

Die Regulation der  
Vesikelbildung  
am trans-Golgi-Netzwerk  
durch  
Proteinkinase C

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von

Boris Radau

aus Berlin

2001

Diese Arbeit wurde in der Zeit von April 1997 bis Dezember 2000 am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin Buch angefertigt. Der Verfasser versichert, die Arbeit eigenständig durchgeführt und alle Hilfsmittel angegeben zu haben.

Gutachter:           Priv. Doz. Dr. Peter Westermann  
                          Priv. Doz. Dr. Klaus Buchner

Tag der Disputation: 29.05. 2001

meinem Vater, der vor Stolz platzen würde

meiner Mutter

und

meiner Frau

---

## Zusammenfassung

PKC stimuliert am trans-Golgi-Netzwerk (TGN) die Bildung von konstitutiven Transportvesikeln [165]. Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus wurden zwei Wege beschrrieben:

Zunächst wurden Bindungsproteine der PKC mit Hilfe der „overlay“-Technik analysiert. Durch hochauflösende 2D-Elektrophorese und Mikrosequenzierung wurde Golgi-assoziiertes  $\beta$ -Aktin als Hauptbindungsprotein von aktivierter PKC $\alpha$  am Golgiapparat (GA) nachgewiesen.

In weiteren Experimenten wurden Golgi-proteine an isolierten Golgizisternen oder in permeabilisierten Zellen phosphoryliert. Die erhaltenen Phosphoproteine wurden von nicht phosphorylierten Proteinen durch zweidimensionale Elektrophorese nach Hartinger et al. [259] und Görg et al. [260,303] getrennt. Proteine, deren Phosphorylierung durch Calphostin C, Ro 31-8220 und Gö 6976 gehemmt werden konnte, wurden sequenziert. Von den identifizierten in-vitro-PKC-Substraten MARCKS, MacMARCKS, der regulatorischen leichten Kette des Myosinkomplexes 2A, Cytokeratin 8 und Cytokeratin 18 konnte auch deren in-situ-Phosphorylierung in permeabilisierten Zellen nachgewiesen. Damit ist eine biologische Relevanz der Phosphorylierung dieser Proteine wahrscheinlich.

Zusätzlich konnten die bekannten Golgi-assoziierten Proteine wie Rab6, Rab8 und Synaptobrevin 2 identifiziert und andere wie Annexin IV, Profilin I, Rab7, GRP 78 und Endobrevin erstmals am GA nachgewiesen werden.

Der Einfluß von Annexin IV und Profilin I auf die in-vitro-Vesikelbiogenese wurde überprüft:

Während ein Annexin IV-spezifischer Antikörper die Verpackung von HSPG im zellfreien System nicht beeinflusste [371], konnte durch Zusatz von spezifischem Profilin I-Antikörper die Vesikelbildung gehemmt werden [368]. Profilin I wurde daneben auch biochemisch in post-Golgi-Vesikelfractionen nachgewiesen, was die oben gemachte Aussage unterstützt.

Die Identifizierung der hauptsächlichen PKC-Substrate MARCKS, MacMARCKS und der regulatorischen leichten Kette des Myosinkomplexes 2A deutet auf einen neuen Signaltransduktionsweg hin, durch den PKC die Vesikelbildung am TGN steuern könnte.

---

---

## Summary

PKC is known to stimulate the formation of constitutive transport vesicles at the trans Golgi network [165]. In an attempt to understand the mechanism behind that process, two possible experimental approaches were followed:

In the first approach PKC-binding proteins at the Golgi apparatus (GA) were analyzed according to a PKC-overlay assay technique.  $\beta$ -Actin was identified as a major binding protein of activated PKC $\alpha$  by high resolution 2D-electrophoresis and microsequencing techniques.

In the second experimental setup isolated Golgi cisternae or permeabilized HepG2-cells were used to phosphorylate and separate Golgi proteins by high resolution 2D-electrophoresis according to Hartinger et al. [259] and Görg et al. [303] in the presence of PKC $\alpha$  [260]. Proteins not phosphorylated in the presence of Calphostin C, Ro 31-8220 and/or Gö 6976, were sequenced by mass spectroscopy (MALDI-MS and Q-TOF). For the identified in vitro PKC-substrates MARCKS, MacMARCKS, Myosin RLC, Cytokeratin 8 and Cytokeratin 18, it was possible to demonstrate their phosphorylation in permeabilized HepG2 cells too. Therefore, a biological relevance of this phosphorylation can be assumed.

Other known Golgi associated proteins like Rab-6, Rab-8 and VAMP-2 were also identified or were shown to be Golgi associated for the first time as in the case of Annexin-IV, Profilin-I, Rab-7, GRP-78 and Endobrevin.

Additionally Annexin IV and Profilin I were tested for their effect on in-vitro-vesicle biogenesis: Even though an Annexin IV-specific antibody did not influence the budding efficacy of HSPG in the cell free system at all [371], the addition of a Profilin I-specific antibody did actually reduce the budding efficiency [368]. Supporting the above result, Profilin I was also identified in post-Golgi-vesicle fractions biochemically.

Generally the identification of the mayor PKC substrates MARCKS, MacMARCKS and Myosin RLC is pointing towards a new signal transduction pathway, by which PKC might regulate the vesicle biogenesis at the TGN.

---

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>DER VESIKELTRANSPORT</b>	<b>4</b>
<b>1.2</b>	<b>DIE BILDUNG KONSTITUTIVER TRANSPORTVESIKEL AM TRANS-GOLGI NETZWERK (TGN)</b>	<b>4</b>
1.2.1	CLATHRIN UMHÜLLTE VESIKEL	4
1.2.2	KONSTITUTIVE EXOCYTOTISCHE/SEKRETORISCHE VESIKEL	5
1.2.3	APIKAL- UND BASOLATERAL-GERICHTETER, KONSTITUTIVER VESIKELTRANSPORT	6
<b>1.3</b>	<b>MECHANISMEN DER SORTIERUNG VON TRANSPORTIERTEN PROTEINEN</b>	<b>7</b>
1.3.1	SORTIERUNG DURCH RETENTION	7
1.3.2	SORTIERUNG DURCH SELEKTION	7
1.3.2.1	Tyrosin-haltige Sortierungsmotive	8
1.3.2.2	Di-Leucin Motive	8
1.3.2.1	Glykosylierungssignale und Sphingolipid-artige Sortierungssignale	8
1.3.2.2	Weitere Sortierungssignale	9
<b>1.4</b>	<b>EFFEKTOREN DES VESIKELTRANSPORTES</b>	<b>9</b>
1.4.1	GTP-BINDENDE PROTEINE (G-PROTEINE)	9
1.4.1.1	Heterotrimere G-Proteine	9
1.4.1.2	GTPasen der Ras-Superfamilie	10
1.4.1.3	Dynamamin	11
1.4.2	PHOSPHOLIPIDE UND LÖSLICHE PHOSPHOINOSITIDE	11
<b>1.5</b>	<b>DIE PHOSPHORYLIERUNG VON PROTEINEN ALS UBIQUITÄRER REGULATIONSMECHANISMUS</b>	<b>12</b>
1.5.1	PROTEINKINASEN UND PROTEINPHOSPHATASEN	12
1.5.2	PROTEINKINASE C (PKC)	13
1.5.2.1	Konventionelle Isoformen der PKC (cPKCs)	17
1.5.2.2	Neue Isoformen der PKC (nPKCs)	19
1.5.2.3	Atypische Isoformen der PKC	20
1.5.3	EINFLUß DER PKC-ISOFORMEN AUF DEN INTRAZELLULÄREN VESIKELTRANSPORT UND AUF DIE SEKRETION VON PROTEINEN	20
1.5.4	SUBSTRATE DER PKC	23
<b>2</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG</b>	<b>25</b>

---

<b>3 MATERIAL</b>	<b>26</b>
<b>3.1 COMPUTERPROGRAMME</b>	<b>26</b>
<b>3.2 GERÄTE</b>	<b>26</b>
<b>3.3 VERBRAUCHSMATERIAL UND ZELLKULTUR</b>	<b>27</b>
<b>3.4 CHEMIKALIEN</b>	<b>28</b>
<b>3.5 BIOLOGISCHE MATERIALIEN</b>	<b>30</b>
<b>3.6 LÖSUNGEN</b>	<b>31</b>
<b>3.7 ANTIKÖRPER</b>	<b>32</b>
<b>4 METHODEN</b>	<b>33</b>
<b>4.1 ZELLBIOLOGISCHE VERFAHREN</b>	<b>33</b>
4.1.1 KULTIVIERUNG VON HEPG2-ZELLEN	33
4.1.2 KULTIVIERUNG VON SF9-ZELLEN	33
4.1.3 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON ZELLEN MIT [ <sup>35</sup> S]-SULFAT	33
4.1.4 PRÄPARATION VON GOLGIMEMBRANEN	33
4.1.4.1 Reinigung von Golgimembranen aus HepG2-Zellen nach Westermann	33
4.1.4.2 Anreicherung von TGN im Verlauf der Golgi-Präparation nach Westermann	35
4.1.5 GEWINNUNG CYTOSOLISCHER PROTEINE AUS HEPG2-ZELLEN	35
4.1.5.1 ATP-inkubiertes Cytosol (ATP-Cytosol)	35
4.1.5.2 Isolierung von Proteinkomplexen aus dem ATP-Cytosol	35
4.1.6 VESIKELBILDUNG AM TGN IN ZELLFREIEN SYSTEMEN	36
4.1.6.1 Vesikelbildung an gereinigten Golgimembranen	36
4.1.6.2 Bestimmung des [ <sup>35</sup> S]-Sulfat-markierten HSPG	36
4.1.7 <i>PROTEINÜBEREXPRESSION</i>	37
4.1.7.1 Plasmid, Expressionssystem	37
4.1.7.2 Aufarbeitung von GST-PKC $\alpha$	37
4.1.7.2.1 Affinitätsreinigung nach dem Säulenreinigungsverfahren	37
4.1.7.2.2 Affinitätsreinigung nach dem Batchverfahren	38
4.1.7.3 Dialyse und Aufbewahrung der Fusionsproteine	40
4.1.7.4 Aktivitätsbestimmung von GST-PKC $\alpha$	40
<b>4.2 BIOCHEMISCHE VERFAHREN</b>	<b>42</b>
4.2.1 ELEKTROPHORESE	42
4.2.1.1 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli	42
4.2.1.2 SDS-PAGE mit kontinuierlichem Polyacrylamid-Gradienten	42
4.2.1.3 2D-Elektrophorese nach Hartinger	42
4.2.1.4 2D-Elektrophorese nach Görg	43

---

---

4.2.2	WESTERN BLOTTING	43
4.2.3	ANDERE ANTIKÖRPERREAKTIONEN	44
4.2.3.1	1D- und 2D-„Overlay assay“ nach Newton	44
4.2.3.1.1	1D-Overlay	44
4.2.3.1.2	2D-Overlay	45
4.2.3.2	Immunfluoreszenzmikroskopie	45
4.2.4	PHOSPHORYLIERUNGSANSÄTZE	46
4.2.4.1	Filterassay adaptiert nach Hannun et al. 1985	46
4.2.4.2	Analytische Phosphorylierungsansätze	46
4.2.4.3	Präparative Phosphorylierungsansätze	47
4.2.4.4	In-situ-Phosphorylierung permeabilisierter HepG2-Zellen	47
4.2.4.5	Proteinsequenzierung	47
4.2.5	NACHWEIS POTENTIELLER PKC-SUBSTRATE ALS BESTANDTEIL VON POST-GOLGI-VESIKELN	48
4.2.5.1	Nachweis im Geschwindigkeitsgradienten	48
4.2.5.2	Nachweis mittels isopyknischer Zentrifugation	48
4.2.6	SONSTIGE METHODEN	49
4.2.6.1	Proteinbestimmung	49
4.2.6.2	Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen und auf Nitrocellulose	49
4.2.6.2.1	Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blau	49
4.2.6.2.2	Proteinfärbung mit Ponceau S	49
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>50</b>
<b>5.1</b>	<b>EXPRESSION, REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES FUSIONSPROTEINS AUS PKCa UND GLUTATHION-S-TRANSFERASE (GST-PKCa)</b>	<b>50</b>
<b>5.2</b>	<b>NACHWEIS DER IN HEPG2-ZELLEN EXPRIMIERTEN PKC-ISOFORMEN</b>	<b>52</b>
<b>5.3</b>	<b>ANREICHERUNG DES TGN IM VERLAUF DER GOLGI-PRÄPARATION AUS HEPG2-ZELLEN</b>	<b>54</b>
<b>5.4</b>	<b>NACHWEIS UND QUANTIFIZIERUNG DER FÄHIGKEIT DER ISOLIERTEN GOLGIZISTERNEN ZUR BILDUNG VON TRANSPORTVESIKELN</b>	<b>56</b>
<b>5.5</b>	<b>ANPASSUNG DER PHOSPHORYLIERUNGSBEDINGUNGEN NACH HANNUN AN DIE BEDINGUNGEN DER IN-VITRO-VESIKELBIOGENESE</b>	<b>56</b>
<b>5.6</b>	<b>NACHWEIS DER ATP-ABHÄNGIGEN KOMPLEXBILDUNG VON PHOSPHORYLIERTEN CYTOSOLISCHEN PROTEINEN</b>	<b>58</b>
<b>5.7</b>	<b>UNTERSUCHUNG DER PHOSPHORYLIERUNG VON GOLGI-ASSOZIIERTEN PROTEINEN</b>	<b>60</b>
<b>5.8</b>	<b>UNTERSUCHUNG DES MÖGLICHEN EINFLUSSES VON RO 31-8220 AUF DIE MEMBRANBINDUNG VON PKCa</b>	<b>62</b>
<b>5.9</b>	<b>IDENTIFIZIERUNG VON GOLGI-ASSOZIIERTEN PKC-SUBSTRATEN</b>	<b>63</b>
5.9.1	ERGEBNISSE DER PHOSPHORYLIERUNGSVERSUCHE	63

---



---

5.9.2	ZWEIDIMENSIONALE TRENNUNG DER PROTEINE NACH HARTINGER ET AL.	63
5.9.3	ZWEIDIMENSIONALE PROTEINTRENNUNG MODIFIZIERT NACH GÖRG ET AL.	68
5.9.3.1	In-vitro-Phosphorylierung der Proteine von isolierten Golgizisternen	70
5.9.3.2	In-situ-Phosphorylierung in permeabilisierten HepG2-Zellen	73
5.9.3.3	Nachweis von PKC-Substraten <b>durch</b> immunologische Identifizierung	77
5.9.4	IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS DER DURCH MASSENSPEKTROSKOPISCHE PEPTIDSEQUENZIERUNG IDENTIFIZIERTEN POTENTIELLEN PKC-SUBSTRATE IN DEN GOLGI-PRÄPARATEN	79
5.9.4.1	Immunnachweis der potentiellen PKC-Substrate in Gewebs- und Zellextrakten	79
5.9.4.2	2D-Nachweis der potentiellen PKC-Substrate	81
5.9.5	ZUSAMMENFASSUNG DER DATEN ZUR IDENTIFIZIERUNG UND PHOSPHORYLIERUNG VON GOLGI-ASSOZIIERTEN PROTEINEN UND IHRE MÖGLICHE BEDEUTUNG FÜR DIE VESIKELBILDUNG AM TGN	82
5.9.5.1	Die bevorzugten PKC-Substrate, MacMarcks, MARCKS und die regulatorische leichte Kette des Myosinkomplexes 2A	82
5.9.5.1.1	MacMARCKS	82
5.9.5.1.2	MARCKS	82
5.9.5.1.3	Regulatorische leichte Kette des Myosinkomplexes 2A	83
5.9.5.2	Rab-Proteine	83
5.9.5.2.1	Rab6	83
5.9.5.2.2	Rab7	84
5.9.5.2.3	Rab8	84
5.9.5.3	Cytokeratine	84
5.9.5.3.1	Cytokeratin 1	85
5.9.5.3.2	Cytokeratin 8 und Cytokeratin 18	85
5.9.5.4	Membran- und Vesikel-assoziierte Proteine	86
5.9.5.4.1	Synaptobrevin 2	86
5.9.5.4.2	Endobrevin	86
5.9.5.5	Lumenale Proteine	86
5.9.5.5.1	$\lambda$ -Immunglobulin und Lysozym C	86
5.9.5.5.2	Cab45	87
5.9.5.5.3	GRP78	87
5.9.5.6	Golgi-assoziierte Proteine, die nicht phosphoryliert werden	88
5.9.5.6.1	Annexin IV	88
5.9.5.6.2	Profilin I	88
5.9.5.7	Verschiedene am Golgi lokalisierte Proteine	89
5.9.5.7.1	Cofilin	89
5.9.5.7.2	P1589	
5.9.5.7.3	S15A	89

---

---

<b>5.10</b>	<b>NACHWEIS VON PKC-SPEZIFISCHEN BINDUNGSPROTEINEN AN GOLGIZISTERNEN</b>	<b>90</b>
<b>5.11</b>	<b>EINFLUß VON GOLGI-ASSOZIERTEN PROTEINEN UND POTENTIELLEN PKC-SUBSTRATEN AUF DEN VESIKELTRANSPORT AM TGN</b>	<b>92</b>
5.11.1	INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON PROFILIN I UND ANNEXIN IV	92
5.11.2	NACHWEIS VON PROFILIN I UND ANNEXIN IV ALS BESTANDTEIL VON POST-GOLGI-VESIKELN	93
5.11.3	EINFLUß DER PROFILIN I- UND ANNEXIN IV-SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPER AUF DIE IN-VITRO-VESIKELBIOGENESE	96
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>TABELLEN</b>	<b>100</b>
<b>9</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>106</b>

---

---

## Danksagungen

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Priv. Doz. Dr. Peter Westermann, der die Ausführung dieser Arbeit durch seine tatkräftige Unterstützung maßgeblich gefördert hat, immer diskussionsbereit war und ein offenes Ohr für die praktischen Probleme hatte, die während der Anfertigung der Arbeit auftraten.

Priv. Doz. Dr. Klaus Buchner danke ich für seinen von „außen“ eingeflossenen Rat, seine Bereitschaft, die Arbeit zu begutachten und die damit verbundenen langen Gespräche und Diskussionen.

Dipl.-Ing. Maria Knoblich danke ich besonders für die gute Einführung in den Laboralltag der Arbeitsgruppe zu Beginn meiner Zeit im Arbeitskreis, der Hilfe beim Überlebenskampf an der Zellkultur-Werkbank und für ihre ständige Diskussionsbereitschaft.

Dr. Jiaxin Dong, dessen Doktorarbeit zur gleichen Zeit im Arbeitskreis entstanden ist, danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Diskussionsbereitschaft, besonders wenn ich beim Auswerten meiner Phosphoimager-Daten ab und zu Halluzinationen hatte.

Dr. Albrecht Otto und Dr. Eva-Christina Müller gilt mein Dank für die Anfertigung der Proteinsequenzierungen und deren Bereitschaft die von mir erzeugte Probenflut zu erdulden. Desweiteren gilt mein Dank auch den Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Dr. Eckart Matthes, Dr. Martin Lipp und Dr. Klaus Scheiderei, die von meinen Fragen und Anfragen heimgesucht wurden. Auch den Mitarbeitern der Bildverarbeitung und der Bibliothek am MDC sei zum einen für ihre Anregungen und geleistete Hilfestellung bei der graphischen Bearbeitung meiner 2D-Proteinmuster und zum anderen für die Einführung in die Datenbankrecherche gedankt.

Last but not least danke ich meiner Frau und allen Verwandten, Freunden sowie Bekannten für die tapfere Erduldung eines schweren Falles von „chronischer Doktoritis“.

---

## Abkürzungsverzeichnis

% (w/v)	Konzentration in mg / 100 µl Lösung	MLC	Myosin leichte Kette
% (v/v)	Konzentration in µl / 100 µl Lösung	MLCK	Myosin light chain kinase
Abb.	Abbildung	MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
AlF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Aluminiumfluorid	MRLC 2A	regulatorische leichte Kette des Myosinkomplexes 2A
APS	Ammoniumperoxodisulfat	MS	Massenspektroskopie
ARF	ADP-Ribosylierungs-Faktor	MT 1-Zellen	Brustkrebszelllinie der Maus
ARF/Sar	GTPase-aktivierendes Protein von ARF	NC	Nitrocellulose
ATP	Adenosin-triphosphat	NIH	National Institute of Health (USA)
16-BAC	Benzyl-dimethyl-n-hexadecylammoniumchlorid	NIH 3T3-Zellen	3T3-Fibroblasten-Zelllinie des NIH aus Maus
BSA	bovines Serum albumin	nPKC	neue PKC-Isoform
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	NRK-Zellen	"normale Ratten-Nieren"-Zelllinie
CBB	Coumassie brilliant blue	PAA	Polyacrylamid
CCVs	„Clathrin coated vesicles“	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
CD	"cluster of differentiation"	PC12-Zellen	Phaeochromocytomzellen 12 der Ratte
CDC	"cell division cycle"	PH-Domäne	Pleckstrin-Homologiedomäne
CGN	Cis-Golgi-Netzwerk	PI	Phosphatidylinositol
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat	PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
CK	Casein Kinase	PIN	Phosphatase-Inhibitoren
COP	„coat protein“	PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-disphosphat
CPC	Cetylpyridiniumchlorid	PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat
cPKC	konventionelle PKC-Isoformen	PITP	Phosphatidylinositol-Transferprotein
cpm	counts per minute	PKA	Protein Kinase A
C-Terminus	Carboxyterminus von Proteinen	PKC	Protein Kinase C
Cy2	Cyanine 2	PKD	Protein Kinase D
Cy3	Cyanine 3	PKG	Proteinkinase G
DAB	3,3'-Diaminobenzidine	PKM	Katalytische Untereinheit von PKC
DAG	Diacylglycerol	PLD	Phospholipase D
DG	DAG-Kinase	PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	PNS	Postnuklearer Überstand
DMSO	Dimethylsulfoxid	PP	Proteinphosphatase
DTE	1,4-Dithio-(D,L)-erythritol	PS	Phosphatidylserin
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	Q-TOF	Quadropole-time-of-flight
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat	Rab	RAS related protein
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor	RACK	receptor of activated C-kinase
EGTA	epidermal growth factor	RBL	basophilische Leukämie-Zelllinie aus Ratte
EMBL	European Molecular Biology Organization Laboratories	rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
ER	Endoplasmatisches Retikulum	RICK	receptor of inactivated C-kinase
FFA	cis ungesättigte Fettsäuren	rpm	Rotationen pro Minute
FKS	fötale Kälberserum	Sec	Mutation für Sekretion in Hefe
GA	Golgi-Apparat	SDS	Sodium dodecylsulfat
GAG	Glykosaminoglykan	Sf9-Zelle	Spodoptera frugiperda-Insektenzelllinie
G $\alpha$ i	$\alpha$ -Untereinheit von inhibitorischen G-Proteinen	S-MEM	minimal essential medium without
G $\alpha$ s	$\alpha$ -Untereinheit von stimulatorischen G-Proteinen	TBS	Tris-buffered saline
GAP	"gap junction associated protein"	TBS-T	Tris-buffered saline-Tween buffer
G-Protein	GTP-bindendes Protein	TCA	Trichloressigsäure
GDP	Guanosin-diphosphat	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
GRP	Glucose Regulated Protein	TFA	Trifluoressigsäure
GPI	Glycosylphosphatidylinositol	TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
GST	Glutathion-S-Transferase	TM	Totalmembran-Fraktion aus HepG2-Zellen
GTP	Guanosin-triphosphat	TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetat
GTP $\gamma$ S	Guanosin 5'-O-(3-thiotriphosphat)	Tris	Trishydroxymethyl-amino-methan
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure	Triton X100	t-Oktylphenoxypolyethoxyethanol
HepG2-Zellen	humane Hepatomzelllinie G2	t-SNARE	SNAP-Rezeptor in der Targetmembran
HETE	"hydroxyeicosatetraenoic acid"	Tween-20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
HME	Puffer s. bei Lösungen	VAMP	vesicle associated membrane proteins
HNE	4-Hydroxy-2,3-nonenal	VIP	"vesicular integral membrane protein"
HRP	"horseradish peroxidase"	Vps-Protein	Mutation für vakuoläre Proteinsortierung in Hefe
HSPG	Heparansulfatproteoglykan	VSV	vesikulärer Stomatitisvirus
IgG	Immunglobulin G	v-SNARE	SNAP-Rezeptor in der Vesikelmembran
IPG	Immobilisierter pH-Gradient		
kD	Kilodalton		
KAc	Kaliumacetat		
KDEL-Rezeptor	Rezeptor für Proteine mit C-terminaler Sequenz KDEL		
LysoPC	Lysphosphatidylcholin		
MARCKS	Myristoyliertes Alanin reich C-Kinase Substrat		
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase		
MAPKABK	MAPK-aktivierte Proteinkinase		
mCi	Milli-Curie		
MDCK	"Madin-Darby Canine Kidney"-Zellen		
MEK	MAP-Kinase-Kinase		

---

## Lebenslauf

Name: Radau, Boris  
Geburtsdatum, -ort: 20.04.1966 in Berlin  
Familienstand: verheiratet



### Schulbildung:

1972-1977: Oskar-Heinroth-Grundschule in Berlin-Neukölln  
1977-1984: Kath. Schule St. Marien Abitur (Note 1,8)

### Studium:

1985-1990: Studium der Chemie an der TU Berlin, Wahlfach Biochemie,  
Diplomarbeit auf dem Gebiet Biochemie bei Prof. Salnikow.

### Berufsweg:

1990-1995: Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei  
in Berlin (VLB)

Arbeitsgebiet: Aufklärung des spontanen Überschäumens von Bier.

1996: Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Volker  
Erdmann (Dr. Corinna Lipmann) am Inst. f. Biochemie der FU Berlin

Arbeitsgebiet: Isolierung einer ribosomal assoziierten Kinase.

1997-2000: Doktorand in der Arbeitsgruppe von Priv. Doz. Dr. Peter Westermann,  
Max-Delbrück-Zentrum für molekulare Medizin in Berlin Buch

---

---

## Publikationen

- Shallan MA-AM, Radau B, Salnikow J & Vater J:  
Topological analysis of components of the cytochrome b<sub>6</sub>f complex by chemical crosslinking.  
Biochimica et Biophysica Acta 1057, 64-68, 1991
  - Krüger E, Radau B. & Rönn D:  
Untersuchung von Schaum und Bier mit proteinchemischen Arbeitsmethoden.  
Monatsschrift für Brauwissenschaft 46 (9), 312-319, 1993
  - Harms J, Radau B, Krüger E:  
Bestimmung von Oxalsäure in Malz, Würze und Bier mittels HPLC.  
Monatsschrift für Brauwissenschaft 47 (11), 2-5, 1994
  - Radau B, Linemann A & Krüger E:  
Modifizierter Carlsberg-Test (MCT).  
Brauerei-Forum **10** (23/95), 377-378, 1995  
zitiert in der MEBAK
  - Radau B, Karpenko D & Krüger E:  
Dynamischer Gasentbindungs-Test (DGT) zur Gushingbeurteilung von Bier.  
Brauerei-Forum 11 (1/96); 11-12; 1996
  - Radau B, Otto A, Müller E-C, Lindschau C & Westermann P.:  
Protein kinase C $\alpha$ -dependent phosphorylation of Golgi proteins.  
Electrophoresis 21 (13), 2684 - 2187, 2000
  - Dong J, Radau B, Otto A, Müller E-C, Lindschau C & Westermann P.:  
Profilin 1 attached to the Golgi is required for the formation of constitutive transport vesicles at the *trans-Golgi* network.  
Biochimica et Biophysica Acta 1497, 253-260, 2000
-