

# IV Diskussion

## 1 I-Plastin-Defizienz führt zu Veränderungen des intestinalen Bürstensaums

Zellmembranausstülpungen, die durch dicht gepackte Aktinfilamentbündel unterstützt werden, existieren in vielen verschiedenen Formen, wie beispielsweise die Mikrovilli in resorbierenden intestinalen Epithelzellen, die Stereozilien (auch Stereovilli genannt) der Hörsinneszellen und die Borsten von *D. melanogaster*. Die Mikrovilli der Darmepithelzellen stellen dabei die einfachste Struktur dar und sind aus diesem Grund für Studien an Membranausstülpungen, die durch Aktin unterstützt werden, als Modellsystem bestens geeignet (DeRosier und Tilney, 2000). F-Aktin wird in den intestinalen Mikrovilli durch I-Plastin (Fimbrin), Villin und Espin gebündelt (Bretscher und Weber, 1979; Bretscher und Weber, 1980; Bartles et al., 1998). Für I-Plastin ist bekannt, dass es *in vitro* Aktinfilamente so bündelt, dass sie strukturell denen in den Mikrovilli ähnlich sind (Glenney et al., 1981; Matsudaira et al., 1983). Durch Villin *in vitro* gebündelte Aktinfilamente weisen diese Ähnlichkeit dagegen nicht auf (Matsudaira et al., 1983). Es wird daher angenommen, dass I-Plastin das wichtigste aktinbündelnde Protein in den Mikrovilli ist, zumal Mikrovilli erst embryonal vervollständigt werden, wenn I-Plastin apikal in den intestinalen Epithelzellen lokalisiert (Ezzell et al., 1989). Um die Rolle von I-Plastin *in vivo* zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine I-Plastin defiziente Mauslinie charakterisiert.

### 1.1 I-Plastin ist für die Verlängerung der Mikrovilli verantwortlich

Die Länge von Membranausstülpungen wird bestimmt durch die Stabilität der Aktinfilamente, die sie unterstützen. Dabei wird die Stabilität durch Vernetzung der Filamente mittels aktinbündelnder Proteine erhöht (Mogilner und Rubinstein, 2005; Atilgan et al., 2006). Die intrinsische Biegesteifigkeit ist abhängig von der Anzahl der Filamente, nicht aber von der I-Plastin-Konzentration (Claessens et al., 2006). Die Depolymerisation von F-Aktin kann nur erfolgen, wenn die aktinbündelnden Proteine nicht mehr an die Aktinfilamente binden (Prost et al., 2007). Aus diesem Grund limitieren diese Proteine die Depolymerisation und sind somit für die Verlängerung der

Filamente mitverantwortlich (Zigmond et al., 1992; Tilney et al., 2003). In I-Plastin defizienten Mäusen ist die Länge der Mikrovilli um 20 % reduziert (Abbildung III-11). Sowohl für Villin als auch für Espin ist in Überexpressionsstudien festgestellt worden, dass sie für die Verlängerung der Mikrovilli verantwortlich sind (Loomis et al., 2003). *In vivo* trifft dies aber nicht zu, da bei Defizienz dieser Proteine normale Mikrovilli gebildet werden (Pinson et al., 1998; Ferrary et al., 1999; Athman et al., 2002). Dies bedeutet, dass von den bekannten mikrovillaren aktinbündelnden Proteinen nur I-Plastin für die Verlängerung der intestinalen Mikrovilli wichtig ist. Bereits 1994 stellten Arpin et al. die These auf, dass I-Plastin nur bereits existierende Mikrovilli stabilisieren und verlängern kann, nicht aber für die Initiierung der *de novo* Assemblierung verantwortlich ist. Dies wird nun durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt. Die Länge der verkürzten Mikrovilli unterschreitet allerdings nicht die maximal erreichbare Länge von 0,5  $\mu\text{m}$ , die schwach gebündelte Aktinfilamente erreichen können (Mogilner und Rubinstein, 2005). Damit ist auch bei I-Plastin-Defizienz das axiale Bündel durch die verbliebenen Bündelungsproteine stabil. Dies wird durch EM-Aufnahmen von isolierten Bürstensäumen, die gebündelte Aktinfilamente innerhalb der Mikrovilli aufweisen, bestätigt (Abbildung III-14). Eine reduzierte Anzahl von gebündelten Filamenten ist nicht auszuschließen, wobei EM-Aufnahmen von Querschnitten der Mikrovilli nicht darauf hindeuten (Abbildung III-12). Mit Hilfe von Immunfluoreszenzstudien mit F-Aktin und den anderen mikrovillaren aktinbindenden Proteinen sind keine Veränderungen beobachtet worden (Abbildung III-15, -16).

## 1.2 I-Plastin ist für den Aufbau des terminalen Netzes notwendig

Die Aktinfilamente der intestinalen Mikrovilli erstrecken sich bis in das terminale Netz, in dem sie als Aktinwurzeln blind enden (Hull und Staehelin, 1979; Mooseker, 1985). An die Aktinwurzeln bindet Tropomyosin (Bretscher und Weber, 1978; Drenckhahn und Groschel-Stewart, 1980). Die Aktinwurzeln werden durch Myosin IIa, Spektrin und Filamin miteinander verbunden, wodurch dem Bürstensaum zusätzliche Stabilität verliehen wird (Bretscher und Weber, 1978; Mooseker et al., 1978; Glenney und Glenney, 1983; Hirokawa et al., 1983). Bei dem markantesten strukturellen Defekt, der durch den Verlust von I-Plastin in dieser Arbeit festgestellt worden ist, handelt es sich um die fehlenden Aktinwurzeln (Abbildung III-11 und 14). In TEM-Studien von Dünndarmschnitten sind sie nicht vorhanden. Lediglich in TEM-Aufnahmen von isolierten Bürstensäumen können vereinzelte, rudimentäre Aktinfilamente, die aus den

Mikrovilli ins Zytoplasma hineinreichen, beobachtet werden. Letzteres könnte zumindest teilweise auf die Kontrolle der Aktinfilamentlänge, wie sie für aktinbündelnde und quervernetzende Proteine bereits diskutiert wurde, zurückzuführen sein (Prost et al., 2007).

I-Plastin ist das erste Protein im Bürstensaum, für das gezeigt werden konnte, dass dessen Verlust zu Veränderungen im terminalen Netz führt. Wie Immunfluoreszenzstudien verdeutlichen, resultiert die Defizienz von I-Plastin in Lokalisationsdefekten von Tropomyosin, Myosin IIa und  $\alpha$ -II-Spektrin im terminalen Netzwerk (Kapitel III-3.2.2.). Neben den  $\alpha$ -Tropomyosinen (hochmolekulare und u.a. aber auch die niedermolekularen Isoformen 5a und 5b), die mit dem hier verwendeten Antikörper detektiert werden konnten, lokalisieren auch  $\gamma$ -Tropomyosine im terminalen Netz. Ihre Lokalisation ist vermutlich ebenfalls beeinträchtigt, da die Aktinwurzeln, mit denen sie interagieren, fehlen. Die Tropomyosine spielen allerdings auch eine Rolle an den Adhäsionskontakten und sorgen für Stabilität im Aktingürtel, wobei verschiedene Tropomyosine mit unterschiedlichen Aktinfilamenten assoziieren (Dalby-Payne et al., 2003; Gunning et al., 2005). Dies könnte die Ursache für die reduzierte Immunfluoreszenzfärbung von Tropomyosinen anstelle der beobachteten Delokalisation von Spektrin und Myosin IIa sein.

Der Verlust von Myosin IIa bei I-Plastin-Defizienz beschränkt sich auf das terminale Netz. An den Adhäsionskontakten vermittelt Myosin IIa *in vitro* die Kontraktion des Bürstensaums (Rodewald et al., 1976; Burgess, 1982; Keller und Mooseker, 1982). Kontraktionsstudien an isolierten Bürstensäumen in An- und Abwesenheit des Myosin II-spezifischen Inhibitors Blebbistatin in dieser Arbeit verdeutlichen, dass nur Myosin IIa, das am Aktingürtel und den Adhäsionskontakten lokalisiert, für die Kontraktion verantwortlich ist. Myosin IIa, das die Aktinwurzeln miteinander vernetzt, und die Aktinwurzeln selbst besitzen demnach keinen Einfluss auf die Kontraktion (Abbildung III-29). Dies verdeutlicht die funktionellen Unterschiede von Myosin IIa im terminalen Netz zu seiner Funktion im Aktingürtel und den Adhäsionskontakten.

In früheren Untersuchungen ist festgestellt worden, dass während der Assemblierung der Mikrovilli ihre Verlängerung und die Ausbildung des terminalen Netzes mit Spektrin erst stattfindet, wenn unter anderem I-Plastin apikal lokalisiert (Takemura et al., 1988; Ezzell et al., 1989). Der Verlust von apikalem Spektrin bei I-Plastin-Defizienz lässt somit vermuten, dass I-Plastin für dessen Rekrutierung zumindest mitverantwortlich ist.

In *D. melanogaster* führt der Verlust eines büstensaumspezifischen  $\beta$ -Spektrins zu Defekten in frühen Endosomen. Dieses Spektrin ist für die Etablierung und Aufrechterhaltung der Zusammensetzung der Büstensaumproteine über die Regulierung des frühen endosomalen Recyclingsignalweges verantwortlich (Phillips und Thomas, 2006). Williams et al. (2004) konnten zudem zeigen, dass die Überexpression des Büstensaum spezifischen  $\beta$ -Spektrins zu einer Inhibition der Endozytose führt (Williams et al., 2004). Der apikale Verlust bei I-Plastin-Defizienz von Spektrin, weiterer Komponenten des terminalen Netzes und der Aktinwurzeln selbst könnten somit zu einer erhöhten Endozytose führen, zumal eine Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts nicht notwendig wäre (Yarar et al., 2005) (siehe Kapitel IV-5). Phillips und Thomas (2006) schlagen in *Drosophila* ein Modell vor, indem neu geformte endozytotische Vesikel durch die Aktinwurzeln, Spektrin und Myosin II im terminalen Netz navigieren müssen, bevor sie zu den frühen Endosomen gelangen. Spektrin soll die Vesikel so durch das terminale Netz dirigieren, dass es Einfluss darauf nimmt, ob Proteine zurück zur Membran gelangen oder den Degradationsprozess in den Lysosomen durchlaufen (Phillips und Thomas, 2006). Wie in *D. melanogaster* der Verlust von apikalem Spektrin, könnte auch in I-Plastin defizienten Mäusen die Fehllokalisation von Spektrin zu einer erhöhten Anzahl von Endosomen und Lysosomen führen.

### 1.2.1 Einfluss von I-Plastin auf die Keratinfilamente

Es ist bekannt, dass Intermediärfilamente aus Keratinen mit dem Aktinzytoskelett verknüpft sind (Green et al., 1986; Green et al., 1987). In EM-Aufnahmen von intestinalen Epithelzellen mit Hilfe des Schockgefrierverfahrens konnte bereits früher gezeigt werden, dass das Keratinnetzwerk mit den Aktinwurzeln der mikrovillaren Aktinfilamente verbunden ist (Hirokawa et al., 1982; Hirokawa et al., 1983). Es wird zudem vermutet, dass zum Aufbau der Keratinfilamente das Aktinnetzwerk mit Beteiligung von Myosinen benötigt wird (Weber und Bement, 2002; Helfand et al., 2004). Andere Autoren sind der Meinung, dass die apikale Verteilung der Intermediärfilamente der Polarität von Aktinfilamenten und Mikrotubuli vorausgeht (Oriolo et al., 2007b). So lokalisieren Keratinfilamente zwei Tage vor der Ausbildung des Büstensaums in Caco2-Zellen (einer humanen Adenokarzinom-Zelllinie) apikal (Wald et al., 2005). In Myosin Ia defizienten Mäusen ist die Keratinfärbung apikal verstärkt, was auf Umverteilungen zurückgeführt wird (Tyska et al., 2005). Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigen unter Verwendung des gleichen Pan-Keratinantikörpers eine apikale Reduzierung der Keratine. Der Verlust von

Keratinfilamenten führt zu einer erhöhten Zellfragilität, die im Darm durch schnelle Zellerneuerung kompensiert wird (Owens und Lane, 2004). In den TEM-Aufnahmen von isolierten Bürstensäumen (Abbildung III-14) sind allerdings apikale Intermediärfilamente noch näher an den Mikrovilli sichtbar und spezifische Antikörper gegen Keratin 8 bzw. 19 färben das Keratinnetzwerk an. Die höher apikal liegende Lokalisation könnte aus der fehlenden Aktinwurzel als Abstandshalter resultieren. Mit der Auflösung eines konfokalen Lasermikroskops ist eine veränderte Lokalisation nicht nachweisbar (Abbildung III-20 und -21). Die beobachtete Reduzierung der Keratine mittels Pan-Keratinantikörpers könnte aufgrund von Veränderungen der Keratine 18 oder 20 auftreten, sofern der Antikörper für diese Keratine eine höhere Affinität besitzt, was nicht bekannt ist. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Veränderungen des Aktinzytoskeletts zu der Fehlorganisation des Keratinnetzwerks in I-Plastin defizienten Mäusen führt. Durch Reduktion von Keratin 19 *in vitro* kommt es sowohl im Aktin- als auch im Mikrotubulinnetzwerk zu Störungen (Salas et al., 1997). Zudem konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Filamente aus Keratin 18/8 und 19/8 in Caco2-Zellen an die Mikrotubuli-organisierenden Zentren gebunden, sowie für deren apikale Lokalisation verantwortlich sind (Salas et al., 1997; Salas, 1999; Ameen et al., 2001; Oriolo et al., 2007a; Oriolo et al., 2007b). Dies lässt vermuten, dass auch bei I-Plastin-Defizienz die Lokalisation des Mikrotubulinnetzwerks teilweise beeinträchtigt ist. Färbungen von Mitgliedern der Plakinfamilie, die mit Komponenten des Zytoskeletts interagieren, zeigen allerdings keine Veränderungen (Anhang Abbildung A-2), wobei dies möglicherweise auf die geringe Auflösung des Licht- und Fluoreszenzmikroskops zurückzuführen ist. Immunelektronenmikroskopische Aufnahmen sollten zukünftig Aufklärung bringen.

Keratin 19 defiziente Mäuse weisen keinen auffälligen Phänotyp auf, allerdings ist bisher nur die Lokalisation der anderen Keratine im Darm untersucht worden, die nicht beeinträchtigt sind. Der milde Phänotyp resultiert aus der Kompensierung durch Keratin 18, das auch in den Caco2-Zellen die meisten Funktionen von Keratin 19, mit Ausnahme apikaler Veränderungen von F-Aktin und daraus resultierenden Auswirkungen auf den Transport, übernehmen kann (Tamai et al., 2000).

### 1.2.2 I-Plastin interagiert mit Proteinen im terminalen Netz

Die beobachtete Reduktion der organellenfreien Zone in I-Plastin defizienten Mäusen kann mit dem Verlust der Aktinwurzeln und des terminalen Netzes in Zusammenhang gebracht werden. Die Aufhebung dieser Barriere zwischen dem Zellinneren und der

Plasmamembran führt dazu, dass der Abstand zwischen den Organellen und der Plasmamembran nicht länger aufrechterhalten bleibt.

Die Existenz der Aktinwurzel kann aber nicht nur auf die Regulation der Filamentlänge zurückgeführt werden, vielmehr muss die Aktinwurzel das Resultat einer Interaktion des Aktinbündels mit der Zellmembran und/oder mit dem terminalen Netz sein. Der Verlust der Aktinwurzel bei I-Plastin-Defizienz kann durch zwei mögliche Hypothesen erklärt werden:

- 1) Die Aktinwurzel stellt den Teil des mikrovillaren Filamentbündels dar, der nicht in der Plasmamembran verankert ist. Daher müsste im unteren Teil des Bündels ein Mechanismus existieren, der den Ausschluss eines Proteins ermöglicht, das für diese Verankerung verantwortlich ist. Dieses Protein könnte Ezrin sein, das im Gegensatz zu Myosin Ia nicht mit den Filamenten der Aktinwurzel assoziiert (Hanono et al., 2006). Der Verlust von I-Plastin würde diesen Ausschlussmechanismus beeinträchtigen, entweder direkt oder durch eine bisher unbekannt posttranslationale Modifikation von I-Plastin in der Aktinwurzel oder durch die Rekrutierung anderer Proteine, welche die Membranverankerung verhindern. Diese Proteine würden ausschließlich in den Aktinwurzeln wie Tropomyosin, Spektrin und Myosin IIa detektiert werden, aber nicht innerhalb der Mikrovilli (Bretscher und Weber, 1978; Mooseker et al., 1978; Drenckhahn und Groschel-Stewart, 1980; Glenney und Glenney, 1983; Hirokawa et al., 1983). Diese Hypothese wird unterstützt durch die Existenz von Subdomänen entlang des Bürstensaums, die eine leicht unterschiedliche Proteinzusammensetzung im Aktinzytoskelett vorweisen (Hanono et al., 2006). Die Verkürzung der Mikrovilli bei I-Plastin-Defizienz lässt aber vermuten, dass diese These nicht zutrifft, da eine Verlängerung anzunehmen wäre.
- 2) Die zweite Hypothese stützt sich auf die Verankerungen der Filamentbündel im terminalen Netz, wie sie in EM-Aufnahmen mit Hilfe des Gefrierbruchverfahrens erkennbar sind (Hirokawa et al., 1982; Hirokawa et al., 1983). I-Plastin könnte für die Verankerung der Aktinwurzel direkt durch Interaktion mit Proteinen im terminalen Netz oder indirekt durch Rekrutierung von Proteinen zur Aktinwurzel, die für deren Verankerung notwendig sind, verantwortlich sein.

Die zweite Hypothese wird unterstützt durch CH-Domänen beinhaltende Proteine, die nicht nur mit Aktin sondern auch mit Intermediärfilamenten interagieren. Auch für L-Plastin sind neben Aktin weitere Bindungspartner wie beispielsweise Grancalcin

(Lollike et al., 2001), Vimentin und Hsp70 bekannt (Correia et al., 1999). Lediglich die Interaktion von L-Plastin mit Vimentin ist weiter untersucht worden. L-Plastin formt einen adhäsionsabhängigen Komplex mit einer Vimentin-Tetrameruntereinheit, nicht aber mit Vimentin-Intermediärfilamenten. Die beiden Proteine kolokalisieren z.B. in Podosomen und um den Zellkern herum. Die N-terminale Domäne von Vimentin wurde als plastinbindende Stelle identifiziert, während die erste CH-Domäne von L-Plastin mit Vimentin interagiert. Es wird vermutet, dass diese Interaktion wichtig für die Assemblierung des Vimentinzytoskeletts bei der Zelladhäsion ist (Delanote et al., 2005). Ein weiteres Beispiel für die Interaktion eines CH-Domänen-Proteins mit Intermediärfilamenten ist Dystrophin. Durch *in vitro* Studien ist eine Interaktion der ABD von Dystrophin mit Keratin 19 festgestellt worden (Stone et al., 2005). Wir konnten hier zeigen, dass I-Plastin verstärkt im terminalen Netz lokalisiert (Abbildung III-22 und 23, Immunfluoreszenz). Die Tatsache, dass der Verlust von I-Plastin zu wesentlichen Veränderungen im terminalen Netz führt, lässt dort eine spezifische Funktion von I-Plastin vermuten, die nicht von anderen Proteinen kompensiert werden kann. Wie bereits diskutiert, könnte diese Funktion über die Bindung einer Komponente des terminalen Netzes erfolgen. Wir haben Keratin 19 und Myosin IIa als potenzielle Bindungspartner identifiziert (Abbildung III-24). Vermutlich sind diese Interaktionen für die Verankerung der mikrovillaren Filamente im terminalen Netz verantwortlich. In weiterführenden Experimenten, wie Immunpräzipitationen oder Koexpressionen in Zellen und anschließender Analyse einer Kolokalisation, müssen die Interaktionen verifiziert werden. Die potenzielle Interaktion von I-Plastin mit Keratin 19 wird bekräftigt durch *in vitro* Studien, die zeigen, dass die Reduzierung von Keratin 19 zu apikalen Aktindefekten führt. Diese Defekte können nicht von Keratin 18 oder einem anderen Keratin kompensiert werden (Salas et al., 1997), da diese vermutlich nicht mit I-Plastin, wie beispielsweise für Keratin 8 festgestellt, interagieren.

### 1.3 Verlust der $\beta$ -Aktin-Anreicherung im terminalen Netz bei I-Plastin-Defizienz

In den meisten Organismen treten innerhalb derselben Zelle oder in verschiedenen Zelltypen mehr als eine Aktinisoform auf. Dies lässt vermuten, dass sich fast identische Aktine für spezialisierte Funktionen entwickelt haben (MacQueen et al., 2005). Ob aber spezifische, zelluläre Strukturen spezifische Aktinisoformen verwenden, ist bisher unklar. ACT-5 ist als ein Aktin in *C. elegans* identifiziert worden, das spezifisch für mikrovillbildende Zellen ist. Außerdem ist ACT-5 essenziell für die Bildung intestinaler

Mikrovilli (MacQueen et al., 2005). In Säugern werden nicht muskuläre, zytoplasmatische  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktine exprimiert (Vandekerckhove und Weber, 1981). Sawtell et al. postulieren spezifische  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktine im Bürstensaum von Ratten, Hühnern und Menschen, wobei bis heute nicht klar ist, ob es funktionelle Unterschiede zwischen diesen und den anderen bekannten zytoplasmatischen Aktinen gibt (Sawtell et al., 1988). Sie vermuten aber, dass eine verstärkte Interaktion dieser Aktine mit einem Protein zur apikalen Anreicherung in Darmepithelzellen führt. Hier durchgeführte, spezifische  $\beta$ -Aktinfärbungen in Dünndarmschnitten von Wildtypmäusen detektierten nur ein geringes Signal innerhalb der Mikrovilli, während im terminalen Netz eine deutliche Anreicherung vorlag (Abbildung III-19). Es liegt daher die Vermutung nahe, dass in den apikalen Mikrodomänen Aktinisoformen unterschiedlich lokalisieren oder aber, dass das Epitop durch starke Bündelung nicht voll zugänglich ist. Im Bürstensaum von I-Plastin defizienten Mäusen liegt keine Anreicherung von  $\beta$ -Aktin im terminalen Netz mehr vor. Dies verdeutlicht die gravierenden Veränderungen bei I-Plastin-Defizienz, es lässt aber auch vermuten, dass I-Plastin für die Anreicherung von  $\beta$ -Aktin verantwortlich ist. I-Plastin könnte ähnlich wie L-Plastin eine höhere Affinität zu  $\beta$ -Aktin als zu  $\alpha$ - oder  $\gamma$ -Aktin besitzen (Namba et al., 1992). Um dies zu untersuchen, könnten unterschiedliche Experimente durchgeführt werden. So ist es beispielweise möglich, rekombinant exprimierte Aktinisoformen in Gegenwart von I-Plastin zu polymerisieren und durch Kosedimentation die Bindungsaffinitäten zu ermitteln.

Die Anreicherung von  $\beta$ -Aktin durch I-Plastin wird durch Studien in Hörsinneszellen von Hühnern bekräftigt, die zeigen, dass  $\gamma$ -Aktin sowohl innerhalb der Stereozilien, in der Kutikularplatte als auch an den Adhäsionskontakten lokalisiert. Das  $\beta$ -Aktin ist dagegen spezifisch innerhalb der Stereozilien, wo sie u.a. von Plastin gebündelt wird (Hofer et al., 1997). Studien in Hühnern zeigen, dass F-Aktin aus  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktin in Mikrovilli (im Bürstensaum im Verhältnis 1:1,6) und Stereozilien (im Verhältnis 1:2) vorliegt (Vandekerckhove und Weber, 1981; Hofer et al., 1997; Korrapati et al., 2007), was für die diskutierte Unzugänglichkeit des Epitops spricht. Die fehlende Anreicherung von  $\beta$ -Aktin im terminalen Netz resultiert vermutlich in veränderte Proportionen von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktin. Diese könnten die Ursache für die verkürzten Mikrovilli darstellen, da bekannt ist, dass veränderte Proportionen von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktin zu verkürzten Stereozilien führen (Hofer et al., 1997).

## 2 Auswirkungen der I-Plastin-Defizienz auf die Mikrovilli von Darmepithelzellen

Die Funktion vieler Zytoskelettkomponenten bei der Assemblierung der Mikrovilli ist sowohl *in vitro* mit Hilfe von RNAi, *antisense* RNA und Überexpressionsstudien als auch in *knockout*-Modellen (Tabelle I-1) untersucht worden. Vor allem die *in vitro* Studien haben viele Informationen geliefert, können aber die *in vivo* Situation nicht exakt reproduzieren, wie die Verlustphänotypen erkennen lassen. Dies wird auch durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Obwohl *in vitro* Studien zeigen, dass I-Plastin Mikrovilli *de novo* ausbilden kann (Glenney et al., 1981; Matsudaira et al., 1983; Adams et al., 1991) ergaben REM- und TEM-Studien im Darm von Wildtyp- und I-Plastin defizienten Mäusen (Abbildung III-9, -10, -11, -12 und -14), dass trotz des Verlusts von I-Plastin Mikrovilli in intestinalen Darmepithelzellen gebildet werden. *In vitro* Studien zeigen ebenfalls, dass Villin für die Assemblierung der Mikrovilli essenziell ist (Friederich et al., 1990; Friederich et al., 1992; Costa de Beauregard et al., 1995), allerdings weisen Villin defiziente Mäuse keine strukturellen Veränderungen der Mikrovilli auf. Des Weiteren sind die membran- und aktinbindenden Proteine in ihrer Lokalisation unverändert (Pinson et al., 1998; Ferrary et al., 1999; Athman et al., 2002). Der Verlust von Villin in der Leber soll dagegen der Schlüssel zum Mechanismus der Cholestase in Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung und hepatischen Defekten sein (Phillips et al., 2003). *In vivo* zeigen Espin defiziente Mäuse ebenfalls keine auffälligen morphologischen Veränderungen in Darmepithelzellen (persönliche Mitteilung S. Robine). Vermutlich spielt Espin nur eine untergeordnete Rolle im Darm, was auch seine schwache Expression im Vergleich zu I-Plastin und Villin erklären könnte. Zudem besteht die Möglichkeit, dass ein gewisses Maß an funktioneller Redundanz mit anderen aktinbündelnden Proteinen die Ursache dieser milden Verlustphänotypen sein könnte.

### 2.1 I-Plastin-Defizienz wird nicht durch andere Plastinproteine kompensiert

In Vertebraten werden drei verschiedene Plastinproteine (I-, L- und T-Plastin) gewebespezifisch exprimiert (Lin et al., 1988; de Arruda et al., 1990; Lin et al., 1990). In dieser Arbeit ist gezeigt worden, dass weder L- noch T-Plastin in der Lage ist, die I-Plastin-Defizienz zu kompensieren (Abbildung III-4) und dass keines der untersuchten

aktinbündelnden Proteine höher exprimiert wird. Die Tatsache, dass diese homologen Proteine auch während der embryonalen Differenzierung des Darms in verschiedenen Zelltypen und Zellkompartimenten lokalisieren, verdeutlicht ihre funktionellen Unterschiede. Es ist bekannt, dass Plastine funktionell zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert sind, obwohl sie evolutionär divergent sind (Adams et al., 1995). In Hefen konnten Adams et al. zeigen, dass humanes L- und T-Plastin die Defekte einer Hefe-Fimbrinmutante (Sac6) kompensieren. I-Plastin kann diesen Defekt dagegen nicht aufheben. Die funktionellen Unterschiede der Mitglieder der Plastinfamilie in Vertebraten resultieren aus unterschiedlichen Regulierungen und Bindungspartnern. L-Plastin wird zum Beispiel als einziges Plastin durch Phosphorylierung reguliert (Janji et al., 2006).

Bereits früher ist gezeigt worden, dass T- und I-Plastin nicht die gleichen Funktionen besitzen, aber zur gleichen Zeit benötigt werden (Arpin et al., 1994). Funktionelle Unterschiede von T- und I-Plastin werden durch Infektionsstudien in dieser Arbeit bekräftigt. Während I-Plastin nicht essenziell für die Invasion von Bakterien ist (Abbildung III-31 und 32), vermutet man durch *in vitro* Studien, dass T-Plastin in die Umordnung des Zytoskeletts während der Invasion enteropathogener Bakterien involviert ist. Zudem ist es in Mesenchymzellen an Fokalkontakten sowie am *leading edge* lokalisiert (Arpin et al., 1994). In Darmepithelzellen ist Villin als aktinbündelndes Protein für die Invasion von Shigellen wichtig (Athman et al., 2005).

T- und I-Plastin lokalisieren beide an stabilen Strukturen und werden während der embryonalen Entwicklung in den gleichen Zellkompartimenten exprimiert (Chafel et al., 1995). So sind sowohl T-Plastin als auch I-Plastin während der embryonalen Assemblierung von intestinalen Mikrovilli und den Stereozilien der Hörsinneszellen nachweisbar (Tilney et al., 1992; Daudet und Lebart, 2002). Es wird vermutet, dass Villin und T-Plastin für die Bildung rudimentärer Mikrovilli im Darm verantwortlich sind, aber normale Mikrovilli erst entstehen, sobald I-Plastin exprimiert wird (Chafel et al., 1995).

Die Existenz von Mikrovilli sowohl bei I-Plastin- als auch bei Villindefizienz legt aber auch die Vermutung nahe, dass die embryonale, apikale Lokalisation von T-Plastin im Darmepithel ausreichend für die Ausbildung rudimentärer Mikrovilli ist. Später in der Embryogenese und in den Tiefen der Krypten, wo rudimentäre Mikrovilli bereits vorliegen, wird dann I-Plastin exprimiert und ist für das Erreichen der vollständigen mikrovillaren Länge notwendig.

## 2.2 Mögliche Kompensierung durch andere aktinbündelnde Proteine

EM-Studien am Darm von Mäusen mit allen möglichen Kombinationen von Doppel- und Dreifachdefizienzen der drei aktinbündelnden Proteine in den Mikrovilli (I-Plastin, Villin und Espin) weisen, wie die singulären Defizienzen, intestinale Mikrovilli auf. Die Phänotypen der doppel (sofern I-Plastin-Defizienz besteht) und dreifach defizienten Mäuse entsprechen dabei dem Verlustphänotyp von I-Plastin defizienten Mäusen, der in der vorliegenden Arbeit beschrieben worden ist (persönliche Mitteilung S. Robine). Villin/Espin defiziente Mäuse zeigen dagegen unter normalen Bedingungen keinen Phänotyp, wodurch die Relevanz von I-Plastin ebenfalls bestätigt wird.

Die Tatsache, dass selbst bei I-Plastin/Villin/Espin-Defizienz Mikrovilli gebildet werden, deutet auf die Existenz eines oder mehrerer bisher unbekannter oder weniger beachteter, aktinbündelnder Proteine hin. Ein potenzieller Kandidat ist Advillin, das im Darm exprimiert wird. Es ist Mitglied der Gelsolinfamilie und weist eine hohe Ähnlichkeit zu Villin auf. Einige Autoren vermuten, dass es in den Mikrovilli lokalisiert und daher für den geringen Phänotyp in Villin defizienten Mäusen verantwortlich ist (Marks et al., 1998; Tumer et al., 2002).

Die Bildung intestinaler Mikrovilli bei I-Plastin-Defizienz, wie ebenfalls bei den Doppel- und Dreifachdefizienzen, könnte auch auf die funktionelle Redundanz von Proteinen mit Calponin-Homologie (CH)-Domänen zurückzuführen sein. Dies ist bereits für den geringen Phänotyp beim Verlust von Fimbrin in *Dictyostelium discoideum* postuliert worden (Pikzack et al., 2005). In diesem Organismus besteht die Möglichkeit, dass Fimbrin gemeinsame Funktionen mit  $\alpha$ -Aktinin und Filamin besitzt (Rivero et al., 1996; Rivero et al., 1999). Auch in *Schizosaccharomyces pombe* ist eine überlappende Funktion von Fimbrin mit einem  $\alpha$ -Aktinin ähnlichen Protein festgestellt worden, die sich aber lediglich auf die Zytokinese beschränkt (Wu et al., 2001). In *S. cerevisiae* existiert Scp1 (ein Calponin/Transgelin Homolog), das eine CH-Domäne besitzt und Aktinfilamente ähnlich wie Plastin stabilisiert bzw. bündelt. Allerdings wird diese Funktion in dem Fall nicht durch die CH-Domäne vermittelt. Des Weiteren ist dieses Protein in der Lage, die Plastin-Defizienz in Hefen zu kompensieren oder bei Verlust zu verstärken (Goodman et al., 2003). Eine funktionelle Überlagerung von Plastin und anderen Calponin-Proteinen könnte auch in anderen Organismen konserviert sein, da sie oft eine überlappende subzelluläre Lokalisation in Säugerzellen aufweisen (Goodman et al., 2003).

Dabei darf aber nicht außer Acht gelassen werden, dass beispielsweise Hefen nur ein limitiertes Repertoire an aktinbündelnden und quervernetzenden Proteinen besitzen und daher der Verlust von einem Protein zu einem stärkeren Phänotyp führen kann als in anderen Organismen.

Dass die Zusammenstellung von unterschiedlichen aktinbündelnden Proteinen eine wichtige Rolle für die Funktion spielt, wird auch durch das Vorhandensein spezifischer Repertoires aktinbündelnder Proteine in den verschiedenen Formen von Membranausstülpungen deutlich. Allen aktinabhängigen Membranausstülpungen ist gemeinsam, dass sie durch ein oder mehrere Bündel paralleler Aktinfilamente unterstützt werden. Die Aktinfilamentbündel sind uniform polarisiert und die wachsenden Plusenden befinden sich an den Spitzen der Ausstülpungen (Revenu et al., 2004; Lin et al., 2005). Einige Autoren sind der Meinung, dass all diese Strukturen Derivate der Mikrovilli sind und sekundär modifiziert werden (DeRosier und Tilney, 2000).

Die Stereozilien der Sinneszellen im Innenohr sind in die mechanoelektrische Signaltransduktion involviert (Roberts et al., 1988). Die Stereozilien sind zwischen 1,5 und 5,5  $\mu\text{m}$  lang und jedes Bündel besitzt bis zu 900 Aktinfilamente (Tilney et al., 1992). Dagegen ist die Anzahl der intestinalen Mikrovilli je Epithelzelle, der Filamente pro Bündel und ihre Länge konstant. Die Stereozilien verjüngen sich nach unten, so dass nur die zentralen Aktinfilamente als Aktinwurzel in das Zytoplasma reichen, das hier als Kutikularplatte bezeichnet wird und dem terminalen Netz in Darmepithelzellen entspricht (Tilney et al., 1992). Die Aktinfilamente werden durch I- und T-Plastin (Tilney et al., 1992; Daudet und Lebart, 2002) und Espin (Zheng et al., 2000) gebündelt sowie über verschiedene Myosine und Radixin mit der Membran verbunden (Revenu et al., 2004). Im Gegensatz zum Darm wird Espin hier stark exprimiert (Zheng et al., 2000; Sekerkova et al., 2006a). T-Plastin tritt ähnlich wie in Darmepithelzellen nur während der Entwicklung auf. Viele Studien sind an den Stereozilien durchgeführt worden, da mehrere menschliche Erkrankungen auf Defekte in diesem Bereich zurückzuführen sind. Espindefizienz führt, zum Beispiel, zu Taubheit (Zheng et al., 2000; Rzadzinska et al., 2005), während die in dieser Arbeit untersuchten I-Plastin defizienten Mäuse keine Anzeichen dafür aufweisen. Dies ist allerdings schon vermutet worden, da *in vitro* Studien zeigen, dass bei Verlust von Plastin in Stereozilien weiterhin Aktinbündel vorhanden sind, obwohl es normalerweise stark exprimiert wird (Tilney et al., 1989). Plastin scheint des Weiteren nicht essenziell für die Bildung der Kutikularplatte zu sein, da dortige Defekte die Taubheit zur Folge haben. So führen der Verlust oder Mutationen von Proteinen, die in der Kutikularplatte lokalisieren wie Myosin VIIa und VI zu Taubheit (Avraham et al., 1995; Gibson et al., 1995; Weil et al., 1995).

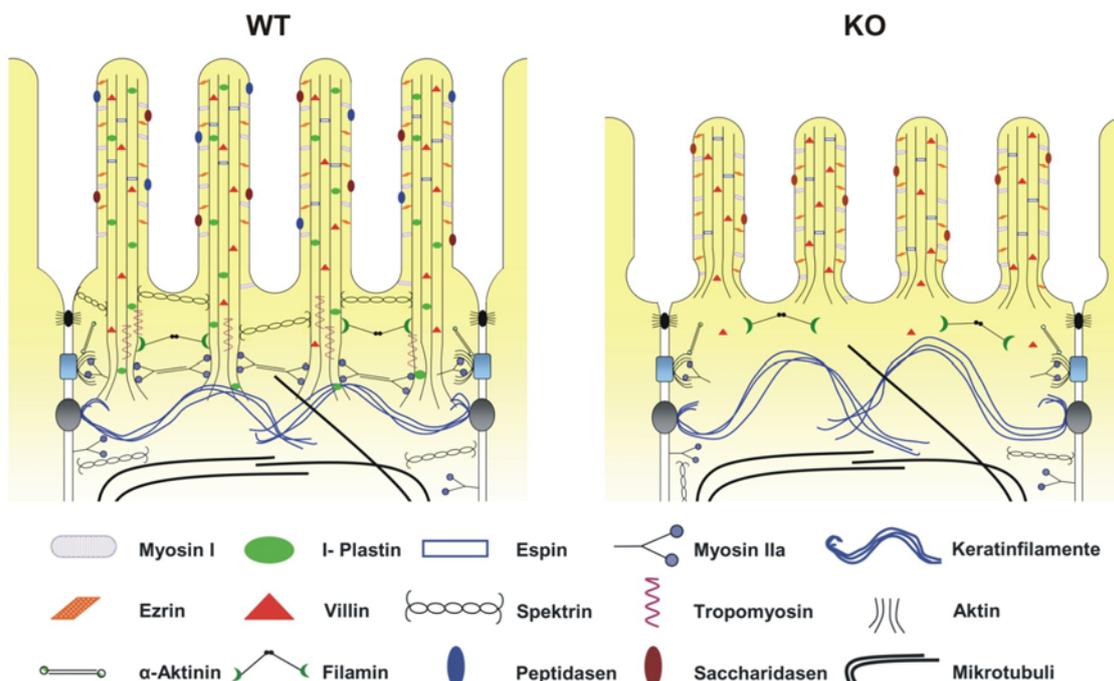
In *D. melanogaster* besitzt eine mechanosensorische Zelle nur eine Borste mit einer Länge von 400  $\mu\text{m}$ . Jedes der 11 Aktinfilamentbündel, die eine Borste stabilisieren, besteht aus 100 bis 500 Aktinfilamenten. Diese werden durch Fascin und Forked (espinähnlich) gebündelt (Tilney et al., 1995). Beide Proteine sind für eine feste und gerade Organisation der Borsten essenziell (Tilney et al., 1998). Somit sind immer wenigstens zwei nicht redundante, aktinbündelnde Proteine in fingerartigen Ausstülpungen vorhanden. Dies gilt nicht nur für die hier beschriebenen drei Strukturen, sondern auch für andere aktinbasierte Formen. Dies schließt Mikrovilli ähnliche Strukturen in Seeigeleiern (villinähnliches Protein, Fascin), Filopodien ( $\alpha$ -Aktinin, Fascin) und ektoplasmatische Spezialisierungen der Sertolizellen (Espin und Fimbrin-verwandtes Protein) ein (Bartles, 2000). Daraus kann man schließen, dass aktinbündelnde Proteine teilweise überlappende Funktionen haben, die bei Verlust eines oder mehrerer Proteine kompensiert werden können. Allerdings haben die Proteine auch Funktionen, die nicht durch andere übernommen werden können.

Es liegt daher nahe, dass im Bürstensaum bisher nicht identifizierte, aktinbindende Proteine lokalisieren. Dass noch nicht alle Proteine im Bürstensaum bekannt sind, zeigt die kürzliche Entdeckung von Myosin Id mit Hilfe der Massenspektrometrie (Benesh et al., 2007). Die embryonale Assemblierung der Mikrovilli und während der Differenzierung der Zellen in den Krypten wird daher vermutlich bei Defizienz der bekannten und hochexprimierten aktinbündelnden Proteine durch diese kompensiert.

## 3 Modell der Funktion von I-Plastin im Bürstensaum

### 3.1 Rolle bei der Mikroviillassemblierung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass I-Plastin eine essenzielle Rolle bei der Verlängerung, nicht aber bei der Bildung erster Mikroviilli spielt. Nach Bildung der ersten Mikroviilli lokalisiert I-Plastin apikal und die mikroviillaren Aktinfilamente können vermutlich durch Interaktion mit Keratin 19 in den Intermediärfilamenten verankert werden. Bei Verlust dieser Verbindung können somit die freien Enden einfacher depolymerisieren und die Mikroviilli sind nicht mehr so stabil, was kürzere Filamente und damit verkürzte Mikroviilli als Konsequenz hat. Somit könnte eine weitere Funktion von I-Plastin die Stabilisierung von F-Aktin unabhängig von der bündelnden Rolle sein, wie es bereits für T-Plastin bekannt ist (Giganti et al., 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen weiterhin, dass I-Plastin für die Ausbildung des terminalen Netzes verantwortlich ist. Durch Rekrutierung von Myosin IIa und weiterer Proteine wird es ausgebildet, die Aktinwurzeln werden miteinander vernetzt und dem Bürstensaum wird somit Stabilität verliehen. Die Veränderungen des Bürstensaums bei Verlust von I-Plastin, die zu diesem Modell führen, sind im Vergleich zum Wildtyp in Abbildung IV-1 zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung IV-1 (vorherige Seite): Auswirkung der I-Plastin-Defizienz auf den Bürstensaum.** In I-Plastin defizienten (KO), resorbierenden Darmepithelzellen sind die Mikrovilli verkürzt, die Aktinwurzel fehlt und es wird kein vollständiges terminales Netz ausgebildet. Ob sich die Lokalisation von  $\alpha$ -Aktinin, Filamin oder der Mikrotubuli ändert, ist bisher nicht untersucht worden. Die Basis der Mikrovilli ist verengt und die organellenfreie Zone ist verkleinert. Die Proteine der Zell-Zellkontakte lokalisieren und werden exprimiert vergleichbar zum Wildtyp (WT). Apikal sind dagegen Peptidasen wie die Dipeptidylpeptidase IV und die Neutrale Aminopeptidase reduziert, während Saccharidasen, mit Ausnahme der Sucrase-Isomaltase, die leicht verändert ist, nicht beeinträchtigt sind.

## 3.2 Stabilisierung des Bürstensaums

Wie bereits diskutiert, ist eine wesentliche Funktion von I-Plastin die Ausbildung des terminalen Netzes, das dem Bürstensaum Stabilität verleiht. Der Verlust des terminalen Netzes erklärt die erhöhte Fragilität von I-Plastin defizienten, isolierten Bürstensäumen (Abbildung III-13) und wird durch beschädigte Mikrovilli in REM-Aufnahmen (Abbildung III-9) bestätigt. Der apikale Verlust von  $\alpha$ -II-Spektrin lässt ebenfalls eine Instabilität vermuten. Es ist bekannt, dass  $\alpha$ -II-Spektrin für die Aufrechterhaltung der Zellintegrität verantwortlich ist. Beim apoptotischen Zelltod wird es durch Caspase-3 gespalten und spielt eine wichtige Funktion bei Veränderung der Membranstabilität (Williams et al., 2003).

Die Verengung der Mikrovillibasis, wie sie in TEM-Aufnahmen (Abbildung III-11 und 14) erkennbar ist, kann ebenfalls in einer erhöhten Instabilität resultieren. Biophysikalische Studien zeigen, dass die Biegesteifigkeit der gebündelten Aktinfilamente abhängig ist von der Zusammensetzung des Bündels, der aktinbündelnden Proteine und der Filamentgröße (Claessens et al., 2006). In Stereozilien und anderen fingerartigen, aktinabhängigen Membranausstülpungen ist die Biegesteifigkeit essenziell für die Zellfunktion (Hudspeth und Corey, 1977; Kachar et al., 1986; Bursac et al., 2005; Mogilner und Rubinstein, 2005). So ist diese beispielsweise in Stereozilien für die Fähigkeit des Hörens notwendig, wie auch Espin defiziente Mäuse beweisen (Hudspeth und Corey, 1977; Kachar et al., 1986; Zheng et al., 2000). Es ist daher wahrscheinlich, dass der Verlust des aktinbündelnden I-Plastins in intestinalen Mikrovilli ebenfalls zu einer veränderten Biegesteifigkeit führt und die Mikrovilli instabiler sind.

In Myosin Ia defizienten Mäusen und bei Myosin IB-Defizienz in *D. melanogaster* wird eine geringe Stabilität des Bürstensaums auf die fehlende Kalziumpufferwirkung der Myosine zurückgeführt (Tyska et al., 2005; Hegan et al., 2007). Es wird vermutet, dass der Verlust eines kalziumbindenden Proteins eine Fragmentierung der Aktinfilamente durch Villin früher ermöglicht. I-Plastin ist durch seine N-terminalen EF-Hände ebenfalls in der Lage, Kalzium zu binden (Lin et al., 1994) und könnte aus diesem

Grund die aktinfragmentierende Aktivität von Villin inhibieren. Allerdings wird I-Plastin nicht so hochexprimiert wie die Myosine und besitzt daher vermutlich einen geringen Einfluss auf die Kalziumkonzentration. Isolierte Bürstensäume von I-Plastin/Villin und I-Plastin/Villin/Espin defizienten Mäusen sind aber in der Tat nicht so fragil wie die von I-Plastin und I-Plastin/Espin defizienten Mäusen (persönliche Mitteilung, S. Robine). I-Plastin könnte die Aktinfragmentierung durch Villin auch durch sterische Hinderung oder durch Stabilisierung der Filamente inhibieren. I-Plastin ist somit vermutlich essenziell für die Stabilität des Bürstensaums durch die Ausbildung des terminalen Netzes und den Schutz vor der aktinfragmentierenden Aktivität von Villin.

Die Aktinfragmentierung durch Villin wird *in situ* mittels Carbachol induziert, indem die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht und Villin zusätzlich phosphoryliert wird (Cohen et al., 1991; Khurana et al., 1997; Ferrary et al., 1999). In Villin defizienten Mäusen erfolgt keine carbacholinduzierte Aktinfragmentierung (Ferrary et al., 1999). In den hier durchgeführten *in situ* Studien konnten keine Unterschiede in der F-Aktin-Fragmentierung zwischen Wildtyp und I-Plastin defizienten Bürstensäumen festgestellt werden (Abbildung III-30). Mit dieser Methode ist es allerdings nicht möglich zu ermitteln, ob die Fragmentierung bei I-Plastin-Defizienz schneller erfolgen kann.

Die villinvermittelte Fragmentierung von Aktinfilamenten kann neben der beschriebenen *in situ* Methode auch *in vivo* durch Hungern und anschließender Fütterung induziert werden (Mooseker et al., 1984; Ferrary et al., 1999). Es wird vermutet, dass nach 24-stündigem Hungern die Zellproliferation reduziert wird und bei Nahrungsaufnahme wieder ohne Verzögerung einsetzt. Durch die Reduktion der Zellproliferation während des Hungerns wird die Villushöhe reduziert, da verlorene Zellen nicht ersetzt werden. Das Aktinzytoskelett bleibt aber erhalten, lediglich die Mikrovilli verkürzen sich durch die *Capping*-Aktivität von Villin. Unsere Ergebnisse bestätigen dies (Anhang Abbildung A-4). Durch Wiederaufnahme der Nahrung steigt die Kalziumkonzentration schnell an und F-Aktin wird fragmentiert. Weiterhin soll eine Vesikulierung der Mikrovilli erfolgen, wodurch die Oberfläche für die Resorption erhöht werden soll (Mooseker et al., 1984). Die Mikrovilli bleiben auch dabei intakt und Villin assoziiert mit G-Aktin. In der vorliegenden Arbeit konnten auch hier keine Unterschiede bei I-Plastin-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Auffallend ist, dass die *in vivo* induzierte Aktinfragmentierung auch Auswirkungen auf das terminale Netz hat, wie die  $\beta$ -Aktin-Färbung in Darmschnitten von Wildtypmäusen zeigt (Anhang Abbildung A-4). Der Verlust der apikalen  $\beta$ -Aktin-Färbung könnte daraus resultieren, dass das Epitop mit der G-Aktinbindestelle von Villin übereinstimmt oder aus anderen Gründen nicht mehr zugänglich ist.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass durch die Aktinfragmentierung  $\beta$ -Aktin nicht mehr konzentriert auf geringer Fläche vorliegt und die Färbung daher sehr schwach ist. Nicht auszuschließen ist zudem, dass  $\beta$ -Aktin verschwindet und  $\gamma$ -Aktin eine größere Rolle in solchen Situationen spielt.

Somit konnten in dieser Arbeit weder *in vivo* noch *in situ* Studien einen Unterschied zwischen der Aktinfragmentierung durch Villin bei I-Plastin-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp feststellen. Ein Einfluss von I-Plastin auf die villininduzierte F-Aktin-fragmentierung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da mit diesen Methoden keine Unterschiede in der Kinetik untersucht werden können. Aufschluss über mögliche Geschwindigkeitsunterschiede könnten *in vitro* Versuche mit isolierten Bürstensäumen geben.

Die diskutierten Möglichkeiten der Destabilisierung des Bürstensaums und die dadurch eingeschränkte Barrierefunktion sind bei I-Plastin-Defizienz zu erwarten. Erste Untersuchungen des transepithelialen Widerstandes (TER) von I-Plastin defizientem Darmgewebe bestätigen diese Hypothese durch einen reduzierten Widerstand. Die Messung reflektiert dabei eine Kombination der trans- und parazellulären Permeabilitätswege (Kapus und Szaszi, 2006). Eine erhöhte parazelluläre Permeabilität in I-Plastin defizienten Mäusen ist nicht auszuschließen. Die untersuchten Zell-Zellkontaktproteine lokalisieren normal (Abbildung III-25 und im Anhang Abbildung A-3), aber die Zellgrenzen in REM-Aufnahmen sind deutlicher zu erkennen als im Wildtyp (Abbildung III-9). Dies könnte auf einen funktionellen Defekt der Kontakte zurückzuführen sein, der als Folge ineffiziente *Tight junctions* hat. In Colonozyten konnte gezeigt werden, dass die epitheliale Barriere durch akuten Stress gestört wird und die Proteine der *Tight junctions* endozytiert werden (Demaude et al., 2006). Chronische Entzündungen des Darmgewebes können ebenfalls die Barriere auf diese Weise negativ beeinflussen (Utech et al., 2005). Die Immunfluoreszenzaufnahmen von Zell-Zellkontaktproteinen in Darmepithelzellen von I-Plastin defizienten Mäusen weisen allerdings keine Veränderungen in der Intensität auf und lassen vermuten, dass der gemessene reduzierte Widerstand aus einer verringerten apikalen, epithelialen Barriere und somit in einem erhöhten transzellulären Transport resultiert. Die Stabilität der Darmepithelzellen wurde auch *in vivo* durch Behandlung der Mäuse mit Dextran Natrium Sulfat (DSS) untersucht (Abbildungen III-33 bis 35). Diese Substanz ist dafür bekannt, dass sie Läsionen im kolorektalen Epithelium ähnlich einer Kolitis induziert (Mashimo et al., 1996). Für Villin defiziente Mäuse ist eine erhöhte Empfindlichkeit gegen DSS-Behandlung festgestellt worden (Ferrary et al., 1999). Während Ferrary et al. einen Defekt in der Wundheilung annahmen, deuten neuere

Studien daraufhin, dass Villin ein anti-apoptotisches Protein ist, dessen Verlust unter Stress zu einer erhöhten Apoptose führt, so dass Apoptose und Zellerneuerung nicht mehr im Gleichgewicht sind (Wang et al., 2008). Die in dieser Arbeit durchgeführte DSS-Behandlung von I-Plastin defizienten Mäusen führte früher zu ersten Symptomen einer Kolitis als bei Wildtypmäusen. Dies unterstützt die These, dass der Bürstensaum bei I-Plastin-Defizienz instabiler ist. Weibliche *knockout*-Mäuse starben signifikant früher als Wildtypmäuse gleichen Geschlechts, während bei männlichen Mäusen kein signifikanter Unterschied in der Sterberate bestand. Allerdings wiesen sowohl männliche als auch weibliche I-Plastin defiziente Mäuse früher Symptome auf als die Wildtypmäuse. HE-gefärbte Darmschnitte von männlichen *knockout*-Mäusen zeigen zudem, dass diese stärkere Läsionen im Colon besitzen als der Wildtyp (Abbildung III-35). Weibchen besitzen bekanntermaßen ein schwaches Bindegewebe, was die höhere Anfälligkeit im Vergleich zu den Männchen erklären könnte (Gaubitz, 2006). Eine weitere Erklärung könnte ein erhöhter Zellumsatz (erhöhte Apoptoserate verbunden mit einer erhöhten Zellerneuerungsrate) sein, der später diskutiert wird. Für Balb/c-Weibchen ist bekannt, dass sie resistenter gegen gewisse Infektionen sind, da sie einen höheren Zellumsatz besitzen als die Männchen und so Parasiten leichter ausstoßen (Bancroft et al., 2000; Cliffe et al., 2005). Ein erhöhter Zellumsatz in Normalsituationen bei I-Plastin-Defizienz könnte in Weibchen unter Stressbedingungen vermutlich nicht weiter gesteigert werden, wodurch sie anfälliger sein könnten.

## 4 Erhöhter Zellumsatz als Kompensierungsmechanismus

Das Darmepithel wird kontinuierlich und schnell erneuert durch einen Prozess, der Zellproliferation, Differenzierung, Zellmigration und den Abwurf von ausdifferenzierten Zellen zwei bis fünf Tage später einschließt (Kerr et al., 1972; Adams, 2003; Crosnier et al., 2006). Mechanische Instabilität des intestinalen Epithels durch Verlust von Proteinen im Bürstensaum ist vielfach diskutiert worden. Im Gegensatz zu dem vielschichtigen Epithel der Epidermis ist das Darmepithel nur einschichtig, und ein effizienter Prozess verhindert hier eine Zerstörung der Barrierefunktion des Gewebes durch Zellyse. Der Zellverlust im intestinalen Epithel durch Defizienz-verursachte Zellinstabilität wird dadurch schnell geheilt, ohne sichtbare Lücken im Epithel zu verursachen (Moore et al., 1989; Madara, 1990; Owens und Lane, 2004). Dies wird durch weitere Studien bekräftigt, die zeigen, dass sowohl der Verlust von Myosin IB in

*D. melanogaster*, Myosin Ia-Defizienz in Mäusen als auch Keratinmutationen im Menschen zur mechanischen Instabilität führen. Die erhöhte Instabilität hat ein gestresstes Gewebe zur Folge, was wiederum eine Erhöhung der Apoptoserate bewirkt (Owens et al., 2004; Tyska et al., 2005; Hegan et al., 2007). In Villin defizienten Mäusen konnte dagegen keine erhöhte Apoptoserate unter normalen Haltungsbedingungen festgestellt werden. Erst induzierte Läsionen führen bei Villindefizienz zur Steigerung der Apoptoserate (Wang et al., 2008). Villin spielt demnach weniger eine Rolle bei der Stabilisierung des intestinalen Bürstensaums, vielmehr stellt es ein anti-apoptotisches Protein dar. Es wird vermutet, dass Villin die Apoptose durch Inhibition von Caspase-9 und -3 unterdrückt, und dass die aktinfragmentierende Aktivität von Villin dafür essenziell ist. Der Verlust von Villin, aber auch die Spaltung von Villin führt zu einem erhöhten Zellabwurf vom Epithel ins Lumen (Wang et al., 2008). Somit soll ein Ungleichgewicht zwischen Apoptose und Zellerneuerung vorliegen, was zu Dünndarmerkrankungen führen kann.

Die Regulierung der Zellzahl im Darmtrakt von Säugern erfolgt durch die Zellerneuerung begleitet von einer äquivalenten Apoptoserate (Hall et al., 1994). Im Darmepithel von I-Plastin defizienten Mäusen konnte in dieser Arbeit ein vierfach erhöhter Zelltod festgestellt werden (Abbildung III-36). Die These, dass der erhöhte Zelltod bei I-Plastin-Defizienz auf einen instabilen Bürstensaum zurückzuführen ist, wird zusätzlich durch Studien in Ratten unterstützt, die zeigen, dass eine erhöhte Verletzungsrate des Epithels in einem Anstieg der Apoptoserate resultiert (Noda et al., 1998; Fujise et al., 2006). Zudem ist bekannt, dass Veränderungen des Aktinzytoskeletts mit zahlreichen Zellantworten wie Überleben, Proliferation, Apoptose und Bewegung verbunden sind (Papakonstanti und Stournaras, 2008). Sowohl die TUNEL-Analysen bei I-Plastin-Defizienz als auch die bei Myosin IB- und Myosin Ia-Defizienz können bei der erhöhten Zelltodrate allerdings nicht zwischen Apoptose und Nekrose unterscheiden. Es gab aber keine Hinweise (erhöhte Anzahl an Makrophagen, Anschwellen der Zellorganellen) dafür, dass es sich bei I-Plastin-Defizienz um Nekrose handelt.

Wie bereits erwähnt, ist die Apoptose im Darmepithel normalerweise mit der Zellerneuerung ausgeglichen. Eine erhöhte Apoptoserate, wie sie bei I-Plastin-Defizienz durch die Instabilität des Bürstensaums beobachtet worden ist, kann daher zu einer erhöhten Zellerneuerungsrate führen. Es wird vermutet, dass die Anzahl der intestinalen Stammzellen nicht konstant ist, sondern im Bedarfsfall erhöht (z.B. Schädigung) oder verringert (z.B. Energiemangel) werden kann (Booth und Potten, 2000). Zudem wird die Dauer der Teilung einer Stammzelle oder ihrer Tochterzelle von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Die Teilungsrate und die Teilungsgeschwindigkeit

können beispielsweise bei einem Energiemangel (z.B. bei parenteraler Ernährung) sinken. Diese Parameter steigen, wenn der Zellbedarf erhöht ist. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn als Folge einer bakteriellen Infektion viele Epithelzellen defekt oder beschädigt sind (Wong und Wright, 1999). Wobei auch ohne Erhöhung der Teilungsrates die Integrität des Epithels bei größeren Verletzungen durch einen schnellen Verschluss gewährleistet sein kann (Mammen und Matthews, 2003). Eine verstärkte intestinale Permeabilität, die auch bei I-Plastin-Defizienz angenommen wird, kann ebenfalls zur erhöhten Zellproliferation führen (Laukoetter et al., 2007). Sowohl die Verwendung des Ki67-Antikörpers (Abbildung III-37) als auch die histologische Untersuchung zwei Stunden nach BrdU-Injektion (Abbildung III-38) zeigen, dass die proliferierende Zone auch im I-Plastin defizienten Darmepithel auf die Krypten beschränkt ist. Eine erhöhte Anzahl von proliferierenden Zellen bei I-Plastin-Defizienz kann derzeit weder ausgeschlossen noch bestätigt werden. Eine solche Änderung könnte durch eine Färbung von Histon 3, das nur in der M-Phase des Zellzyklus detektierbar ist, nachgewiesen werden. Mit Hilfe des kürzlich entdeckten spezifischen Stammzellmarkers Lgr5 in den Krypten (Barker et al., 2007), könnte außerdem eine Veränderung der Stammzellanzahl untersucht werden. Es konnte hier aber gezeigt werden, dass die erhöhte Apoptoserate bei I-Plastin-Defizienz zu einer signifikant erhöhten Zellmigration von BrdU-positiven Zellen 24 und 48 Stunden nach BrdU-Injektion führt. Dies lässt vermuten, dass es sich bei I-Plastin im Gegensatz zu Villin nicht um ein anti-apoptotisches Protein handelt. Vielmehr führt die durch I-Plastin-Defizienz verursachte Instabilität des Bürstensaums zu einer erhöhten Apoptoserate, die wiederum durch den Anstieg der Zellerneuerung ausgeglichen wird. Dass dies sehr effizient erfolgt, wird auch dadurch bestätigt, dass trotz des Barriere-defekts keine erhöhte Infektionsrate erfolgt. Es konnte außerdem mit Hilfe von Differenzierungsmarkern wie dem I-Fabp (Abbildung III-39) oder Villin gezeigt werden, dass die Steigerung des Zellumsatzes keine Auswirkungen auf die Differenzierung der Darmepithelzellen hat. Die Erhöhung des Zellumsatzes als Kompensierungsmechanismus ist effizient und daher vermutlich die Ursache für den milden Phänotyp auf den Allgemeinzustand der I-Plastin defizienten Mäuse.

## 5 Die Aktinwurzel als Transportroute

Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli sind voneinander abhängig und formen ein Netzwerk, das die Zellpolarität reguliert. Die Defekte bei I-Plastin-Defizienz lassen vermuten, dass I-Plastin eine wichtige Rolle bei der Integration dieser drei Zytoskelettelemente im Bürstensaum besitzt. Bei I-Plastin-Defizienz ist das apikale Aktinzytoskelett durch den Verlust der Aktinwurzel und der aktinbindenden Proteine im terminalen Netz beeinträchtigt. Zusätzlich weisen I-Plastin defiziente Darmepithelzellen einen Lokalisationsdefekt von Peptidasen, wie der Neutralen Aminopeptidase und der Dipeptidylpeptidase IV, auf (Abbildung III-26). Wie die Untersuchungen zeigen, ist der Defekt aber nur partiell, da die apikale Lokalisation von Saccharidasen nicht beeinträchtigt ist. Diese werden möglicherweise über einen Myosin Ia-vermittelten Weg zur apikalen Membran rekrutiert (Tyska und Mooseker, 2004; Tyska et al., 2005). Es ist bekannt, dass Myosin Ia mit Vesikeln im terminalen Netz (Drenckhahn und Dermietzel, 1988) und mit Vesikeln des Golgiapparats, die mit Dynein, einem Motorprotein der Mikrotubuli, verbunden sind, assoziiert ist (Fath und Burgess, 1993; Fath et al., 1994; Fath et al., 1997; Jacob et al., 2003). Myosin Ia soll sich *in vitro* entlang der mikrovillaren Aktinbündel bewegen (McConnell und Tyska, 2007). Es wird vermutet, dass dies *in vivo* dem intramikrovillaren Transport von Membranlipiden und Proteinen dient oder eine bisher unbekannt Funktion hat. Ein Transportdefekt bei Verlust von I-Plastin wird auch durch TEM-Aufnahmen unterstützt, die eine Anhäufung von Vesikeln in Darmepithelzellen von I-Plastin defizienten Mäusen zeigen (Abbildung III-10). Dies lässt vermuten, dass die Aktinwurzeln als Transportwege zur apikalen Domäne verwendet werden, wie es bereits früher vorgeschlagen worden ist (Hirokawa et al., 1983). Ferner ist bekannt, dass Mikrotubuli für einen effizienten apikalen Transport notwendig sind (Musch, 2004), wobei diese nur teilweise ins terminale Netz hineinreichen. Das terminale Netz ist so dicht, dass selbst kleine Organellen wie Ribosomen ausgeschlossen sind. Eine passive Diffusion von Transportvesikeln durch das terminale Netz ist daher unwahrscheinlich. Ein Transportvesikel könnte über die Mikrotubuli zum terminalen Netz gelangen und dann mit Hilfe eines Myosinmotorproteins über die Aktinwurzeln durch das terminale Netz transportiert werden und schließlich mit der apikalen Plasmamembran fusionieren (Fath et al., 1994; Tuxworth und Titus, 2000; Apodaca, 2001; Krendel und Mooseker, 2005; Delacour und Jacob, 2006). Diese These wird nun durch die Tatsache gestützt, dass Enzyme wie LPH, deren apikaler Transport unabhängig von Aktin ist, in I-Plastin defizienten Bürstensäumen unverändert lokalisieren.

Ein Transportdefekt bei I-Plastin-Defizienz wird auch durch die beobachtete Reduzierung von Tropomyosinen, wie 5a und 5b, bekräftigt (Abbildung III-17). Eine Reduktion von Tropomyosin 5a und 5b mittels siRNA hat den Einbau einer erhöhten Menge von CFTR in die apikale Membran zur Folge (Dalby-Payne et al., 2003), und ist daher auch bei Verlust von I-Plastin zu erwarten. Die *in vitro* Studien lassen zudem vermuten, dass diese Isoformen die Interaktion von Aktin und Myosin inhibieren, so dass ein aktiver Transportprozess von Vesikeln entlang der Aktinfilamente inhibiert wird (Dalby-Payne et al., 2003). Die apikale Reduzierung von Tropomyosinen bei I-Plastin-Defizienz könnte somit die Lokalisationsdefekte einiger hier untersuchter Hydrolasen erklären. Allerdings ist auch postuliert worden, dass Myosinmotoren den aktiven Transport von sekretorischen Vesikeln (Schott et al., 2002) entlang von Tropomyosin haltigen Aktinfilamenten bewerkstelligen (Evangelista et al., 2002). Spezifischer zu den in dieser Arbeit untersuchten Epithelzellen sind die Erkenntnisse von Fanning et al. (1994). Hoch- und niedermolekulare Tropomyosine regulieren auf unterschiedliche Weise die Myosine im Bürstensaum. Die Reduktion von Tropomyosinen und das Fehlen von Myosin IIa im terminalen Netz von I-Plastin defizienten Mäusen verstärken die These, dass das Aktinzytoskelett eine Rolle in der lokalen Anlieferung von Vesikeln zur apikalen Membran spielt. Dies hätte bei Verlust von I-Plastin eine Anhäufung von sekretorischen Vesikeln im Zytoplasma zur Folge. Es könnte sich daher bei den beobachteten Vesikeln und tubulären Strukturen in TEM-Aufnahmen um solche handeln (Abbildung III-10). Wenn das terminale Netz somit als physikalische Barriere für den Transport von Vesikeln dient, so blockiert es nicht alle auf die gleiche Art und Weise.

Auch eine direkte Rolle von I-Plastin beim apikalen Transport ist möglich, da in Hefen das Plastinohomolog Sac6p in den intrazellulären Transport involviert ist (Kubler und Riezman, 1993) und dessen reduzierte Expression in eine Störung der Aktinzytoskelettorganisation resultiert. Der Verlust von I-Plastin kann möglicherweise frühe Transportprozesse beeinflussen, die spezifisch für jeden Vesikeltyp sind. So sind beispielsweise nur solche apikalen Enzyme bei I-Plastin-Defizienz betroffen, deren Transporte von Lipid-Rafts abhängig sind (Garcia et al., 1993; Danielsen, 1995; Delacour et al., 2006).

Dass ein Transportdefekt bei I-Plastin-Defizienz vorliegt, wird auch durch die diskutierten Veränderungen der Intermediärfilamente unterstützt. Das Keratinnetzwerk ist für die Aufrechterhaltung der apikalen Polarität und der epithelialen Funktion notwendig wie Keratin 8-defiziente Mäuse zeigen. Keratin 8-Defizienz führt zum Verlust des Intermediärfilamentnetzwerks und beispielsweise zur Fehllokalisation der Sucrase-Isomaltase (Ameen et al., 2001; Owens und Lane, 2004). Auch die Reduktion von Keratin 19 in Zellen hat Auswirkungen auf den apikalen Transport und weist Veränderungen von F-Aktin auf (Salas et al., 1997).

Die hier untersuchte basolaterale Lokalisation beispielsweise von  $\alpha$ -Spektrin, Myosin IIa, Natrium/Kalium-ATPase, E-Cadherin und von Cateninen ist hingegen nicht beeinträchtigt (Abbildung III-18, -25, -26 und im Anhang Abbildung A-3). Dies zeigt, dass bei I-Plastin-Defizienz ein Transport-, aber kein Sortierungsdefekt für die Polarität besteht. Die unveränderte laterale Lokalisation von Proteinen gewährleistet zumindest teilweise die Aufrechterhaltung der Adhäsion, Zellteilungskontrolle, Resorption und interzelluläre Permeabilität, wie sie von Conti und Adelstein (2008) beschrieben worden ist. Dies erklärt auch, warum die Mäuse trotz des Verlusts von I-Plastin und den daraus resultierenden Defekten lebensfähig sind.

Trotz der apikalen Fehllokalisation von Enzymen bei I-Plastin-Defizienz ist die Nährstoffresorption nicht deutlich beeinträchtigt (Tabelle III-1; Abbildung III-5, III-6 und III-7). Dies ist nicht außergewöhnlich, da Studien an Ratten gezeigt haben, dass 45 % des Darms entnommen werden können, ohne dass die resorbierende Funktion beeinträchtigt ist (Menge und Robinson, 1978).

Eine erhöhte Endozytoserate ist in I-Plastin defizienten Mäusen ebenfalls möglich. Untersuchungen haben ergeben, dass Mikrofilamente eine Rolle bei der Endozytose von Proteinen an der apikalen Membran von Epithelzellen spielen. In dieser Hypothese wird angenommen, dass die Mikrofilamente entweder in die Bewegung von mikrovillaren Membrankomponenten in Richtung des intermikrovillaren Bereichs oder in die Kraftbildung zur Bildung von endozytotischen Vesikeln involviert sind (Gottlieb et al., 1993; McConnell und Tyska, 2007). In dieser Arbeit durchgeführte Immunfluoreszenzstudien mit Clathrin und Lamp2 (ein mit Lysosomen assoziiertes Membranprotein) zeigen keinen nennenswerten Unterschied zwischen Wildtyp und I-Plastin defizienten Mäusen (Abbildung III-27). Quantifizierungen der Clathrin-expression deuten allerdings auf eine zweifache Erhöhung hin (Abbildung III-28) und es könnte sich daher bei den vesikulären Strukturen in EM-Aufnahmen auch um endozytierte Vesikel handeln. Myosin VI ist an der Endozytose im Bürstensaum beteiligt, indem es die Vesikel ins Zellinnere transportiert (Morris et al., 2002;

Aschenbrenner et al., 2004; Ameen und Apodaca, 2007). Untersuchungen der Expression und Lokalisation von Myosin VI könnten demnach weitere Aufschlüsse über eine veränderte Endozytoserate liefern. Eine Erhöhung der Rate könnte eine Erklärung für die geringen Auswirkungen auf die Mäuse trotz verkürzter Mikrovilli und somit einer reduzierten, resorbierenden Oberfläche und weiterer Defekte sein.

## 6 Schlussfolgerung

Diese Arbeit zeigt, dass I-Plastin für die Ausbildung der Aktinwurzeln und des terminalen Netzes essenziell ist. Des Weiteren ist es notwendig damit die Mikrovilli ihre normale Länge erreichen, da I-Plastin für die Verankerung der mikrovillaren Aktinfilamente im terminalen Netz durch potenzielle Interaktionen mit Keratin 19 und Myosin IIa verantwortlich ist. Dadurch wird den Mikrovilli eine höhere Stabilität verliehen. Die Verlängerung der Mikrovilli kann auch dadurch erfolgen, dass I-Plastin für eine Anreicherung von  $\beta$ -Aktin sorgt und somit Einfluss auf die Proportionen von  $\beta$ - zu  $\gamma$ -Aktin besitzt. Die I-Plastin-Defizienz resultiert somit in einen instabilen Bürstensaum, der durch einen erhöhten Zellumsatz (Apoptose zusammen mit Zellerneuerung) kompensiert wird. Zudem kann der Verlust der Aktinwurzeln zu Auswirkungen auf den apikalen Transport und die Endozytose führen. Es ist daher denkbar, dass die Aktinwurzeln sowohl als Transportroute dienen, als auch eine zu überwindende Barriere darstellen.

# Literaturverzeichnis

- Aberle, H., S. Butz, J. Stappert, H. Weissig, R. Kemler and H. Hoschuetzky. 1994. "Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins." J Cell Sci **107 ( Pt 12)**:3655-3663.
- Adam, T., M. Arpin, M. C. Prevost, P. Gounon and P. J. Sansonetti. 1995. "Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells." J Cell Biol **129**:367-381.
- Adams, A. E., D. Botstein and D. G. Drubin. 1991. "Requirement of yeast fimbrin for actin organization and morphogenesis in vivo." Nature **354**:404-408.
- Adams, A. E., W. Shen, C. S. Lin, J. Leavitt and P. Matsudaira. 1995. "Isoform-specific complementation of the yeast *sac6* null mutation by human fimbrin." Mol Cell Biol **15**:69-75.
- Adams, J. M. 2003. "Ways of dying: multiple pathways to apoptosis." Genes Dev **17**:2481-2495.
- Alberts, B., A. Johnson, L. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter. 2004. Molekularbiologie der Zelle. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Ameen, N. and G. Apodaca. 2007. "Defective CFTR apical endocytosis and enterocyte brush border in myosin VI-deficient mice." Traffic **8**:998-1006.
- Ameen, N. A., Y. Figueroa and P. J. Salas. 2001. "Anomalous apical plasma membrane phenotype in CK8-deficient mice indicates a novel role for intermediate filaments in the polarization of simple epithelia." J Cell Sci **114**:563-575.
- Apodaca, G. 2001. "Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton." Traffic **2**:149-159.
- Arpin, M., E. Friederich, M. Algrain, F. Vernel and D. Louvard. 1994. "Functional differences between L- and T-plastin isoforms." J Cell Biol **127**:1995-2008.
- Aschenbrenner, L., S. N. Naccache and T. Hasson. 2004. "Uncoated endocytic vesicles require the unconventional myosin, Myo6, for rapid transport through actin barriers." Mol Biol Cell **15**:2253-2263.
- Athman, R., M. I. Fernandez, P. Gounon, P. Sansonetti, D. Louvard, D. Philpott and S. Robine. 2005. "*Shigella flexneri* infection is dependent on villin in the mouse intestine and in primary cultures of intestinal epithelial cells." Cell Microbiol **7**:1109-1116.
- Athman, R., D. Louvard and S. Robine. 2002. "The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. III. How is villin involved in the actin cytoskeleton dynamics in intestinal cells?" Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **283**:G496-502.
- Atilgan, E., D. Wirtz and S. X. Sun. 2006. "Mechanics and dynamics of actin-driven thin membrane protrusions." Biophys J **90**:65-76.
- Avraham, K. B., T. Hasson, K. P. Steel, D. M. Kingsley, L. B. Russell, M. S. Mooseker, N. G. Copeland and N. A. Jenkins. 1995. "The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells." Nat Genet **11**:369-375.
- Bacallao, R., C. Antony, C. Dotti, E. Karsenti, E. H. Stelzer and K. Simons. 1989. "The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium." J Cell Biol **109**:2817-2832.
- Bajaj-Elliott, M. and I. R. Sanderson. 2004. Chapter 1: Structure and Function of the Gastrointestinal Mucosa. London, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Bancroft, A. J., D. Artis, D. D. Donaldson, J. P. Sypek and R. K. Grencis. 2000. "Gastrointestinal nematode expulsion in IL-4 knockout mice is IL-13 dependent." Eur J Immunol **30**:2083-2091.

- Baribault, H., J. Penner, R. V. Iozzo and M. Wilson-Heiner. 1994. "Colorectal hyperplasia and inflammation in keratin 8-deficient FVB/N mice." Genes Dev **8**:2964-2973.
- Baribault, H., J. Price, K. Miyai and R. G. Oshima. 1993. "Mid-gestational lethality in mice lacking keratin 8." Genes Dev **7**:1191-1202.
- Barker, N., J. H. van Es, J. Kuipers, P. Kujala, M. van den Born, M. Cozijnsen, A. Haegebarth, J. Korving, H. Begthel, P. J. Peters and H. Clevers. 2007. "Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5." Nature **449**:1003-1007.
- Bartles, J. R. 2000. "Parallel actin bundles and their multiple actin-bundling proteins." Curr Opin Cell Biol **12**:72-78.
- Bartles, J. R., A. Wierda and L. Zheng. 1996. "Identification and characterization of espin, an actin-binding protein localized to the F-actin-rich junctional plaques of Sertoli cell ectoplasmic specializations." J Cell Sci **109 ( Pt 6)**:1229-1239.
- Bartles, J. R., L. Zheng, A. Li, A. Wierda and B. Chen. 1998. "Small espin: a third actin-bundling protein and potential forked protein ortholog in brush border microvilli." J Cell Biol **143**:107-119.
- Beaulieu, J. F. 1997. "Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation." Prog Histochem Cytochem **31**:1-78.
- Beaulieu, J. F. 1999. "Integrins and human intestinal cell functions." Front Biosci **4**:D310-321.
- Bement, W. M. and M. S. Mooseker. 1996. The cytoskeleton of the intestinal epithelium: components, assembly, and dynamic rearrangements, JAI Press Inc.
- Benesh, A. E., R. E. McConnell, S. Mao and M. J. Tyska (2007). Myosin-1d Is a Major Component of the Enterocyte Brush Border cytoskeleton. American Society of Cell Biology (ASCB), Washington, D.C., Molecular Biology of the Cell.
- Bennett, V. and A. J. Baines. 2001. "Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues." Physiol Rev **81**:1353-1392.
- Berryman, M., Z. Franck and A. Bretscher. 1993. "Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells." J Cell Sci **105 ( Pt 4)**:1025-1043.
- Betapudi, V., L. S. Licate and T. T. Egelhoff. 2006. "Distinct roles of nonmuscle myosin II isoforms in the regulation of MDA-MB-231 breast cancer cell spreading and migration." Cancer Res **66**:4725-4733.
- Birnboim, H. C. and J. Doly. 1979. "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**:1513-1523.
- Bjerknes, M. and H. Cheng. 1999. "Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors." Gastroenterology **116**:7-14.
- Booth, C. and C. S. Potten. 2000. "Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells." J Clin Invest **105**:1493-1499.
- Bretscher, A. 1983. "Purification of an 80,000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells." J Cell Biol **97**:425-432.
- Bretscher, A. 1999. "Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family." Curr Opin Cell Biol **11**:109-116.
- Bretscher, A., D. Chambers, R. Nguyen and D. Reczek. 2000. "ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function." Annu Rev Cell Dev Biol **16**:113-143.
- Bretscher, A. and K. Weber. 1978. "Localization of actin and microfilament-associated proteins in the microvilli and terminal web of the intestinal brush border by immunofluorescence microscopy." J Cell Biol **79**:839-845.
- Bretscher, A. and K. Weber. 1979. "Villin: the major microfilament-associated protein of the intestinal microvillus." Proc Natl Acad Sci U S A **76**:2321-2325.

- Bretscher, A. and K. Weber. 1980. "Fimbrin, a new microfilament-associated protein present in microvilli and other cell surface structures." J Cell Biol **86**:335-340.
- Bridgman, P. C., S. Dave, C. F. Asnes, A. N. Tullio and R. S. Adelstein. 2001. "Myosin IIB is required for growth cone motility." J Neurosci **21**:6159-6169.
- Brunner, J., H. Hauser, H. Braun, K. J. Wilson, H. Wacker, B. O'Neill and G. Semenza. 1979. "The mode of association of the enzyme complex sucrose.isomaltase with the intestinal brush border membrane." J Biol Chem **254**:1821-1828.
- Bullock, W. O. 1987. Biotechniques **5**:376-378.
- Burgess, D. R. 1982. "Reactivation of intestinal epithelial cell brush border motility: ATP-dependent contraction via a terminal web contractile ring." J Cell Biol **95**:853-863.
- Burgess, D. R., K. O. Broschat and J. M. Hayden. 1987. "Tropomyosin distinguishes between the two actin-binding sites of villin and affects actin-binding properties of other brush border proteins." J Cell Biol **104**:29-40.
- Burgess, D. R. and B. E. Prum. 1982. "Reevaluation of brush border motility: calcium induces core filament solution and microvillar vesiculation." J Cell Biol **94**:97-107.
- Bursac, P., G. Lenormand, B. Fabry, M. Oliver, D. A. Weitz, V. Viasnoff, J. P. Butler and J. J. Fredberg. 2005. "Cytoskeletal remodelling and slow dynamics in the living cell." Nat Mater **4**:557-561.
- Cai, Y., N. Biais, G. Giannone, M. Tanase, G. Jiang, J. M. Hofman, C. H. Wiggins, P. Silberzan, A. Buguin, B. Ladoux and M. P. Sheetz. 2006. "Nonmuscle myosin IIA-dependent force inhibits cell spreading and drives F-actin flow." Biophys J **91**:3907-3920.
- Carroll, S. L., K. A. Roth and J. I. Gordon. 1990. "Liver fatty acid-binding protein: a marker for studying cellular differentiation in gut epithelial neoplasms." Gastroenterology **99**:1727-1735.
- Chafel, M. M., W. Shen and P. Matsudaira. 1995. "Sequential expression and differential localization of I-, L-, and T-fimbrin during differentiation of the mouse intestine and yolk sac." Dev Dyn **203**:141-151.
- Chailer, P. and D. Menard. 1999. "Ontogeny of EGF receptors in the human gut." Front Biosci **4**:D87-101.
- Chambers, C. and R. D. Grey. 1979. "Development of the structural components of the brush border in absorptive cells of the chick intestine." Cell Tissue Res **204**:387-405.
- Chandler, J. S., D. Calnek and A. Quaroni. 1991. "Identification and characterization of rat intestinal keratins. Molecular cloning of cDNAs encoding cytokeratins 8, 19, and a new 49-kDa type I cytokeratin (cytokeratin 21) expressed by differentiated intestinal epithelial cells." J Biol Chem **266**:11932-11938.
- Chen, H., A. Mocsai, H. Zhang, R. X. Ding, J. H. Morisaki, M. White, J. M. Rothfork, P. Heiser, E. Colucci-Guyon, C. A. Lowell, H. D. Gresham, P. M. Allen and E. J. Brown. 2003a. "Role for plactin in host defense distinguishes integrin signaling from cell adhesion and spreading." Immunity **19**:95-104.
- Chen, Y., N. Takizawa, J. L. Crowley, S. W. Oh, C. L. Gatto, T. Kambara, O. Sato, X. D. Li, M. Ikebe and E. J. Luna. 2003b. "F-actin and myosin II binding domains in supervillin." J Biol Chem **278**:46094-46106.
- Chung, C. T. and R. H. Miller. 1988. "A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells." Nucleic Acids Res **16**:3580.
- Church, G. M. and W. Gilbert. 1984. "Genomic sequencing." Proc Natl Acad Sci U S A **81**:1991-1995.
- Claessens, M. M., M. Bathe, E. Frey and A. R. Bausch. 2006. "Actin-binding proteins sensitively mediate F-actin bundle stiffness." Nat Mater **5**:748-753.

- Cliffe, L. J., N. E. Humphreys, T. E. Lane, C. S. Potten, C. Booth and R. K. Grencis. 2005. "Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion." Science **308**:1463-1465.
- Cohen, M. E., J. Wesolek, J. McCullen, K. Rys-Sikora, S. Pandol, R. P. Rood, G. W. Sharp and M. Donowitz. 1991. "Carbachol- and elevated Ca(2+)-induced translocation of functionally active protein kinase C to the brush border of rabbit ileal Na<sup>+</sup> absorbing cells." J Clin Invest **88**:855-863.
- Coleman, T. R., D. J. Fishkind, M. S. Mooseker and J. S. Morrow. 1989a. "Contributions of the beta-subunit to spectrin structure and function." Cell Motil Cytoskeleton **12**:248-263.
- Coleman, T. R., D. J. Fishkind, M. S. Mooseker and J. S. Morrow. 1989b. "Functional diversity among spectrin isoforms." Cell Motil Cytoskeleton **12**:225-247.
- Coluccio, L. M. 1997. "Myosin I." Am J Physiol **273**:C347-359.
- Coluccio, L. M. and A. Bretscher. 1987. "Calcium-regulated cooperative binding of the microvillar 110K-calmodulin complex to F-actin: formation of decorated filaments." J Cell Biol **105**:325-333.
- Coluccio, L. M. and A. Bretscher. 1989. "Reassociation of microvillar core proteins: making a microvillar core in vitro." J Cell Biol **108**:495-502.
- Conner, S. D. and S. L. Schmid. 2003. "Regulated portals of entry into the cell." Nature **422**:37-44.
- Cooper, J. A. 2002. "Actin dynamics: tropomyosin provides stability." Curr Biol **12**:R523-525.
- Correia, I., D. Chu, Y. H. Chou, R. D. Goldman and P. Matsudaira. 1999. "Integrating the actin and vimentin cytoskeletons. adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages." J Cell Biol **146**:831-842.
- Costa de Beauregard, M. A., E. Pringault, S. Robine and D. Louvard. 1995. "Suppression of villin expression by antisense RNA impairs brush border assembly in polarized epithelial intestinal cells." Embo J **14**:409-421.
- Coudrier, E., H. Reggio and D. Louvard. 1981. "Immunolocalization of the 110,000 molecular weight cytoskeletal protein of intestinal microvilli." J Mol Biol **152**:49-66.
- Craig, S. W. and J. V. Pardo. 1979. "alpha-Actinin localization in the junctional complex of intestinal epithelial cells." J Cell Biol **80**:203-210.
- Creamer, B., R. G. Shorter and J. Bamforth. 1961. "The turnover and shedding of epithelial cells. I. The turnover in the gastro-intestinal tract." Gut **2**:110-118.
- Crepaldi, T., A. Gautreau, P. M. Comoglio, D. Louvard and M. Arpin. 1997. "Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor-mediated migration and morphogenesis in epithelial cells." J Cell Biol **138**:423-434.
- Crosnier, C., D. Stamatakis and J. Lewis. 2006. "Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control." Nat Rev Genet **7**:349-359.
- Dalby-Payne, J. R., E. V. O'Loughlin and P. Gunning. 2003. "Polarization of specific tropomyosin isoforms in gastrointestinal epithelial cells and their impact on CFTR at the apical surface." Mol Biol Cell **14**:4365-4375.
- Danielsen, E. M. 1995. "Involvement of detergent-insoluble complexes in the intracellular transport of intestinal brush border enzymes." Biochemistry **34**:1596-1605.
- Daudet, N. and M. C. Lebart. 2002. "Transient expression of the t-isoform of plastins/fimbrin in the stereocilia of developing auditory hair cells." Cell Motil Cytoskeleton **53**:326-336.
- de Arruda, M. V., H. Bazari, M. Wallek and P. Matsudaira. 1992. "An actin footprint on villin. Single site substitutions in a cluster of basic residues inhibit the actin severing but not capping activity of villin." J Biol Chem **267**:13079-13085.

- de Arruda, M. V., S. Watson, C. S. Lin, J. Leavitt and P. Matsudaira. 1990. "Fimbrin is a homologue of the cytoplasmic phosphoprotein plastin and has domains homologous with calmodulin and actin gelation proteins." J Cell Biol **111**:1069-1079.
- De Matteis, M. A. and J. S. Morrow. 2000. "Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway." J Cell Sci **113 ( Pt 13)**:2331-2343.
- Delacour, D., C. I. Cramm-Behrens, H. Drobecq, A. Le Bivic, H. Y. Naim and R. Jacob. 2006. "Requirement for galectin-3 in apical protein sorting." Curr Biol **16**:408-414.
- Delacour, D. and R. Jacob. 2006. "Apical protein transport." Cell Mol Life Sci **63**:2491-2505.
- Delanote, V., J. Vandekerckhove and J. Gettemans. 2005. "Plastins: versatile modulators of actin organization in (patho)physiological cellular processes." Acta Pharmacol Sin **26**:769-779.
- Demaude, J., C. Salvador-Cartier, J. Fioramonti, L. Ferrier and L. Bueno. 2006. "Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction." Gut **55**:655-661.
- DeRosier, D. J. and L. G. Tilney. 2000. "F-actin bundles are derivatives of microvilli: What does this tell us about how bundles might form?" J Cell Biol **148**:1-6.
- Donnenberg, M. S. 2000. "Pathogenic strategies of enteric bacteria." Nature **406**:768-774.
- Drenckhahn, D. and R. Dermietzel. 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. and H. Franz. 1986. "Identification of actin-, alpha-actinin-, and vinculin-containing plaques at the lateral membrane of epithelial cells." J Cell Biol **102**:1843-1852.
- Drenckhahn, D. and U. Groschel-Stewart. 1980. "Localization of myosin, actin, and tropomyosin in rat intestinal epithelium: immunohistochemical studies at the light and electron microscope levels." J Cell Biol **86**:475-482.
- Drenckhahn, D., H. D. Hofmann and H. G. Mannherz. 1983. "Evidence for the association of villin with core filaments and rootlets of intestinal epithelial microvilli." Cell Tissue Res **228**:409-414.
- Drenckhahn, D., T. Schäfer and M. Prinz. 1985. "Actin, myosin, and associated proteins in the vertebrate auditory and vestibular organs: immunocytochemical and biochemical studies." Auditory Biochemistry, Springfield, IL.:317-335.
- Dudouet, B., S. Robine, C. Huet, C. Sahuquillo-Merino, L. Blair, E. Coudrier and D. Louvard. 1987. "Changes in villin synthesis and subcellular distribution during intestinal differentiation of HT29-18 clones." J Cell Biol **105**:359-369.
- Erez, N., A. Bershadsky and B. Geiger. 2005. "Signaling from adherens-type junctions." Eur J Cell Biol **84**:235-244.
- Eudy, J. D., M. D. Weston, S. Yao, D. M. Hoover, H. L. Rehm, M. Ma-Edmonds, D. Yan, I. Ahmad, J. J. Cheng, C. Ayuso, C. Cremers, S. Davenport, C. Moller, C. B. Talmadge, K. W. Beisel, M. Tamayo, C. C. Morton, A. Swaroop, W. J. Kimberling and J. Sumegi. 1998. "Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa." Science **280**:1753-1757.
- Evangelista, M., D. Pruyne, D. C. Amberg, C. Boone and A. Bretscher. 2002. "Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast." Nat Cell Biol **4**:32-41.
- Ezzell, R. M., M. M. Chafel and P. T. Matsudaira. 1989. "Differential localization of villin and fimbrin during development of the mouse visceral endoderm and intestinal epithelium." Development **106**:407-419.

- Fanning, A. S., J. S. Wolenski, M. S. Mooseker and J. G. Izant. 1994. "Differential regulation of skeletal muscle myosin-II and brush border myosin-I enzymology and mechanochemistry by bacterially produced tropomyosin isoforms." Cell Motil Cytoskeleton **29**:29-45.
- Fath, K. R. and D. R. Burgess. 1993. "Golgi-derived vesicles from developing epithelial cells bind actin filaments and possess myosin-I as a cytoplasmically oriented peripheral membrane protein." J Cell Biol **120**:117-127.
- Fath, K. R., S. N. Mamajiwalla and D. R. Burgess. 1993. "The cytoskeleton in development of epithelial cell polarity." J Cell Sci Suppl **17**:65-73.
- Fath, K. R., S. D. Obenauf and D. R. Burgess. 1990. "Cytoskeletal protein and mRNA accumulation during brush border formation in adult chicken enterocytes." Development **109**:449-459.
- Fath, K. R., G. M. Trimbur and D. R. Burgess. 1994. "Molecular motors are differentially distributed on Golgi membranes from polarized epithelial cells." J Cell Biol **126**:661-675.
- Fath, K. R., G. M. Trimbur and D. R. Burgess. 1997. "Molecular motors and a spectrin matrix associate with Golgi membranes in vitro." J Cell Biol **139**:1169-1181.
- Fernandez, M. I., A. Thuizat, T. Pedron, M. Neutra, A. Phalipon and P. J. Sansonetti. 2003. "A newborn mouse model for the study of intestinal pathogenesis of shigellosis." Cell Microbiol **5**:481-491.
- Ferrary, E., M. Cohen-Tannoudji, G. Pehau-Arnaudet, A. Lapillonne, R. Athman, T. Ruiz, L. Boulouha, F. El Marjou, A. Doye, J. J. Fontaine, C. Antony, C. Babinet, D. Louvard, F. Jaisser and S. Robine. 1999. "In vivo, villin is required for Ca(2+)-dependent F-actin disruption in intestinal brush borders." J Cell Biol **146**:819-830.
- Fievet, B. T., A. Gautreau, C. Roy, L. Del Maestro, P. Mangeat, D. Louvard and M. Arpin. 2004. "Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin." J Cell Biol **164**:653-659.
- Frank, G., J. Brunner, H. Hauser, H. Wacker, G. Semenza and H. Zuber. 1978. "The hydrophobic anchor of small-intestinal sucrase--isomaltase: N-terminal sequence of isomaltase subunit." FEBS Lett **96**:183-188.
- Franke, W. W., B. Appelhans, E. Schmid, C. Freudenstein, M. Osborn and K. Weber. 1979. "The organization of cytokeratin filaments in the intestinal epithelium." Eur J Cell Biol **19**:255-268.
- Friederich, E., E. Pringault, M. Arpin and D. Louvard. 1990. "From the structure to the function of villin, an actin-binding protein of the brush border." Bioessays **12**:403-408.
- Friederich, E., K. Vancompernelle, C. Huet, M. Goethals, J. Finidori, J. Vandekerckhove and D. Louvard. 1992. "An actin-binding site containing a conserved motif of charged amino acid residues is essential for the morphogenic effect of villin." Cell **70**:81-92.
- Fucini, P., C. Renner, C. Herberhold, A. A. Noegel and T. A. Holak. 1997. "The repeating segments of the F-actin cross-linking gelation factor (ABP-120) have an immunoglobulin-like fold." Nat Struct Biol **4**:223-230.
- Fujise, T., R. Iwakiri, B. Wu, S. Amemori, T. Kakimoto, F. Yokoyama, Y. Sakata, S. Tsunada and K. Fujimoto. 2006. "Apoptotic pathway in the rat small intestinal mucosa is different between fasting and ischemia-reperfusion." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **291**:G110-116.
- Fujita, H., H. Chiba, H. Yokozaki, N. Sakai, K. Sugimoto, T. Wada, T. Kojima, T. Yamashita and N. Sawada. 2006. "Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine." J Histochem Cytochem **54**:933-944.
- Galkin, V. E., A. Orlova, O. Cherepanova, M. C. Lebart and E. H. Egelman. 2008. "High-resolution cryo-EM structure of the F-actin-fimbrin/plastin ABD2 complex." Proc Natl Acad Sci U S A **105**:1494-1498.

- Garcia, M., C. Mirre, A. Quaroni, H. Reggio and A. Le Bivic. 1993. "GPI-anchored proteins associate to form microdomains during their intracellular transport in Caco-2 cells." J Cell Sci **104 ( Pt 4)**:1281-1290.
- Garcia-Alvarez, B., A. Bobkov, A. Sonnenberg and J. M. de Pereda. 2003. "Structural and functional analysis of the actin binding domain of plectin suggests alternative mechanisms for binding to F-actin and integrin beta4." Structure **11**:615-625.
- Gaubitz, M. 2006. "Epidemiology of connective tissue disorders." Rheumatology (Oxford) **45 Suppl 3**:iii3-4.
- Gavrieli, Y., Y. Sherman and S. A. Ben-Sasson. 1992. "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." J Cell Biol **119**:493-501.
- Geiger, B., A. H. Dutton, K. T. Tokuyasu and S. J. Singer. 1981. "Immunoelectron microscope studies of membrane-microfilament interactions: distributions of alpha-actinin, tropomyosin, and vinculin in intestinal epithelial brush border and chicken gizzard smooth muscle cells." J Cell Biol **91**:614-628.
- Geiger, B., E. Schmid and W. W. Franke. 1983. "Spatial distribution of proteins specific for desmosomes and adherens junctions in epithelial cells demonstrated by double immunofluorescence microscopy." Differentiation **23**:189-205.
- Geiger, B., K. T. Tokuyasu and S. J. Singer. 1979. "Immunocytochemical localization of alpha-actinin in intestinal epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **76**:2833-2837.
- George, S. P., Y. Wang, S. Mathew, K. Srinivasan and S. Khurana. 2007. "Dimerization and actin-bundling properties of villin and its role in the assembly of epithelial cell brush borders." J Biol Chem **282**:26528-26541.
- Gibson, F., J. Walsh, P. Mburu, A. Varela, K. A. Brown, M. Antonio, K. W. Beisel, K. P. Steel and S. D. Brown. 1995. "A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1." Nature **374**:62-64.
- Giepmans, B. N. 2004. "Gap junctions and connexin-interacting proteins." Cardiovasc Res **62**:233-245.
- Giganti, A., J. Plastino, B. Janji, M. Van Troys, D. Lentz, C. Ampe, C. Sykes and E. Friederich. 2005. "Actin-filament cross-linking protein T-plastin increases Arp2/3-mediated actin-based movement." J Cell Sci **118**:1255-1265.
- Glenney, J. R., Jr. and P. Glenney. 1983. "Fodrin is the general spectrin-like protein found in most cells whereas spectrin and the TW protein have a restricted distribution." Cell **34**:503-512.
- Glenney, J. R., Jr., P. Glenney, M. Osborn and K. Weber. 1982a. "An F-actin- and calmodulin-binding protein from isolated intestinal brush borders has a morphology related to spectrin." Cell **28**:843-854.
- Glenney, J. R., Jr., P. Glenney and K. Weber. 1982b. "F-actin-binding and cross-linking properties of porcine brain fodrin, a spectrin-related molecule." J Biol Chem **257**:9781-9787.
- Glenney, J. R., Jr., P. Kaulfus, P. Matsudaira and K. Weber. 1981. "F-actin binding and bundling properties of fimbrin, a major cytoskeletal protein of microvillus core filaments." J Biol Chem **256**:9283-9288.
- Goldstein, D., J. Djeu, G. Latter, S. Burbeck and J. Leavitt. 1985. "Abundant synthesis of the transformation-induced protein of neoplastic human fibroblasts, plastin, in normal lymphocytes." Cancer Res **45**:5643-5647.
- Goode, B. L. and M. J. Eck. 2007. "Mechanism and function of formins in the control of actin assembly." Annu Rev Biochem **76**:593-627.
- Goodman, A., B. L. Goode, P. Matsudaira and G. R. Fink. 2003. "The *Saccharomyces cerevisiae* calponin/transgelin homolog Scp1 functions with fimbrin to regulate stability and organization of the actin cytoskeleton." Mol Biol Cell **14**:2617-2629.

- Gottlieb, T. A., I. E. Ivanov, M. Adesnik and D. D. Sabatini. 1993. "Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells." J Cell Biol **120**:695-710.
- Greaser, M. L. and J. Gergely. 1971. "Reconstitution of troponin activity from three protein components." J Biol Chem **246**:4226-4233.
- Green, K. J., B. Geiger, J. C. Jones, J. C. Talian and R. D. Goldman. 1987. "The relationship between intermediate filaments and microfilaments before and during the formation of desmosomes and adherens-type junctions in mouse epidermal keratinocytes." J Cell Biol **104**:1389-1402.
- Green, K. J., J. C. Talian and R. D. Goldman. 1986. "Relationship between intermediate filaments and microfilaments in cultured fibroblasts: evidence for common foci during cell spreading." Cell Motil Cytoskeleton **6**:406-418.
- Gunning, P. W., G. Schevzov, A. J. Kee and E. C. Hardeman. 2005. "Tropomyosin isoforms: divining rods for actin cytoskeleton function." Trends Cell Biol **15**:333-341.
- Hagen, S. J., C. H. Allan and J. S. Trier. 1987. "Demonstration of microtubules in the terminal web of mature absorptive cells from the small intestine of the rat." Cell Tissue Res **248**:709-711.
- Hall, P. A., P. J. Coates, B. Ansari and D. Hopwood. 1994. "Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis." J Cell Sci **107 ( Pt 12)**:3569-3577.
- Hanahan, D. 1983. "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol **166**:557-580.
- Hanein, D., N. Volkmann, S. Goldsmith, A. M. Michon, W. Lehman, R. Craig, D. DeRosier, S. Almo and P. Matsudaira. 1998. "An atomic model of fimbrin binding to F-actin and its implications for filament crosslinking and regulation." Nat Struct Biol **5**:787-792.
- Hanono, A., D. Garbett, D. Reczek, D. N. Chambers and A. Bretscher. 2006. "EPI64 regulates microvillar subdomains and structure." J Cell Biol **175**:803-813.
- Hasson, T. 2003. "Myosin VI: two distinct roles in endocytosis." J Cell Sci **116**:3453-3461.
- Hegan, P. S., V. Mermall, L. G. Tilney and M. S. Mooseker. 2007. "Roles for Drosophila melanogaster myosin IB in maintenance of enterocyte brush-border structure and resistance to the bacterial pathogen Pseudomonas entomophila." Mol Biol Cell **18**:4625-4636.
- Heintzelman, M. B., T. Hasson and M. S. Mooseker. 1994. "Multiple unconventional myosin domains of the intestinal brush border cytoskeleton." J Cell Sci **107 ( Pt 12)**:3535-3543.
- Heintzelman, M. B. and M. S. Mooseker. 1990. "Assembly of the brush border cytoskeleton: changes in the distribution of microvillar core proteins during enterocyte differentiation in adult chicken intestine." Cell Motil Cytoskeleton **15**:12-22.
- Heintzelman, M. B. and M. S. Mooseker. 1992. "Assembly of the intestinal brush border cytoskeleton." Curr Top Dev Biol **26**:93-122.
- Helfand, B. T., L. Chang and R. D. Goldman. 2004. "Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture." J Cell Sci **117**:133-141.
- Herman, I. M. and T. D. Pollard. 1981. "Electron microscopic localization of cytoplasmic myosin with ferritin-labeled antibodies." J Cell Biol **88**:346-351.
- Hesse, M., T. M. Magin and K. Weber. 2001. "Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18." J Cell Sci **114**:2569-2575.
- Hirokawa, N., R. E. Cheney and M. Willard. 1983. "Location of a protein of the fodrin-spectrin-TW260/240 family in the mouse intestinal brush border." Cell **32**:953-965.

- Hirokawa, N., L. G. Tilney, K. Fujiwara and J. E. Heuser. 1982. "Organization of actin, myosin, and intermediate filaments in the brush border of intestinal epithelial cells." J Cell Biol **94**:425-443.
- Hofer, D., T. Jons, J. Kraemer and D. Drenckhahn. 1998. "From cytoskeleton to polarity and chemoreception in the gut epithelium." Ann N Y Acad Sci **859**:75-84.
- Hofer, D., W. Ness and D. Drenckhahn. 1997. "Sorting of actin isoforms in chicken auditory hair cells." J Cell Sci **110 ( Pt 6)**:765-770.
- Hook, J., F. Lemckert, H. Qin, G. Schevzov and P. Gunning. 2004. "Gamma tropomyosin gene products are required for embryonic development." Mol Cell Biol **24**:2318-2323.
- Howe, C. L., M. S. Mooseker and T. A. Graves. 1980. "Brush-border calmodulin. A major component of the isolated microvillus core." J Cell Biol **85**:916-923.
- Hudspeth, A. J. and D. P. Corey. 1977. "Sensitivity, polarity, and conductance change in the response of vertebrate hair cells to controlled mechanical stimuli." Proc Natl Acad Sci U S A **74**:2407-2411.
- Hull, B. E. and L. A. Staehelin. 1979. "The terminal web. A reevaluation of its structure and function." J Cell Biol **81**:67-82.
- Jacob, R., M. Heine, M. Alfalah and H. Y. Naim. 2003. "Distinct cytoskeletal tracks direct individual vesicle populations to the apical membrane of epithelial cells." Curr Biol **13**:607-612.
- Jaisser, F., J. D. Horisberger and B. C. Rossier. 1993. "Primary sequence and functional expression of a novel beta subunit of the P-ATPase gene family." Pflugers Arch **425**:446-452.
- Janji, B., A. Giganti, V. De Corte, M. Catillon, E. Bruyneel, D. Lentz, J. Plastino, J. Gettemans and E. Friederich. 2006. "Phosphorylation on Ser5 increases the F-actin-binding activity of L-plastin and promotes its targeting to sites of actin assembly in cells." J Cell Sci **119**:1947-1960.
- Janmey, P. A. and T. P. Stossel. 1987. "Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate." Nature **325**:362-364.
- Kachar, B., W. E. Brownell, R. Altschuler and J. Fex. 1986. "Electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells." Nature **322**:365-368.
- Kapus, A. and K. Szaszi. 2006. "Coupling between apical and paracellular transport processes." Biochem Cell Biol **84**:870-880.
- Kedinger, M., I. Duluc, C. Fritsch, O. Lorentz, M. Plateroti and J. N. Freund. 1998a. "Intestinal epithelial-mesenchymal cell interactions." Ann N Y Acad Sci **859**:1-17.
- Kedinger, M., O. Lefebvre, I. Duluc, J. N. Freund and P. Simon-Assmann. 1998b. "Cellular and molecular partners involved in gut morphogenesis and differentiation." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **353**:847-856.
- Keep, N. H., S. J. Winder, C. A. Moores, S. Walke, F. L. Norwood and J. Kendrick-Jones. 1999. "Crystal structure of the actin-binding region of utrophin reveals a head-to-tail dimer." Structure **7**:1539-1546.
- Keller, T. C., 3rd, K. A. Conzelman, R. Chasan and M. S. Mooseker. 1985. "Role of myosin in terminal web contraction in isolated intestinal epithelial brush borders." J Cell Biol **100**:1647-1655.
- Keller, T. C., 3rd and M. S. Mooseker. 1982. "Ca<sup>++</sup>-calmodulin-dependent phosphorylation of myosin, and its role in brush border contraction in vitro." J Cell Biol **95**:943-959.
- Kelley, R. O. 1973. "An ultrastructural and cytochemical study of developing small intestine in man." J Embryol Exp Morphol **29**:411-430.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie. 1972. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**:239-257.
- Khurana, S. 2000. "Role of actin cytoskeleton in regulation of ion transport: examples from epithelial cells." J Membr Biol **178**:73-87.

- Khurana, S., M. Arpin, R. Patterson and M. Donowitz. 1997. "Ileal microvillar protein villin is tyrosine-phosphorylated and associates with PLC-gamma1. Role of cytoskeletal rearrangement in the carbachol-induced inhibition of ileal NaCl absorption." J Biol Chem **272**:30115-30121.
- Khurana, S. and S. P. George. 2008. "Regulation of cell structure and function by actin-binding proteins: Villin's perspective." FEBS Lett.
- Klein, M. G., W. Shi, U. Ramagopal, Y. Tseng, D. Wirtz, D. R. Kovar, C. J. Staiger and S. C. Almo. 2004. "Structure of the actin crosslinking core of fimbrin." Structure **12**:999-1013.
- Klinke, R. and S. Silbernagl. 1996. Lehrbuch der Physiologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Kobielak, A. and E. Fuchs. 2004. "Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics." Nat Rev Mol Cell Biol **5**:614-625.
- Kodama, A., I. Karakesisoglou, E. Wong, A. Vaezi and E. Fuchs. 2003. "ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics." Cell **115**:343-354.
- Kolega, J. 1998. "Cytoplasmic dynamics of myosin IIA and IIB: spatial 'sorting' of isoforms in locomoting cells." J Cell Sci **111 ( Pt 15)**:2085-2095.
- Korenbaum, E. and F. Rivero. 2002. "Calponin homology domains at a glance." J Cell Sci **115**:3543-3545.
- Korrapati, S., M. Zhu and K. Friderici (2007). Characterization and Expression of Cytoplasmic Actins (beta & gamma) in LLC-PK1-CL4 Cells to Elucidate the Role of gamma-actin Mutations Causing Non-syndromic Hearing Loss. American Society of Cell Biology (ASCB), Washington, D.C., Molecular Biology of the Cell.
- Kottke, M. D., E. Delva and A. P. Kowalczyk. 2006. "The desmosome: cell science lessons from human diseases." J Cell Sci **119**:797-806.
- Kovacs, M., F. Wang, A. Hu, Y. Zhang and J. R. Sellers. 2003. "Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle IIA isoform." J Biol Chem **278**:38132-38140.
- Kreft, J., J. A. Vazquez-Boland, S. Altmann, G. Dominguez-Bernal and W. Goebel. 2002. "Pathogenicity islands and other virulence elements in Listeria." Curr Top Microbiol Immunol **264**:109-125.
- Kreis, T. and R. Vale. 1999. Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins. New York, Oxford University Press, Inc.
- Krendel, M. and M. S. Mooseker. 2005. "Myosins: tails (and heads) of functional diversity." Physiology (Bethesda) **20**:239-251.
- Kubler, E. and H. Riezman. 1993. "Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast." Embo J **12**:2855-2862.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**:680-685.
- Laird, P. W., A. Zijderveld, K. Linders, M. A. Rudnicki, R. Jaenisch and A. Berns. 1991. "Simplified mammalian DNA isolation procedure." Nucleic Acids Res **19**:4293.
- Landsverk, M. L. and H. F. Epstein. 2005. "Genetic analysis of myosin II assembly and organization in model organisms." Cell Mol Life Sci **62**:2270-2282.
- Landsverk, T. 1998. Immune system. In: Textbook of veterinary histology. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins.
- Lanzetti, L. 2007. "Actin in membrane trafficking." Curr Opin Cell Biol **19**:453-458.
- Laukoetter, M. G., P. Nava, W. Y. Lee, E. A. Severson, C. T. Capaldo, B. A. Babbitt, I. R. Williams, M. Koval, E. Peatman, J. A. Campbell, T. S. Dermody, A. Nusrat and C. A. Parkos. 2007. "JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo." J Exp Med **204**:3067-3076.

- Lebart, M. C., F. Hubert, C. Boiteau, S. Venteo, C. Roustan and Y. Benyamin. 2004. "Biochemical characterization of the L-plastin-actin interaction shows a resemblance with that of alpha-actinin and allows a distinction to be made between the two actin-binding domains of the molecule." Biochemistry **43**:2428-2437.
- Lee, J. K., R. S. Coyne, R. R. Dubreuil, L. S. Goldstein and D. Branton. 1993. "Cell shape and interaction defects in alpha-spectrin mutants of *Drosophila melanogaster*." J Cell Biol **123**:1797-1809.
- Lehrach, H., D. Diamond, J. M. Wozney and H. Boedtke. 1977. "RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination." Biochemistry **16**:4743-4751.
- Lin, C. S., R. H. Aebersold, S. B. Kent, M. Varma and J. Leavitt. 1988. "Molecular cloning and characterization of plastin, a human leukocyte protein expressed in transformed human fibroblasts." Mol Cell Biol **8**:4659-4668.
- Lin, C. S., R. H. Aebersold and J. Leavitt. 1990. "Correction of the N-terminal sequences of the human plastin isoforms by using anchored polymerase chain reaction: identification of a potential calcium-binding domain." Mol Cell Biol **10**:1818-1821.
- Lin, C. S., Z. P. Chen, T. Park, K. Ghosh and J. Leavitt. 1993a. "Characterization of the human L-plastin gene promoter in normal and neoplastic cells." J Biol Chem **268**:2793-2801.
- Lin, C. S., A. Lau and T. F. Lue. 1998. "Analysis and mapping of plastin phosphorylation." DNA Cell Biol **17**:1041-1046.
- Lin, C. S., A. Lau, C. C. Yeh, C. H. Chang and T. F. Lue. 2000. "Upregulation of L-plastin gene by testosterone in breast and prostate cancer cells: identification of three cooperative androgen receptor-binding sequences." DNA Cell Biol **19**:1-7.
- Lin, C. S., T. Park, Z. P. Chen and J. Leavitt. 1993b. "Human plastin genes. Comparative gene structure, chromosome location, and differential expression in normal and neoplastic cells." J Biol Chem **268**:2781-2792.
- Lin, C. S., W. Shen, Z. P. Chen, Y. H. Tu and P. Matsudaira. 1994. "Identification of I-plastin, a human fimbrin isoform expressed in intestine and kidney." Mol Cell Biol **14**:2457-2467.
- Lin, H. W., M. E. Schneider and B. Kachar. 2005. "When size matters: the dynamic regulation of stereocilia lengths." Curr Opin Cell Biol **17**:55-61.
- Lin, J. J., K. S. Warren, D. D. Wamboldt, T. Wang and J. L. Lin. 1997. "Tropomyosin isoforms in nonmuscle cells." Int Rev Cytol **170**:1-38.
- Liu, J., D. W. Taylor and K. A. Taylor. 2004. "A 3-D reconstruction of smooth muscle alpha-actinin by CryoEm reveals two different conformations at the actin-binding region." J Mol Biol **338**:115-125.
- Lo, C. M., D. B. Buxton, G. C. Chua, M. Dembo, R. S. Adelstein and Y. L. Wang. 2004. "Nonmuscle myosin IIb is involved in the guidance of fibroblast migration." Mol Biol Cell **15**:982-989.
- Lollike, K., A. H. Johnsen, I. Durussel, N. Borregaard and J. A. Cox. 2001. "Biochemical characterization of the penta-EF-hand protein grancalcin and identification of L-plastin as a binding partner." J Biol Chem **276**:17762-17769.
- Loomis, P. A., L. Zheng, G. Sekerkova, B. Changyaleket, E. Mugnaini and J. R. Bartles. 2003. "Espin cross-links cause the elongation of microvillus-type parallel actin bundles in vivo." J Cell Biol **163**:1045-1055.
- Lottspeich, F. and H. Zorbas. 1998. "Bioanalytik." Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**:265-275.
- Lüllmann-Rauch. 2003. Histologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

- MacQueen, A. J., J. J. Baggett, N. Perumov, R. A. Bauer, T. Januszewski, L. Schriefer and J. A. Waddle. 2005. "ACT-5 is an essential *Caenorhabditis elegans* actin required for intestinal microvilli formation." Mol Biol Cell **16**:3247-3259.
- Madara, J. L. 1987. "Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton." Am J Physiol **253**:C171-175.
- Madara, J. L. 1989. "Loosening tight junctions. Lessons from the intestine." J Clin Invest **83**:1089-1094.
- Madara, J. L. 1990. "Maintenance of the macromolecular barrier at cell extrusion sites in intestinal epithelium: physiological rearrangement of tight junctions." J Membr Biol **116**:177-184.
- Majno, G. and I. Joris. 1995. "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." Am J Pathol **146**:3-15.
- Mamajiwalla, S. N., K. R. Fath and D. R. Burgess. 1992. "Development of the chicken intestinal epithelium." Curr Top Dev Biol **26**:123-143.
- Mammen, J. M. and J. B. Matthews. 2003. "Mucosal repair in the gastrointestinal tract." Crit Care Med **31**:S532-537.
- Marks, P. W., M. Arai, J. L. Bandura and D. J. Kwiatkowski. 1998. "Advillin (p92): a new member of the gelsolin/villin family of actin regulatory proteins." J Cell Sci **111** (Pt 15):2129-2136.
- Marshman, E., C. Booth and C. S. Potten. 2002. "The intestinal epithelial stem cell." Bioessays **24**:91-98.
- Martin, T. A., G. Harrison, R. E. Mansel and W. G. Jiang. 2003. "The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis." Crit Rev Oncol Hematol **46**:165-186.
- Mashimo, H., D. C. Wu, D. K. Podolsky and M. C. Fishman. 1996. "Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor." Science **274**:262-265.
- Mathan, M., P. C. Moxey and J. S. Trier. 1976. "Morphogenesis of fetal rat duodenal villi." Am J Anat **146**:73-92.
- Matsudaira, P., E. Mandelkow, W. Renner, L. K. Hesterberg and K. Weber. 1983. "Role of fimbrin and villin in determining the interfilament distances of actin bundles." Nature **301**:209-214.
- Matsudaira, P. T. and D. R. Burgess. 1979. "Identification and organization of the components in the isolated microvillus cytoskeleton." J Cell Biol **83**:667-673.
- Matsudaira, P. T. and D. R. Burgess. 1982. "Structure and function of the brush-border cytoskeleton." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **46 Pt 2**:845-854.
- Mayhew, T. M., R. Myklebust, A. Whybrow and R. Jenkins. 1999. "Epithelial integrity, cell death and cell loss in mammalian small intestine." Histol Histopathol **14**:257-267.
- McConnell, R. E. and M. J. Tyska. 2007. "Myosin-1a powers the sliding of apical membrane along microvillar actin bundles." J Cell Biol **177**:671-681.
- Meng, J., D. Vardar, Y. Wang, H. C. Guo, J. F. Head and C. J. McKnight. 2005. "High-resolution crystal structures of villin headpiece and mutants with reduced F-actin binding activity." Biochemistry **44**:11963-11973.
- Menge, H. and J. W. Robinson. 1978. "The relationship between the functional and structural alterations in the rat small intestine following proximal resection of varying extents." Res Exp Med (Berl) **173**:41-53.
- Miller, D. L., W. Hanson, H. P. Schedl and J. W. Osborne. 1977. "Proliferation rate and transit time of mucosal cells in small intestine of the diabetic rat." Gastroenterology **73**:1326-1332.
- Mogensen, M. M., J. B. Tucker and H. Stebbings. 1989. "Microtubule polarities indicate that nucleation and capture of microtubules occurs at cell surfaces in *Drosophila*." J Cell Biol **108**:1445-1452.
- Mogilner, A. and B. Rubinstein. 2005. "The physics of filopodial protrusion." Biophys J **89**:782-795.

- Moll, R., W. W. Franke, D. L. Schiller, B. Geiger and R. Krepler. 1982. "The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells." Cell **31**:11-24.
- Moore, R., S. Carlson and J. L. Madara. 1989. "Villus contraction aids repair of intestinal epithelium after injury." Am J Physiol **257**:G274-283.
- Mooseker, M. S. 1985. "Organization, chemistry, and assembly of the cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border." Annu Rev Cell Biol **1**:209-241.
- Mooseker, M. S., E. M. Bonder, K. A. Conzelman, D. J. Fishkind, C. L. Howe and T. C. Keller, 3rd. 1984. "Brush border cytoskeleton and integration of cellular functions." J Cell Biol **99**:104s-112s.
- Mooseker, M. S., T. D. Pollard and K. Fujiwara. 1978. "Characterization and localization of myosin in the brush border of intestinal epithelial cells." J Cell Biol **79**:444-453.
- Mooseker, M. S. and L. G. Tilney. 1975. "Organization of an actin filament-membrane complex. Filament polarity and membrane attachment in the microvilli of intestinal epithelial cells." J Cell Biol **67**:725-743.
- Morris, S. M., S. D. Arden, R. C. Roberts, J. Kendrick-Jones, J. A. Cooper, J. P. Luzio and F. Buss. 2002. "Myosin VI binds to and localises with Dab2, potentially linking receptor-mediated endocytosis and the actin cytoskeleton." Traffic **3**:331-341.
- Moxey, P. C. and J. S. Trier. 1979. "Development of villus absorptive cells in the human fetal small intestine: a morphological and morphometric study." Anat Rec **195**:463-482.
- Mühlhardt, C. 2000. "Der Experimentator: Molekularbiologie." Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg.
- Musch, A. 2004. "Microtubule organization and function in epithelial cells." Traffic **5**:1-9.
- Namba, Y., M. Ito, Y. Zu, K. Shigesada and K. Maruyama. 1992. "Human T cell L-plastin bundles actin filaments in a calcium-dependent manner." J Biochem **112**:503-507.
- Noda, T., R. Iwakiri, K. Fujimoto, S. Matsuo and T. Y. Aw. 1998. "Programmed cell death induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa." Am J Physiol **274**:G270-276.
- Norwood, F. L., A. J. Sutherland-Smith, N. H. Keep and J. Kendrick-Jones. 2000. "The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy." Structure **8**:481-491.
- Nusrat, A., J. R. Turner and J. L. Madara. 2000. "Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **279**:G851-857.
- Oriolo, A. S., F. A. Wald, G. Canessa and P. J. Salas. 2007a. "GCP6 binds to intermediate filaments: a novel function of keratins in the organization of microtubules in epithelial cells." Mol Biol Cell **18**:781-794.
- Oriolo, A. S., F. A. Wald, V. P. Ramsauer and P. J. Salas. 2007b. "Intermediate filaments: a role in epithelial polarity." Exp Cell Res **313**:2255-2264.
- Otey, C. A. and O. Carpen. 2004. "Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player." Cell Motil Cytoskeleton **58**:104-111.
- Owens, D. W. and E. B. Lane. 2004. "Keratin mutations and intestinal pathology." J Pathol **204**:377-385.
- Owens, D. W., N. J. Wilson, A. J. Hill, E. L. Rugg, R. M. Porter, A. M. Hutcheson, R. A. Quinlan, D. van Heel, M. Parkes, D. P. Jewell, S. S. Campbell, S. Ghosh, J. Satsangi and E. B. Lane. 2004. "Human keratin 8 mutations that disturb filament assembly observed in inflammatory bowel disease patients." J Cell Sci **117**:1989-1999.

- Pak, C. W., K. C. Flynn and J. R. Bamberg. 2008. "Actin-binding proteins take the reins in growth cones." Nat Rev Neurosci **9**:136-147.
- Pakkanen, R., C. H. von Bonsdorff, O. Turunen, T. Wahlstrom and A. Vaheri. 1988. "Redistribution of Mr 75,000 plasma membrane protein, cytovillin, into newly formed microvilli in herpes simplex and Semliki Forest virus infected human embryonal fibroblasts." Eur J Cell Biol **46**:435-443.
- Papakonstanti, E. A. and C. Stournaras. 2008. "Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton." FEBS Lett.
- Percival, J. M., G. Thomas, T. A. Cock, E. M. Gardiner, P. L. Jeffrey, J. J. Lin, R. P. Weinberger and P. Gunning. 2000. "Sorting of tropomyosin isoforms in synchronised NIH 3T3 fibroblasts: evidence for distinct microfilament populations." Cell Motil Cytoskeleton **47**:189-208.
- Peterson, M. D., W. M. Bement and M. S. Mooseker. 1993. "An in vitro model for the analysis of intestinal brush border assembly. II. Changes in expression and localization of brush border proteins during cell contact-induced brush border assembly in Caco-2BBE cells." J Cell Sci **105 ( Pt 2)**:461-472.
- Peterson, M. D. and M. S. Mooseker. 1993. "An in vitro model for the analysis of intestinal brush border assembly. I. Ultrastructural analysis of cell contact-induced brush border assembly in Caco-2BBE cells." J Cell Sci **105 ( Pt 2)**:445-460.
- Phillips, G. N., Jr., J. P. Fillers and C. Cohen. 1986. "Tropomyosin crystal structure and muscle regulation." J Mol Biol **192**:111-131.
- Phillips, G. N., Jr., E. E. Lattman, P. Cummins, K. Y. Lee and C. Cohen. 1979. "Crystal structure and molecular interactions of tropomyosin." Nature **278**:413-417.
- Phillips, M. D. and G. H. Thomas. 2006. "Brush border spectrin is required for early endosome recycling in Drosophila." J Cell Sci **119**:1361-1370.
- Phillips, M. J., T. Azuma, S. L. Meredith, J. A. Squire, C. A. Ackerley, F. G. Pluthero, E. A. Roberts, R. A. Superina, G. A. Levy and P. A. Marsden. 2003. "Abnormalities in villin gene expression and canalicular microvillus structure in progressive cholestatic liver disease of childhood." Lancet **362**:1112-1119.
- Pikzack, C., J. Prassler, R. Furukawa, M. Fechheimer and F. Rivero. 2005. "Role of calcium-dependent actin-bundling proteins: characterization of Dictyostelium mutants lacking fimbrin and the 34-kilodalton protein." Cell Motil Cytoskeleton **62**:210-231.
- Pinson, K. I., L. Dunbar, L. Samuelson and D. L. Gumucio. 1998. "Targeted disruption of the mouse villin gene does not impair the morphogenesis of microvilli." Dev Dyn **211**:109-121.
- Pittenger, M. F., J. A. Kazzaz and D. M. Helfman. 1994. "Functional properties of non-muscle tropomyosin isoforms." Curr Opin Cell Biol **6**:96-104.
- Podolsky, D. K. 1993. "Regulation of intestinal epithelial proliferation: a few answers, many questions." Am J Physiol **264**:G179-186.
- Potten, C. S. 1997. "Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis." Am J Physiol **273**:G253-257.
- Potten, C. S. and C. Booth. 1997. "The role of radiation-induced and spontaneous apoptosis in the homeostasis of the gastrointestinal epithelium: a brief review." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **118**:473-478.
- Prevost, M. C., M. Lesourd, M. Arpin, F. Vernel, J. Mounier, R. Hellio and P. J. Sansonetti. 1992. "Unipolar reorganization of F-actin layer at bacterial division and bundling of actin filaments by platin correlate with movement of Shigella flexneri within HeLa cells." Infect Immun **60**:4088-4099.
- Prost, J., C. Barbetta and J. F. Joanny. 2007. "Dynamical control of the shape and size of stereocilia and microvilli." Biophys J **93**:1124-1133.
- Qualmann, B., M. M. Kessels and R. B. Kelly. 2000. "Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton." J Cell Biol **150**:F111-116.

- Quaroni, A., D. Calnek, E. Quaroni and J. S. Chandler. 1991. "Keratin expression in rat intestinal crypt and villus cells. Analysis with a panel of monoclonal antibodies." J Biol Chem **266**:11923-11931.
- Quaroni, A. and K. J. Isselbacher. 1985. "Study of intestinal cell differentiation with monoclonal antibodies to intestinal cell surface components." Dev Biol **111**:267-279.
- Rehm, H. 2000. "Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics." Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg **3. Auflage**.
- Rethinasamy, P., M. Muthuchamy, T. Hewett, G. Boivin, B. M. Wolska, C. Evans, R. J. Solaro and D. F. Wieczorek. 1998. "Molecular and physiological effects of alpha-tropomyosin ablation in the mouse." Circ Res **82**:116-123.
- Revenu, C., R. Athman, S. Robine and D. Louvard. 2004. "The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals." Nat Rev Mol Cell Biol **5**:635-646.
- Revenu, C., M. Courtois, A. Michelot, C. Sykes, D. Louvard and S. Robine. 2007. "Villin severing activity enhances actin-based motility in vivo." Mol Biol Cell **18**:827-838.
- Reya, T. and H. Clevers. 2005. "Wnt signalling in stem cells and cancer." Nature **434**:843-850.
- Rimm, D. L., E. R. Koslov, P. Kebriaei, C. D. Cianci and J. S. Morrow. 1995. "Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex." Proc Natl Acad Sci U S A **92**:8813-8817.
- Rivero, F., R. Furukawa, M. Fechheimer and A. A. Noegel. 1999. "Three actin cross-linking proteins, the 34 kDa actin-bundling protein, alpha-actinin and gelation factor (ABP-120), have both unique and redundant roles in the growth and development of Dictyostelium." J Cell Sci **112 ( Pt 16)**:2737-2751.
- Rivero, F., B. Koppel, B. Peracino, S. Bozzaro, F. Siegert, C. J. Weijer, M. Schleicher, R. Albrecht and A. A. Noegel. 1996. "The role of the cortical cytoskeleton: F-actin crosslinking proteins protect against osmotic stress, ensure cell size, cell shape and motility, and contribute to phagocytosis and development." J Cell Sci **109 ( Pt 11)**:2679-2691.
- Roberts, W. M., J. Howard and A. J. Hudspeth. 1988. "Hair cells: transduction, tuning, and transmission in the inner ear." Annu Rev Cell Biol **4**:63-92.
- Rodewald, R., S. B. Newman and M. J. Karnovsky. 1976. "Contraction of isolated brush borders from the intestinal epithelium." J Cell Biol **70**:541-554.
- Rosenfeld, S. S., J. Xing, L. Q. Chen and H. L. Sweeney. 2003. "Myosin IIb is unconventionally conventional." J Biol Chem **278**:27449-27455.
- Ross, M. H., I. K. Gordon and P. Wojciech. 2003. Histology, A Text and Atlas, With cell and molecular biology. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins.
- Rotter, B., O. Bournier, G. Nicolas, D. Dhemy and M. C. Lecomte. 2005. "Alphal-spectrin interacts with Tes and EVL, two actin-binding proteins located at cell contacts." Biochem J **388**:631-638.
- Rzadzinska, A., M. Schneider, K. Noben-Trauth, J. R. Bartles and B. Kachar. 2005. "Balanced levels of Espin are critical for stereociliary growth and length maintenance." Cell Motil Cytoskeleton **62**:157-165.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich. 1988. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**:487-491.
- Salas, P. J. 1999. "Insoluble gamma-tubulin-containing structures are anchored to the apical network of intermediate filaments in polarized CACO-2 epithelial cells." J Cell Biol **146**:645-658.
- Salas, P. J., M. L. Rodriguez, A. L. Viciano, D. E. Vega-Salas and H. P. Hauri. 1997. "The apical submembrane cytoskeleton participates in the organization of the apical pole in epithelial cells." J Cell Biol **137**:359-375.
- Sambrook, J., J. David and W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual.

- Sandoz, D., M. C. Laine and G. Nicolas. 1986. "Distribution of microtubules within the intestinal terminal web as revealed by quick-freezing and cryosubstitution." Eur J Cell Biol **39**:481-484.
- Saotome, I., M. Curto and A. I. McClatchey. 2004. "Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine." Dev Cell **6**:855-864.
- Sawtell, N. M., A. L. Hartman and J. L. Lessard. 1988. "Unique isoactins in the brush border of rat intestinal epithelial cells." Cell Motil Cytoskeleton **11**:318-325.
- Schliwa, M. 1999. "Myosin steps backwards." Nature **401**:431-432.
- Schott, D. H., R. N. Collins and A. Bretscher. 2002. "Secretory vesicle transport velocity in living cells depends on the myosin-V lever arm length." J Cell Biol **156**:35-39.
- Schwarze, L. 1962. Kompendium der Veterinär- Anatomie, Band II- Eingeweidesystem. Jena, VEB Gustav Fischer Verlag.
- Schweizer, J., P. E. Bowden, P. A. Coulombe, L. Langbein, E. B. Lane, T. M. Magin, L. Maltais, M. B. Omary, D. A. Parry, M. A. Rogers and M. W. Wright. 2006. "New consensus nomenclature for mammalian keratins." J Cell Biol **174**:169-174.
- Seifert, G. J., D. Lawson and G. Wiche. 1992. "Immunolocalization of the intermediate filament-associated protein plectin at focal contacts and actin stress fibers." Eur J Cell Biol **59**:138-147.
- Sekerkova, G., D. Freeman, E. Mugnaini and J. R. Bartles. 2005. "Espin cytoskeletal proteins in the sensory cells of rodent taste buds." J Neurocytol **34**:171-182.
- Sekerkova, G., L. Zheng, P. A. Loomis, B. Changyaleket, D. S. Whitlon, E. Mugnaini and J. R. Bartles. 2004. "Espins are multifunctional actin cytoskeletal regulatory proteins in the microvilli of chemosensory and mechanosensory cells." J Neurosci **24**:5445-5456.
- Sekerkova, G., L. Zheng, P. A. Loomis, E. Mugnaini and J. R. Bartles. 2006a. "Espins and the actin cytoskeleton of hair cell stereocilia and sensory cell microvilli." Cell Mol Life Sci **63**:2329-2341.
- Sekerkova, G., L. Zheng, E. Mugnaini and J. R. Bartles. 2006b. "Differential expression of espin isoforms during epithelial morphogenesis, stereociliogenesis and postnatal maturation in the developing inner ear." Dev Biol **291**:83-95.
- Self, T., T. Sobe, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, K. B. Avraham and K. P. Steel. 1999. "Role of myosin VI in the differentiation of cochlear hair cells." Dev Biol **214**:331-341.
- Semenza, G. 1987. "Glycosidases." Mammalian ectoenzymes, Elsevier, Amsterdam:265-287.
- Semenza, G. and S. Auricchio. 1989. "Small-Intestinal Disaccharidases." The metabolic basis of inherited diseases, Mc Graw-Hill, New York:2975-2997.
- Shinomiya, H., A. Hagi, M. Fukuzumi, M. Mizobuchi, H. Hirata and S. Utsumi. 1995. "Complete primary structure and phosphorylation site of the 65-kDa macrophage protein phosphorylated by stimulation with bacterial lipopolysaccharide." J Immunol **154**:3471-3478.
- Shohet, R. V., M. A. Conti, S. Kawamoto, Y. A. Preston, D. A. Brill and R. S. Adelstein. 1989. "Cloning of the cDNA encoding the myosin heavy chain of a vertebrate cellular myosin." Proc Natl Acad Sci U S A **86**:7726-7730.
- Siddique, M. S., G. Mogami, T. Miyazaki, E. Katayama, T. Q. Uyeda and M. Suzuki. 2005. "Cooperative structural change of actin filaments interacting with activated myosin motor domain, detected with copolymers of pyrene-labeled actin and acto-S1 chimera protein." Biochem Biophys Res Commun **337**:1185-1191.
- Sjostrom, H., O. Noren, L. Christiansen, H. Wacker and G. Semenza. 1980. "A fully active, two-active-site, single-chain sucrase.isomaltase from pig small intestine. Implications for the biosynthesis of a mammalian integral stalked membrane protein." J Biol Chem **255**:11332-11338.

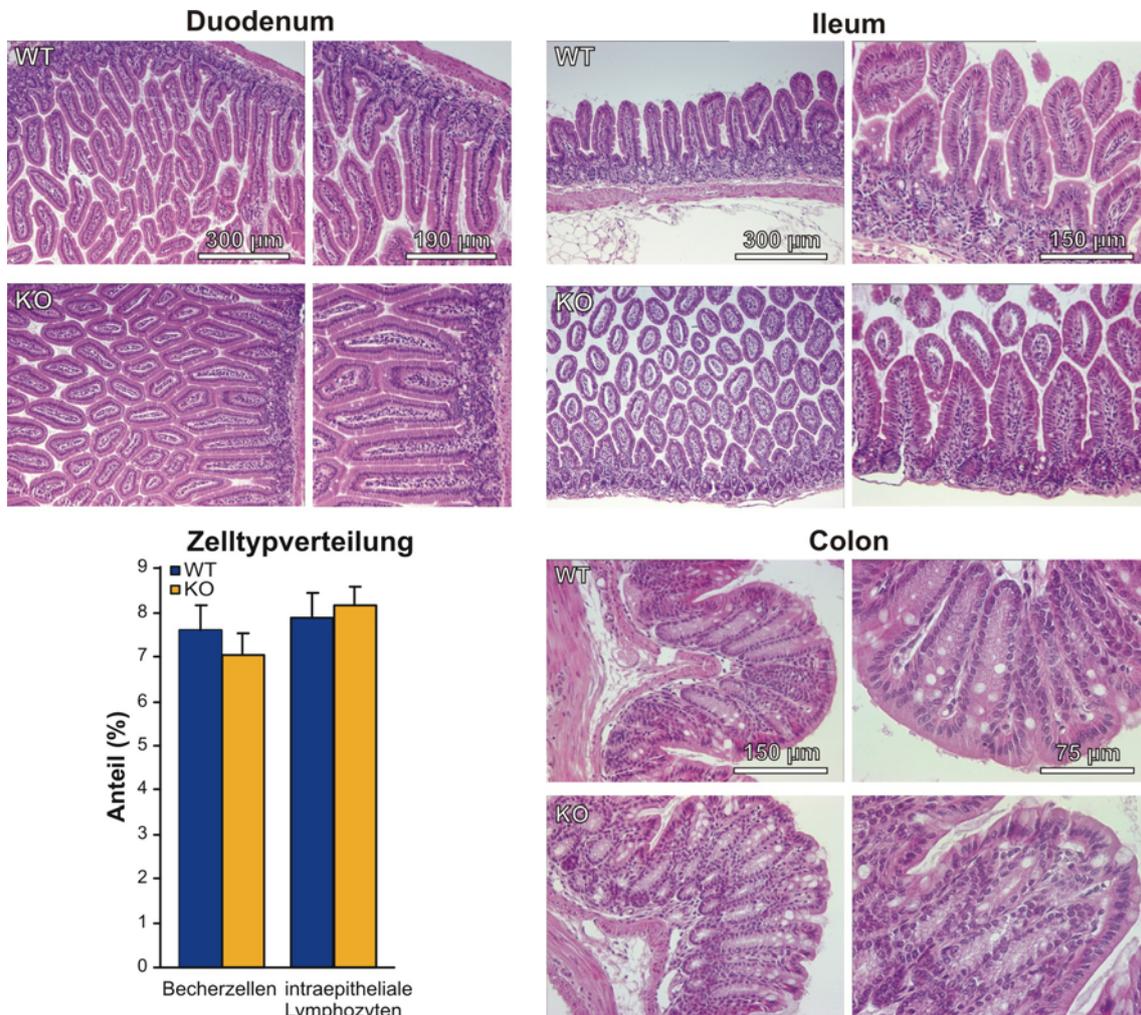
- Skowron, J. F., W. M. Bement and M. S. Mooseker. 1998. "Human brush border myosin-I and myosin-Ic expression in human intestine and Caco-2BBE cells." Cell Motil Cytoskeleton **41**:308-324.
- Slepnev, V. I. and P. De Camilli. 2000. "Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis." Nat Rev Neurosci **1**:161-172.
- Sonnenberg, A. and R. K. Liem. 2007. "Plakins in development and disease." Exp Cell Res **313**:2189-2203.
- Southern, E. M. 1975. "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." J Mol Biol **98**:503-517.
- Stone, M. R., A. O'Neill, D. Catino and R. J. Bloch. 2005. "Specific interaction of the actin-binding domain of dystrophin with intermediate filaments containing keratin 19." Mol Biol Cell **16**:4280-4293.
- Stone, M. R., A. O'Neill, R. M. Lovering, J. Strong, W. G. Resneck, P. W. Reed, D. M. Toivola, J. A. Ursitti, M. B. Omary and R. J. Bloch. 2007. "Absence of keratin 19 in mice causes skeletal myopathy with mitochondrial and sarcolemmal reorganization." J Cell Sci **120**:3999-4008.
- Stossel, T. P., J. Condeelis, L. Cooley, J. H. Hartwig, A. Noegel, M. Schleicher and S. S. Shapiro. 2001. "Filamins as integrators of cell mechanics and signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **2**:138-145.
- Studier, F. W. and B. A. Moffatt. 1986. "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J Mol Biol **189**:113-130.
- Svitkina, T. M., A. B. Verkhovsky and G. G. Borisy. 1996. "Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton." J Cell Biol **135**:991-1007.
- Takemura, R., T. Masaki and N. Hirokawa. 1988. "Developmental organization of the intestinal brush-border cytoskeleton." Cell Motil Cytoskeleton **9**:299-311.
- Takeuchi, K., N. Sato, H. Kasahara, N. Funayama, A. Nagafuchi, S. Yonemura and S. Tsukita. 1994. "Perturbation of cell adhesion and microvilli formation by antisense oligonucleotides to ERM family members." J Cell Biol **125**:1371-1384.
- Tamai, Y., T. Ishikawa, M. R. Bosl, M. Mori, M. Nozaki, H. Baribault, R. G. Oshima and M. M. Taketo. 2000. "Cytokeratins 8 and 19 in the mouse placental development." J Cell Biol **151**:563-572.
- Tilney, L. G., P. S. Connelly, L. Ruggiero, K. A. Vranich and G. M. Guild. 2003. "Actin filament turnover regulated by cross-linking accounts for the size, shape, location, and number of actin bundles in *Drosophila* bristles." Mol Biol Cell **14**:3953-3966.
- Tilney, L. G., P. S. Connelly, K. A. Vranich, M. K. Shaw and G. M. Guild. 1998. "Why are two different cross-linkers necessary for actin bundle formation in vivo and what does each cross-link contribute?" J Cell Biol **143**:121-133.
- Tilney, L. G., M. S. Tilney and D. J. DeRosier. 1992. "Actin filaments, stereocilia, and hair cells: how cells count and measure." Annu Rev Cell Biol **8**:257-274.
- Tilney, L. G., M. S. Tilney and G. M. Guild. 1995. "F actin bundles in *Drosophila* bristles. I. Two filament cross-links are involved in bundling." J Cell Biol **130**:629-638.
- Tilney, M. S., L. G. Tilney, R. E. Stephens, C. Merte, D. Drenckhahn, D. A. Cotanche and A. Bretscher. 1989. "Preliminary biochemical characterization of the stereocilia and cuticular plate of hair cells of the chick cochlea." J Cell Biol **109**:1711-1723.
- Toivola, D. M., H. Baribault, T. Magin, S. A. Michie and M. B. Omary. 2000. "Simple epithelial keratins are dispensable for cytoprotection in two pancreatitis models." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **279**:G1343-1354.
- Toivola, D. M., S. Krishnan, H. J. Binder, S. K. Singh and M. B. Omary. 2004. "Keratins modulate colonocyte electrolyte transport via protein mistargeting." J Cell Biol **164**:911-921.

- Tosco, A., R. A. Siciliano, G. Cacace, M. F. Mazzeo, R. Capone, A. Malorni, A. Leone and L. Marzullo. 2005. "Dietary effects of copper and iron deficiency on rat intestine: a differential display proteome analysis." J Proteome Res **4**:1781-1788.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**:4350-4354.
- Trier, J. S. 1963. "Studies on Small Intestinal Crypt Epithelium. I. The Fine Structure of the Crypt Epithelium of the Proximal Small Intestine of Fasting Humans." J Cell Biol **18**:599-620.
- Tseng, Y., K. M. An, O. Esue and D. Wirtz. 2004. "The bimodal role of filamin in controlling the architecture and mechanics of F-actin networks." J Biol Chem **279**:1819-1826.
- Tumer, Z., P. J. Croucher, L. R. Jensen, J. Hampe, C. Hansen, V. Kalscheuer, H. H. Ropers, N. Tommerup and S. Schreiber. 2002. "Genomic structure, chromosome mapping and expression analysis of the human AVIL gene, and its exclusion as a candidate for locus for inflammatory bowel disease at 12q13-14 (IBD2)." Gene **288**:179-185.
- Tutton, P. J. 1973. "Variations in crypt cell cycle time and mitotic time in the small intestine of the rat." Virchows Arch B Cell Pathol **13**:68-78.
- Tuxworth, R. I. and M. A. Titus. 2000. "Unconventional myosins: anchors in the membrane traffic relay." Traffic **1**:11-18.
- Tyska, M. J., A. T. Mackey, J. D. Huang, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and M. S. Mooseker. 2005. "Myosin-1a is critical for normal brush border structure and composition." Mol Biol Cell **16**:2443-2457.
- Tyska, M. J. and M. S. Mooseker. 2004. "A role for myosin-1A in the localization of a brush border disaccharidase." J Cell Biol **165**:395-405.
- Utech, M., A. I. Ivanov, S. N. Samarin, M. Bruewer, J. R. Turner, R. J. Mrsny, C. A. Parkos and A. Nusrat. 2005. "Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane." Mol Biol Cell **16**:5040-5052.
- Utermohlen, O., U. Karow, J. Lohler and M. Kronke. 2003. "Severe impairment in early host defense against *Listeria monocytogenes* in mice deficient in acid sphingomyelinase." J Immunol **170**:2621-2628.
- van der Flier, A. and A. Sonnenberg. 2001. "Structural and functional aspects of filamins." Biochim Biophys Acta **1538**:99-117.
- Van Furden, D., K. Johnson, C. Segbert and O. Bossinger. 2004. "The *C. elegans* ezrin-radixin-moesin protein ERM-1 is necessary for apical junction remodelling and tubulogenesis in the intestine." Dev Biol **272**:262-276.
- Van Itallie, C. M. and J. M. Anderson. 2004. "The molecular physiology of tight junction pores." Physiology (Bethesda) **19**:331-338.
- van Wijk, E., R. J. Pennings, H. te Brinke, A. Claassen, H. G. Yntema, L. H. Hoefsloot, F. P. Cremers, C. W. Cremers and H. Kremer. 2004. "Identification of 51 novel exons of the Usher syndrome type 2A (USH2A) gene that encode multiple conserved functional domains and that are mutated in patients with Usher syndrome type II." Am J Hum Genet **74**:738-744.
- Vandekerckhove, J. and K. Weber. 1978. "Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins." Proc Natl Acad Sci U S A **75**:1106-1110.
- Vandekerckhove, J. and K. Weber. 1981. "Actin typing on total cellular extracts: a highly sensitive protein-chemical procedure able to distinguish different actins." Eur J Biochem **113**:595-603.

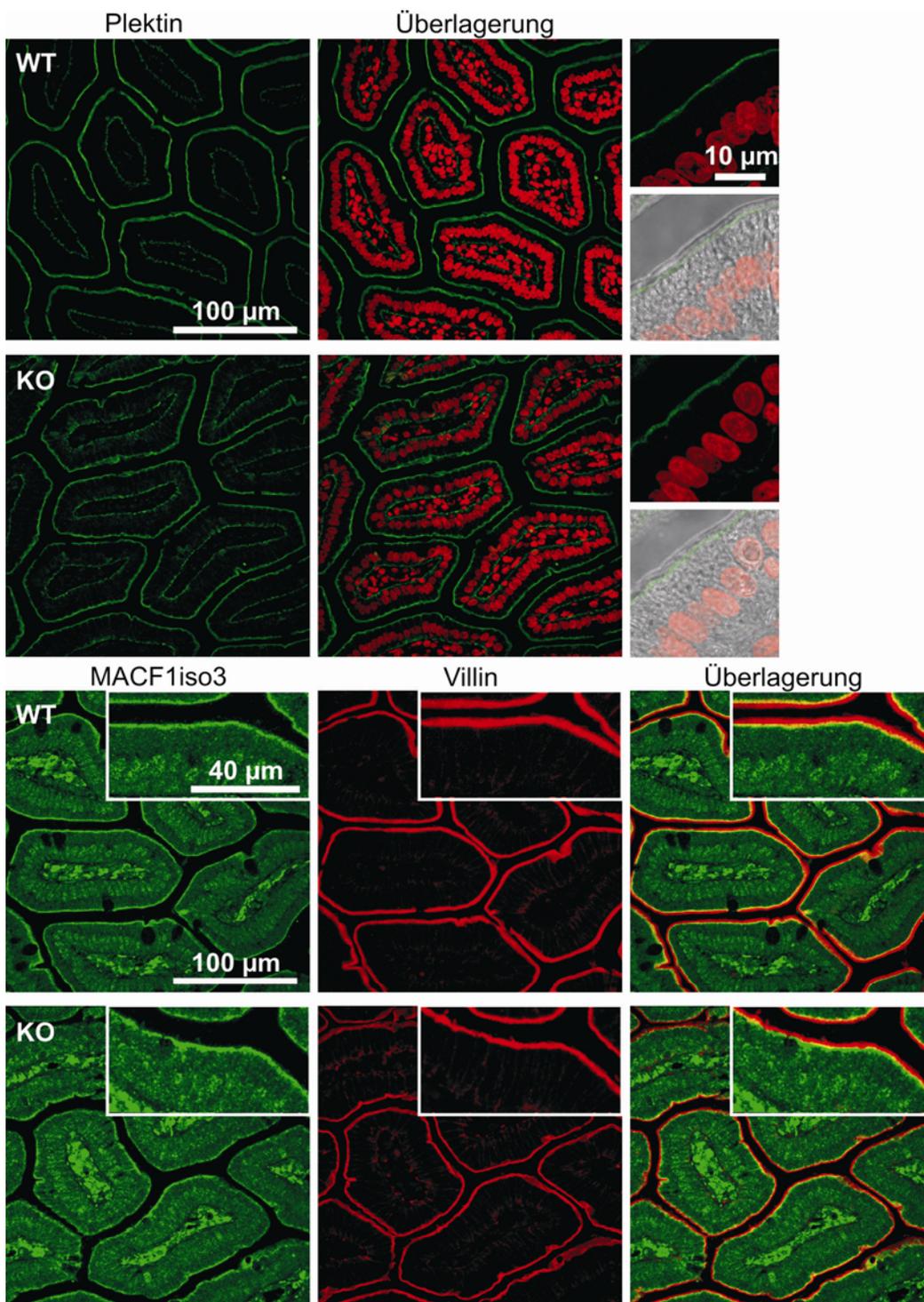
- Vermeulen, W., P. Vanhaesebrouck, M. Van Troys, M. Verschueren, F. Fant, M. Goethals, C. Ampe, J. C. Martins and F. A. Borremans. 2004. "Solution structures of the C-terminal headpiece subdomains of human villin and advillin, evaluation of headpiece F-actin-binding requirements." Protein Sci **13**:1276-1287.
- Vicente-Manzanares, M., J. Zareno, L. Whitmore, C. K. Choi and A. F. Horwitz. 2007. "Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells." J Cell Biol **176**:573-580.
- Volkman, N., D. DeRosier, P. Matsudaira and D. Hanein. 2001. "An atomic model of actin filaments cross-linked by fimbrin and its implications for bundle assembly and function." J Cell Biol **153**:947-956.
- Wade, R. H. and A. A. Hyman. 1997. "Microtubule structure and dynamics." Curr Opin Cell Biol **9**:12-17.
- Wald, F. A., A. S. Oriolo, M. L. Casanova and P. J. Salas. 2005. "Intermediate filaments interact with dormant ezrin in intestinal epithelial cells." Mol Biol Cell **16**:4096-4107.
- Wang, F., M. Kovacs, A. Hu, J. Limouze, E. V. Harvey and J. R. Sellers. 2003. "Kinetic mechanism of non-muscle myosin IIB: functional adaptations for tension generation and maintenance." J Biol Chem **278**:27439-27448.
- Wang, J. and E. J. Brown. 1999. "Immune complex-induced integrin activation and L-plastin phosphorylation require protein kinase A." J Biol Chem **274**:24349-24356.
- Wang, Y., K. Srinivasan, M. R. Siddiqui, S. P. George, A. Tomar and S. Khurana. 2008. "A novel role for villin in intestinal epithelial cell survival and homeostasis." J Biol Chem.
- Weber, K. L. and W. M. Bement. 2002. "F-actin serves as a template for cytokeratin organization in cell free extracts." J Cell Sci **115**:1373-1382.
- Weil, D., S. Blanchard, J. Kaplan, P. Guilford, F. Gibson, J. Walsh, P. Mburu, A. Varela, J. Levilliers, M. D. Weston and et al. 1995. "Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B." Nature **374**:60-61.
- Weiser, M. M. 1973. "Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis. I. An indicator of cellular differentiation." J Biol Chem **248**:2536-2541.
- Wells, A. L., A. W. Lin, L. Q. Chen, D. Safer, S. M. Cain, T. Hasson, B. O. Carragher, R. A. Milligan and H. L. Sweeney. 1999. "Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards." Nature **401**:505-508.
- Welsch, U. 2005. SOBOTTA Atlas Histologie. München, Elsevier GmbH.
- Wiche, G., R. Krepler, U. Artlieb, R. Pytela and H. Denk. 1983. "Occurrence and immunolocalization of plectin in tissues." J Cell Biol **97**:887-901.
- Williams, J. A., B. MacIver, E. A. Klipfell and G. H. Thomas. 2004. "The C-terminal domain of Drosophila (beta) heavy-spectrin exhibits autonomous membrane association and modulates membrane area." J Cell Sci **117**:771-782.
- Williams, S. T., A. N. Smith, C. D. Cianci, J. S. Morrow and T. L. Brown. 2003. "Identification of the primary caspase 3 cleavage site in alpha II-spectrin during apoptosis." Apoptosis **8**:353-361.
- Winkelmann, J. C. and B. G. Forget. 1993. "Erythroid and nonerythroid spectrins." Blood **81**:3173-3185.
- Wong, W. M. and N. A. Wright. 1999. "Cell proliferation in gastrointestinal mucosa." J Clin Pathol **52**:321-333.
- Wu, J. Q., J. Bahler and J. R. Pringle. 2001. "Roles of a fimbrin and an alpha-actinin-like protein in fission yeast cell polarization and cytokinesis." Mol Biol Cell **12**:1061-1077.
- Wylie, S. R. and P. D. Chantler. 2003. "Myosin IIA drives neurite retraction." Mol Biol Cell **14**:4654-4666.

- Yamamoto, S., F. Russ, H. C. Teixeira, P. Conradt and S. H. Kaufmann. 1993. "Listeria monocytogenes-induced gamma interferon secretion by intestinal intraepithelial gamma/delta T lymphocytes." Infect Immun **61**:2154-2161.
- Yao, X., C. Chaponnier, G. Gabbiani and J. G. Forte. 1995. "Polarized distribution of actin isoforms in gastric parietal cells." Mol Biol Cell **6**:541-557.
- Yarar, D., C. M. Waterman-Storer and S. L. Schmid. 2005. "A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis." Mol Biol Cell **16**:964-975.
- Yen, T. H. and N. A. Wright. 2006. "The gastrointestinal tract stem cell niche." Stem Cell Rev **2**:203-212.
- Yin, T. and K. J. Green. 2004. "Regulation of desmosome assembly and adhesion." Semin Cell Dev Biol **15**:665-677.
- Zhai, L., P. Zhao, A. Panebra, A. L. Guerrerio and S. Khurana. 2001. "Tyrosine phosphorylation of villin regulates the organization of the actin cytoskeleton." J Biol Chem **276**:36163-36167.
- Zhang, J. S., L. Wang, H. Huang, M. Nelson and D. I. Smith. 2001. "Keratin 23 (K23), a novel acidic keratin, is highly induced by histone deacetylase inhibitors during differentiation of pancreatic cancer cells." Genes Chromosomes Cancer **30**:123-135.
- Zheng, L., G. Sekerkova, K. Vranich, L. G. Tilney, E. Mugnaini and J. R. Bartles. 2000. "The deaf jerker mouse has a mutation in the gene encoding the espin actin-bundling proteins of hair cell stereocilia and lacks espins." Cell **102**:377-385.
- Zigmond, S. H., R. Furukawa and M. Fechheimer. 1992. "Inhibition of actin filament depolymerization by the Dictyostelium 30,000-D actin-bundling protein." J Cell Biol **119**:559-567.

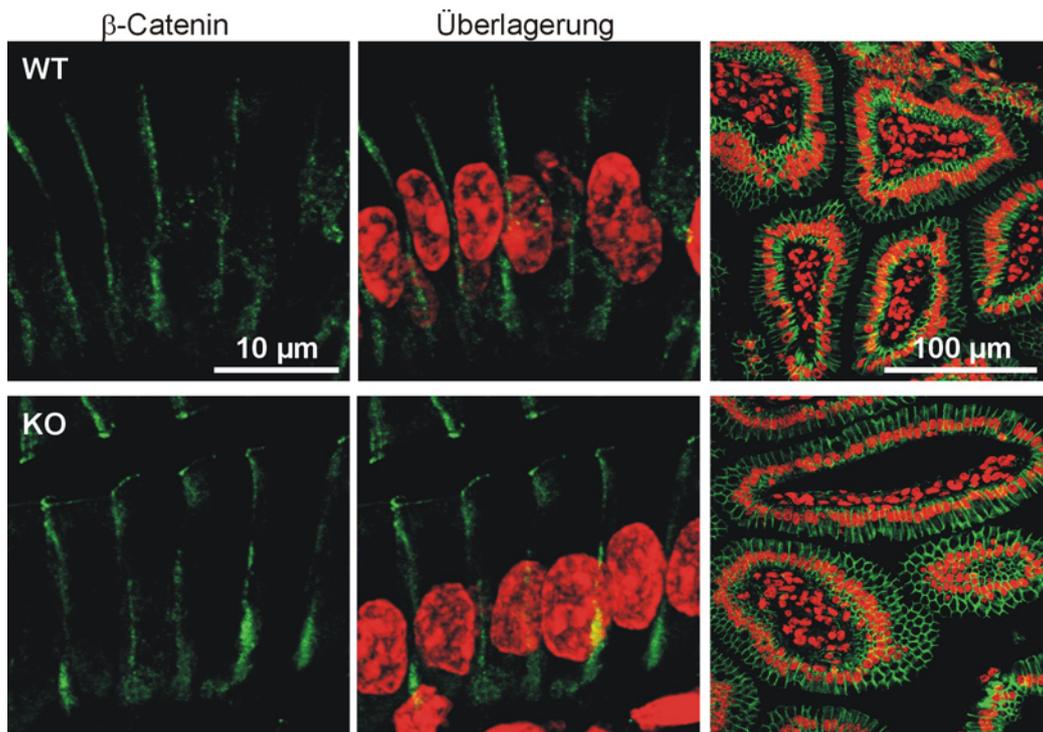
# Anhang



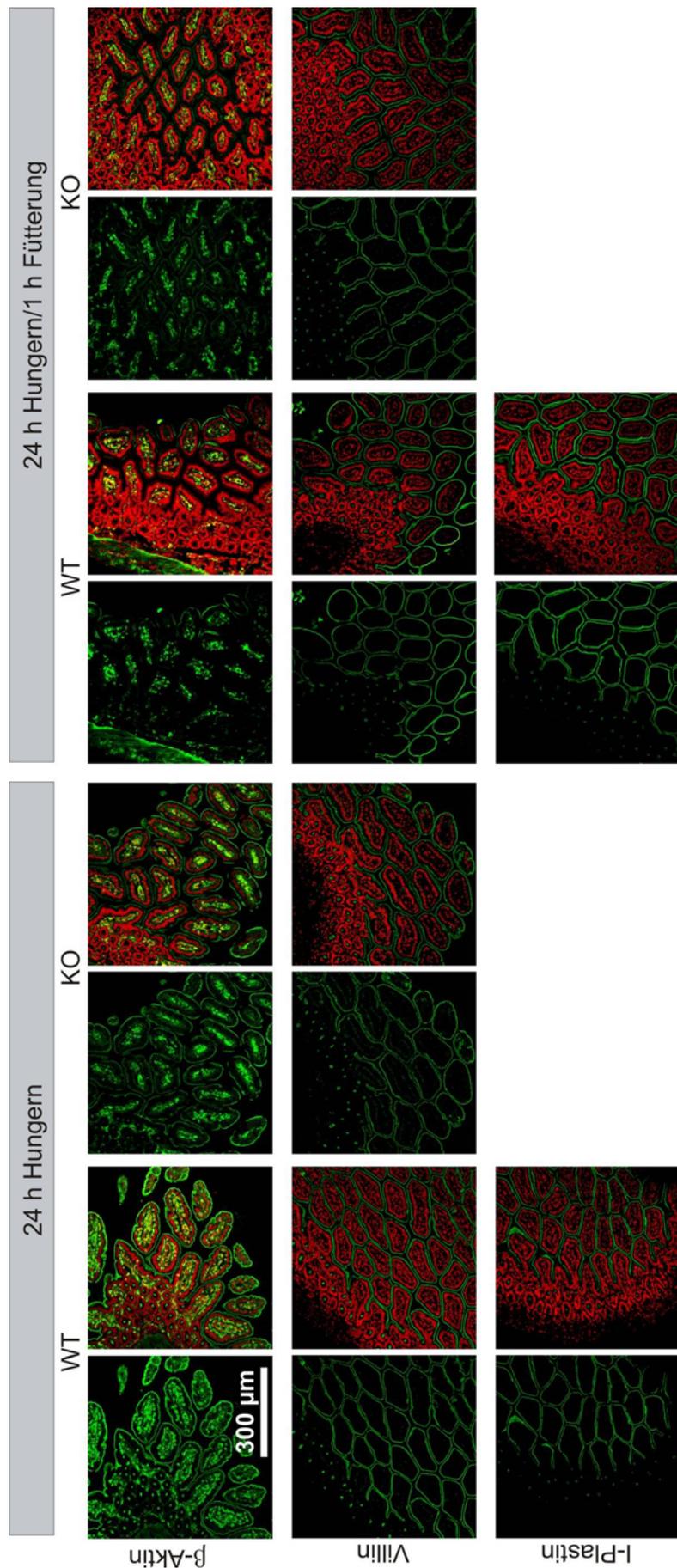
**Abbildung A-1: Histologische Untersuchung des Dün- und Dickdarms.** Dargestellt sind Hematoxylin und Eosin (HE) gefärbte Längs- und Querschnitte der einzelnen Darmabschnitte. Weder im Duodenum noch im Ileum wurden morphologische Unterschiede zwischen Wildtyp- und I-Plastin defizienten Mäusen festgestellt. Auch im Dickdarm wurden keine Abnormalitäten beobachtet. In HE-gefärbten Paraffinschnitten des Dünndarms wurde der Anteil an Becherzellen und der intraepithelialen Lymphozyten in Bezug auf die Anzahl der intestinalen Epithelzellen gezählt. Die Graphen sind jeweils mit Standardfehler dargestellt. Es wurden zwei Wildtypmäuse (WT) mit 40 Villi und 1838 Epithelzellen und zwei *knockout*-Mäuse (KO) mit 63 Villi und 2814 Epithelzellen ausgewertet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.



**Abbildung A-2: Immunlokalisation von Plektin und MACF1iso3.** Abgebildet sind konfokale Aufnahmen von Querschnitten des Darms (Jejunum). Nach Inkubation mit einem polyklonalen Plektinantikörper bzw. einem MACF1iso3-Antikörper wurden die Alexa488- (grün) und Alexa568- (rot) gekoppelte Sekundärantikörper detektiert. Sowohl im Wildtyp (WT) als auch in I-Plastin defizienten (KO) Mäusen lokalisieren die Plektine unterhalb der Mikrovilli, wie die Durchlichtaufnahmen zeigen. Die Zellkerne wurden zur Orientierung mit Propidiumjodid (rot) angefärbt. Die Kofärbung von MACF1 und Villin zeigt auch, dass MACF1 im terminalen Netz, im Zytoplasma und im Kern lokalisiert. Mit der, in der Fluoreszenzmikroskopie möglichen, Vergrößerung konnten keine nennenswerten Unterschiede festgestellt werden.



**Abbildung A-3: I-Plastin Defizienz hat keine Auswirkungen auf die Lokalisation von β-Catenin.** Paraffinschnitte des Darms von Wildtyp- (WT) und I-Plastin defizienten (KO) Mäusen wurden mit einem β-Catenin Antikörper inkubiert. Die Fluoreszenz des Alexa488- (grün) gekoppelten Sekundärantikörpers wurde mit Hilfe eines konfokalen aufgenommen. Die Zellkerne wurden mit Propidiumjodid angefärbt. Die basolaterale Lokalisation von β-Catenin in Darmepithelzellen ist in den *knockout*-Mäusen unverändert.



**Abbildung A-4: Auswirkungen auf die Lokalisation von Aktin und aktinbindenden Proteinen durch fasting/refeeding.** Dargestellt sind die Immunfluoreszenzanalysen von Paraffinschnitten des Dünndarms. Wildtyp- (WT) und I-Plastin defiziente Mäuse (KO) wurden 24 h nicht gefüttert bzw. nach dem Hungern für eine Stunde gefüttert. Die Schnitte wurden mit Antikörpern gegen Aktin, Villin und I-Plastin (nur Wildtyp) inkubiert und die Fluoreszenz des Alexa488- (grün) gekoppelt, sekundären Antikörpers am konfokalen Lasermikroskop aufgenommen. Die Zellkerne wurden mit Propidiumjodid (rot) angefärbt. Zur besseren Orientierung sind die Proteinfärbungen mit der Kernfärbung überlagert worden. Abgebildet sind Querschnitte, die Villi und z.T. Krypten zeigen. Sowohl in Wildtyp- als auch in I-Plastin defizienten Mäusen ist die Lokalisation von Aktin, Villin und I-Plastin (im WT) vergleichbar mit normal gefütterten Mäusen. Mäuse, die nach dem Hungern für eine Stunde gefüttert wurden, zeigen teilweise sowohl im Wildtyp als auch im *knockout* keine apikale Aktinfärbung. Die Villin- und I-Plastinfärbungen sind unverändert. Es wurde kein Unterschied zwischen Wildtyp- und I-Plastin defizienten Mäusen festgestellt.

# Abkürzungen

<sup>32</sup> p	radioaktives Phosphoratom
aa	Aminosäure
ABD	aktinbindende Domäne
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bakterielles Chromosom
bp	Basenpaare
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
C57Bl/6	Mausinzuchtstamm
Caco2	humane Adenokarzinom-Zelllinie
Caco2-BBE	klonale Zelllinie von Caco2
cDNA	revers transkribierte DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CFU	<i>colony forming units</i>
CH	Calponin-Homologie
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DEPC	Diethyldicarbonat/Diethylpyrocarbonat
DPPIV	Dipeptidylpeptidase IV
DSS	Dextran Natrium Sulfat
DTT	Dithiothreitol
E1-4	Exon 1-4
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-Hände	Helix-turn-helix-Motiv
EM	elektronenmikroskopisch/Elektronenmikroskopie
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
ES	embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
F-Aktin	Aktinfilamente
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
fwd	<i>forward primer</i>
G-Aktin	Aktinmonomere
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GST	Glutathion-S-Transferase
HE	Hämatoxylin und Eosin
HeLa	humane Zervixkarzinom-Zelllinie
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
i.g.	<i>intra gastral</i>
IF	Immunfluoreszenz

I-Fabp	<i>intestinal fatty acid binding protein</i>
IHC	Immunhistochemie
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
KO	Defizienz ( <i>knockout</i> )
Lamp	lysosomenassoziiertes Membranprotein
LPH	Laktase Phlorhizin Hydrolase
MACF	Mikrotubuli-Aktin-verknüpfender Faktor ( <i>microtubule actin-cross linking factor</i> )
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MV	Mikrovilli
NP-40	Nonidet P-40
oD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
PIC	Proteaseinhibitorcocktail ( <i>protease inhibitor cocktail</i> )
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ponceau S	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(sulfo-phenylazo)phenylazo]- 2,7-naphthalindisulfonsäure
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rev	<i>reverse primer</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Standardfehler des Mittelwertes ( <i>standard error of the mean</i> )
SI	Sucrase-Isomaltase
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Trisbase mit Borsäure und EDTA
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
TER	transepithelialer Widerstand
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TW	terminales Netz
U	Einheit der Enzymaktivität (unit)
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	<i>Western Blot</i>
WT	Wildtyp
xg	Erdbeschleunigung = 9,81*s <sup>-1</sup>

**Einheiten von Messungen und Präfixe**

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
kDa	Kilodalton
dl	Deziliter
g	Gramm
h	Stunde/hora
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
mCi	Millicurie
min	Minuten
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
s	Sekunde
V	Volt
Ω	Ohm

# Zusammenfassung

Die Darmepithelzellen sind für die Resorption hydrolysierter Nährstoffe verantwortlich. Ihre resorbierende apikale Oberfläche wird durch einen Bürstensaum, der aus Mikrovilli und einem terminalen Netz besteht, vergrößert. Mikrovilli sind fingerartige Membranausstülpungen, die durch ein dicht gepacktes Aktinfilamentbündel gestützt werden und mit der Aktinwurzel ins terminale Netz hineinreichen. F-Aktin wird durch I-Plastin, Villin und Espin gebündelt und mit der Plasmamembran durch Myosine der Klasse I und Ezrin verknüpft. Die Aktinwurzeln werden durch Myosin IIa, Spektrin und Filamin miteinander verbunden und assoziieren mit dem Keratinnetzwerk. Obwohl die Struktur und Zusammensetzung der Mikrovilli schon seit fast 30 Jahren bekannt ist, sind die molekularen Mechanismen der Assemblierung von den Mikrovilli und des terminalen Netzes noch nicht aufgeklärt. I-Plastin gehört zu der Familie der Plastine (Fimbrine), die N-terminal zwei EF-Hände besitzen und F-Aktin mit Hilfe von zwei Zwillingsanordnungen von Calponin-Homologie-Domänen bündeln. Mitglieder dieser Familie werden gewebespezifisch exprimiert und sind im Allgemeinen an Fokalkontakten, Lammellipodien, Filopodien oder Mikrovilli und Stereozilien zu finden. I-Plastin wird spezifisch im Bürstensaum des Darms, der Niere und des Innenohrs exprimiert. Das Ziel dieser Arbeit ist die Aufklärung der Rolle von I-Plastin im intestinalen Bürstensaum. Wir haben dazu die I-Plastin-Defizienz der verwendeten Mauslinie verifiziert und die Auswirkungen dieses Verlusts morphologisch und funktionell detailliert analysiert. Wir konnten mit Hilfe immunhistochemischer und biochemischer Analysen eine Kompensierung der I-Plastin-Defizienz durch andere Plastinisoformen ausschließen. Während I-Plastin defiziente Mäuse keinen äußerlich erkennbaren Phänotyp aufweisen, zeigen sowohl elektronenmikroskopische als auch immunhistochemische Analysen gravierende Unterschiede im Aufbau und in der Komposition des terminalen Netzes. So sind spezifische Komponenten des terminalen Netzes (Tropomyosin, Myosin IIa, Spektrin,  $\beta$ -Aktin) reduziert oder fehlen. Die organellenfreie Zone, normalerweise durch das terminale Netz ausgefüllt, erscheint schmaler. Die charakteristische Aktinwurzel fehlt meistens, in einzelnen Fällen ist sie rudimentär erkennbar. Zudem weist der intestinale Bürstensaum verkürzte Mikrovilli mit einer verengten Basis auf. Diese Veränderungen resultieren in einem instabilen Bürstensaum, einer erhöhten Empfindlichkeit vor allem der Weibchen auf die Dextran Natrium Sulfat Behandlung und einem reduzierten transepithelialen Widerstand, der durch einen erhöhten Zellumsatz der Darmepithelzellen kompensiert wird und daher zu einem äußerlich geringen Phänotyp führt. Wir konnten weiterhin zeigen, dass einige

apikale Enzyme fehllokalisieren, während basolaterale Marker wie beispielsweise die Zell-Zellkontakte unverändert sind. Wir postulieren daher, dass bei I-Plastin-Defizienz ein Transportdefekt sowie eine erhöhte Endozytoserate vorliegen. Ein ganz neuer Aspekt ist die Anreicherung von I-Plastin im terminalen Netz und die mit Hilfe der Kopräzipitation ermittelte potenzielle Interaktion von I-Plastin mit Keratin 19 und Myosin IIa. Wir schlagen aus diesem Grund ein Modell vor, in dem durch die Expression und die apikale Lokalisation von I-Plastin die Mikrovilli verlängert werden. Des Weiteren wird durch eine Interaktion mit Keratin 19 das mikrovillare Aktinfilamentbündel mit der Aktinwurzel im terminalen Netz verankert. Durch eine direkte oder indirekte Rekrutierung von Myosin IIa und weiteren Proteinen durch I-Plastin erhält der Bürstensaum seine Stabilität.

# Abstract

The intestinal tract executes essential roles as a digestive and absorptive surface. The most abundant cell population of the intestinal epithelium are the columnar cells, which bear a brush border (BB) domain at the apical surface. The BB consists of microvilli and the underlying so-called terminal web. Microvilli are cell surface projections each supported by a densely packed bundle of actin filaments that extends as a rootlet into the terminal web. In the intestinal epithelial cell each bundle is extensively cross linked by I-plastin (fimbrin), villin and espin and attached to the plasma membrane by class I myosins and ezrin. The actin rootlets are interconnected by myosin IIa, spectrin and filamin; in addition they associate with the keratin network. The architecture of the BB is known with considerable detail. Although most of their main cytoskeletal components were identified nearly 30 years ago, their actions at the molecular level in the assembly of the microvilli and the terminal web are less well understood. I-plastin is one of three mammalian plastin isoforms. They consist of two actin-binding domains in tandem preceded by two calcium-binding EF-hands. Members of the plastin family localise to focal contacts, lamellipodia, filopodia or microvilli and stereocilia. I-plastin is an actin-bundling protein of the BB of the intestine, kidney and the inner ear. The aim of this thesis is to investigate the contribution of I-plastin to the BB architecture. We verified the I-plastin deficiency of a previously generated KO strain and analysed the consequences of the deficit by morphological and functional studies. We also observed that no other plastin isoform is able to compensate loss of I-plastin. Although at the whole animal level knockout mice did not show any overt phenotype, major morphological and compositional alterations of the BB, especially in the terminal web, could be assessed by ultrastructural and immunohistochemical studies. In particular the rootlet that extends the microvillar core actin bundle into the terminal web is missing or remains rudimentary. Microvilli are shorter and their width at the base is smaller. In addition several terminal web components (tropomyosin, myosin IIa, spectrin,  $\beta$ -actin) are decreased or absent. The organelle free zone normally occupied by the terminal web is thinner. As a consequence these BB are more fragile and especially females are more sensitive to dextran sodium sulphate treatment. These alterations also account for the decreased transepithelial resistance and the increased cell turnover. I-plastin deficiency also affects the apical targeting of some enzymes whereas basolateral markers like proteins of the junctional complexes are not affected. We postulate that loss of I-plastin leads to a partial transport defect and increased endocytosis. We also found that I-plastin is enriched in the terminal web region and

---

establishes links with myosin IIa and keratin 19. We therefore propose a model for the role of I-plastin in assembling the BB in which expression and apical localisation of I-plastin stabilises F-actin bundles and leads to the extension of microvilli. In addition, through potential interaction of I-plastin and keratin 19 the axial bundles are anchored in the terminal web. On the basis of direct or indirect recruitment of myosin IIa and other terminal web markers, I-plastin confers rigidity to the BB.

# Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken in Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Angelika A. Noegel und PD Dr. Francisco Rivero Crespo betreut worden.

Köln, den 22.04.2008

---

Eva-Maria Sarah Grimm-Günter

# LEBENS LAUF

**Name, Vorname:** Grimm-Günter, Eva-Maria Sarah  
**Familienstand:** verheiratet, keine Kinder  
**Geburtsname:** Günter  
**Geburtsdatum und -ort:** 21.09.1979 Moers  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch

## Schulbildung:

1986 – 1990 Ernst-Moritz-Arndt Grundschule, Neukirchen-Vluyn  
1990 – 1996 Julius-Stursberg Gymnasium, Neukirchen-Vluyn  
1996 – 1999 Grafschafter Gymnasium, Moers

## Hochschulbildung:

10/1999 – 09/2001 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum mit Abschluss des Vordiploms  
10/2001 – 09/2004 Hauptstudium der Biologie an der Universität zu Köln  
10/ 2003 – 09/2004 Diplomarbeit mit dem Thema „Funktionale Charakterisierung der Tubulin-PACSIN Interaktion“ im Fachbereich Biologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln  
Seit Oktober 2004 Praktische Durchführung der Dissertation bei Prof. Angelika A. Noegel in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Francisco Rivero Crespo am Institut für Biochemie I der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln mit dem Thema „Untersuchungen zur Rolle von I-Plastin im intestinalen Bürstensaum“  
Februar 2005 Kollaborationsarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. Sylvie Robine am Institut Curie, Paris, Frankreich

## Publikation aus der Diplomarbeit:

**E.-M.S. Grimm-Günter**, M. Milbrandt, B. Merkl, M. Paulsson, M. Plomann (2008). PACSIN proteins bind tubulin and promote microtubule assembly. *Experimental Cell Research*, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.03.015 (*in press*)