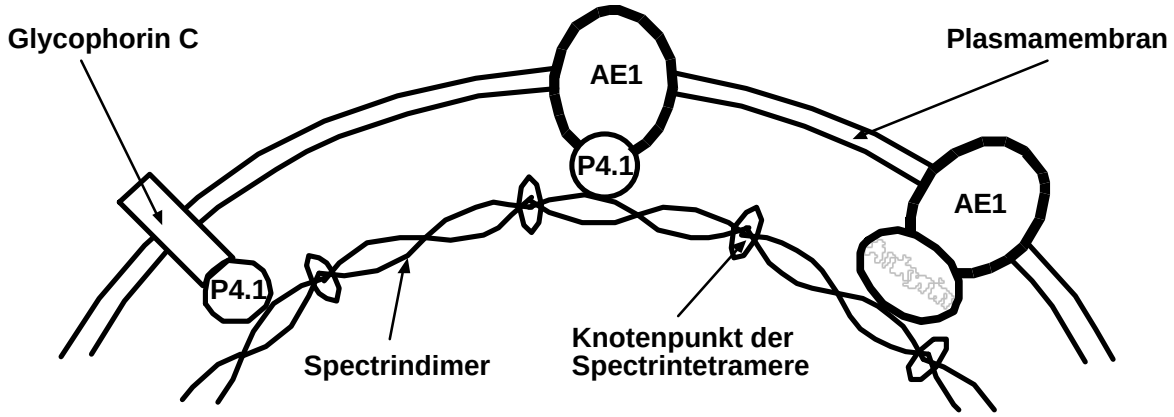
2.1 Das Membranzytoskelett der Erythrozyten

Das Membranzytoskelett der Erythrozyten stellt heutzutage das am intensivsten untersuchte und am besten verstandene zytoskelettale System dar und wird deshalb auch als Modell für das Verständnis des zytoskelettalen Aufbaus in nicht-erythrozytären Zellen herangezogen.

In Erythrozyten wird das Membranzytoskelett aus Spectrin und Actin aufgebaut, dabei bilden α,β-Spectrintetramere zusammen mit kurzen Actinfilamenten und weiteren akzessorischen Proteinen ein zweidimensionales Netzwerk, das mit itegralen Membranproteinen der Lipiddoppelschicht verknüpft ist. Das submembranäre Zytoskelett verleiht den Erythrozyten offensichtlich über einen längeren Zeitraum hinweg (beim Menschen etwa 120 Tage) ihre ungewöhnlichen biophysikalischen Eigenschaften. Diese sind durch hohe Flexibilität und Elastizität bei gleichzeitiger ausgeprägter Rigidität gekennzeichnet. So ausgestattet können die Erythrozyten den hohen Scherbelastungen, die während der Zirkulation im Gefäßsystem auftreten, widerstehen.

Verknüpfung von integralen Membranproteinen mit dem erytrozytären un dem epithelialen Membranzytoskelett

a



b

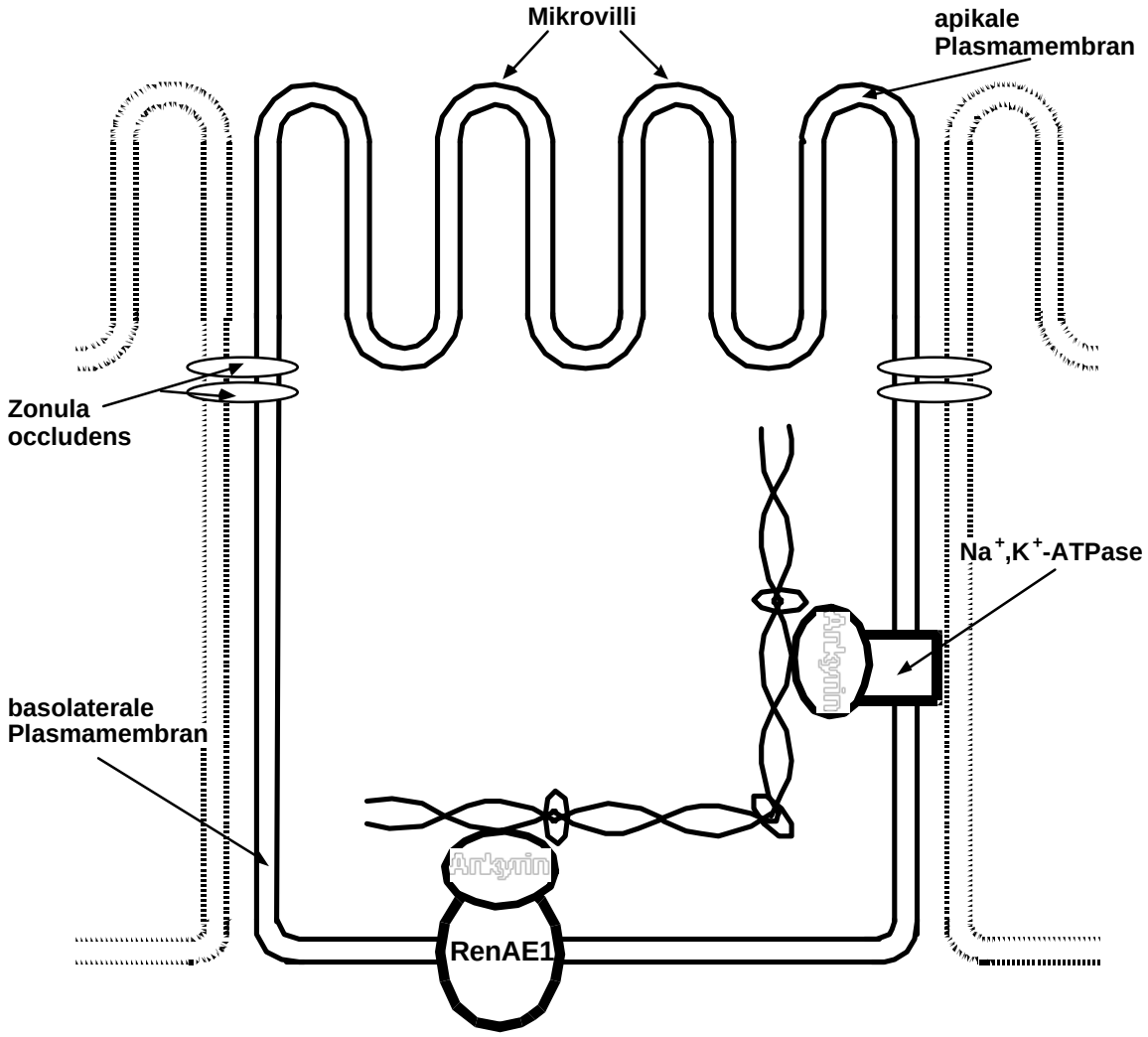


Abb. 2a Das Membranzytoskelett der Erythrozyten in stark vereinfachter Form schematisch dargestellt. In den Knotenpunkten sind Spectrintetramere, die die Hauptkompo Aufbau entspricht hier in vielen Merkmalen dem des erythrozytären Membranzytoskeletts. Die Verknüpfung des zytoskelettalen Netzwerkes mit der Plasmamembran erfolgt auch i nente des zytoskelettalen Netzwerkes darstellen, mit kurzen Actinfilamenten und weiteren zytoskelettalen Proteinen verknüpft (genauere Beschreibung siehe im Text). Über die Membranproteine Glycophorin C und AE1 wird das submembranäre Netzwerk in der Plasmamembran der Erythrozyten verankert. Vermittelt wird diese Verknüpfung über die Adaptorproteine Protein4.1 (P4.1) und Ankyrin.

b Dargestellt ist eine ausdifferenzierte Epithelzelle. Das Membranzytoskelett ist exemplarisch für die laterale und basale Membrandomäne eingezeichnet. Der zytoskelettale n den Epithelzellen über Adaptorproteine. Dargestellt ist die Bindung von Ankyrin an die Na^+,K^+-ATPase und an RenAE1 (RenAE1 kommt in den Schaltzellen der Niere vor (siehe S. 25).

Inzwischen wurden auch in zahlreichen nicht-erythrozytären Zellen Isoformen der erythrozytären Zytoskelettproteine identifiziert. Es stellte sich heraus, daß in Epithelzellen das Membranzytoskelett insbesondere der lateralen Domäne der Plasmamembran viele Eigenschaften des erythrozytären Membranzytoskeletts besitzt.

Im Folgenden werden diejenigen Proteine des erythrozytären Membranzytoskeletts genauer beschrieben, die für das Verständnis des zytoskelettalen Systems von genereller Bedeutung sind.

2.1.1 Filamentbildende Proteine

2.1.1.1 Spectrin

Der Name Spectrin kommt vom lateinischen *spectrum*, Erscheinung und beschreibt die schattenhafte Erscheinung der lysierten hämoglobinfreien Erythrozyten („Geister“), deren Hauptprotein Spectrin ist. Außer dem erythrozytären Spectrin sind in den letzten Jahren verschiedene andere Spectrinisoformen identifiziert worden (Tabelle 1 S. 13). Die in der Tabelle eingeführte Namengebung für die Spectrine entspricht der neuen einheitlichen Nomenklatur (Morrow, 1999).

Im Erythrozyten kommt Spectrin in zwei Untereinheiten von 280 kDa und 246 kDa vor. Es handelt sich um elongierte, flexible Moleküle, die in antiparalleler Anordnung Heterodimere bilden, die sich zu den in Erythrozyten hauptsächlich vorkommenden Tetrameren zusammenlagern.

Die αIΣ1,βIΣ1-Spectrintetramere bilden durch Verknüpfung mit weiteren zytoskelettalen Proteinen, unter anderen Actin und Adducin, ein unmittelbar unterhalb der Plasmamembran befindliches zweidimensionales Netzwerk. Es besteht aus pentagonalen und hexagonalen Strukturen, die über Ankyrin und Protein4.1 mit der zytoplasmatischen Domäne des Anionenaustauschers 1 (AE1) verbunden sind. Zusätzlich wird das zytoskelettale Netztwerk über die Bindung von Protein4.1 an die zytoplasmatische Domäne des integralen Membranproteins Glycophorin C mit der Zellmembran der Erythrozyten verankert.

Für die Proteininteraktionen, die Spectrin im Erythrozyten und in anderen Zellen eingeht, spielen zum einen der C- und N-terminale Molekülbereich und zum anderen repetitive Domänen eine wichtige Rolle. Die homologen, repetitiven Strukturmotive bestehen aus 106 Aminosäuren, die in einer dreifachen α-helikalen Anordnung vorliegen. Die homologen Einheiten werden durch nicht homologe Abschnitte unterteilt. Die einzelnen repetitiven Einheiten variieren untereinander in ihrer Peptidsequenz (Sequenzidentität von einer zur nächsten Motivwiederholung beträgt 10 - 30%) und bilden so für sich allein oder auch in Kombination miteinander Bindungsstellen für verschiedene Proteine (Hartwig, 1994; Li und Bennett, 1996). Spectrin-Repeats kommen auch auf weiteren mit Spectrin verwandten zytoskelettalen Proteinen wie α-Actinin, Dystrophin und Utrophin vor (Hartwig, 1994).

Neben den Bindungsstellen für die verschiedenen zytoskelettalen Proteine, deren Interaktion mit Spectrin im weiteren noch genauer beschrieben wird, besitzt αIΣ1-Spectrin zwischen dem 11. und 12. Repeat Bindungsstellen für die Ca^{2+}-bindenden Proteine Calmodulin und Calpain (Seubert et al., 1987; Harris und Morrow, 1990). Zusätzlich verfügt αIΣ1-Spectrin im C-terminalen Proteinabschnitt über zwei Ca^{2+}-bindende, als „EF-hand“ bezeichnete „helix-loop-helix“-Motive und verfügt damit selbst über die Möglichkeit, Ca^{2+}-Ionen zu binden (Strynadka und James, 1989;

Tabelle 1 Spectrin:

Gen	Proteinisoformen	weitere Bezeichnung	Vorkommen
αI	αIΣI-Spectrin	α-Spectrin	im Erythrozyten und im Gehirr
αII	αIIΣ1 bis 8-Spectrin	α-Fodrin	in den meisten Geweben
βI	βIΣ1 und 2-Spectrin	β-Spectrin	im Erythrozyten und in Skelettmuskelfasern
βII	βIIΣ1 und 2-Spectrin	β-Fodrin	in den meisten Geweben
βIII	βIIIΣ1-Spectrin	—	in Neuronen

(Morrow, 1999)

Lundberg et al., 1997). Veränderungen in der Ca^{2+}-Konzentration könnten so direkt, nämlich durch Bindung von Ca^{2+} an Spectrin Konformationsänderungen bewirken.

Die damit im Zusammenhang stehenden möglichen Veränderungen von Bindungsaffinitäten zu anderen zytoskelettalen Proteinen könnte die Stabilität des Netzwerkes beeinflussen (Seubert et al., 1987; Harris und Morrow, 1990; Lundberg et al., 1997).

2.1.1.2 Actin

Im Erythrozten gehört Actin mit 400.000 bis 500.000 Molekülen pro Zelle zu den Hauptproteinen des Membranzytoskeletts. Darüber hinaus gehört Actin zu den häufigsten Proteinen von Eukaryonten. Es ist neben Myosin Hauptbestandteil des kontraktilen Apparats der Muskulatur. Nahezu alle Zellen besitzen ein Actinfilamentsystem. Actinfilamente (F-Actin) entstehen durch Polimerisation von Actinmonomeren (G-Actin). Unterhalb der Zellmembran bilden die 7nm dicken α-helikal gewundenen Actinfilamente Netzwerke aus. Parallel angeordnete Bündel von gleichsinniger Orientierung bilden das Grundgerüst der Mikrovilli des Bürstensaums (Drenckhahn und Dermietzel, 1988). In periodischer Anordnung mit Myosinfilamenten bilden Atin-

filamente in der Skelett- und Herzmuskulatur die kontraktilen Myofibrillen und in vielen nichtmuskulären Zellen kontraktile Streßfasern. Streßfasern sind besonders in Endothelzellen entwickelt, die hohen hydrodynamischen Belastungen ausgesetzt sind. Streßfasern, wie alle Organisationsformen von Actinfilamenten, sind dynamische Strukturen, welche minutenschnell durch Depolymerisation verschwinden können, um sich an anderer Stelle wieder neu zu bilden (Drenckhahn, 1988).

Anders als die meisten Zellen enthalten Erythrozyten fast ausschließlich β-Actin. Ob aus dem Vorhandensein nur einer Actinisoform auf eine spezielle Funktion von Actin im Erythrozyten geschlossen werden kann, konnte noch nicht nachgewiesen werden. Für verschiedene Epithelzellen, wie Parietalzellen (siehe S. 38), ist bekannt, daß Actinisoformen in polarer Verteilung vorhanden sind und sich durch spezifische Interaktion mit anderen Proteinen an der Ausbildung und Aufrechterhaltung zellulärer Subdomänen und Oberflächenstrukturen beteiligen (Publikation 3; Yao et al., 1996).

Im Erythrozyten ist Actin auf sehr kurze Filamente beschränkt, die zusammen mit Protein4.1, Adducin und und weiteren Proteinen die Knotenpunkte innerhalb des Spectrinnetzwerkes bilden. Fast sämtliche Actinmoleküle sind so mit dem Spectrinfilamentsystem verbunden und bilden damit eine Hauptkomponente des erythrozytären zytoskelettalen Netzwerkes. Freies Actin liegt knapp unterhalb der kritischen Konzentration für die Polymerisation zu Actinfilamenten vor (Pinder und Gratzer, 1983). Isoliertes erythrozytäres Actin polimerisiert bei Konzentrationen >0,2µM (~8µg/ml) ebenso wie Actin von anderen Zellen in vitro zu langen Filamenten aus und aktiviert die Myosin-ATPase (Tilney und Detmers, 1975; Sheetz et al., 1976). In Erythrozyten liegt Actin in Gestalt von 33-37nm langen Filamenten vor, die 12-14 G-Actinmonomere enthalten (Lin und Lin, 1978; Brenner und Korn, 1980; Bennett, 1990). Drei Actin-bindende Proteine kontrollieren die Filamentlänge: Das ~35nm lange Tropomyosin stabilisiert die Filamente und dient als Schablone, die die Länge festlegt. An den beiden Enden der Filamente sitzen zwei unterschiedliche Kappenproteine; am Polymerisationsende (Plusende) Adducin, ein Protein, das auch als Verknüpfungsmolekül zwischen Spectrin und Actin dient; am Minusende Tropomodulin, welches die Depolymerisation der Actinfilamente verhindert (Fowler, 1996).

2.1.2 Erythrozytäre Verknüpfungsproteine

2.1.2.1 Adducin

Die Adducinfamilie besteht aus α-, β- und γ-Adducin, für die drei eng miteinander verwandte Gene kodieren. (Gardner und Bennett, 1986; Joshi et al., 1991 Dong et al., 1995). In reifen Erythrozyten kommen α, β-Adducin-Oligomere vor, die an den Spectrin-Actin-Bindungsstellen lokalisiert sind. Während der Erythropoese tritt Adducin bereits im Normoblasten-Stadium und damit relativ früh in der Entwicklung auf (Nehls et al., 1991). Adducin bindet, wie im vorangegangenen Kapitel erwähnt, an die schnell wachsenden Enden der Actinfilamente und hat die Funktion eines Actin-bündelnden Kappenproteins. Es verknüpft zwei αIΣ1,βIΣ1-Spectrintetramere mit den kurzen Actinfilamenten (siehe S. 12) und ist so an der Entstehung des Membranzytoskeletts entscheidend beteiligt (Matsuoka et al., 1996; Li et al., 1998).

Adducin bindet auch an das erythrozytäre integrale Membranprotein Stomatin und dient dadurch neben Protein4.1 und Ankyrin (siehe S. 17 und S. 19) als Adaptorprotein zwischen dem zytoskelettalen Netzwerk und der Plasmamembran. Stomatin besitzt wahrscheinlich eine inhibitorischen Wirkung auf Ionenkanäle. Bei der autosomal dominant vererbten hämolytischen Anämie Stomatozytose ist Stomatin in den Erythrozyten nicht nachweisbar. Die Membranen der betroffenen Erythrozyten weisen eine abnormal gesteigerte Permeabilität für Na^+-Ionen auf und können so eine osmotische Hämolyse begünstigen (Delaunay et al., 1999; Innes et al., 1999).

In der Niere scheint Adducin neben Ankyrin (siehe S. 28) für die Verknüpfung der Na^+,K^+-ATPase mit dem kortikalen Spectrin-Actin-Membranzytoskeletts von Bedeutung zu sein und bindet möglicherweise direkt an die α-Untereinheit der ATPase (Manunta et al., 1998). In hypertensiven Milan-Ratten wurde ein Polimorphismus von α-Adducin festgestellt, der in direktem Zusammenhang mit der für diese Tiere typischen Blutdruckerhöhung zu stehen scheint. Diese Beobachtung deutet auf eine regulatorische Funktion von Adducin für die Na^+,K^+-ATPase in den Nierenzelle hin (Manunta et al., 1998; Manunta et al., 1999).

Für die Steuerung der verschiedenen Adducinfunktionen spielen sowohl die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration als auch der Phosphorylierungsgrad eine wichtige Rolle, wobei das Wechselspiel zwischen den beiden Regulationsmechanismen noch nicht ganz verstanden ist. Von den Adducinen besitzt β-Adducin die höchste Affinität zu Ca^{2+}/Calmodulin. Durch die Ca^{2+}/Calmodulin-Bindung verliert β-Adducin seine Funktion als Actin-Kappenprotein, und die zwischen Spectrin, F-Actin und Adducin gebildeten Verknüpfungsknoten werden gelöst. Adducin ist sowohl Substrat der Protein-Kinase C (PKC) als auch der Protein-Kinase A (PKA). Phosphorylierung durch beide Kinasen führt zur Inhibition der Calmodulin-Bindung (Matsuoka et al., 1996).

2.1.2.2 Protein4.1

Erythrozytäres Protein4.1 ist der erste Vertreter einer wachsenden Proteinsuperfamilie, die bisher in fünf Untergruppen aufgeteilt werden kann: die Protein4.1-Familie, Talin, die PTPH1-Familie (Protein-Tyrosin-Phosphatasen), die ERM-Familie (Ezrin, Radixin, Moesin, Merlin) (genauere Besprechung von Ezrin siehe S. 21) und die NBL4-Familie (novel band4.1-like protein).

Schon vor mehr als 10 Jahren sind zahlreiche immunologisch mit Protein4.1 verwandte Proteine beschrieben worden, deren Molekulargewichte von 30.000 - 210.000 reichen und die in verschiedenen, auch nicht-erythrozytären Geweben exprimiert werden (Granger und Lazarides, 1984; Granger und Lazarides, 1985; Anderson et al., 1988). Ursprünglich aber wurde Protein4.1 als Bestandteil des Membranzytoskeletts der Erythrozyten identifiziert. Mit 200.000 Kopien pro Zelle ist Protein4.1 eines der Hauptproteine der Erythrozyten. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung von lysierten hämoglobinfreien Erythrozyten zeigen sich zwei Proteinbanden mit einem apparenten Molekulargewicht von 78- bzw. 80kDa. Der Unterschied im Molekulargewicht beruht nicht auf einer unterschiedlichen Länge der Aminosäuresequenz, sondern auf einer posttranslationalen Modifikation im C-terminalen Proteinabschnitt (Bennett, 1990). Für das Verhältnis zwischen der 78- und der 80kDa-Form ist das Alter der Erythrozyten von Bedeutung (Nelson und Veshnock, 1987).

Die ungewöhnliche Heterogenität der zahlreichen Protein4.1-Isoformen wird durch komplexes alternatives Spleißen der prä-mRNA sowie durch posttranslationale Modifikation des Protein4.1-Moleküls erreicht (Discher et al., 1993; Horne et al., 1993; Huang et al., 1993; Baklouti et al., 1997).

Im Erythrozyten werden Protein4.1 zumindest zwei Funktionen zugeschrieben:

1. die Bindung an Glycophorin C und an AE1 und dadurch die Verknüpfung des Membranzytoskeletts mit der Plasmamembran (siehe Abb. 2a S. 10)
2. die Verstärkung der Bindung zwischen Spectrin und Actin.

Für die Stabilität des Membranzytoskeletts spielt Ca^{2+}/Calmodulin eine wichtige regulatorische Rolle (siehe S. 12 und S. 16). Die Bindungsstelle von Calmodulin auf Protein4.1 befindet sich auf dem C-terminalen 30kDa-Fragment, das nach α-chymotryptischem Verdau erhalten wird und allen Mitgliedern der Protein4.1-Superfamilie gemeinsam ist. Dieser Proteinabschnitt enthält auch die Bindungsstellen für AE1 und Glycophorin C. Die Bindung zwischen βIΣ1-Spectrin und Actin wird durch den Calmodulin/Protein4.1-Komplex verstärkt. Steigende Ca^{2+}-Konzentration und die damit verbundende Bindung von Ca^{2+} an Calmodulin führt anscheinend zu einer Konformationsänderung im Protein4.1-Molekül wobei sich die Specrin/Actin-Bindung lockert. Die Spectrin/Protein4.1-Bindung wird durch die Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration nicht beeinflußt (Tanaka et al., 1991).

Die Bedeutung von Protein4.1 als Verknüpfungsmolekül zwischen dem Membranzytoskelett und der Plasmamembran der Erythrozyten ist in den letzten Jahren intensiv untersucht worden. Für die Bindung von Protein4.1 an AE1 ist auf beiden Proteinen ein kurzes Motiv, bestehend aus jeweils fünf Aminosäuren, von Bedeutung (Jöns und Drenckhahn, 1992). Auf AE1 besteht dieses Motiv aus drei aufeinander folgenden Argininen (Aminosäuren mit stark basischen Seitengruppen), die zusammen einen basischen Kern bilden, der N- und C-terminal von einer hydrophoben Aminosäure flankiert wird. Diesem LRRRY- bzw. IRRRY-Motiv auf AE1 ist das Motiv LEEDY auf Protein4.1 gegenübergestellt. LEEDY hat mit zwei Glutaminsäuren und einer Asparaginsäure einen stark sauren Kern, der ebenfalls von hydrophoben Aminosäuren flankiert wird. Punktmutationen der einzelnen Aminosäuren innerhalb des

Bindungsmotivs auf Protein4.1 ergaben, daß die Bindungsaffinität von Protein4.1 sowohl durch Austausch der hydrophoben wie auch der sauren Aminosäuren signifikant vermindert wird (Jöns et al. Manuskript in Vorbereitung). Stöchiometrische Analysen zum Bindungsverhältnis zwischen AE1 und Protein4.1 belegen, daß bis zu zwei Moleküle Protein4.1 an einem Molekül AE1 binden können (Rückmann et al., 1997). Durch Deletion unterschiedlicher Bereiche der zytoplasmatischen Domäne von AE1 konnte gezeigt werden, daß in vitro die Peptidabschnitte LRRRY/IRRRY beide eine Bindung mit Protein4.1 eingehen können (Jöns et al. bisher nicht veröffentlicht).

Die auf AE1 identifizierte Bindungssequenz LRRRY/IRRRY findet sich in identischer oder in abgewandelter Form auch in einer Anzahl weiterer Proteine (Drenckhahn et al., 1996). Die auf Glycophorin C (YRHKG) und CD44 (SRRRC/-QKKKL) vorhandenen Motivabschnitte scheinen ebenfalls für die Bindung dieser Proteine an Protein4.1 von Bedeutung zu sein (Marfatia et al., 1994; Nunomura et al., 1997).

Welche Funktionen Protein4.1-Isoformen in nicht-erythrozytären Zellen haben, ist bisher noch wenig untersucht worden. Protein4.1 kommt in nicht-erythrozytären Zellen in verschiedenen zellulären Lokalisationen vor und scheint außer mit Spectrin und Actin auch Interaktionen mit weiteren Proteinen, wie zum Beispiel Tubulin oder Myosin, eingehen zu können (Correas und Avila, 1988; Pasternack und Racusen, 1989). In Endothelzellen ist Protein4.1 strikt membranassoziiert und im Bereich der Adhaerenskontakte angereichert (Cohen et al., 1982; Leto et al., 1986). Neben den Plasmamembran-assoziierten Protein4.1-Isoformen sind in den letzten Jahren verschiedene kernassozierte Isoformen beschrieben worden (Correas, 1991; Krauss et al., 1997a; Krauss et al., 1997b; Lallena und Correas, 1997; Luque et al., 1998).

2.1.2.3 Ankyrin

Ankyrin wurde wie die meisten Proteine, die das Membranzytoskelett aufbauen, ursprünglich als peripheres Membranprotein der Erythrozyten entdeckt. Neben der Hauptproteinbande von 206 kDa findet sich nach gelelektrophoretischer Auftrennung eine Abfolge weiterer Proteinbanden, die Ankyrinisoformen darstellen, entstanden

durch unterschiedliche Prozessierung der prä-mRNA sowie durch proteolytischen Abbau von Ankyrin (Steck et al., 1971; Lux et al., 1990a).

Neben dem erythrozytären Ankyrin sind verschiedene Ankyrinisoformen beschrieben worden, für die drei Gene kodieren. In Tabelle 2 (S. 20) sind die bekannten Ankyringene, die Genprodukte und deren Vorkommen zusammengestellt.

Alle Ankyrinisoformen verfügen über eine gemeinsame Proteinstruktur, die aus einer N-terminalen Membranbindungsdomäne, einer Spectrin-Bindungsdomäne sowie einer C-terminalen regulatorischen Domäne bestehen (Bennett, 1992; Lambert und Bennett, 1993; Peters und Lux, 1993).

Im Erythrozyten verankert Ankyrin als Adaptormolekül über die Bindung an Spectrin und an AE1 das submembranäre Zytoskelett mit der Zellmembran (Bennett und Stenbuck, 1979). In den letzten Jahren sind weitere Membranproteine als Bindungspartner sowohl für das erythrozytäre als auch für die anderen Ankyrinisoformen identifiziert worden. So bindet Ankyrin an die Na^+,K^+-ATPase, den Na^+, Ca^{2+}-Austauscher und an spannungsabhängige Natriumkanäle (Nelson und Veshnock, 1987; Koob et al., 1988; Srinivasan et al., 1988; Smith et al., 1991; Li et al., 1993; Jordan et al., 1995). Die über Ankyrin mit dem Spectrin-Actinzytoskelett verknüpften integralen Membranproteine sind in ihrer lateralen Mobilität eingeschränkt und können in bestimmten Subdomänen angereichert sein, wie z. B. die Na^+,K^+-ATPase im Ranvierschen-Schnürring (Bennett, 1990).

Bestimmte Ankyrinisoformen binden an die zur Immunoglobulin-Superfamilie gehörenden Zelladhäsionsmoleküle Neurofascin und L1 (Davis und Bennett, 1994). Die durch Ankyrin vermittelte Verknüpfung dieser Zelladhäsionsmoleküle mit dem Spektrin-Actinzytoskelett spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems (Davis und Bennett, 1993; Davis et al., 1993; Davis und Bennett, 1994)

Tabelle 2 Ankyrin:

Gen	Proteinisoformen	weitere Bezeichnung	Vorkommen
ANKI	ANK ΣI1-2	Protein2.1, Protein2.2 Ankyrin1,Ank $_R$ (R = rote Blutzelle)	im Erythrozyten und im Kleinhirn
ANKII	ANK ΣII1-2	Ankyrin2, Ank $_B$ (B = brain)	in Neuronen und Gliazellen
ANKIII	ANK ΣIII1-4	Ankyrin3, Ank $_G$ (G = general)	im Ranvierschen Schnürring, in verschiedenen Epithelzellen, in der Plazenta, etc.

(Lambert et al., 1990; Lux et al., 1990a; Otto et al., 1991; Kordelli et al., 1995)

Die Membranbindungsdomäne von Ankyrin 1 besteht aus 24 repetitiven Sequenzabschnitten, den Ankyrin-Repeats, die jeweils ca. 33 Aminosäuren umfassen (Lambert et al., 1990; Lux et al., 1990b). Jeweils sechs dieser Ankyrin-Repeats organisieren sich zu vier Bindungssubdomänen (Michaely und Bennett, 1993). Homologe der Ankyrin-Repeats sind auch in vielen nicht mit Ankyrin verwandten Proteinen beschrieben worden (Bork, 1993; Peters und Lux, 1993). Proteine mit Ankyrin-Repeats sind ubiquitärer verbreitet und kommen auch in Invertebraten, Hefen, Bakterien und Viren vor (Gallagher et al., 1997).

Kombinationen der unterschiedlichen Repeats sowie die unterschiedlichen Determinanten, die auf einer Repeat-Domäne vorhanden sind, führen zu der großen Diversität der Ankyrin-Membranprotein-Interaktionen (Michaely und Bennett, 1995a; Michaely und Bennett, 1995b).

2.1.2.4 Protein4.2 (Pallidin) Protein4.9 (Dematin)

Protein4.2 und Protein4.9 sind beide als Komponenten des Membranzytoskeletts des Erythrozyten entdeckt (Bennett, 1990; Cohen et al., 1993) und in der Zwischenzeit auch in verschiedenen nicht-erythrozytären Zellen nachgewiesen worden (Fried-richs

et al., 1989). Obwohl beide Proteine, insbesondere Protein4.2, mit 200.000 Kopien pro Zelle (Yu und Steck, 1975; Korsgren und Cohen, 1986), wichtige Komponenten des Membranzytoskeletts zu sein scheinen (hämolytische Anaemie bei Protein4.2-Mangel), konnte deren genaue Funktion noch nicht aufgeklärt werden. Protein4.2 bindet wie auch Protein4.1 und Ankyrin an die zytoplasmatische Domäne von AE1. Die durch diese Bindung bewirkte Konformationsänderung reguliert möglicherweise die Bindung von Ankyrin an AE1 (Cohen et al., 1993).

Für Protein4.9 ist bekannt, daß es an Actin bindet und Actin-bündelnde Eigenschaften besitzt. Es besteht aus zwei 48kDa- sowie einer 52kDa-Untereinheit. Die N-terminale 30kDa Domäne der 48kDa-Untereinheit weist Homologien zu Villin auf, einem ebenfalls Actin-bindenden und -bündelnden Protein des Bürstensaums. Bei der Erythrozytenreifung ist die durch Protein4.9 vermittelte Actinbündelung während der Kernausstoßung der Normoblasten möglicherweise wichtig. (Koury et al., 1989). Interessanterweise haben Protein4.2 und Protein4.9 einen elf Aminosäuren langen identischen Peptidabschnitt, zeigen sonst aber keine Sequenzhomologie. Dieses Motiv enthält eine ATP-Bindungsstelle. Es erscheint somit denkbar, daß die Protein-Protein-Interaktionen, die Protein4.2 und Protein4.9 eingehen können, über ATP-Bindung reguliert werden (Azim et al., 1996).

2.2 Epitheliale Verknüpfungsproteine

Im Folgenden werden mit Ezrin und SAP 97 zwei Proteine beschrieben, die nicht im Erythrozyten, aber in verschiedenen Epithelzellen vorkommen. Beide Proteine binden an zytoskelettale Strukturen und haben Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Polarität dieser Zellen.

2.2.1 Ezrin

Ezrin gehört zur Protein4.1-Superfamilie (siehe S. 16) und bildet zusammen mit Radixin und Moesin eine Unterfamilie, die als ERM-Familie bezeichnet wird (Mangeat et al., 1999; Tsukita et al., 1994).

Die ERM-Proteine sind wie Protein4.1 Membran-Zytoskelett-Verknüpfungsproteine. Ezrin kommt in verschiedenen Epithelzellen vor, ist dort meist apikal, aber auch basolateral lokalisiert (Publikation 3; Hanzel et al., 1989; Hanzel et al., 1991).

Für die Funktionen von Ezrin spielt die Phosphorylierung einzelner Aminosäuren eine entscheidende Rolle (Nakamura et al., 1996; Matsui et al., 1998). Es besitzt C- und N-terminale-Assoziations-Domänen, welche die Bildung von Dimeren und Oligomeren ermöglichen und die für die Bindung an Actin und möglicherweise auch an weitere Proteine wichtig sind. Im nicht-phosphorylierten Zustand sind die Assoziations-Domänen durch Faltung innermolekular maskiert und die Bindung an Actin sowie aneinander ist nicht möglich oder erschwert. Phosphorylierung führt zur Entfaltung der Assoziations-Domänen und so zur Aktivierung der Ezrinmoleküle. Diese können nun dimerisieren oder auch oligomerisieren; dies scheint eine Voraussetzung für die Translokation zum apikalen Zellpol zu sein (Chen et al., 1995; Kondo et al., 1997). Durch Phosphorylierung aktiviertes Ezrin bindet an Actin und beteiligt sich an der Ausbildung von Mikrovilli und anderen Membranauffaltungen (Oshiro et al., 1998; Shaw et al., 1998). Darüber hinaus besitzt Ezrin Bindungsstellen für verschiedene Membranproteine wie CD44, die Interzellulären Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, 2, 3) und die H^+,K^+-ATPase (Serrador et al., 1997; Tsukita et al., 1997; Heiska et al., 1998; Yonemura et al., 1998). Möglicherweise wird die Bindung von Ezrin an Proteine mit mehreren Transmembrandomänen durch ein weiteres Adaptormolekül vermittelt. EBP50 (ERM bindendes Phosphoprotein von 50kDa) wurde in Epithelien mit Ezrin kolokalisiert gefunden (Reczek et al., 1997). EBP50 besitzt zwei PDZ-Domänen (siehe S. 23) und verfügt über Bindungsstellen für Ezrin und für zytoplasmatische Domänen verschiedener Membranproteine (Hall et al., 1998a; Hall et al., 1998b), wie den CFTR-Chloridkanal (Short et al., 1998).

2.2.2 SAP 97

Das Synapsen-assozierte-Protein (SAP) 97 gehört zur Familie der MAGUK-Proteine, wobei MAGUK für „**m**embrane **a**ssociated **g**uanylate **k**inase homologues“ steht. SAP 97 kommt in verschiedenen Regionen im Gehirn vor (hier überwiegend an präsynapti-

schen Nervenendigungen asymmetrischer Synapsen), ist aber auch in unterschiedlichen peripheren Organen gefunden worden (Müller et al., 1995). Wir konnten zeigen, daß SAP 97 in Parietalzellen vorhanden ist und hier entlang der basolateralen Plasmamembran vorkommt (Publikation 3). Die Funktion der MAGUK-Proteine liegt in der Kopplung extrazellulärer Signale mit intrazellulären Übertragungswegen sowie in der Interaktion mit dem zellulären Zytoskelett.

Die Mitglieder der MAGUK-Familie sind gekennzeichnet durch das gemeinsame Vorkommen von drei charakteristischen Domänen (Cho et al., 1992; Woods and Bryant, 1991): der PDZ-Domäne, der SH3-Domäne und der GUK-Domäne. PDZ leitet sich her von den Anfangsbuchstaben der ersten drei Mitglidern dieser Familie: **P**SD-95 (protein of postsynaptic density of 95kDa), **D**lg (Drosophila lethal discs-large-1 tumor suppressor gene) und **Z**O-1 (Zonula-Occludens-Protein-1). der SH3 steht für (**s**rc **h**omology **3**). Die GUK-Domäne weist Homologie zu einem Enzym der **Gu**anylat-**K**inase auf.

Die PDZ-Domänen der MAGUK-Proteine sind bisher am besten untersucht und kommen außer bei den MAGUK-Proteinen auch in anderen Proteinen wie zum Beispiel in EBP50 vor (siehe S. 22). Eine PDZ-Domäne stellt einen 80-90 Aminosäuren langen Peptidabschnitt dar und enthält Bindungsstellen für verschiedene Membranproteine, die über die letzten drei bis zehn C-terminalen Aminosäuren gebunden werden. In-vitro-Studien konnten zeigen, daß z.B. der Glutamatrezeptor vom Typ des N-methyl-D-aspartat (NMDA) Rezeptors oder der einwärts rektifizierende Kaliumkanal Kir4.1 so gebunden und möglicherweise an bestimmten Subdomänen der Plasmamembran von Nervenzellen angereichert werden (Kim et al., 1995). Wir konnten bei einer Membranpräparation aus der Niere die Na^+,K^+-ATPase und SAP 97 mit den entsprechenden gegen diese Proteine gerichteten Antikörpern kopräzipitieren (Bennai et al., Manuskript in Vorbereitung).

Die Verbindung der MAGUK-Proteine mit dem Zytoskelett kann außer über direkte Bindung an Actin (Fanning et al., 1998) auch über die Adaptorproteine Protein4.1 oder Ezrin erfolgen (siehe S. 38; Publikation 3; Marfatia et al., 1994; Marfatia et al., 1995). In verschiedenen anderen Proteinfamilien, die ebenfalls SH3-Domänen be-

sitzen, werden diese für die Bindung an Actin oder an andere Proteine, die in die Signalübertragung eingeschaltet sind, verantwortlich gemacht. Für die MAGUK-Proteine ist jedoch bisher außer Actin (Fanning et al., 1998) kein weiterer SH3-Bindungspartner identifiziert worden. Die Funktion der GUK-Domäne bei MAGUK-Proteinen ist ebenfalls noch ungeklärt. Die ATP-abhängige Phosphorylierung von GMP zu GDP durch MAGUK-Proteine konnte noch nicht nachgewiesen werden. Das Bindungsverhalten für die Nukleotide ist zwischen den Familienmitgliedern sehr unterschiedlich. Erythrozytäres P55 bindet sowohl ATP wie GMP; ZO-1 und ZO-2 binden keines von beiden; SAP 90 nur GMP, aber kein ATP und dürfte somit wie die ZO-Proteine keine Enzymaktivität aufweisen. Ob die MAGUK-Proteine an einen G-Protein-abhängigen Signalweg gekoppelt sind und möglicherweise lokal die Nukleotidkonzentration beeinflussen, ist nicht geklärt. Alternativ könnte aber auch ein durch die Nukleotidbindung bewirkter allosterischer Effekt die Protein-Protein-Interaktionen beeinflussen.

3 Transportproteine mit Verbindung zum Membranzytoskelett

3.1 HCO_3^-, Cl^--Anionenaustauscher

AE1 ist verantwortlich für den elektroneutralen Austausch von Bikarbonationen (HCO_3^-) gegen Chloridionen (Cl^-) in Erythrozyten. Erythrozyten sind hoch spezialisiert für den O_2 -Transport und den Gasaustausch in der Lunge und peripheren Geweben. In der Lunge führt die Bindung von O_2 an Hämoglobin zur Abdissoziation von H^+-Ionen. Der H^+-Anstieg treibt die Carboanhydrasereaktion in Richtung CO_2 ($H^+ + HCO_3^- \rightarrow CO_2 + H_2O$). Für jedes abgegebene CO_2 wird ein HCO_3^- -Ion im Austausch gegen ein Cl^--Ion in den Erythrozyten aufgenommen. In der Peripherie wird in den Erythrozyten die Umsetzung von CO_2 und H_2O in H^+-Ionen und HCO_3^--Ionen katalysiert. HCO_3^- wird im Austausch gegen Cl^- in das Blutplasma abgegeben und wird so aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt. Das in der Zelle verbleibende H^+-Ion bindet an

Hämoglobin und beschleunigt dadurch die O_2-Abgabe (Rechtsverschiebung der O_2-Dissoziationskurve, Bohr´scher Effekt).

Mitglieder der AE-Genfamilie, von denen mittlerweile neben AE1 auch AE2 und AE3 identifiziert worden sind, konnten in den letzten Jahren in fast allen Geweben beschrieben werden (siehe Tabelle 3 S. 26). Der Prototyp der AE-Familie kommt allerdings nur in Erythrozyten und im Gehirn vor (Havenga et al., 1994). In den Typ-A-Schaltzellen der Niere wird das AE1-Gen alternativ gespleißt, so daß eine N-terminal trunkierte AE1isoform (RenAE1) entsteht (Wagner et al., 1987; Drenckhahn et al., 1989; Kudrycki und Shull, 1989; Kollert-Jöns et al., 1993). RenAE1 ist funktionell an die Aktivität der apikalen Protonenpumpe gekoppelt. Für jedes apikal in den Urin abgegebene H^+-Ion verbleibt ein HCO_3^--Ion als Alkaliäquivalent in der Zelle, das basolateral (Blutseite der Zellen) im Austausch gegen Cl^- abgegeben wird (die A-Schaltzellen sind wie die Erythrozyten reich an Carboanhydrase). Defekte dieser Sammelrohrfunktion (unter anderem durch Mutationen von RenAE1 bedingt) führen zum Krankheitsbild der distalen renalen Azidose (Bruce et al., 1997; Rysava et al., 1997; Tanner, 1997).

Zwei der bisher klonierten AE2-Familienmitglieder (AE2a und AE2b) zeigen zumindest in der Northernblot-Analyse ein ubiquitäreres Expressionsmuster (Wang et al., 1996). Das Genprodukt von AE2c wird hingegen nur im Magengewebe gefunden (Alper et al., 1994; Wang et al., 1996; Alper et al., 1997). Im Magen kommt AE2c ausschließlich in Parietalzellen vor und ist hier basolateral lokalisiert (Publikation 1; Stuart Tilley et al., 1994).

AE1 erfüllt zwei Funktionen:

1. den Bikarbonattransport im Dienste des O_2/CO_2 Gasaustausches und
2. die Bildung eines plasmalemmalen Verankerungspunktes für das Membrazytoskelett. Die Verankerung erfolgt über die Adaptormoleküle Ankyrin und Protein 4.1 (siehe Abb. 2 S. 10).

Interessanterweise scheint AE1 für den strukturellen Aufbau des submembranären zytoskelettalen Netzwerkes der Erythrozyten nur von untergeordneter Bedeutung zu

sein. Das erythrozytäre Membranzytoskeletts von Mäusen mit einer Nullmutation für das AE1-Gen weist so gut wie keine Unterschiede zu normalen Erythrozyten auf. Spectrin, Actin und Protein4.1 waren in normaler Konzentration vorhanden; Ankyrin war um 50% reduziert; Protein4.2. konnte nicht nachgewiesen werden. Die Tiere hatten zwar eine schwere hämolytische Anämie (Sphärozytose), waren aber zum Teil sogar fortpflanzungsfähig (Peters et al., 1996). Ob möglicherweise die Bindung über Adducin an Stomatin oder von Protein4.1 über Glycophorin C das Fehlen von AE1 ersetzen kann oder ob die Fixierung des Membranzytoskeletts an integrale Membranproteine überhaupt für die regelgerechte Anordnung und Zusammensetzung des Membranzytoskeletts notwendig ist, kann noch nicht abschließend beantwortet werden.

Tabelle 3 Anionenaustauscher:

Gen	Proteinisoformen	weitere Bezeichnung	Vorkommen
AE1	EryAE1, RenAE1	Bande 3	in Erythrozyten,im Gehirn und in Typ A Schaltzellen der Niere
AE2	AE2a, b, c	—	AE2a: in sämtlichen Gewben AE2b: im Magendarmtrakt, Niere, Leber, Gehirn, Lunge und Uterus AE2c: in Parietalzellen des Magens
AE3	AE3a, b, c	—	in Herzmuskelzellen, in Muskelzellen der Gefäßwand und des Uterus, in verschiedenen Epithelzellen, im Gehirn, in Retina und Lunge

(Drenkhahn et al., 1984; Wagner et al., 1987; Kopito, 1990; Alper, 1991; Kollert-Jöns et al. 1993; Morgans und Kopito, 1993; Yannoukakos et al.,1994)

3.2 Na^+,K^+-ATPase und H^+,K^+-ATPase

Die Na^+,K^+-ATPase ist unter anderem für die Ausbildung des Membranpotentials und damit als Motor für Natrium-Kotransportsysteme notwendig. Sie kommt praktisch in sämtlichen Zellen vor und ist in Epithelzellen bis auf wenige Ausnahmen (Epithel des Plexus choroideus und Pigmentepithel der Retina) in der basolateralen Zellmembran lokalisiert.

Im Unterschied zu dem ubiquitären Vorkommen der Na^+,K^+-ATPase sind H^+,K^+-ATPasen auf wenige Zelltypen des Organismus beschränkt. Im Magen kommt die H^+,K^+-ATPase nur in den Parietalzellen der Magendrüsen vor, die für die Ansäuerung des Mageninhaltes verantwortlich sind. Die H^+,K^+-ATPase kommt in einer streng polarisierten Verteilung in den Parietalzellen vor. Dort ist sie im Gegensatz zur basolateral lokalisierten Na^+,K^+-ATPase ausschließlich auf die apikale Plasmamembran beschränkt und fehlt basolateral (siehe S. 36).

Beide ATPasen gehören zur Familie der P-Typ-ATPasen und bestehen aus einer α- und einer β-Untereinheit, die sich in einer 1:1 Stöchiometrie zu stabilen Heterodimeren zusammen lagern (Koenderink et al., 1999). Die Bezeichnung P-Typ weist auf einen hochkonservierten Asparaginsäurerest im aktiven Zentrum der ATPasen hin, der während des Ionentransportes transient **p**hosphoryliert wird. Die katalytischen α-Untereinheiten der Na^+,K^+-ATPase und der H^+,K^+-ATPase weisen mit 63% einen hohen Grad an Sequenzidentität auf (Koenderink et al., 1999). Die stark glykosylierten β-Untereinheiten beider ATPasen sind einander strukturell ebenfalls sehr ähnlich, besitzen jedoch nur eine Sequenzidentität von 30%. Die Bildung von Chimären zwischen den verschiedenen Untereinheiten der Na^+,K^+-ATPase und der H^+,K^+-ATPase ist experimentell möglich. Die ATPase-Aktivität dieser Chimärenmoleküle liegt jedoch nur bei ca. 10% des jeweiligen Wildtyps, außerdem zeigen die entsprechenden β-Untereinheiten eine klare Präferenz zur eigenen α-Untereinheit (Koenderink et al., 1999). Obwohl die katalytischen Funktionen der Enzyme eindeutig auf der α-Untereinheit lokalisiert sind, ist für ihre Aktivität die Komplexbildung mit der β-Untereinheit zwingend notwendig. Der bereits im endoplasmatischen Retikulum erfolgte Zusammenbau des Heterodimers ist die Voraussetztung für den gerichteten Transport zur basolateralen (Na^+,K^+-ATPase) bzw. zur apikalen (H^+,K^+-ATPase) Zelldomäne (Caplan, 1997b). Die Signalsequenzen für den gerichteten Transport nach apikal oder nach basolateral sind auf der α-Untereinheit der ATPasen lokalisiert (Dunbar et al., 1998; Muth et al., 1998).

Die Na^+,K^+-ATPase und die H^+,K^+-ATPase weisen, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, hinsichtlich ihrer kompartimentspezifischen Positionierung deutli-

che Unterschiede auf. Die sehr unterschiedliche Dynamik und die komplementäre Lokalisation der beiden ATPasen deuten differenzielle, spezifische Verankerungsmechanismen mit zytoskelettalen Strukturen an.

Überexpression von Spectrinfragmenten in Epithelzellen führt zur Disorganisation des Membranzytoskelets, zu einer randomisierten Verteilung der Na^+,K^+-ATPase und damit zur Zerstörung der normalen epithelialen Polarität (Hu et al., 1995). Die Na^+,K^+-ATPase verfügt mit der Aminosäuresequenz „ALLK“ über ein Bindungsmotiv für Ankyrin und kann so über ihre zytoplasmatische Domäne an dieses Verknüpfungmolekül binden (Koob et al., 1988; Jordan et al., 1995).

Im Unterschied zur statischen Verankerung der Na^+,K^+-ATPase sollte eine mögliche Wechselwirkung der H^+,K^+-ATPase mit Komponenten des Zytoskeletts dynamischer sein. Die tubulären Vesikel und damit auch die H^+,K^+-ATPase haben keinen erkennbaren Kontakt mit zytoskelettalen Proteinen (Hanzel et al., 1989). Erst während der stimulationsabhängigen Fusion dieser Vesikel mit der apikalen Membran kommt es zur zytoskelettalen Interaktion, die, im Sinne einer Oberflächenvergrößerung, in der Ausbildung unregelmäßig geformter mikrovillusähnlicher Strukturen resultiert (siehe S. 38).

Die Interaktion von Membranproteinen mit dem Membranzytoskelett stabilisiert die entsprechenden Membrandomänen und gewährleistet so eine gleichbleibende Funktionstüchtigkeit der Zellen.

Dieser Funktionszustand kann durch Aktivierung oder durch Deaktivierung der Zellen verändert werden. Die Verbindungen zu den zytoskelettalen Strukturen können gelöst oder neu geknüpft werden, und es kann zu umfassenden Umbauvorgänge innerhalb der Zellen kommen. Beispielhaft sind derartige zelluläre Veränderungen an den Parietalzellen untersucht worden. In diesen Zellen kommt es nach Aktivierung der Zellen durch Fusionsereignisse zu einer Oberflächenvergrößerung der apikalen Membrandomäne und daran gekoppelt zu einer Steigerung der HCl-Sekretion. Der dieser Fusion zugrundeliegende Mechanismus war bisher nicht bekannt und konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeiten in wesentlichen Teilen aufgeklärt werden. In

den nachfolgenden Kapitel der Einleitung werden kurz der intrazelluläre Transport von Vesikeln und ausführlicher Mechanismen der Membranfusion beschrieben.

4 Gerichtete Membranfusion in Epithelzellen

Es bestehen prinzipiell zwei Möglichkeiten, wie Membranproteine eine polare Verteilung in Epithelzellen erhalten können (Caplan, 1997a):

1. Vektorieller Transport: Die Membranproteine werden im Trans-Golgi-Netzwerk in spezifische apikale bzw. basolaterale Transportvesikel sortiert, die nur mit der apikalen oder basolateralen Plasmamembran fusionieren können (Simons und Wandinger Ness, 1990; Drubin und Nelson, 1996).
2. Transzytotische Steuerung: Die apikalen- und basolateralen Membranproteine werden nicht in unterschiedliche Transportvesikel sortiert, sondern randomisiert in die basolaterale Plasmamembran der Zelle eingebaut. Die nach diesem Zufallsprinzip in die falsche Domäne gelangten Proteine werden anschließend durch Transzytose zur korrekten Membrandomäne transportiert oder lysosomal abgebaut (Drubin und Nelson, 1996; Weimbs et al., 1997). Darmepithelien nutzen eine Mischung aus beiden Transportwegen, wohingegen in Hepatozyten Transzytose der vorherrschende Sortierungsmechanismus zu sein scheint. Die Zymogengranula der exokrinen Pankreasdrüsenzellen werden durch vektoriellen Transport nach apikal befördert. Der Inhalt der Vesikel wird dann durch regulierte Exozytose ausschließlich an dieser Zelloberfläche abgegeben (Gardner und Jensen, 1986).

Die Effizienz des gerichteten Transport zum apikalen Zellpol wird durch das Mikrotubulus-System entscheidend gesteigert. Mikrotubuli sind in Epithelzellen spezifisch ausgerichtet, wobei das polimerisationsinaktive Ende (Minusende) zum apikalen und das Plusende zum basalen Zellpol weist. Somit ist innerhalb der Epithelzellen ein gerichtetes Transportsystem ausgebildet. Mit Hilfe von mikrotubulusabhängigen Motorproteinen können Vesikel entweder zum Minusende (Dynein) oder zum Plusende (Kinesin) transportiert werden. (Achler et al., 1989; Holzbaur und Vallee, 1994; Lafont et al., 1994; Kraemer et al., 1999). Diese Vorstellung wird unter anderem dadurch gestützt, daß Zymogengranula des Pankreas auf ihrer Membran den Dyneinrezeptor

und Dynein tragen, nicht jedoch den Kinesinrezeptor und Kinesin und daher nur an der apikalen Plasmamembran zur Exozytose kommen (Kraemer et al., 1999).

Die Bedeutung der Mikrotubuli für das korrekte Sortieren von Membranproteinen läßt sich durch Gabe von Colchicin oder Vinblastin nachweisen. Diese die Mikrotubuli zerstören Substanzen haben einen dramatischen Einfluß auf die Verteilung von apikalen Membranproteinen, wie etwa der Sucrose-Isomaltase, der Aminopeptidase N oder der Alkalischen-Phosphatase. Nach Colchicin- oder Vinblastin-Gabe erscheinen die normalerweise nur apikal lokalisierten Proteine auch basolateral, wohingegen die Verteilung der basolateral lokalisierten Na^+,K^+-ATPase nicht beeinträchtigt ist (Achler et al., 1989; Eilers et al., 1989). Nach Wegnahme der Alkaloide reorganisiert sich das Mikrotubulus-Systems wieder und die zelluläre Polarität baut sich erneut auf.

4.1 SNARE-Mechanismus

Die exozytotische Fusion zwischen intrazellulären Vesikeln und der Plasmamembran findet nicht spontan statt, sondern erfordert spezifische Fusionsproteine, die die Lipiddoppelschichten so nahe aneinanderbringen, daß eine Fusion ermöglicht wird. In dieser Modellvorstellung wird postuliert, daß die Paarung von SNARE-Proteinen (**SNA**P-**Re**zeptor-Proteine) der **V**esikel (**v-SNARE**-Proteine) mit verwandten Rezeptorproteinen auf der Ziel (**t**arget)-Membran (**t-SNARE**-Proteine) für die Spezifität der Anheftung und damit für den ersten Schritt des Fusionsvorgangs verantwortlich ist (Söllner et al., 1993; Rothman und Warren, 1994).

In den letzten Jahren sind verschiedene Proteine identifiziert worden, die für das Anheften der Vesikel und die Einleitung der anschließenden Fusion von Bedeutung sind (Bennett und Scheller, 1993; Ferro-Novick und Jahn, 1994). Integrale v-SNARE-Proteine sekretorischer Vesikel gehören zur Synaptobrevin-Familie, während an der Plasmamembranseite die t-SNARE-Proteine Syntaxin und SNAP25 vorhanden sind. Diese Proteine haben eine hohe Affinität zueinander und bilden einen initialen Haftkomplex aus (Söllner et al., 1993; Calakos et al., 1994). Für die Ausbildung dieses Komplexes ist ein ungefähr sechzig Aminosäuren langer Proteinabschnitt verant-

wortlich, der in allen SNARE-Proteinen vorhanden ist und als SNARE-Motiv bezeichnet wird (Terrian und White, 1997; Weimbs et al., 1997). Kristallographische Untersuchungen haben gezeigt, daß im Zentrum der SNARE-Motive entweder ein Glutamin (Q), z. B. bei den Syntaxinen und bei SNAP25 oder ein Argenin (R), z. B. bei den Synaptobrevinen an exponierter Stelle lokalisiert ist. Diese Entdeckung hat zu einer erweiterten Terminologie der SNARE-Proteine geführt. Die neue Q/R-Klassifizierung ist der alten Terminologie insofern überlegen, da das Verteilungsmuster von einigen Mitgliedern der SNARE-Familie sich nicht mit der streng nach Vesikel- und Ziel-Membran unterscheidenden v- und t-SNARE-Terminologie in Einklang bringen läßt (Jahn und Südhof, 1999).

Der SNARE-Haftkomplex bildet sich spontan in nicht denaturierenden Lösungen und ist ungewöhnlich stabil. Weder Erhitzen auf 90°C noch SDS-Behandlung führen zur Spaltung des Komplexes. Zellen, in denen Membranfusion durch die Ausbildung des SNARE-Komplexes initiiert wird, verfügen über spezialisierte Regulatorproteine, deren Aufgabe die Dissoziation der im Haftkomplexkomplex miteinander verbundenen SNARE-Proteine ist. Bei diesen Regulatorproteinen handelt es sich um die auch frei im Zytoplasma vorkommenden Proteine NSF (N-ethylmaleimid-sensitive factor) und die Adaptor-Proteine α, β, γ-SNAP (α, β, γ-soluble NSF attachment protein). NSF ist ein Hexamer und hat Eigenschaften einer ATPase (Wilson et al., 1989; Tagaya et al., 1993). NSF alleine ist nicht in der Lage, den SNARE-Komplex zu binden und diesen zu spalten, sondern bedarf der SNAPs. Diese müssen zuerst an den SNARE-Haftkomplex gebunden haben, bevor NSF binden kann. Die Hydrolyse von ATP führt dann zur Dissoziation des zuvor gebildeten Komplexes, wodurch die eigentliche Fusion der Lipiddoppelmembranen eingeleitet wird. Die Vorgänge, die zwischen der ATP-Hydrolyse, der Dissoziation des SNARE-Komplexes und der Fusion liegen, sind molekular noch nicht geklärt (Südhof, 1995).

Die SNARE-Proteine wurden ursprünglich sowohl in Hefe als auch in Neuronen identifiziert und sind inzwischen auch in zahlreichen nicht-neuronalen Zellen nachgewiesen worden. In verschiedenen Epithelzelltypen wie den Hepatozyten (Fujita et al., 1998), den Sammelrohrzellen der Niere (Jo et al., 1995), den Parietalzellen des Magens

(Publikation 4; Calhoun und Goldenring, 1997; Peng et al., 1997) und den Deckzellen der Harnblase (Born, et al., 1999) konnten Isoformen verschiedener SNARE-Proteine identifiziert werden.

Das subzelluläre Verteilungsmuster der SNARE-Proteine in den verschiedenen Epithelzellen ist sehr heterogen und läßt kein einheitliches Schema erkennen (Gaisano et al., 1996; Delgrossi et al., 1997; Fujita et al., 1998). Einige SNARE-Proteine wie das in Epithelzellen verbreitete SNAP23 (ein Homolog von SNAP25), kommt sowohl basolateral vor (Azinuszellen des Pankreas), aber auch in einer hauptsächlich apikalen Verteilung (MDCK-Zellen, Low et al., 1998). Außerdem kann es zu einer überlappender Verteilung homologer Mitglieder der SNARE-Familie innerhalb einer Zelle kommen (Fujita et al., 1998). Welche Bedeutung diese uneinheitliche Verteilung der SNARE-Proteine für die Epithelzellen hat, kann noch nicht beantwortet werden.

Die SNARE-Proteine selber scheinen nicht den Ort der Exozytose zu spezifizieren, sondern nur an der Ausbildung der Haftkomplexe beteiligt zu sein. Dafür spricht unter anderem die Beobachtung, daß Syntaxin 1 und SNAP25 in Neuronen entlang des gesamten Axons gleichmäßig verteilt vorkommen, die Exozytose der synaptischen Vesikel aber nur an der präsynaptischen Membran stattfindet. Es bedarf also weiterer Proteine, die den Ort der Fusion definieren.

Zum einen wäre es möglich, daß in Subdomänen, in denen die Fusion stattfindet, die Q-SNARE-Proteine vor der Fusion aktiviert werden, zum Beispiel durch Assoziation oder Dissoziation regulatorischer Proteine (Rothman und Söllner, 1997). Alternativ wäre aber auch denkbar, daß die Q-SNARE-Proteine immer aktiviert und kompetent für eine Fusion sind, die Vesikel aber durch Leitstrukturen wie Mikrotubuli, Actin- oder Septinfilamente an den Ort der Fusion transportiert werden (Adams und Pringle, 1984; Hsu et al., 1998; Xie et al., 1999).

Zu den Proteinen mit einer regulatorischen Funktion für SNARE-Proteine gehört *Unc-18* aus Caenorhabditis elegans und dessen Homologe in Säugern, die *Munc-18*-Isoformen (Hata et al., 1993; Garcia et al., 1994; Pevsner et al., 1994). Diese Proteine weisen eine polare Verteilung in Epithelzellen auf und binden, im Fall von *Munc 18* gezeigt, je nach Isoform nur an bestimmte Syntaxinisoformen. Die Bindung von *Munc*

18 an Syntaxin verhindert die Bindung von SNAP25 oder Synaptobrevin, verhindert also die Haftkomplexbildung. Regulatorische Proteine wie die *Mints* sind über ihre PDZ-Domänen an Plasmamembranproteine gebunden und so in den Abschnitten, in denen Vesikelanheftung und -fusion abläuft, angereichert (Okamoto und Südhof, 1997).

Eine weitere Gruppe von Proteinen, die für das Anheften und für die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran von Bedeutung sind, stellen die Rab-Proteine dar. Diese gehören zur Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine. Bisher ist jedoch noch keine präzise Funktion der Rab-Proteine während des Fusionsprozesses bekannt (Chavrier et al., 1990; Sogaard et al., 1994; Zahraoui et al., 1994; Rothman und Söllner, 1997), es konnte jedoch durch Einsatz von dominant-negativ-Mutationen gezeigt werden, daß Abwesenheit bestimmter Rab-Proteine zu einer Blockade in unterschiedlichen Stadien der Fusion führt (Tisdale et al., 1992; Holz et al., 1994; Li et al., 1994; Lazzarino et al., 1998; Ren et al., 1998;). Rab-Proteine haben offensichtlich keine Bedeutung für einen gerichteten Transport der Vesikel zur Zielmembran, möglicherweise aber für die Membranerkennung und die initiale Anheftung (Cao et al., 1998; Ungermann et al., 1998a).

4.2 Homotypische Fusion

Bei der bisher beschriebenen Modellvorstellung der Fusionsvorgänge handelte es sich um die heterotypische Fusionen, also die Fusion von zwei unterschiedlichen Membranen. Beide Membranen haben mit den aufgeführten R- bzw. Q-SNARE-Proteinen und den Begleitproteinen eine unterschiedliche Proteinbestüc??kung, die eine ortsgebundene und zielgerichtete Fusion ermöglicht. Neben dieser Art der Fusion gibt es eine weitere, die homotypische Fusion. Beispiele sind die Fusion der Vakuolen in der Hefe, die Fusion von im endoplasmatischen Retikulum gebildeten Transportvesikeln mit dem Golgikomplex oder die Fusion von Lysosomen untereinander (Nichols et al., 1997; Nichols und Pelham, 1998). Auch bei den homotypischen Fusionsvorgängen sind SNARE-Proteine entscheidend involviert. Im Gegen-

satz zur heterotypischen Fusion finden sich bei der homotypischen Fusion auf den Membranen, die miteinander fusionieren, ein jeweils identischer Proteinbesatz aus Q- und aus R-SNARE-Proteinen. So ist es möglich, daß bei der homotypischen Fusion jeder Membranabschnitt sowohl als Ziel- wie auch als Vesikelmembran an der Fusion teilnehmen kann. Untersuchungen an Hefe-Vakuolen zeigten, daß die Hefeanaloga von NSF (*Sec18p*) und von α-SNAP (*Sec17p*) auch für die homotypische Fusion der Vakuolen von Bedeutung sind. In diesem System haben die Regulatorproteine möglicherweise aber eine andere oder zumindest noch eine zusätzliche Funktion (Ungermann et al., 1998b). Die bei der homotypischen Fusion nebeneinander auf einer Vesikelmembran vorhandenen SNARE-Proteine scheinen ebenfalls in einem Komplex miteinander verbunden sein. Damit die einzelnen SNARE-Proteine für die Ausbildung des initialen Haftkomplexes zwischen zwei benachbarten Vesikeln zur Verfügung stehen, muß zuerst dieser laterale Komplex gelöst werden. Dafür scheinen *sec18p* und *sec17p* verantwortlich zu sein (Ungermann et al., 1998b).

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Die Parietalzelle als Modell für polare Differenzierung und Membranfusion

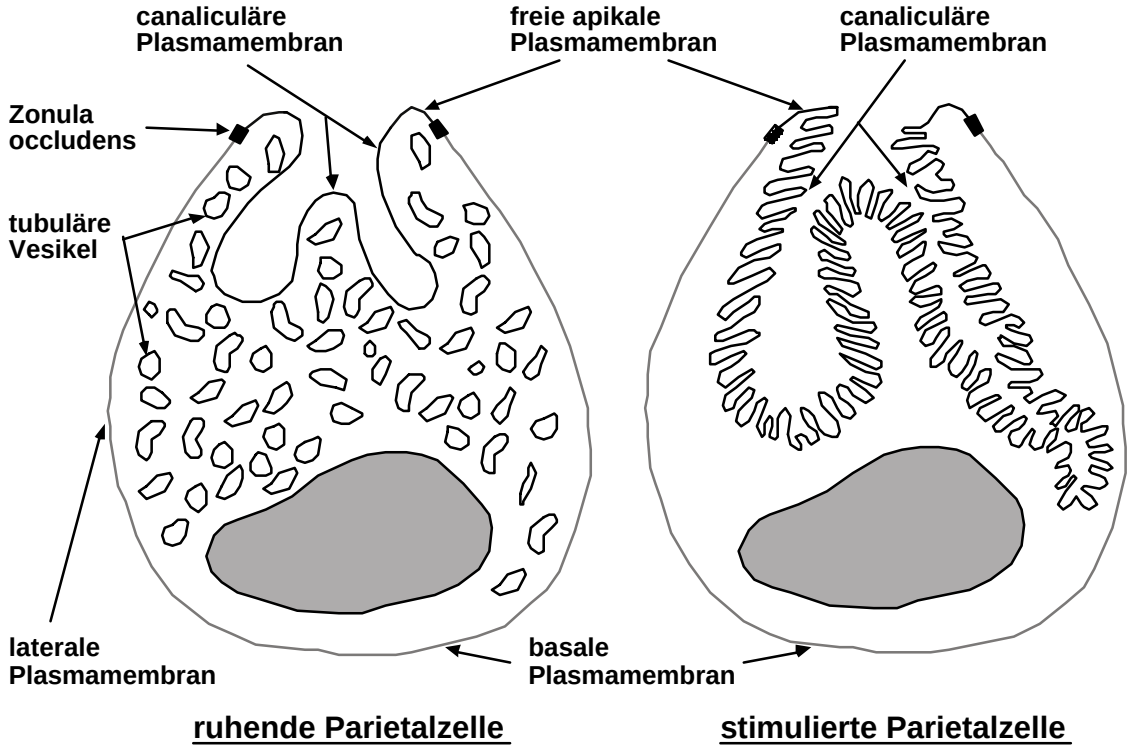
Parietalzellen weisen große strukturelle und molekulare Unterschiede zwischen dem basolateralen und apikalen Membrankompartiment auf (Urushidani und Forte, 1997; Urushidani et al., 1997).

Die apikale Plasmamembran der Parietalzellen kann in verschiedene Kompartimente unterteilt werden:

1. in die freie apikale Membran, die direkt an das Drüsenlumen grenzt,
2. in die, von der freien apikalen Membran ausgehende, tiefe in das Zytoplasma der Zellen hineinragende kanälchenartige Invaginationen und
3. in die unregelmäßig geformten vesikulären Membranen innerhalb der Zelle, die bei Aktivierung der Zellen mit der canaliculären Membran verschmelzen und als präapikale Reservemembran angesehen werden können (siehe Abb. 3 S. 35).

Die Fusion der Tubulovesikel findet unter anderem nach Stimulation der Zellen mit Gastrin, Histamin oder Acetylcholin statt. Als Folge dieser Membranumverteilung vergrößert sich die apikale Membranoberfläche um das Fünf- bis Zehnfache.

Abb. 3 Schematische Darstellung der Membrankompartimente einer ruhenden und einer stimulierierten Parietalzelle. Das Zytoplasma der ruhenden Zelle ist angefüllt mit tubulären Vesikeln, die als präapikale Membran angesehen werden können. Nach Stimulation der Zelle fusionieren die Vesikel mit der canaliculären Plasmamembran, was zu einer deutlichen Vergrößerung dieser Membrandomäne führt. Die



canaliculäre Plasmamembran weist in den stimulierten Zellen Mikrovillus-ähnliche Strukturen auf. An der basolateralen Plasmamembran finden nach Stimulierung der Zellen keine Membranumbauvorgänge statt.

Die stimulationsabhängigen Veränderungen des apikalen Membrankompartiments und die strukturelle Stabilität der basolateralen Plasmamembran werfen eine Reihe von Fragen auf:

1. Worin bestehen die Unterschiede in der Stabilität bzw. in der Dynamik zwischen dem basolateralen und dem apikalen Zellmembrankompartiment?

2. Welche Rolle spielen Verankerungen integraler Membranproteine mit dem Membranzytoskelett für die strukturelle Stabilität der basolateralen Membrandomäne und für die Dynamik der Apikaldomäne?
3. Wie wird das stark vergrößerte apikale Membrankompartiment während der Sekretionsphase stabilisiert?
4. Wie wird die Fusion der tubulären Vesikel mit der apikalen Plasmamembran nach Stimulation vermittelt?

Wir konnten das für die basolaterale Chloridaufnahme verantwortliche Molekül der Parietalzellen des Menschen identifizieren (Publikation 1). Es handelt sich dabei um den Anionenaustauscher AE2 der Cl^--Ionen im Austausch gegen HCO_3^--Ionen in die Zelle aufnimmt. Die Cl^--Ionen werden dann an der apikalen Zellseite durch einen noch nicht identifizierten Cl^--Kanal abgegeben. Zusammen mit den durch die H^+,K^+-ATPase sezernierten H^+-Ionen kommt es dadurch zur Nettosekretion von HCl. Die apikale HCl-Sekretion und die basale Cl^-- Aufnahme sind somit funktionell aneinander gekoppelt. Die Transportmoleküle weisen aber eine sehr unterschiedliche Dynamik auf. H^+,K^+-ATPase-Moleküle werden nach Stimulation der Zellen vom tubulovesikulären Zellkompartiment durch Fusion in die apikale Plasmamembran eingebaut. AE2-Moleküle verbleiben dagegen unabhängig vom Funktionszustand der Zellen in der basolateralen Plasmamembran und scheinen keinem Endozytose/Exozytose-Mechanismus zu unterliegen.

Entlang der basolateralen Plasmamembran der Parietalzellen konnten wir Ankyrin nachweisen (Antikörper gegen die erythrozytären Ankyrinisoform). Ankyrin ist in diesen Zellen mit AE2 kolokalisiert. In einer Bindungsstudie konnte gezeigt werden, daß die cytoplasmatische Domäne von AE2 an erythrozytäres Ankyrin bindet (Publikation 2). AE2 könnte daher über Ankyrin mit dem aus Spectrin und Actin aufgebauten Membranzytoskelett verbunden und so in der basolateralen Membrandomäne immobilisiert sein (siehe Abb. 4 S.37).

Verknüpfung von Membranproteinen mit dem Membranzytoskelett in Parietalzelle

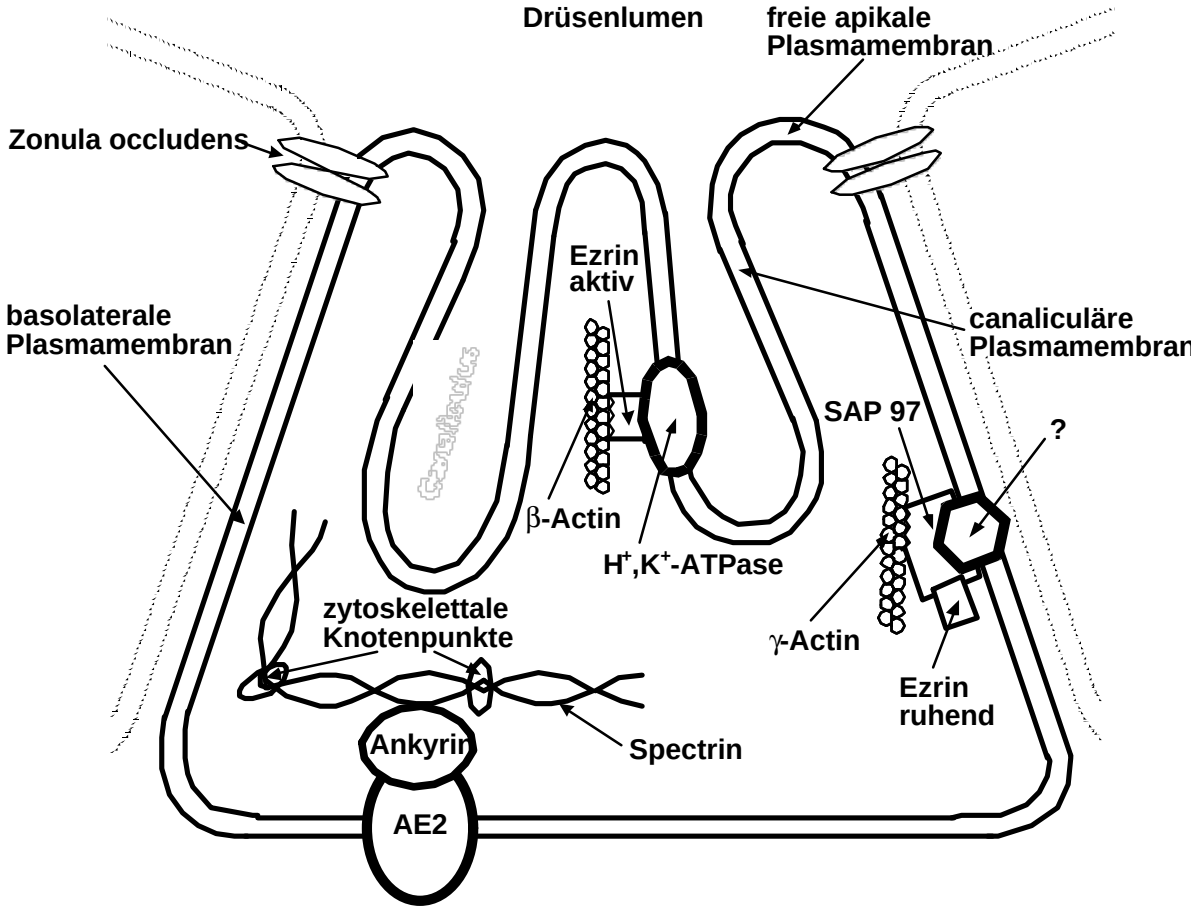


Abb. 4 Schematische Darstellung einer Parietalzelle. In der freien apikalen und der canaliculären Plasmamembran ist die H^+,K^+-ATPase über Ezrin an das apikale β-Actin-Filamentsystem gebunden. Ezrin kommt außerdem an der basolateralen Plasmamembran vor, hier zusammen in einem Komplex mit SAP 97 und γ-Actin. Der Membranbindungspartner für diesen Komplex ist noch nicht bekannt. Das basolateral vorhandene Ezrin stellt möglicherweise die nicht Actin bindende Ruheform des Adaptorproteins dar.

Basolateral ist AE2 über Ankyrin an das Spectrin Membranzytoskelett gebunden.

Actin und Spectrin kommen in Parietalzellen nicht nur entlang der basolateralen Plasmamembran vor, sondern sind auch apikal vorhanden. In den unterschiedlichen Membrandomänen dieser Zellen ist die Verteilung von Actin- und Spectrin-isoformen

jedoch nicht identisch, vielmehr sind apikal und basolateral unterschiedliche Isoformen dieser Zytoskelettproteine angereichert. Basolateral kommt fast ausschließlich γ-Actin vor (Yao et al., 1995), apikal hauptsächlich β-Actin (Publikation 3). Die apikale Plasmamembran der Parietalzellen konnte mit einem gegen αIIΣ-Spectrin (Fodrin) gerichteten Antikörper deutlich dargestellt werden, bei nur schwacher Markierung der basolaterale Membran. Die basolaterale Membrandomäne wurde mit einem gegen αIΣ1/βIΣ1-Spectrin (erythrozytäres Spectrin) gerichten Antikörper markiert, der jedoch die apikale Plasmamembran kaum darstellte (Jöns et al. nicht veröffentliche Daten). Welche Funktion eine derartige domänenspezifische Verteilung von Zytoskelettproteinisoformen innerhalb einer Zelle haben könnte, ist noch nicht geklärt. Es ist jedoch denkbar, daß über unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu Adaptorproteinen wie Ankyrin oder Ezrin Membranproteine wie AE2 (basolateral) oder die H^+,K^+-ATPase (apikal) in bestimmten Membrandomänen verankert werden.

Ezrin kommt in Parietalzellen in apikaler und in basolateraler Verteilung vor (Abb.4 S. 37; Publikation 3; Hanzel et al., 1991). Entlang der freien apikalen und canaliculären Plasmamembran ist Ezrin mit β-Actin und der H^+,K^+-ATPase kolokalisiert. Ezrin-Antikörper kopräzipitieren sowohl β-Actin wie auch die H^+,K^+-ATPase (Publikation 3). Das läßt auf eine mögliche Funktion von Ezrin als zytoskelettales Adaptormolekül der H^+,K^+-ATPase schließen.

An der basolateralen Membrandomäne der Parietalzellen konnte mit SAP 97 ein möglicher Bindungspartner von Ezrin identifiziert werden (Publikation 3; Marfatia et al., 1994; Marfatia et al., 1995). Immunopräzipitationen mit Ezrin- und SAP 97-Antikörpern führen zur Kopräzipitation des jeweils anderen Proteins. Ezrin und SAP 97 könnten somit entweder direkt aneinander binden oder kommen gemeinsam in einem Komplex mit weiteren Proteinen vor. Die Präzipitation mit SAP 97-Antikörpern führt ebenfalls zu Kopräzipitation von Actin, wobei der β-Actinanteil sehr gering ist, da, wie oben erwähnt, β-Actin in Parietalzellen hauptsächlich apikal lokalisiert ist.

Möglicherweise ist Ezrin in ruhenden Parietalzellen basolateral an SAP 97 gebunden und hat selber keinen Kontakt zum Actinzytoskelett (Ezrin bindet mit hoher Präferenz nur an β-Actin, Yao et al., 1995). Nach Stimulierung der Parietalzellen

könnte Ezrin zum canaliculären Kompartiment transloziert werden und dort während der HCl-Sekretionsphase die vergrößerte apikale Membrandomäne durch Veknüpfung der H^+,K^+-ATPase mit dem β-Actinzytoskelett stabilisieren (siehe Abb. 4 S. 37).

Die Fusion der tubulären Vesikel mit der apikalen Plasmamembran ist reguliert und gleicht daher regulierten Membranfusionen, wie sie bei der Exozytose von Neurotransmittern vorkommen.

Wir konnten zeigen, daß die Fusion der tubulären Membranvesikel mit der apikalen Zellmembran durch SNARE-Proteine vermittelt wird (Publikationen 4 und 5). Hiermit weisen die Parietalzellen Ähnlichkeiten mit anderen Systemen auf. Der in Fettzellen und Muskelfasern vorkommende Glukosetransporter GluT4 und der in Sammelrohrzellen der Niere enthaltende Wasserkanal Aquaporin 2 AQP-2 sind in ruhenden Zellen wie die H^+,K^+-ATPase der Parietalzellen in der Membran zytoplasmatischer Vesikel konzentriert. Auf einen adäquaten Stimulus hin (Insulin für GluT4 und Antidiuretisches Hormon für AQP-2) kommt es zur Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran (Cain et al., 1992; Uchida et al., 1994). Für GlutT4-Vesikel ist gezeigt worden, daß die R-SNARE-Proteine Synaptobrevin 2 und Cellubrevin auf der Vesikelmembran vorkommen und daß an der Plasmamembran von Fettzellen die Q-SNARE-Proteine Syntaxin 2, Syntaxin 4 und SNAP23 vorhanden sind (Cain et al., 1992; Timmers et al., 1996; St-Denis et al., 1999).

Durch enzymatische Spaltung von Synaptobrevin 2 und von Cellubrevin mit Botulinum-Neurotoxin B oder D konnte die durch Insulin stimulierte Glukoseaufnahme in Fettzellen inhibiert werden (Cheatham et al., 1996; Olson et al., 1997). Synaptobrevin 2 wurde auch an der Membran der intrazellulären AQP-2-Vesikel der Sammelrohrzellen gefunden. In diesen Zellen konnten außerdem Syntaxin 4 und SNAP23 nachgewiesen werden (Nielsen et al., 1995; Mandon et al., 1996).

In der gastrischen Mucosa ließen sich SNARE-Proteine in Parietalzellen und in Enterochromaffin-ähnlichen Zellen nachweisen. In letzteren spielen die SNARE-Proteine bei der Exozytose von Histamin speichernden Sekretvesikeln eine entscheidende Rol-

le (Höhne-Zell et al., 1997). In Parietalzellen konnten verschiedene Isoformen der SNARE-Proteine identifiziert werden, was möglicherweise auf unterschiedliche Funktionen schließen läßt, an denen diese Proteinen beteiligt sind (Publikationen 4 und 5; Peng et al., 1997). Wir konnten zeigen, daß in Parietalzellen von Ratte und Schwein das R-SNARE-Protein Synaptobrevin 2 und die Q-SNARE-Proteine SNAP25 und Syntaxin 1 vorhanden sind. Darüber hinaus kommen die Regulatorproteine NSF und α, β-SNAP sowie das G-Protein Rab3A in diesen Zellen vor. In Abhängigkeit vom Stimulationszustand der Zellen werden alle Proteine intrazellulär umverteilt (Publikationen 4 und 5). Ein unerwarteter Befund war, daß die R- und die Q-SNARE-Proteine ein identisches subzelluläres Verteilungsmuster zeigten. In Analogie zur neuronalen Fusion der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran hätte man erwarten können, daß Synaptobrevin auf der Membran der tubulären Vesikel nachzuweisen wäre und Syntaxin und SNAP25 entlang der apikalen und canaliculären Membran. Im Gegensatz zu dieser Vorstellung waren die SNARE-Proteine sowohl in ruhenden wie in stimulierten Zellen immer mit der H^+,K^+-ATPase kolokalisiert. Die H^+,K^+-ATPase und die drei SNARE-Proteine kommen in ruhenden Zellen hauptsächlich an der Membran der tubulären Vesikel (im ganzen Zytoplasma verteilt) vor. Nach Stimulation befinden sich alle vier Moleküle an der freien apikalen und der canaliculären Membran der Zellen. Die Erklärung für die Gleichverteilung aller SNARE-Proteine in Parietalzellen könnte in der ganz anderen Zielvorgabe liegen, die hier durch die Fusion erreicht werden soll. In Neuronen fusionieren nur solche Vesikel mit der Plasmamembran, die sich in unmittelbarer Nähe zur präsynaptische Membran befinden. Nach erfolgter Fusion wird die Vesikelmembran sofort durch Endozytose wieder in die Zelle zurückgenommen, die Fusion der synaptischen Vesikel führt somit zu keiner Vergrößerung der Oberfläche der präsynaptischen Membran. In Parietalzellen befinden sich die tubulären Vesikel in der ganzen Zelle verteilt und haben nur zum Teil unmittelbarem Kontakt mit der canaliculären Membran. Eine schnelle und stabile Vergrößerung der Membranoberfläche, die hier erreicht werden soll, ist nur möglich, wenn alle Vesikel untereinander, also nach dem Modell der homotypischen Fusion, fusionieren können (siehe S. 33). Die tubulären Vesikel befinden sich innerhalb der

Zelle in unmittelbarer Nähe zueinander, so daß es überall zur Fusion kommen kann. Die Fusion canaliculusnaher Vesikel mit der invaginierten apikalen Membrandomäne eröffnet dann auch allen bereits miteinander verschmolzenen Vesikeln den Zugang zum Drüsenlumen.

Wir konnten durch Immunopräzipitation zeigen, daß der für eine SNARE-Protein-vermittelte Fusion notwendige Haftkomplex, bestehend aus Synaptobrevin, Syntaxin und SNAP25, in Parietalzellen ausgebildet wird (Publikation 4). Darüber hinaus konnten wir zeigen, daß das Parietalzell-Synaptobrevin genauso wie die neuronale Isoform ein Substrat des clostridialen Neurotoxins TeNt ist. Wenn SNARE-Proteine für die stimulationsbedingte Fusion der tubulären Vesikel mit der apikalen Membran von Bedeutung sind, sollte die enzymatische Spaltung von Synaptobrevin durch TeNt in diesen Zellen die Fusion und damit auch eine gesteigerte Salzsäuresekretion inhibieren. Da TeNt von nicht-neuronalen-Zellen nicht aufgenommen wird, war es notwendig, die Plasmamembran dieser Zellen zu permeabilisieren. Behandlung der Parietalzellen mit Streptolysin O (SLO) gewährleistete eine ausreichende Zugänglichkeit für das Toxin, ohne die Stimulierbarkeit der Zellen mit cAMP zu beeinträchtigen (Publikation 5). Inkubation der SLO-permeabilisierten Zellen mit TeNt führte im Vergleich mit der nicht toxinbehandelten aber auch permeabilisierten Kontrolle zu einer kompletten Inhibition der stimulationsbedingten Steigerung der Salzsäuresekretion (Publikation 5).

Wir konnten somit eindeutig zeigen, daß die Fusion der tubulären Vesikel und die daran gekoppelte Steigerung der HCl-Sekretion der Parietalzellen über einen Mechanismus abläuft, der als essentiellen Bestandteil SNARE-Proteine beinhaltet.

Modellvorstellung der Fusionsereignisse im apikalen Membrankompartiment

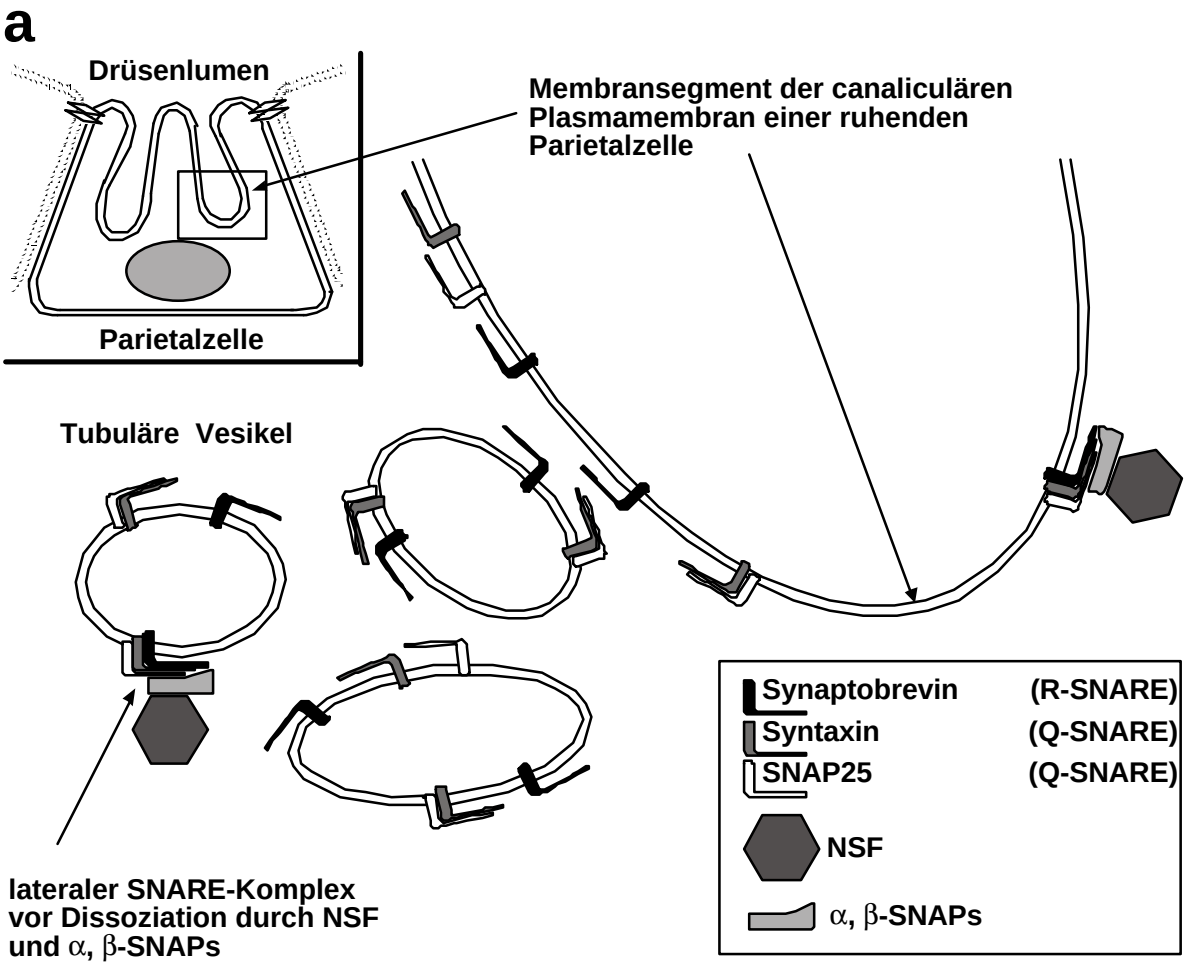


Abb. 5a Ausschnit des apikalen Membrankompartiments einer ruhenden Parietalzelle. Auf der canaliclären und auf der Vesikel Membran sind Q- und R-SNARE-Proteine vorhanden. Die Proteine sind zum Teil in einem lateralen Komplex miteinander verbunden oder kommen einzeln auf der Membran vor. Die komplexierten SNARE-Proteine sind in Assoziation mit α, β-SNAPs und NSF dargestellt, die möglicherweise für die Dissoziation dieses Komplexes verantwortlich sind.

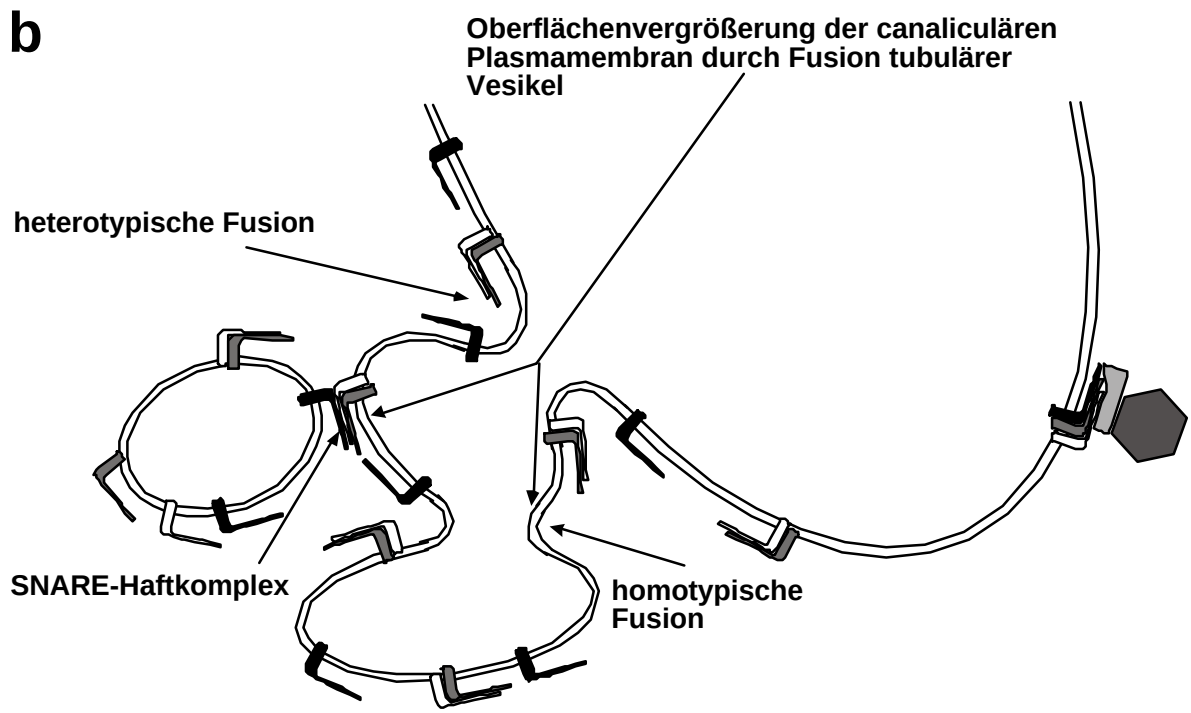


Abb. 5b Nach Aktivierung der Parietalzelle durch Stimulation kommt es zur Fusion der tubulären Vesikel untereinander und mit der canaliculären Membran.

Die Kombination von homotypischer und heterotypischer Fusion macht es möglich, daß auch diejenigen Vesikel direkten Zugang zum Drüsenlumen erhalten, die sich während der Ruhephase der Zellen nicht in unmittelbarer Nähe zur canaliculären Membran befunden haben.

6 Zusammenfassung

Die in der vorliegenden Habilitationsschrift zusammengefaßten Publikationen stel-len Untersuchungen zu zwei Themenschwerpunkten dar:

1. Verankerungsmechanismen von Membranproteinen der basolateralen und der apikalen Plasmamembrandomäne der Parietalzellen mit dem Membranzytoskelett und
2. die regulierte Fusion von zytoplasmatischen Vesikeln mit der apikalen Plasmamembran dieser Zellen.

An den Salzsäure sezernierenden Parietalzellen des Magens sollten die strukturell und molekular sehr unterschiedlich gestaltete apikale und basolaterale Membrandomäne der Parietalzellen funktionell charakterisiert und Mechanismen der Membranumbauvorgänge aufgeklärt werden, die nach Aktivierung der Zellen im apikalen Membrankompartiment ablaufen.

Die Sekretion von HCl in das Drüsenlumen ist an eine basolaterale Cl^--Aufnahme funktionell gekoppelt, welche durch den Anionenaustauscher 2 (AE2) sichergestellt wird (Publikation 1).

Für die strukturelle Stabilität der basolateralen Domäne spielt wahrscheinlich die Verankerung von AE2 über das Verknüpfungsprotein Ankyrin mit dem Membranzytoskelett eine wichtige Rolle. Ankyrin ist in Parietalzellen mit AE2 kolokalisiert und bindet an dessen zytoplasmatische Domäne (Publikation 2).

Die apikale Membrandomäne der Parietalzellen kann in drei Kompartimente unterteilt werden:

1. die freie apikale Plasmamembran, die direkt an das Drüsenlumen grenzt,
2. kanälchenartige Invaginationen der apikalen Plasmamembran, die tief in das Zytoplasma hineinragen und
3. intrazelluläre tubuläre Vesikel „prä-apikale Membranen“, die nach Aktivierung der Zellen mit der canaliculären Membran fusionieren können. Durch diesen Fusionsvorgang vergrößert sich die apikale Membrandomäne, zusätzliche H^+,K^+-ATPase Moleküle erhalten Zugang zum Drüsenlumen, und es kommt zu einer Steigerung der Salzsäuresekretion.

Entlang der freien apikalen und der canaliculären Plasmamembran kommen wie auf der basolateralen Seite die Zytoskelett-Proteine Actin und Spectrin vor, allerdings sind apikal andere Isoformen vorhanden als basolateral (Publikation 3). Nach unseren Untersuchungen könnte es während der Sekretionsphase zu einer temporären Verbindung von H^+,K^+-ATPase Molekülen mit dem Membranzytoskelett kommen. Wahrscheinlich werden die nach der Membranfusion im canaliculären Kompartiment vorhandenen H^+,K^+-ATPasen durch das Verknüpfungsprotein Ezrin mit β-Aktinfilamenten verbunden (Publikation 3).

In Parietalzellen kommt Ezrin nicht nur apikal, sondern auch an der basolateralen Plasmamembran vor wo es möglicherweise in einer nicht-Aktin-bindenden Ruheform über das MAGUK-Protein SAP 97 mit der Plasmamembran verbunden ist (Publikation 3).

Der Mechanismus des Fusionsvorgangs der tubulären Vesikel mit der canaliculären Membran war bisher nicht bekannt. In Parietalzellen konnten die neuronalen SNARE-Proteine Synaptobrevin 2, Syntaxin 1 und SNAP25 sowie das zur Familie der kleinen G-Proteine gehörende Protein Rab3A und die Regulatorproteine NSF und α, β-SNAP nachgewiesen werden. Das Vorhandensein dieser Proteine in Parietalzellen legt einen Fusionsmechanismus nahe, der in Neuronen der Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran zugrunde liegt (Publikationen 4 und 5). Im Unterschied zu Neuronen kommen diese Proteine jedoch in Parietalzellen alle in einer jeweils identischen subzellulären Verteilung vor; in ruhenden Zellen befinden sie sich hauptsächlich im tubulovesikulären Kompartiment und verteilen sich nach Stimulation in das canaliculäre (Publikationen 4 und 5).

Das in Parietalzellen gefundene Verteilungsmuster der SNARE-Proteine entspricht somit nicht der klassischen Vorstellung einer heterotypischen Membranfusion (Q-SNARE-Proteine wie Syntaxin und SNAP25 auf der Zielmembran und R-SNARE-Proteine wie Synaptobrevin auf der Vesikelmembran). Vielmehr entspricht diese Verteilung einer homotypischen Fusion, wie sie für Vakuolen in Hefezellen beschrieben wurde. In Parietalzellen laufen während der Stimulation daher eine Kombination von homotypischen und heterotypischen Fusionen ab. Verschiedene tubuläre Vesikel fu-

sionieren untereinander nach dem Modell der homotypischen Fusion. Einzelne heterotypische Fusionsereignisse mit der canaliculären Plasmamembran ermöglichen dann den Zugang zum Drüsenlumen.

Die Bedeutung der SNARE-Proteine für die Fusion der tubulären Vesikel mit der canaliculären Membran und damit für die Steigerung der HCl-Sekretion konnte durch Inkubation Streptolysin-O-permeabilisierter Parietalzellen mit Tetanus Neurotoxin (TeNt) gezeigt werden (nicht permeabilisierte Zellen nehmen das Toxin nicht auf). Als Protease spaltet TeNt hochselektiv Synaptobrevin, führt aber zu keiner weiteren Beeinträchtigung der behandelten Zellen. Das Fehlen von Synaptobrevin verhindert die Ausbildung des SNARE-Haftkomplexes, der für die eigentlichen Fusion unerläßlich ist. Die Behandlung der Parietalzellen mit TeNt führte zum vollständ-igen Ausbleiben der, nach Stimulation mit cAMP bei Kontrollzellen beobachteten Erhöhung, der Säuresekretion (Publikation 5).

7 Abkürzungen:

α, β, γ -SNAP	α,β,γ-soluble NSF attachment protein
ADH	Antidiuretisches Hormon
AE1, 2, 3	Anion exchanger 1, 2, 3 (Anionenaustauscher 1, 2, 3)
ANK	Ankyrin
AQP-2	Aquaporin 2
ATP	Adenosintriphosphat
c-Src	cellular-sarcoma-(producing protein)
cAMP	zyklisches 3´,5´- Adenosin Monophosphat
CCK_B Rezepto	Gastrin-Rezeptor
CD44	Cluster of differentiation 44
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CsK	Glycogen synthase kinase-3
Dlg	Drosophila lethal discs-large-1tumor suppressor gene
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EZM	Extrazelluläre Matrix
GDP	Guanosindiphosphat
GIP	Gastric inhibitory polypeptide
GluT4	Glukosetransporter T4
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
GUK	Guanylat Kinase
H_2-Rezeptor	Histamin-Rezeptor
IP3	1, 4, 5-Inositoltriphosphat
L1-(Antigen)	Hitze labiles (Antigen) 1
LEF	Lymphoid enhancer binding factor
M_3-Rezeptor	Muskarin Rezeptor
MAGUK	Membrane associated guanylate kinase homologues

MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
NBL4	Novel band4.1 like protein
NSF	N-ethylmaleimid-sensitive factor
P55	Peripheres Membranprotein 55
PDZ	PSD-95, Dlg, ZO-1
PKA	Proteikinase A
PTPH1	Protein Tyrosin Phosphatase human
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
PKC	Protein Kinase C
PSD-95	Protein of postsynaptic density of 95kDa
PTP-LAR	Protein Tyrosine Phosphatase-Leukocyte antigen-related
PTPμ	Protein tyrosine phosphatase μ
Rab3A	Ras related GTP-binding protein
Ras-MAP-Kinase	Rous Sarcoma Virus Oncogen-Protein-p21-Mitogen activated Protein
Rho	Ras Homolog
SAP97	Synapsenassoziertes-Protein 97
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelektrophoresis
sec 17p	Saccharomyces cerevisiae gen 17p
sec 18p	Saccharomyces cerevisiae gen 18p
SH3	Src Homologie 3
SLO	
SNAP25	Synaptosomal associated protein of 25kDa
SNARE	SNAP-Rezeptor
Q-SNARE	Glutamin-SNARE
R-SNARE	Argenin-SNARE
t-SNARE	target-SNARE
v-SNARE	vesicle-SNARE

Sos	Son of sevenless
TeNt	Tetanus Neurotoxin
TGFα	Transformierenden Wachstumsfaktor α
TGN	Trans-Golgi-Netztwerk
ZO-1, 2	Zonula Occludens Protein-1, 2

8 Literatur

Achler, C., Filmer, D., Merte, C., Drenckhahn, D. (1989). Role of microtubules in polarized delivery of apical membrane proteins to the brush border of the intestinal epithelium. J. Cell Biol. *109*, 179-189.

Adams, A. E., Pringle, J. R. (1984). Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant Saccharomyces cerevisiae. J. Cell Biol. *98*, 934-945.

Alper, S. L. (1991). The band 3-related anion exchanger (AE) gene family. Annu. Rev. Physiol. *53*, 549-564.

Alper, S. L., Stuart Tilley, A., Simmons, C. F., Brown, D., Drenckhahn, D. (1994). The fodrin-ankyrin cytoskeleton of choroid plexus preferentially colocalizes with apical Na^+K^+-ATPase rather than with basolateral anion exchanger AE2. J. Clin. Invest. *93*, 1430-1438.

Alper, S. L., Stuart Tilley, A. K., Biemesderfer, D., Shmukler, B. E., Brown, D. (1997). Immunolocalization of AE2 anion exchanger in rat kidney. Am. J. Physiol. *273*, F601-614.

Anderson, R. A., Correas, I., Mazzucco, C., Castle, J. D., Marchesi, V. T. (1988). Tissue-specific analogues of erythrocyte protein4.1 retain functional domains. J. Cell Biochem. *37*, 269-284.

Azim, A. C., Marfatia, S. M., Korsgren, C., Dotimas, E., Cohen, C. M., Chishti, A. H. (1996). Human erythrocyte dematin and protein4.2 (pallidin) are ATP binding proteins. Biochemistry *35*, 3001-3006.

Baklouti, F., Huang, S. C., Vulliamy, T. J., Delaunay, J., Benz, E. J., Jr. (1997). Organization of the human protein4.1 genomic locus: new insights into the tissue-specific alternative splicing of the pre-mRNA. Genomics *39*, 289-302.

Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. Nature *382*, 638-642.

Bennett, V., Stenbuck, P. J. (1979). The membrane attachment protein for spectrin is associated with band 3 in human erythrocyte membranes. Nature *280*, 468-473.

Bennett, V. (1990). Spectrin-based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm. Physiol. Rev. *70*, 1029-1065.

Bennett, V. (1992). Ankyrins. Adaptors between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm. J. Biol. Chem. *267*, 8703-8706.

Bennett, M. K., Scheller, R. H. (1993). The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *90*, 2559-2563.

Bork, P. (1993). Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? Proteins *17*, 363-374.

Born, M., Ahnert-Hilger, G., Jöns, T. (1999). Zur Bedeutung von SNARE-Proteinen im Urothel der Ratte. *Anat. Anz. 182 (Suppl.): im* Druck.

Boulan, E. R., Sabatini, D. D. (1978). Asymmetric budding of viruses in epithelial monlayers: a model system for study of epithelial polarity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *75*, 5071-5075.

Boulan, E. R., Paskiet, K. T., Sabatini, D. D. (1983). Assembly of enveloped viruses in Madin-Darby canine kidney cells: polarized budding from single attached cells and from clusters of cells in suspension. J. Cell Biol. *96*, 866-874.

Boulan, E. R., Powell, S. K. (1992). Polarity of epithelial and neuronal cells. Annu. Rev. Cell Biol. *8*, 395-427.

Brady-Kalnay, S. M., Rimm, D. L., Tonks, N. K. (1995). Receptor protein tyrosine phosphatase PTPmu associates with cadherins and catenins in vivo. J. Cell Biol. *130*, 977-986.

Brenner, S. L., Korn, E. D. (1980). Spectrin-actin complex isolated from sheep e-rythrocytes accelerates actin polymerization by simple nucleation. Evidence for oligo-meric actin in the erythrocyte cytoskeleton. J. Biol. Chem. *255*, 1670-1676.

Bruce, L. J., Cope, D. L., Jones, G. K., Schofield, A. E., Burley, M., Povey, S., Unwin, R. J., Wrong, O., Tanner, M. J. (1997). Familial distal renal tubular acidosis is asso-ciated with mutations in the red cell anion exchanger (Band 3, AE1) gene. J. Clin. In-vest. *100*, 1693-707.

Cain, C. C., Trimble, W. S., Lienhard, G. E. (1992). Members of the VAMP family of synaptic vesicle proteins are components of glucose transporter-containing vesicles from rat adipocytes. J. Biol. Chem. *267*, 11681-11684.

Calakos, N., Bennett, M. K., Peterson, K. E., Scheller, R. H. (1994). Protein-protein interactions contributing to the specificity of intracellular vesicular trafficking. Science *263*, 1146-1149.

Calhoun, B. C., Goldenring, J. R. (1997). Two Rab proteins, vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP-2) and secretory carrier membrane proteins (SCAMPs), are present on immunoisolated parietal cell tubulovesicles. Biochem. J. *325*, 559-564.

Cao, X., Ballew, N., Barlowe, C. (1998). Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. EMBO J. *17*, 2156-2165.

Caplan, M. J. (1997a). Membrane polarity in epithelial cells: protein sorting and estab-lishment of polarized domains. Am. J. Physiol. *272*, F425-429.

Caplan, M. J. (1997b). Ion pumps in epithelial cells: sorting, stabilization, and polarity. Am. J. Physiol. *272*, G1304-1313.

Chavrier, P., Vingron, M., Sander, C., Simons, K., Zerial, M. (1990). Molecular cloning of YPT1/SEC4-related cDNAs from an epithelial cell line. Mol. Cell Biol. *10*, 6578-6585.

Cheatham, B., Volchuk, A., Kahn, C. R., Wang, L., Rhodes, C. J., Klip, A. (1996). Insulin-stimulated translocation of GLUT4 glucose transporters requires SNARE-complex proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *93*, 15169-15173.

Chen, J., Cohn, J. A., Mandel, L. J. (1995). Dephosphorylation of ezrin as an early event in renal microvillar breakdown and anoxic injury. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *92*, 7495-7499.

Cho, K. O., Hunt, C. A., Kennedy, M. B. (1992). The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. Neuron *9*, 929-942.

Clark, E. A., Brugge, J. S. (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. Science *268*, 233-239.

Cobb, B. S., Schaller, M. D., Leu, T. H., Parsons, J. T. (1994). Stable association of pp60src and pp59fyn with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase, pp125FAK. Mol. Cell. Biol. *14*, 147-155.

Cohen, C. M., Foley, S. F., Korsgren, C. (1982). A protein immunologically related to erythrocyte band4.1 is found on stress fibres on non-erythroid cells. Nature *299*, 648-650.

Cohen, C. M., Dotimas, E., Korsgren, C. (1993). Human erythrocyte membrane protein band4.2 (pallidin). Semin. Hematol. *30*, 119-137.

Correas, I., Avila, J. (1988). Erythrocyte protein4.1 associates with tubulin. Biochem. J. *255*, 217-221.

Correas, I. (1991). Characterization of isoforms of protein4.1 present in the nucleus. Biochem. J. *279*, 581-585.

Davis, J. Q., Bennett, V. (1993). Ankyrin-binding activity of nervous system cell adhesion molecules expressed in adult brain. J. Cell. Sci. Suppl. *17*, 109-117.

Davis, J. Q., McLaughlin, T., Bennett, V. (1993). Ankyrin-binding proteins related to nervous system cell adhesion molecules: candidates to provide transmembrane and intercellular connections in adult brain. J. Cell Biol. *121*, 121-133.

Davis, J. Q., Bennett, V. (1994). Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. J. Biol. Chem. *269*, 27163-27166.

Dedhar, S., Hannigan, G. E. (1996). Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. Curr. Opin. Cell Biol. *8*, 657-669.

Delaunay, J., Stewart, G., Iolascon, A. (1999). Hereditary dehydrated and overhydrated stomatocytosis: recent advances. Curr. Opin. Hematol. *6*, 110-114.

Delgrossi, M. H., Breuza, L., Mirre, C., Chavrier, P., Le Bivic, A. (1997). Human syntaxin 3 is localized apically in human intestinal cells. J. Cell Sci. *110*, 2207-2214.

Discher, D., Parra, M., Conboy, J. G., Mohandas, N. (1993). Mechanochemistry of the alternatively spliced spectrin-actin binding domain in membrane skeletal protein4.1. J. Biol. Chem. *268*, 7186-7195.

Dockray, G. J., Varro, A., Dimaline, R. (1996). Gastric endocrine cells: gene expression, processing, and targeting of active products. Physiol. Rev. *76*, 767-798.

Dong, L., Chapline, C., Mousseau, B., Fowler, L., Ramsay, K., Stevens, J. L., Jaken, S. (1995). 35H, a sequence isolated as a protein kinase C binding protein, is a novel member of the adducin family. J. Biol. Chem. *270*, 25534-25540.

Drenckhahn, D., Zinke, K., Schauer, U., Appell, K. C., Low, P. S. (1984). Identification of immunoreactive forms of human erythrocyte band 3 in nonerythroid cells. Eur. J. Cell Biol. *34*, 144-150.

Drenckhahn, D., Dermietzel, R. (1988). Organization of the actin filament cytoskeleton in the intestinal brush border: a quantitative and qualitative immunoelectron microscope study. J. Cell Biol. *107*, 1037-1048.

Drenckhahn, D. (1988). Zytoskelett und Zelldifferenzierung(Cytoskeleton and cell differentiation). Verh. Dtsch. Ges. Path. *72*, 10-29.

Drenckhahn, D., Wagner, S., Jöns, T., Oelmann, M., Koob, R. (1989). Molecular characterization of 3-related anion exchangers in the vertebrate urinary system and Golgi-apparatus. In: Anion transport of the red blood cell membrane, N. Hamasaki, N., Jenning, M. L. eds.: 165-175. Elsevier Science Amsterdam, New York, Oxford.

Drenckhahn, D., Jöns, T., Püschel, B., Schmitz, F. (1996). Role of the cytoskeleton in the development of epithelial polarity. In: The Cytoskeleton, Vol. 2, Hesketh, J. P., Pryme, I. F. eds.: 141-165. Role in Cell Pysiology. Jai Press Inc. London.

Drubin, D. G., Nelson, W. J. (1996). Origins of cell polarity. Cell *84*, 335-344.

Dunbar, L. A., Courtois Coutry, N., Roush, D. L., Muth, T. R., Gottardi, C. J., Rajendran, V., Geibel, J., Kashgarian, M., Caplan, M. J. (1998). Sorting of P-type ATPases in polarized epithelial cells. Acta. Physiol. Scand. Suppl. *643*, 289-295.

Eilers, U., Klumperman, J., Hauri, H. P. (1989). Nocodazole, a microtubule-active drug, interferes with apical protein delivery in cultured intestinal epithelial cells (Caco-2). J. Cell Biol. *108*, 13-22.

Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A., Anderson, J. M. (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. J. Biol. Chem. *273*, 29745-29753.

Ferro-Novick, S., Jahn, R. (1994). Vesicle fusion from yeast to man. Nature *370*, 191-193.

Fowler, V. M. (1996). Regulation of actin filament length in erythrocytes and striated muscle. Curr. Opin. Cell Biol. *8*, 86-96.

Friedrichs, B., Koob, R., Kraemer, D., Drenckhahn, D. (1989). Demonstration of immunoreactive forms of erythrocyte protein4.2 in nonerythroid cells and tissues. Eur. J. Cell Biol. *48*, 121-127.

Fujita, H., Tuma, P. L., Finnegan, C. M., Locco, L., Hubbard, A. L. (1998). Endogenous syntaxins 2, 3 and 4 exhibit distinct but overlapping patterns of expression at the hepatocyte plasma membrane. Biochem. J. *329*, 527-538.

Gaisano, H. Y., Ghai, M., Malkus, P. N., Sheu, L., Bouquillon, A., Bennett, M. K., Trimble, W. S. (1996). Distinct cellular locations of the syntaxin family of proteins in rat pancreatic acinar cells. Mol. Biol. Cell *7*, 2019-2027.

Gallagher, P. G., Tse, W. T., Scarpa, A. L., Lux, S. E., Forget, B. G. (1997). Structure and organization of the human ankyrin-1 gene. Basis for complexity of pre-mRNA processing. J. Biol. Chem. *272*, 19220-19228.

Garcia, E. P., Gatti, E., Butler, M., Burton, J., De Camilli, P. (1994). A rat brain Sec1 homologue related to Rop and UNC18 interacts with syntaxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *91*, 2003-2007.

Gardner, J. D., Jensen, R. T. (1986). Receptors and cell activation associated with pancreatic enzyme secretion. Annu. Rev. Physiol. *48*, 103-117.

Gardner, K., Bennett, V. (1986). A new erythrocyte membrane-associated protein with calmodulin binding activity. Identification and purification. J. Biol. Chem. *261*, 1339-1348.

Granger, B. L., Lazarides, E. (1984). Membrane skeletal protein4.1of avian erythrocytes is composed of multiple variants that exhibit tissue-specific expression. Cell *37*, 595-607.

Granger, B. L., Lazarides, E. (1985). Appearance of new variants of membrane skeletal protein4.1during terminal differentiation of avian erythroid and lenticular cells. Nature *313*, 238-241.

Hall, R. A., Ostedgaard, L. S., Premont, R. T., Blitzer, J. T., Rahman, N., Welsh, M. J., Lefkowitz, R. J. (1998a). A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na^+,H^+-exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *95*, 8496-8501.

Hall, R. A., Premont, R. T., Chow, C. W., Blitzer, J. T., Pitcher, J. A., Claing, A., Stoffel, R. H., Barak, L. S., Shenolikar, S., Weinman, E. J., Grinstein, S., Lefkowitz, R. J. (1998b). The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na^+,H^+-exchanger regulatory factor to control Na^+,H^+ exchange. Nature *392*, 626-630.

Hammerton, R. W., Krzeminski, K. A., Mays, R. W., Ryan, T. A., Wollner, D. A., and Nelson, W. J. (1991). Mechanism for regulating cell surface distribution of Na^+,K^+-ATPase in polarized epithelial cells. Science *254*, 847-850.

Hanks, S. K., Polte, T. R. (1997). Signaling through focal adhesion kinase. Bioessays *19*, 137-145.

Hanzel, D. K., Urushidani, T., Usinger, W. R., Smolka, A., Forte, J. G. (1989). Immunological localization of an 80-kDa phosphoprotein to the apical membrane of gastric parietal cells. Am. J. Physiol. *256*, G1082-1089

Hanzel, D., Reggio, H., Bretscher, A., Forte, J. G., Mangeat, P. (1991). The secretion-stimulated 80K phosphoprotein of parietal cells is ezrin, and has properties of a membrane cytoskeletal linker in the induced apical microvilli. EMBO J. *10*, 2363-2373

Harris, A. S., Morrow, J. S. (1990). Calmodulin and calcium-dependent protease I coordinately regulate the interaction of fodrin with actin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 3009-3013.

Hartwig, J. H. (1994). Actin-binding proteins 1: spectrin superfamily. Protein Profile *1*, 706-778.

Hata, Y., Slaughter, C. A., Südhof, T. C. (1993). Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. Nature *366*, 347-351.

Havenga, M. J., Bosman, G. J., Appelhans, H., and De Grip, W. J. (1994). Expression of the anion exchanger (AE) gene family in human brain. Identification of a new AE protein: AE0. Brain Res Mol Brain Res *25*, 97-104.

Heiska, L., Alfthan, K., Gronholm, M., Vilja, P., Vaheri, A., Carpen, O. (1998). Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. J. Biol. Chem. *273*, 21893-21900.

Höcker, M., Wiedenmann, B. (1998). Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. Ann. N. Y. Acad. Sci. *859*, 160-174.

Höfer, D., Drenckhahn, D. (1996). Cytoskeletal markers allowing discrimination between brush cells and other epithelial cells of the gut including enteroendocrine cells. Histochem. Cell Biol. *105*, 405-412.

Höhne-Zell, B., Galler, A., Schepp, W., Gratzl, M., Prinz, C. (1997). Functional importance of synaptobrevin and SNAP-25 during exocytosis of histamine by rat gastric enterochromaffin-like cells. Endocrinology *138*, 5518-5526.

Holz, R. W., Brondyk, W. H., Senter, R. A., Kuizon, L., Macara, I. G. (1994). Evidence for the involvement of Rab3A in Ca^{2+}-dependent exocytosis from adrenal chromaffin cells. J. Biol. Chem. *269*, 10229-10234.

Holzbaur, E. L., Vallee, R. B. (1994). DYNEINS: molecular structure and cellular function. Annu. Rev. Cell Biol. *10*, 339-372.

Horne, W. C., Huang, S. C., Becker, P. S., Tang, T. K., Benz, E. J., Jr. (1993). Tissue-specific alternative splicing of protein4.1inserts an exon necessary for formation of the ternary complex with erythrocyte spectrin and F-actin. Blood *82*, 2558-2563.

Hsu, S. C., Hazuka, C. D., Roth, R., Foletti, D. L., Heuser, J., Scheller, R. H. (1998). Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. Neuron *20*, 1111-1122.

Hu, R. J., Moorthy, S., Bennett, V. (1995). Expression of functional domains of beta G-spectrin disrupts epithelial morphology in cultured cells. J. Cell Biol. *128*, 1069-1080.

Huang, J. P., Tang, C. J., Kou, G. H., Marchesi, V. T., Benz, E. J., Jr., Tang, T. K. (1993). Genomic structure of the locus encoding protein4.1. Structural basis for complex combinational patterns of tissue-specific alternative RNA splicing. J. Biol. Chem. *268*, 3758-3766.

Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B. G., Kemler, R. (1996). Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. Mech. Dev. *59*, 3-10.

Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell *69*, 11-25.

Innes, D. S., Sinard, J. H., Gilligan, D. M., Snyder, L. M., Gallagher, P. G., Morrow, J. S. (1999). Exclusion of the stomatin, alpha-adducin and beta-adducin loci in a large kindred with dehydrated hereditary stomatocytosis. Am. J. Hematol. *60*, 72-74.

Jacobson, K., Ishihara, A., Inman, R. (1987). Lateral diffusion of proteins in membranes. Annu. Rev. Physiol. *49*, 163-175.

Jahn, R., Südhof, T.C. (1999). Membrane fusion and exocytosis. Annu. Rev. Biochem. *68*, 863-911.

Jo, I., Harris, H. W., Amendt Raduege, A. M., Majewski, R. R., Hammond, T. G. (1995). Rat kidney papilla contains abundant synaptobrevin protein that participates in the fusion of antidiuretic hormone-regulated water channel-containing endosomes in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *92*, 1876-1880.

Jöns, T., Drenckhahn, D. (1992). Identification of the binding interface involved in linkage of cytoskeletal protein4.1 to the erythrocyte anion exchanger. EMBO J. *11*, 2863-2867.

Jordan, C., Püschel, B., Koob, R., Drenckhahn, D. (1995). Identification of a binding motif for ankyrin on the α-subunit of Na^+,K^+-ATPase. J. Biol. Chem. *270*, 29971-29975.

Joshi, R., Gilligan, D. M., Otto, E., McLaughlin, T., Bennett, V. (1991). Primary structure and domain organization of human alpha and beta adducin. J. Cell Biol. *115*, 665-675.

Karam, S. M., Leblond, C. P. (1993). Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. V. Behavior of entero-endocrine and caveolated cells: general conclusions on cell kinetics in the oxyntic epithelium. Anat. Rec. *236*, 333-340.

Kemler, R. (1992). Classical cadherins. Semin. Cell Biol. *3*, 149-155.

Kim, E., Niethammer, M., Rothschild, A., Jan, Y. N., Sheng, M. (1995). Clustering of Shaker-type K^+ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. Nature *378*, 85-88.

Koenderink, J. B., Swarts, H. G., Hermsen, H. P., De Pont, J. J. (1999). The β-subunits of Na^+,K^+-ATPase and gastric H^+ ,K^+-ATPase have a high preference for their own α-subunit and affect the K^+ affinity of these enzymes. J. Biol. Chem. *274*, 11604-11610.

Kollert-Jöns, A., Wagner, S., Hubner, S., Appelhans, H., Drenckhahn, D. (1993). Anion exchanger 1 in human kidney and oncocytoma differs from erythroid AE1 in its NH2 terminus. Am. J. Physiol. *265*, F813-821.

Kondo, T., Takeuchi, K., Doi, Y., Yonemura, S., Nagata, S., Tsukita, S. (1997). ERM (ezrin/radixin/moesin)-based molecular mechanism of microvillar breakdown at an early stage of apoptosis. J. Cell Biol. *139*, 749-758.

Koob, R., Zimmermann, M., Schoner, W., Drenckhahn, D. (1988). Colocalization and coprecipitation of ankyrin and Na^+,K^+-ATPase in kidney epithelial cells. Eur. J. Cell Biol. *45*, 230-237.

Kopito, R. R. (1990). Molecular biology of the anion exchanger gene family. Int. Rev. Cytol. *123*, 177-199.

Kordeli, E., Lambert, S., Bennett, V. (1995). AnkyrinG. A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier. J. Biol. Chem. *270*, 2352-2359.

Korsgren, C., Cohen, C. M. (1986). Purification and properties of human erythrocyte band4.2. Association with the cytoplasmic domain of band 3. J. Biol. Chem. *261*, 5536-5543.

Koury, S. T., Koury, M. J., Bondurant, M. C. (1989). Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. J. Cell Biol. *109*, 3005-3013.

Kraemer, J., Schmitz, F., Drenckhahn, D. (1999). Cytoplasmic dynein and dynactin as likely candidates for microtubule-dependent apical targeting of pancreatic zymogen granules. Eur. J. Cell Biol. *78*, 265-277.

Krauss, S. W., Chasis, J. A., Rogers, C., Mohandas, N., Krockmalnic, G., Penman, S. (1997a). Structural protein4.1is located in mammalian centrosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *94*, 7297-7302.

Krauss, S. W., Larabell, C. A., Lockett, S., Gascard, P., Penman, S., Mohandas, N., Chasis, J. A. (1997b). Structural protein4.1in the nucleus of human cells: dynamic rearrangements during cell division. J. Cell Biol. *137*, 275-289.

Kudrycki, K. E., Shull, G. E. (1989). Primary structure of the rat kidney band 3 anion exchange protein deduced from a cDNA. J. Biol. Chem. *264*, 8185-8192.

Kypta, R. M., Su, H., Reichardt, L. F. (1996). Association between a transmembrane protein tyrosine phosphatase and the cadherin-catenin complex. J. Cell Biol. *134*, 1519-1529.

Lafont, F., Burkhardt, J. K., Simons, K. (1994). Involvement of microtubule motors in basolateral and apical transport in kidney cells. Nature *372*, 801-803.

Lallena, M. J., Correas, I. (1997). Transcription-dependent redistribution of nuclear protein4.1to SC35-enriched nuclear domains. J. Cell Sci. *110*, 239-247.

Lambert, S., Yu, H., Prchal, J. T., Lawler, J., Ruff, P., Speicher, D., Cheung, M. C., Kan, Y. W., Palek, J. (1990). cDNA sequence for human erythrocyte ankyrin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 1730-1734.

Lambert, S., Bennett, V. (1993). From anemia to cerebellar dysfunction. A review of the ankyrin gene family. Eur. J. Biochem. *211*, 1-6.

Lazzarino, D. A., Blier, P., Mellman, I. (1998). The monomeric guanosine triphosphatase Rab4 controls an essential step on the pathway of receptor-mediated antigen processing in B cells. J. Exp. Med. *188*, 1769-1774.

Leto, T. L., Pratt, B. M., Madri, J. A. (1986). Mechanisms of cytoskeletal regulation: modulation of aortic endothelial cell protein band 4.1 by the extracellular matrix . J. Cell Physiol. *127*, 423-431.

Li, Z. P., Burke, E. P., Frank, J. S., Bennett, V., Philipson, K. D. (1993). The cardiac Na^{+}-Ca^{2+} exchanger binds to the cytoskeletal protein ankyrin. J. Biol. Chem. *268*, 11489-11491.

Li, G., Barbieri, M. A., Colombo, M. I., Stahl, P. D. (1994). Structural features of the GTP-binding defective Rab5 mutants required for their inhibitory activity on endocytosis. J. Biol. Chem. *269*, 14631-14635.

Li, X., Bennett, V. (1996). Identification of the spectrin subunit and domains required for formation of spectrin/adducin/actin complexes. J. Biol. Chem. *271*, 15695-15702.

Li, X., Matsuoka, Y., Bennett, V. (1998). Adducin preferentially recruits spectrin to the fast growing ends of actin filaments in a complex requiring the MARCKS-related domain and a newly defined oligomerization domain. J. Biol. Chem. *273*, 19329-19338

Lin, D. C., Lin, S. (1978). High affinity binding of [3H]dihydrocytochalasin B to peripheral membrane proteins related to the control of cell shape in the human red cell. J. Biol. Chem. *253*, 1415-1419.

Low, S. H., Roche, P. A., Anderson, H. A., van Ijzendoorn, S. C., Zhang, M., Mostov, K. E., Weimbs, T. (1998). Targeting of SNAP-23 and SNAP-25 in polarized epithelial cells. J. Biol. Chem. *273*, 3422-3430.

Lundberg, S., Buevich, A. V., Sethson, I., Edlund, U., Backman, L. (1997). Calcium-binding mechanism of human nonerythroid α-spectrin EF-structures. Biochemistry *36*, 7199-7208.

Luque, C. M., Lallena, M. J., Alonso, M. A., Correas, I. (1998). An alternative domain determines nuclear localization in multifunctional protein4.1. J. Biol. Chem. *273*, 11643-11649.

Lux, S. E., Tse, W. T., Menninger, J. C., John, K. M., Harris, P., Shalev, O., Chilcote, R. R., Marchesi, S. L., Watkins, P. C., Bennett, V. (1990a). Hereditary spherocytosis associated with deletion of human erythrocyte ankyrin gene on chromosome 8. Nature *345*, 736-739.

Lux, S. E., John, K. M., Bennett, V. (1990b). Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. Nature *344*, 36-42.

Mandon, B., Chou, C. L., Nielsen, S., Knepper, M. A. (1996). Syntaxin-4 is localized to the apical plasma membrane of rat renal collecting duct cells: possible role in aquaporin-2 trafficking. J. Clin. Invest. *98*, 906-913.

Mangeat, P., Roy, C., Martin, M. (1999). ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. Trends Cell Biol. *9*, 187-192.

Manunta, P., Barlassina, C., Bianchi, G. (1998). Adducin in essential hypertension. FEBS Lett. *430*, 41-44.

Manunta, P., Burnier, M., D'Amico, M., Buzzi, L., Maillard, M., Barlassina, C., Lanella, G., Cusi, D., Bianchi, G. (1999). Adducin polymorphism affects renal proximal tubule reabsorption in hypertension. Hypertension *33*, 694-697.

Marfatia, S. M., Lue, R. A., Branton, D., Chishti, A. H. (1994). In vitro binding studies suggest a membrane-associated complex between erythroid p55, protein4.1, and glycophorin C. J. Biol. Chem. *269*, 8631-8634.

Marfatia, S. M., Leu, R. A., Branton, D., Chishti, A. H. (1995). Identification of the protein4.1binding interface on glycophorin C and p55, a homologue of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. J. Biol. Chem. *270*, 715-719.

Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., Tsukita, S., Tsukita, S. (1998). Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. J. Cell Biol. *140*, 647-657.

Matsuoka, Y., Hughes, C. A., Bennett, V. (1996). Adducin regulation. Definition of the calmodulin-binding domain and sites of phosphorylation by protein kinases A and C. J. Biol. Chem. *271*, 25157-25166.

Matter, K., Mellman, I. (1994). Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. Curr. Opin. Cell Biol. *6*, 545-554.

Michaely, P., Bennett, V. (1993). The membrane-binding domain of ankyrin contains four independently folded subdomains, each comprised of six ankyrin-repeats. J. Biol. Chem. *268*, 22703-22709.

Michaely, P., Bennett, V. (1995a). The ANK-repeats of erythrocyte ankyrin form two distinct but cooperative binding sites for the erythrocyte anion exchanger. J. Biol. Chem. *270*, 22050-22057.

Michaely, P., Bennett, V. (1995b). Mechanism for binding site diversity on ankyrin. Comparison of binding sites on ankyrin for neurofascin and the Cl^-/HCO_3^- -anion exchanger. J. Biol. Chem. *270*, 31298-31302.

Miyamoto, S., Akiyama, S. K., Yamada, K. M. (1995a). Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. Science *267*, 883-885.

Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O. A., Gutkind, J. S., Burbelo, P. D., Akiyama, S. K., Yamada, K. M. (1995b). Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. J. Cell Biol. *131*, 791-805.

Morgans, C. W., Kopito, R. R. (1993). Generation of truncated brain AE3 isoforms by alternate mRNA processing. J. Cell Sci. *106*, 1275-1282.

Morrow, J. S. (1999). Spectrins. In: Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins, eds.: Kreis, T., Vale, R., Sambrook and Tooze Publication at Oxford University Press. 138-141.

Müller, B. M., Kistner, U., Veh, R. W., Cases Langhoff, C., Becker, B., Gundelfinger, E. D., Garner, C. C. (1995). Molecular characterization and spatial distribution of SAP 97, a novel presynaptic protein homologous to SAP 90 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. J. Neurosci. *15*, 2354-2366.

Muth, T. R., Gottardi, C. J., Roush, D. L., Caplan, M. J. (1998). A basolateral sorting signal is encoded in the α-subunit of Na^+,K^+-ATPase. Am. J. Physiol. *274*, C688-696.

Nakamura, F., Amieva, M. R., Hirota, C., Mizuno, Y., Furthmayr, H. (1996). Phosphorylation of 558T of moesin detected by site-specific antibodies in RAW264.7 macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. *226*, 650-656

Nehls, V., Drenckhahn, D., Joshi, R., Bennett, V. (1991). Adducin in erythrocyte precursor cells of rats and humans: expression and compartmentalization. Blood *78*, 1692-1696.

Nelson, W. J., Veshnock, P. J. (1986). Dynamics of membrane-skeleton (fodrin) organization during development of polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. J. Cell Biol. *103*, 1751-1765.

Nelson, W. J., Veshnock, P. J. (1987). Ankyrin binding to Na^+,K^+-ATPase and implications for the organization of membrane domains in polarized cells. Nature *328*, 533-536.

Nichols, B. J., Pelham, H. R. (1998). SNAREs and membrane fusion in the Golgi apparatus. Biochim Biophys Acta *1404*, 9-31.

Nichols, B. J., Ungermann, C., Pelham, H. R., Wickner, W. T., Haas, A. (1997). Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs. Nature *387*, 199-202.

Nielsen, S., Marples, D., Birn, H., Mohtashami, M., Dalby, N. O., Trimble, M., Knepper, M. (1995). Expression of VAMP-2-like protein in kidney collecting duct intracellular vesicles. Colocalization with Aquaporin-2 water channels. J. Clin. Invest. *96*, 1834-1844.

Nunomura, W., Takakuwa, Y., Tokimitsu, R., Krauss, S. W., Kawashima, M., Mohandas, N. (1997). Regulation of CD44-protein4.1interaction by Ca^{2+} and calmodulin. Implications for modulation of CD44-ankyrin interaction. J. Biol. Chem. *272*, 30322-30328.

Ojakian, G. K., Schwimmer, R. (1988). The polarized distribution of an apical cell surface glycoprotein is maintained by interactions with the cytoskeleton of Madin-Darby canine kidney cells. J. Cell Biol. *107*, 2377-2387.

Ojakian, G. K., Schwimmer, R. (1994). Regulation of epithelial cell surface polarity reversal by beta 1 integrins. J. Cell Sci. *107*, 561-576.

Okamoto, M., Südhof, T. C. (1997). Mints, Munc18-interacting proteins in synaptic vesicle exocytosis. J. Biol. Chem. *272*, 31459-31464.

Olson, A. L., Knight, J. B., Pessin, J. E. (1997). Syntaxin 4, VAMP2, and/or VAMP3/cellubrevin are functional target membrane and vesicle SNAP receptors for insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. Mol. Cell Biol. *17*, 2425-2435.

Oshiro, N., Fukata, Y., Kaibuchi, K. (1998). Phosphorylation of moesin by rho-associated kinase (Rho-kinase) plays a crucial role in the formation of microvilli-like structures. J. Biol. Chem. *273*, 34663-34666.

Otto, E., Kunimoto, M., McLaughlin, T., Bennett, V. (1991). Isolation and characterization of cDNAs encoding human brain ankyrins reveal a family of alternatively spliced genes. J. Cell Biol. *114*, 241-253.

Parsons, J. T. (1996). Integrin-mediated signalling: regulation by protein tyrosine kinases and small GTP-binding proteins. Curr. Opin. Cell Biol. *8*, 146-152.

Pasternack, G. R., Racusen, R. H. (1989). Erythrocyte protein4.1 binds and regulates myosin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *86*, 9712-9716.

Peng, X. R., Yao, X., Chow, D. C., Forte, J. G., Bennett, M. K. (1997). Association of syntaxin 3 and vesicle-associated membrane protein (VAMP) with H^+,K^+-ATPase-containing tubulovesicles in gastric parietal cells. Mol. Biol. Cell *8*, 399-407.

Peters, L. L., Lux, S. E. (1993). Ankyrins: structure and function in normal cells and hereditary spherocytes. Semin. Hematol. *30*, 85-118.

Peters, L. L., Shivdasani, R. A., Liu, S. C., Hanspal, M., John, K. M., Gonzalez, J. M., Brugnara, C., Gwynn, B., Mohandas, N., Alper, S. L., Orkin, S. H., Lux, S. E. (1996).

Anion exchanger 1 (band 3) is required to prevent erythrocyte membrane surface loss but not to form the membrane skeleton. Cell *86*, 917-927.

Pevsner, J., Hsu, S. C., Scheller, R. H. (1994). n-Sec1: a neural-specific syntaxin-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *91*, 1445-1449.

Pinder, J. C., Gratzer, W. B. (1983). Structural and dynamic states of actin in the e-rythrocyte. J. Cell Biol. *96*, 768-775.

Reczek, D., Berryman, M., Bretscher, A. (1997). Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. J. Cell Biol. *139*, 169-179.

Ren, M., Xu, G., Zeng, J., De Lemos Chiarandini, C., Adesnik, M., Sabatini, D. D. (1998). Hydrolysis of GTP on Rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *95*, 6187-6192.

Rothman, J. E., Warren, G. (1994). Implications of the SNARE hypothesis for intracel-lular membrane topology and dynamics. Curr. Biol. *4*, 220-233.

Rothman, J. E., Söllner, T. H. (1997). Throttles and dampers: controlling the engine of membrane fusion [see comments]. Science *276*, 1212-1213.

Rückmann, B., Jöns, T., Dölle, F., Drenckhahn, D., Schubert, D. (1997). Cytoskele-ton-membrane connections in the human erythrocyte membrane: band4.1 binds to tetrameric band 3 protein. Biochim. Biophys. Acta. *1325*, 226-234

Rysava, R., Tesar, V., Jirsa, M., Jr., Brabec, V., Jarolim, P. (1997). Incomplete distal renal tubular acidosis coinherited with a mutation in the band 3 (AE1) gene. Nephrol. Dial. Transplant. *12*, 1869-1873.

Serrador, J. M., Alonso Lebrero, J. L., del Pozo, M. A., Furthmayr, H., Schwartz Albiez, R., Calvo, J., Lozano, F., Sanchez Madrid, F. (1997). Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization. J. Cell Biol. *138*, 1409-1423.

Seubert, P., Baudry, M., Dudek, S., Lynch, G. (1987). Calmodulin stimulates the degradation of brain spectrin by calpain. Synapse *1*, 20-24.

Shahbakhti, F., Gratzer, W. B. (1986). Analysis of the self-association of human red cell spectrin. Biochemistry *25*, 5969-5975.

Shaw, R. J., Henry, M., Solomon, F., Jacks, T. (1998). RhoA-dependent phosphorylation and relocalization of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts. Mol. Biol. Cell *9*, 403-419.

Sheetz, M. P., Painter, R. G., Singer, S. J. (1976). Relationships of the spectrin complex of human erythrocyte membranes to the actomyosins of muscle cells. Biochemistry *15*, 4486-4492.

Shibamoto, S., Hayakawa, M., Takeuchi, K., Hori, T., Miyazawa, K., Kitamura, N., Johnson, K. R., Wheelock, M. J., Matsuyoshi, N., Takeichi, M. (1995). Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. J. Cell Biol. *128*, 949-957.

Short, D. B., Trotter, K. W., Reczek, D., Kreda, S. M., Bretscher, A., Boucher, R. C., Stutts, M. J., Milgram, S. L. (1998). An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. J. Biol. Chem. *273*, 19797-19801.

Simons, K., Wandinger Ness, A. (1990). Polarized sorting in epithelia. Cell *62*, 207-210.

Smith, P. R., Saccomani, G., Joe, E. H., Angelides, K. J., Benos, D. J. (1991). A-miloride-sensitive sodium channel is linked to the cytoskeleton in renal epithelial cells. Proc. Natl. Acad Sci. USA *88*, 6971-6975.

Sogaard, M., Tani, K., Ye, R. R., Geromanos, S., Tempst, P., Kirchhausen, T., Rothman, J. E., Söllner, T. (1994). A Rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in the docking of transport vesicles. Cell *78*, 937-948.

Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H., Rothman, J. E. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. Cell *75*, 409-418.

Srinivasan, Y., Elmer, L., Davis, J., Bennett, V., Angelides, K. (1988). Ankyrin and spectrin associate with voltage-dependent sodium channels in brain. Nature *333*, 177-180.

St-Denis, J. F., Cabaniols, J. P., Cushman, S. W., Roche, P. A. (1999). SNAP-23 participates in SNARE complex assembly in rat adipose cells. Biochem. J. *338*, 709-715.

Staddon, J. M., Smales, C., Schulze, C., Esch, F. S., Rubin, L. L. (1995). p120, a p120-related protein (p100), and the cadherin/catenin complex. J. Cell Biol. *130*, 369-381.

Steck, T. L., Fairbanks, G., Wallach, D. F. (1971). Disposition of the major proteins in the isolated erythrocyte membrane. Proteolytic dissection. Biochemistry *10*, 2617-2624.

Strynadka, N. C., James, M. N. (1989). Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. Annu. Rev. Biochem. *58*, 951-998.

Stuart Tilley, A., Sardet, C., Pouyssegur, J., Schwartz, M. A., Brown, D., Alper, S. L. (1994). Immunolocalization of anion exchanger AE2 and cation exchanger NHE-1 in distinct adjacent cells of gastric mucosa. Am. J. Physiol. *266*, C559-568.

Südhof, T. C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. Nature *375*, 645-653.

Tagaya, M., Wilson, D. W., Brunner, M., Arango, N., Rothman, J. E. (1993). Domain structure of an N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein involved in vesicular transport. J. Biol. Chem. *268*, 2662-2666.

Tanaka, T., Kadowaki, K., Lazarides, E., Sobue, K. (1991). Ca^{2+}-dependent regulation of the spectrin-actin interaction by calmodulin and protein4.1. J. Biol. Chem. *266*, 1134-1140.

Tanner, M. J. (1997). The structure and function of band 3 (AE1): recent developments. Mol. Membr. Biol. *14*, 155-165.

Terrian, D. M., White, M. K. (1997). Phylogenetic analysis of membrane trafficking proteins: a family reunion and secondary structure predictions. Eur. J. Cell Biol. *73*, 198-204.

Tilney, L. G., Detmers, P. (1975). Actin in erythrocyte ghosts and its association with spectrin. Evidence for a nonfilamentous form of these two molecules in situ. J. Cell Biol. *66*, 508-520.

Timmers, K. I., Clark, A. E., Omatsu Kanbe, M., Whiteheart, S. W., Bennett, M. K., Holman, G. D., Cushman, S. W. (1996). Identification of SNAP receptors in rat adipose cell membrane fractions and in SNARE complexes co-immunoprecipitated with epitope-tagged N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. Biochem. J. *320*, 429-436.

Tisdale, E. J., Bourne, J. R., Khosravi Far, R., Der, C. J., Balch, W. E. (1992). GTP-binding mutants of Rab1 and Rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. J. Cell Biol. *119*, 749-761.

Tsukita, S., Oishi, K., Akiyama, T., Yamanashi, Y., Yamamoto, T., Tsukita, S. (1991). Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. J. Cell Biol. *113*, 867-879.

Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J., Kawai, A., Tsukita, S. (1994). ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. J. Cell Biol. *126*, 391-401.

Tsukita, S., Yonemura, S., Tsukita, S. (1997). ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction. Trends Biochem. Sci. *22*, 53-58.

Uchida, S., Sasaki, S., Fushimi, K., Marumo, F. (1994). Isolation of human aquaporin-CD gene. J. Biol. Chem. *269*, 23451-23455.

Ungermann, C., Sato, K., Wickner, W. (1998a). Defining the functions of trans-SNARE pairs. Nature *396*, 543-548.

Ungermann, C., Nichols, B. J., Pelham, H. R., Wickner, W. (1998b). A vacuolar v-t-SNARE complex, the predominant form in vivo and on isolated vacuoles, is disassembled and activated for docking and fusion. J. Cell Biol. *140*, 61-69.

Urushidani, T., Forte, J. G. (1997). Signal transduction and activation of acid secretion in the parietal cell. J. Membr. Biol. *159*, 99-111.

Urushidani, T., Muto, Y., Nagao, T., Yao, X., Forte, J. G. (1997). ME-3407, a new antiulcer agent, inhibits acid secretion by interfering with redistribution of H^+,K^+-ATPase. Am. J. Physiol. *272*, G1122-1134.

Vega Salas, D. E., Salas, P. J., Gundersen, D., Boulan, E. R. (1987). Formation of the apical pole of epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells: polarity of an apical protein is independent of tight junctions while segregation of a basolateral marker requires cell-cell interactions. J. Cell Biol. *104*, 905-916.

Wagner, S., Vogel, R., Lietzke, R., Koob, R., Drenckhahn, D. (1987). Immunochemical characterization of a band 3-like anion exchanger in collecting duct of human kidney. Am. J. Physiol. *253*, F213-221.

Wang, A. Z., Ojakian, G. K., Nelson, W. J. (1990). Steps in the morphogenesis of a polarized epithelium. II. Disassembly and assembly of plasma membrane domains during reversal of epithelial cell polarity in multicellular epithelial (MDCK) cysts. J. Cell Sci. *95*, 153-165.

Wang, Z., Schultheis, P. J., Shull, G. E. (1996). Three N-terminal variants of the AE2 Cl^-,HCO_3^--exchanger are encoded by mRNAs transcribed from alternative promoters. J. Biol. Chem. *271*, 7835-7843.

Weimbs, T., Low, S. H., Chapin, S. J., Mostov, K. E., Bucher, P., Hofmann, K. (1997). A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *94*, 3046-3051.

Wilson, D. W., Wilcox, C. A., Flynn, G. C., Chen, E., Kuang, W. J., Henzel, W. J., Block, M. R., Ullrich, A., Rothman, J. E. (1989). A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast. Nature *339*, 355-359.

Woods, D. F., Bryant, P. J. (1991). The discs-large tumor suppressor gene of Drosophila encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. Cell *66*, 451-464.

Xie, H., Surka, M., Howard, J., Trimble, W. S. (1999). Characterization of the mammalian septin H5: distinct patterns of cytoskeletal and membrane association from other septin proteins. Cell Motil. Cytoskeleton *43*, 52-62.

Xing, Z., Chen, H. C., Nowlen, J. K., Taylor, S. J., Shalloway, D., Guan, J. L. (1994). Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the Src SH2 domain. Mol. Biol. Cell *5*, 413-421.

Yamada, K. M., Miyamoto, S. (1995). Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. Curr. Opin. Cell Biol. *7*, 681-689.

Yannoukakos, D., Stuart Tilley, A., Fernandez, H. A., Fey, P., Duyk, G., Alper, S. L. (1994). Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of two isoforms of the AE3 anion exchanger from human heart. Circ. Res. *75*, 603-614.

Yao, X., Chaponnier, C., Gabbiani, G., Forte, J. G. (1995). Polarized distribution of actin isoforms in gastric parietal cells. Mol. Biol. Cell *6*, 541-557.

Yao, X., Cheng, L., Forte, J. G. (1996). Biochemical characterization of ezrin-actin interaction. J. Biol. Chem. *271*, 7224-7229 .

Yeaman, C., Grindstaff, K. K., and Nelson, W. J. (1999). New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. Physiol Rev *79*, 73-98.

Yonemura, S., Hirao, M., Doi, Y., Takahashi, N., Kondo, T., Tsukita, S. (1998). Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. J. Cell Biol. *140*, 885-895.

Yu, J., Steck, T. L. (1975). Isolation and characterization of band 3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane. J. Biol. Chem. *250*, 9170-9175.

Zahraoui, A., Joberty, G., Arpin, M., Fontaine, J. J., Hellio, R., Tavitian, A., Louvard, D. (1994). A small Rab GTPase is distributed in cytoplasmic vesicles in non polarized cells but colocalizes with the tight junction marker ZO-1 in polarized epithelial cells. J. Cell Biol. *124*, 101-115.