Untersuchungen zur zellulären Funktion des humanen Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors ARHGEF6/αPIX in eukaryotischen Zellsystemen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

am Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg

> vorgelegt von Dipl.-Biologin Verena Hertweck aus Niedernhall

> > Hamburg, 2007

Genehmigt vom Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Professor Dr. A. GAL Weiterer Gutachter der Dissertation: Herr Professor Dr. S. DOBLER Tag der Disputation: 09. Februar 2007

Hamburg, den 25. Januar 2007



Professor Dr. Reinhard Lieberei Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

I.	Zus	ammenfassung	.1
II.	Einl	eitung	.3
1	. Ves	ikeltransport in eukaryotischen Zellen	.3
2	Das	Aktinzytoskelett	.5
3	. Rhc	o-GTPasen	.6
	3.1	Rho-GTPasen sich wichtige Regulatoren des Aktinzytoskeletts	.7
	3.2	Rho-GTPasen bei der neuronalen Morphogenese	.8
4	AR	HGEF6/αPIX – ein Rac1/Cdc42-spezifischer Guanin-Nukleotid-	
	Aus	tauschfaktor	10
	4.1	Expression und Spleißvarianten	11
	4.2	Domänenstrukur und Interaktionspartner	12
	4.3	ARHGEF6/ α PIX spielt mit β -Parvin und Calpain eine wichtige	
		regulatorische Rolle während der Bildung fokaler Adhäsionen	13
	4.4	ARHGEF6/ α PIX, PAK und GIT1 sind Teil eines Proteinkomplexes, der	
		sich zwischen Endosomen und der Plasmamembran hin- und	
		herbewegt	14
	4.5	ARHGEF6/ α PIX interagiert im Hefesystem mit dem neuronalen	
		Adaptorprotein FE65	15
5	.PC1	2-Zellen – ein neuronales Zellsystem	16
6	. Ziel	der Arbeit	18
III.	Mat	erial und Methoden	19
1	. Mat	erial	19
	1.1	Materialien für molekularbiologische Methoden	19
	1.2	Materialien für proteinbiochemische Methoden	20
	1.3	Materialien für zellbiologische Methoden	21
	1.4	Sonstige Chemikalien	22
	1.5	Bakterienstämme	23
	1.6	Zelllinien	23
	1.7	Plasmide	24
	1.8	Oligonukleotide	29
	1.	8.1 Oligonukleotide für Klonierungen	29
	1.9	Antikörper	32
2	. Mol	ekularbiologische Methoden	34
	2.1	Anzucht von <i>E.coli</i>	34

	2.2 Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen für die Transformation34			
	2.3	Transformation kompetenter E.coli-Zellen mit Plasmid-DNA	.35	
	2.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	.35	
	2.5	Restriktion von DNA (Smith und Birnstiel, 1976)	.36	
	2.6	Dephosphorylierung von 5'-Phosphat-DNA-Enden	.36	
	2.7	Ligation von DNA	.36	
	2.8	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	.37	
	2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Megaprime-PCR	.37	
	2.10	Agarosegelelektrophorese	.38	
	2.11	Aufreinigung von PCR- und Restriktionsprodukten	.38	
	2.12	2DNA-Sequenzierung	.39	
	2.13	Klonierung mittels TOPO-Cloning-Technologie als Basis für das		
		Gateway-System	.39	
	2.14	IKIonierung mittels GATEWAY [™] -Technologie	.39	
3.	Prot	einbiochemische Methoden	.40	
	3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	.40	
	3.2	Coomassie-Blaufärbung von Proteingelen	.41	
	3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	.41	
	3.4	Western-Blot	.41	
	3.5	Immunologische Detektion immobilisierter Proteine auf Membranen	.42	
	3.6	GST-Pulldown-Experimente	.42	
	3.7	Koimmunpräzipitation	.43	
4.	Zell	biologische Methoden	.45	
	4.1	Zellkultur	.45	
	4.2	Immunfluoreszenz-Analysen	.49	
IV.	Erg	ebnisse	.51	
1.	Biod	chemische und zellbiologische Experimente zur Charakterisierung der		
	Prot	ein-Protein-Interaktion von ARHGEF6/ α PIX und FE65	.51	
	1.1	Vorbemerkungen	.51	
	1.2	Analyse der Interaktion zwischen ARHGEF6/ α PIX und FE65 durch		
		GST-Pulldown-Experimente	.51	
	1.3	ldentifizierung der mit FE65 interagierenden Domänen von		
		ARHGEF6/aPIX mithilfe von GST-Pulldown-Experimenten	.53	
	1.4	Eingrenzung des interagierenden Bereichs von FE65 mit		
		ARHGEF6/aPIX mittels GST-Pulldown-Versuchen	.54	
	1.5	Untersuchung der Interaktion zwischen ARHGEF6/ α PIX und FE65		
		durch Koimmunpräzipitation	.57	
		· ·		

1.6	Immunzytochemische Untersuchungen zur Protein-Protein-Interaktion	
	von ARHGEF6/αPIX und FE6560)
1	.6.1 Analyse der subzellulären Lokalisation von ARHGEF6/ α PIX und	
	FE65 in CHO-K1- und PC12-Zellen60)
1	.6.2 Analyse der Kolokalisation von ARHGEF6/ α PIX und FE65 in CHO-	
	K1- und PC12-Zellen65	5
2. Aus	swirkungen von Deletionen verschiedener Bereiche von ARHGEF6/ $lpha$ PIX	
auf	die subzelluläre Lokalisation in verschiedenen eukaryotischen Zelllinien67	,
2.1	Analyse der subzellulären Lokalisation verschiedener ARHGEF6/ α PIX-	
	Proteine in CHO-K1- und PC12-Zellen67	7
2.2	Immunzytochemische Untersuchungen zur Identifizierung der	
	ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-86-positiven Strukturen in verschiedenen	
	eukaryotischen Zelllinien67	7
2.3	Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von	
	ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 in CHO-K1-Zellen bei Koexpression	
	verschiedener Rac1- bzw. Cdc42-Proteinvarianten67	7
3. Unt	tersuchungen zur Funktion von ARHGEF6/ $lpha$ PIX bei der Differenzierung	
von	n PC12-Zellen67	7
3.1	Etablierung eines Zellsystems zur Untersuchung der Neuritenbildung67	,
3.2	Charakterisierung der morphologischen Veränderungen während des	
	NGF-induzierten Neuritenwachstums von PC12-Zellen nach	
	Überexpression von ARHGEF7/ β PIX bzw. verschiedener	
	ARHGEF6/αPIX-Proteinvarianten67	,
3.3	Analyse eines PI3-Kinase-Hemmstoffes auf die Morphologie von	
	ARHGEF6/ α PIX- und ARHGEF6/ α PIX Δ SH3 überexprimierenden PC12-	
	Zellen67	,
4. Unt	tersuchungen zur Rolle von ARHGEF6/ $lpha$ PIX und dessen	
Inte	eraktionspartnern bei der Ausbildung von Zellfortsätzen in verschiedenen	
euk	aryotischen Zelllinien67	,
4.1	Auswirkungen auf die Zellmorphologie von CHO-K1- und PC12-Zellen	
	nach ektopischer Expression verschiedener ARHGEF6/ α PIX-	
	Interaktionspartner sowie nach Koexpression von ARHGEF6/ α PIX bzw.	
	ARHGEF6/αPIXΔSH367	,
4.2	Analyse des Phänotyps von PC12- und CHO-K1-Zellen nach	
	Expression verschiedener Rac1- bzw. Cdc42-Proteinvarianten und	
	Koexpression mit ARHGEF6/αPIX67	7

V.	Diskussion	67
	1. Mögliche Interaktion von ARHGEF6/ α PIX und dem neuronalen	
	Adaptorprotein FE65 und dessen mögliche funktionelle Bedeutung	67
	2. Verschiedene ARHGEF6/ α PIX-Domänen sind wichtig für dessen	
	subzelluläre Lokalisation	67
	3. ARHGEF6/ α PIX hat eine wichtige Funktion bei der Ausbildung von	
	Zellfortsätzen in eukaryotischen Zellen	67
VI.	Literatur	67

Posterpräsentation

Danksagung

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	mikro
αPIX	"αPAK interacting exchange factor "
RPIX	"BPAK interacting exchange factor "
Δ	Adenin
Λ ΛΛ	Ademin
AA Abb	Activitie
ADD.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1,-2,-3,-4	Adaptorkomplexe-1,-2,-3,-4
APP	"Amyloid precusor protein"
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ARHGEF6	"alpha rho guanine nucleotide exchange factor 6"
ARHGEE7	"alpha rho guanine nucleotide exchange factor 7"
RAA	Bisach/lamid
	Aminosäuro(n)
вр	Basenpaar(e)
BSA	"bovine serum albumine"
С	Cytosin
Cbl	"Casitas B-lymphoma"
CC	"coiled-coil" (Proteindomäne)
cDNA	"copy"-Desoxyribonukleinsäure"
Cdc42	cell division cycle 42"
CH	calponin homology" (Proteindomäne)
	Adhärente Fibroblasten aus dem Ovarium des Chinesischen Hamsters
	Fibroblasten ähnliche Nierenzellen (afrikanische grüne Meerkatze)
	elened out of library 2"
C00I-2	"cioned out of library-2
C-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins
Cy3	Cyanin3
Dbl	"diffus B-cell lymphoma"
DH	"Dbl homology" (Proteindomäne)
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagle Medium" (Zellkulturmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid"
ΠΝΔερ	Desovyribonuklesse
	Desoxy Nukloosid Triphosphot, Didosoxy Nukloosid Triphosphot
	Desoxy-Nukleosiu-Inpilospilal, Didesoxy-Nukleosiu-Inpilospilal
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zelikulturen
	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	"et altera" (und Andere)
EtOH	Ethanol
F-Aktin	filamentöses Aktin
FRS	fetal bovine serum"
	faciogonital dvenlacia"
	"Idologetillai uyspiasia Oromm Milliaromm Mikrogromm
g, mg, µg	
G	Guanin
G-Aktin	globuláres Aktin
GAP	"GTPase activating protein" (GTPase aktivierendes Protein)
GBD	"Git1-binding domain" (Proteindomäne)
GDI	"guanine nucleotide dissociation inhibitor" GTPase bindendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	"quanine nucleotide exchange factor"
GIT1	"G protein counled recentor-kinase interactor1"
GST	Glutathion_S_Transferaçe
	Outatilion-o-manaiciase Outanasin 5' triphosphet
	Guanosin-o -Inphosphat
GIPase	GDP/GTP-bindendes Protein mit GTPase-Aktivität

h	"hour"
HamF12	Zellkulturmedium
Hela	humane Zelllinie. Cervixkarzinom
HPLC	high pressure liquid chromatography" (Chromatographieverfahren)
HRP	"horseradish peroxidase" (Meerettich-Peroxidase)
HS	horse serum"
IF	Immunfluoreszenz
" " " " " " " " " " " " " " " " " " "	integrin-linked kinase"
IRSn53	insulin recentor substrate of 53 kDa"
	"INK interacting protein 2"
Kh	"ont-interacting protein-z
	Kilodaltan
Km	Kanamyoin
	Liter Milliliter Mikroliter
ι, πι, μι Ι D	Lucia Broth Modium
	Continetor Millimeter Mikrometer Nanometer
μ	Milliomnere
M	Mal
	IVIOI mitagan activated protain kingaa"
Mare Ninase	"milogen-activated protein kinase
	"Mammalian ENA
	Minute
MLK3	"mixed-lineage kinase 3"
mol, mmol, µmol,	MOI, MIIIIMOI, MIKROMOI
MR	
NGF	"nerve growth factor"
nmol, pmol	Nanomol, Pikomol
NP40	nichtionisches Detergenz P40
NS-XLMR	nicht-syndromale XLMR
N-Terminus	Aminoterminus eines Proteins
OD	Optische Dichte
p21	GTPase-Protein mit ca. 21 kDa Molekulargewicht
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	"p21 activated kinase"
PC12-Zellen	Phäochromocytom-Zellen (Ratte)
PCR	"polymerase chain reaction"
PBS	"phosphate buffered saline"
PFA	Paraformaldehyd
PH	"pleckstrin homolgy" (Proteindomäne)
PTB	"Phosphotyrosine binding" (Proteindomäne)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSD	postsynaptische Dichte
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rac	"ras-related C3 botulinum toxin substrate "
Ras	"rat sarcoma"
Rho	"Ras homologous member"
RNA	"ribonucleic acid"
RNAse A	Ribonuklease A
RPMI	Zellkulturmedium
RSID	"Rac-specific interaction domain"
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
S17N	Mutation von Serin nach Asparagin
SAP	"SLAM (signaling lymphocyte activation molecule)-associated protein"
SDS	"sodium dodecyl sulfate"
SH3	"Src homology" (Proteindomäne)
Shank	"SH3 domain and ankyrin repeat containing protein"
Т	Thymin
T61L	Mutation von Threonin nach Leucin
Tab.	Tabelle
TBS	"Tris-buffered saline

TBST	TBS + Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEMED	N'-N'-N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
U	"Units"
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	"volume per volume"
WB	Westernblot
WT	Wildtyp
w/v	"weight per volume"
WW	"Tryptophane-Tryptophane" (Proteindomäne)
XLMR	"X-linked mental retardation"

I. Zusammenfassung

Mitglieder der Familie der Rho-GTPasen, beispielsweise RhoA, Rac1 und Cdc42, üben bei verschiedenen zellulären Prozessen wie Transkription, Zellteilung, intrazellulären Transportvorgängen und vor allem bei der Reorganisation des Aktinzytoskeletts wichtige Funktionen aus. Für die kontrollierte Aktivierung der Rho-GTPasen sind Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren (GEFs) notwendig, die die Rho-GTPasen vom inaktiven, GDP-gebundenen in den aktiven, GTP-gebundenen Zustand überführen (Rho-GTPase-Zyklus). Die lokale, durch GEF-Proteine regulierte Aktivität der Rho-GTPasen ist für die Bildung von Zellfortsätzen während der Migration fibroblastenähnlicher Zellen, aber auch für das Auswachsen von Neuriten und die Bildung von Synapsen während der neuronalen Morphogenese von entscheidender Bedeutung. Gestützt werden diese Befunde durch das Auftreten von Mutationen in mehreren Genen, deren Genprodukte an verschiedenen Stellen in den Rho-GTPase Zyklus eingreifen, und die zu einer X-chromosomal vererbten geistigen Behinderung führen. Das ARHGEF6/aPIX-Gen, das für einen Rac1/Cdc42-spezifischen GEF kodiert, gehört hierzu. Eine der in ARHGEF6 gefundenen Mutationen führt zu einem Protein, dem im N-Terminus 28 Aminosäuren fehlen (ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83), und das nach Überexpression im Gegensatz zum Wildtyp-Protein in einem punktförmigen Muster im Zytoplasma verteilt vorliegt. Mithilfe von Koimmunfluoreszenzfärbungen sollte geklärt werden, ob es sich bei diesen Strukturen um Vesikel handelt, die an intrazellulären Transportprozessen beteiligt sind. Eine partielle Kolokalisation konnte mit γ -Adaptin, einer Untereinheit des AP-1-Komplexes nachgewiesen werden. AP-1-Komplexe sind mit bestimmten Vesikeln assoziiert und regulieren so vesikuläre Transportprozesse zwischen dem Trans-Golgi-Netzwerk, Endosomen und der Plasmamembran. Eine Koexpression von ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 mit der konstitutiv-aktiven Form der GTPase Rac1 bzw. Cdc42 führte zur Relokalisation des mutanten ARHGEF6/ α PIX-Proteins an die Zellperipherie. Diese Daten deuten an, dass ARHGEF6/αPIX vermutlich mit intrazellulären Vesikeln assoziiert ist und an der Regulation von Transportvorgängen beteiligt sein könnte.

FE65, ein im Vorfeld dieser Arbeit im Hefesystem identifizierter möglicher Interaktionspartner von ARHGEF6/αPIX, ist ein neuronales Adaptorprotein, das in Lamellipodien und neuronalen Wachstumskegeln lokalisiert ist und dort im Komplex mit Mena, einem Regulator der Aktinpolymerisation, an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts beteiligt ist. In dieser Arbeit konnte zunächst die Bindung von ARHGEF6/αPIX an FE65 mittels GST-Pulldown-Experimenten bestätigt und die für die Assoziation notwendigen Bereiche, die C-terminale coiled-coil-Domäne von ARHGEF6/ α PIX und der N-Terminus (AS136-254) von FE65, bestimmt werden. Mithilfe von Immunfluoreszenzanalysen wurde gezeigt, dass FE65 in CHO-K1-Zellen nach Koexpression mit ARHGEF6/ α PIX verstärkt an der Zellperipherie lokalisiert, was auf eine durch ARHGEF6/ α PIX vermittelte Translokation von FE65 an die Zellmembran hinweist. Dort könnte ARHGEF6/ α PIX durch die Bindung an FE65 und Rac1 bzw. Cdc42 an der Bildung eines Proteinkomplexes, in dem auch Mena vorkommt, beteiligt sein, der die Reorganisation des Aktinzytoskeletts und somit die Zellmigration stimuliert.

Um weitere Hinweise auf die Funktion von ARHGEF6/αPIX in einem neuronalen Zellsystem zu erhalten, sollte dessen Rolle bei der Ausbildung von Neuriten untersucht werden. Hierfür wurde das neuronale PC12-Zellsystem etabliert, da diese Zellen nach Stimulation mit NGF ("nerve growth factor") neuritenähnliche Zellfortsätze ausbilden, weshalb sie als Modellsystem für neuronale Differenzierung angesehen werden. Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass die Überexpression von ARHGEF6/aPIX sowie der Deletionsmutante ARHGEF6/αPIXΔSH3 zu einer verstärkten Lamellipodienund geringeren Neuritenbildung führte, während die Überexpression anderer ARHGEF6/aPIX-Deletionsmutanten eine normale Neuritenbildung in PC12-Zellen zur Folge hatte. Diese gualitative Beobachtung wurde durch eine statistische Auswertung bestätigt. Aufgrund der verstärkten Zellausbreitung und Lamellipodienbildung, die auch nach Überexpression von Rac1 (Wildtyp und konstitutiv-aktiver Variante) beobachtet wurde, kann vermutet werden, dass die ARHGEF6/aPIX-Überexpression zu einer Aktivierung von Rac1 führt. Eine Koexpression von ARHGEF6/aPIX mit PAK1, ein über die SH3-Domäne von ARHGEF6/aPIX interagierendes Protein, führte zu einer Revertierung des durch ARHGEF6/ α PIX vermittelten Phänotyps und damit zur Ausbildung von Neuriten. Im Gegensatz dazu breiteten sich PC12-Zellen nach Koexpression von ARHGEF6/aPIXASH3 mit PAK1 wieder verstärkt aus und bildeten keine Neuriten, was darauf hindeutet, dass PAK1 durch die Interaktion mit ARHGEF6/αPIX die ARHGEF6/aPIX-vermittelte Aktivierung von Rac1 negativ reguliert. Anaolog durchgeführte Experimente in CHO-K1-Zellen ergaben vergleichbare morphologische Veränderungen. Diese Daten deuten daraufhin, dass PAK1 in eukaryotischen Zellsystemen während der Bildung von Zellfortsätzen die GEF-Aktivität von ARHGEF6/αPIX beeinflusst, wodurch der Interaktion dieser Proteine bei der lokalen Aktivierung von Rac1, insbesondere während der neuronalen Morphogenese, eine entscheidende Rolle zuzukommen scheint.

II. Einleitung

1. Vesikeltransport in eukaryotischen Zellen

Der Transport von Proteinen und Lipiden erfolgt in eukaryotischen Zellen hauptsächlich durch Vesikel, welche sich als kleine Membranbläschen von einem Organell abschnüren und mit der Membran eines anderen fusionieren können (Palade et al., 1975). Das Endoplasmatische Reticulum (ER), der **Golgi-Apparat** sowie die **Endosomen** und **Lysosomen** sind Zellkompartimente, die in diese Transportprozesse involviert sind (Abb. 1).



Abb. 1: Vereinfachte Darstellung des intrazellulären Vesikeltransports

Der Endozytoseweg (grüne Pfeile) verläuft über frühe Endosomen zu Endosomen späten und zu Lysosomen. Im sekretorischen Weg (rote Pfeile) erfolgt der Transport vom ER zum Golgi-Apparat und zur Plasmamembran bzw. über die Endosomen zu den Lysosomen. Der Recycling-Weg (blaue Pfeile) bezieht sich auf Transportvorgänge von späten Endosomen über den Golgi zum ER bzw. von frühen Endosomen Plasmamembran zur (ER: Endoplasmatisches Retikulum: CGN: cis-Golgi-Netzwerk; TGN: trans-Golgi-Netzwerk; SV: sekretorische Vesikel; FE: frühes Endosom; SE: spätes Endosom; LY: Lysosom; PM: Plasmamembran).

Bei der Endozytose werden Proteine aus dem extrazellulären Raum über die Plasmamembran internalisiert und den **frühen Endosomen** ("early endosomes") zugeführt. Von hier aus erfolgt der Transport dann über **späte Endosomen** ("late endosomes") zu den **Lysosomen** (Endozytoseweg). Der sekretorische anterograde ("vorwärtsgerichtete") Transportweg verläuft vom ER über den Golgi-Apparat zu verschiedenen Zellkompartimenten (sekretorischer Weg). Hierbei werden während der Biosynthese sekretorische Proteine wie z.B. Antikörper und Hormone sowie membranständige Proteine wie beispielsweise Rezeptoren vom Golgi zu ihren Bestimmungsorten transportiert. Als retrograd ("rückwärtsgerichtet") wird der Transport vom Endosom über den Golgi-Apparat zum ER bzw. vom frühen Endosom zurück zur Plasmamembran bezeichnet (Recycling-Weg).

Eine der am besten untersuchten Klasse von Vesikeln sind die **Clathrinbeschichteten Vesikel** (**CCV**s; <u>"C</u>lathrin-<u>c</u>oated <u>v</u>esicles"), welche den Transport zwischen dem Golgi-Apparat, den Endosomen, den Lysosomen und der Plasmamembran vermitteln (Nakatsu und Ohno, 2003; Robinson, 2004). Die Hülle dieser Vesikel besteht aus Clathrin, das je nach Transportrichtung mit einem **Adaptorkomplex** assoziiert ist. Diese Adaptorkomplexe sind essentiell für die Sortierung von Proteinen in sich bildenden CCVs (Kirchhausen, 2000; Nakatsu und Ohno, 2003; Owen et al., 2004). Es wird zwischen verschiedenen Adaptorkomplexen, AP-1, AP-2, AP-3 und AP-4, unterschieden, die sich jeweils aus vier verschiedenen, verwandten Untereinheiten zusammensetzen (β 1- β 4; μ 1- μ 4; σ 1- σ 4; α , γ , ε , δ) und in verschiedene Transportwege involviert sind (Abb. 2).



Abb. 2: Übersicht über verschiedene intrazelluläre Transportwege, in die Adaptorkomplexe involviert sind

Die Adaptorkomplexe bestehen aus vier verschiedenen Untereinheiten, die angegeben sind. Der AP-2-Komplex ist an der Plasmamembran bei der Bildung von CCVs während der Endozytose beteiligt. AP-1 ist an der Regulation des Vesikeltransports zwischen Endosomen und dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) beteiligt. AP-3 spielt beim Transport von frühen Endosomen bzw. vom TGN zu späten Endosomen bzw. Lysosomen eine Rolle. AP-4 ist am Transport bestimmter lysosomaler Proteine vom TGN zu Lysosomen beteiligt. Die Pfeile zeigen die Richtung des Transports an [verändert nach: Ohno (2006), J.Cell.Sci. 119, 3719-3721].

Der Transport dieser Vesikel erfolgt unter Energieverbrauch entlang der Mikrotubuli und des **Aktinzytoskeletts**. Eine aktinabhängige Bewegung konnte bereits für verschiedene Vesikel *in vivo* gezeigt werden (Merrifield et al., 1999; Rozelle et al., 2000). Inzwischen sind auch Proteine bekannt, wie z.B. die GTPase Dynamin, die die Endozytosemaschinerie mit Bestandteilen des Aktinzytoskeletts verbindet (Cao et al., 1998).

2. Das Aktinzytoskelett

Das Zytoskelett eukaryotischer Zellen befindet sich in ständigem Umbau, denn es ist neben Transportvorgängen auch an einer Vielzahl anderer komplexer Abläufe wie etwa der Zellteilung, Zellmigration und dem Kontakt mit der extrazellulären Matrix beteiligt. Mithilfe vieler akzessorischer Proteine wird eine hohe Flexibilität und Variabilität des Aktinzytoskeletts erreicht, welche es der Zelle ermöglicht, schnell und koordiniert auf verschiedenste Stimuli zu reagieren. F-Aktin ("filamentöses Aktin") entsteht durch Polymerisation einzelner Aktin-Monomere (G-Aktin), welche durch eine Vielzahl regulatorischer, Aktin-bindender Proteine kontrolliert wird. Jedes Filament wächst am Plus-(+)Ende und verkürzt sich am Minus-(-)Ende (Hall, 1994). F-Aktin kommt im gesamten Zytoplasma eukaryotischer Zellen vor, bildet jedoch unterhalb der Plasmamembran ein so genanntes kortikales Netzwerk aus, wodurch ein mechanischer Schutz für die Zelle entsteht. Tierische Zellen besitzen ein hohes Maß an Bewegungsfähigkeit, welche für die schnelle Reaktion auf verschiedenste Stimuli essentiell sein kann. So bilden sich bei Zell-Bewegungen an der Plasmamembran flächige, dünne Fortsätze, als Lamellipodien bezeichnete Strukturen aus, welche aus einem dichten, geordneten F-Aktin-Netzwerk aufgebaut sind. Filopodien, dünne, fingerförmige Membranausstülpungen, bestehen dagegen aus parallel orientierten Aktin-Filamenten (Welch et al., 1997). Lamellipodien und Filopodien sind an der Ausbildung neuer Zell-Substrat-Kontakte beteiligt. An Kontaktstellen zwischen Zelle und Substrat bilden sich fokale Adhäsionen aus. Filopodien und Lamellipodien, die keinen Kontakt zum Substrat aufnehmen, klappen als Membranumstülpungen über die Zelle in Richtung Zellmitte weg (Rottner et al, 1999). An den Substrat-Kontaktstellen vermitteln Transmembran-Proteine, wie Integrine, eine Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und intrazellulären Aktinfilamenten. Durch Aggregation von Integrinen und Anlagerung weiterer Proteine auf der intrazellulären Seite entstehen dann fokale Komplexe, die durch Protein-Umstrukturierungen zu fokalen Kontakten reifen. An diesen Zell-Matrix-Kontakten enden gebündelte Aktinfibrillen. genannte Stressfasern. welche durch Interaktion SO mit Myosinfilamenten kontraktile Eigenschaften besitzen (Abb. 3).



Abb. 3: Verschiedene Aktin-haltige Strukturen einer Fibroblastenzelle

In einer Fibroblastenzelle sind Aktinbeinhaltende Strukturen in roter Farbe angedeutet. Filopodien, fingerartige dünne bestehen Zellfortsätze, aus parallel angeordneten Aktinfilamenten, während diese in Lamellipodien und Membranumstülpungen vernetzt angeordnet sind. Kontraktile Stressfasern sind über den gesamten Zellkörper verteilt [verändert nach Luo (2000),Nat.Rev.Neurosci. 1, 173-180].

Da Aktin in eine Vielzahl verschiedener zellulärer Prozesse involviert ist und unterschiedlichste biologische Funktionen erfüllt, ist eine komplexe Regulation des Aktinzytoskeletts essentiell. Durch intensive Forschung auf diesem Gebiet hat sich gezeigt, dass der Proteinfamilie der **Rho-GTPasen** hierbei eine Schlüsselrolle zukommt (Hall, 1994; Nobes und Hall; 1995; Hall, 1998).

3. Rho-GTPasen

Die Familie der Rho-GTPasen (<u>"Ras ho</u>mology") stellt eine Untergruppe der Ras-Superfamilie kleiner GTPasen dar, deren Molekulargewichte zwischen 25 und 40 KDa liegen (Takai et al., 2001). GTPasen werden auch als "molekulare Schalter" bezeichnet, da sie zwischen zwei Konformationsstadien wechseln können. In der "abgeschalteten", inaktiven Form liegen sie GDP-gebunden vor, während sie in der "angeschalteten", aktiven Form an GTP gebunden sind. In diesem aktiven Zustand können sie aufgrund einer Konformationsänderung mit über 60 verschiedenen Zielproteinen interagieren und dadurch die Signalweiterleitung fortsetzen, bis sie durch die Hydrolyse von GTP nach GDP wieder inaktiviert werden (Etienne-Manneville und Hall, 2002). Diese Vorgänge sind im GTPase-Zyklus zusammengefasst, welcher von drei verschiedenen Klassen von Regulatorproteinen beeinflusst werden kann (Abb. 4).



Abb. 4: Der Rho-GTPase-Zyklus

Der Übergang der inaktiven Rho-GTPase (Rho-GDP) in die aktive Form (Rho-GTP) wird durch Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) stimuliert. In dieser aktivierten Form ist die Rho-GTPase in der Lage, mit einer Vielzahl von Effektorproteinen (Effektoren) zu interagieren, um intrazelluläre Signale weiterzuleiten. Durch Hydrolyse von GTP nach GDP wird die GTPase in die inaktive Form überführt. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) beschleunigen diesen Vorgang. GDP-Dissoziationsinhibitoren (GDI) stabilisieren den inaktiven Zustand. (GDP: Guanosin-5'-diphosphat; GTP: Guanosin-5'-Triphosphat; Pi: Orthophosphat)

Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (**GEF**s; <u>"g</u>uanine nucleotide <u>e</u>xchange <u>f</u>actor") aktivieren die GTPasen, indem sie den Austausch von GDP nach GTP katalysieren. Sie erleichtern die Dissoziation von GDP und stabilisieren so die nukleotidfreie GTPase. Da GTP in der Zelle im Vergleich zu GDP im Überschuss vorliegt, bindet GTP an den GEF-GTPase-Komplex und die GTP-gebundene GTPase löst sich vom GEF. Im Gegensatz dazu fördern **GTPase-aktivierende Proteine** (**GAP**s; <u>"G</u>TPase <u>a</u>ctivating <u>p</u>rotein") die intrinsische GTP-Hydrolyse-Aktivität und beschleunigen so den Übergang in den inaktiven Zustand. Dieser kann durch **Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitoren** (**GDI**s; <u>"g</u>uanine nucleotide <u>d</u>issociation <u>i</u>nhibitor") stabilisiert werden, welche mit einer erhöhten Affinität an GDP-gebundene GTPasen binden und dadurch die spontane bzw. GEF-stimulierte Ablösung von GDP blockieren (Symons und Settleman, 2000).

3.1 Rho-GTPasen sich wichtige Regulatoren des Aktinzytoskeletts

Bis heute wurden 22 Mitglieder der Rho-GTPase-Familie identifiziert, von welchen **RhoA**, **Rac1** und **Cdc42** am besten charakterisiert sind (Etienne-Maneville and Hall, 2002; Rossman et al., 2005). Ein Aminosäureaustausch von Serin nach Asparagin an der Position 17 (S17N) führt dazu, dass die GTPase mit erhöhter Affinität an GEFs bindet. Nach ektopischer Expression einer solchen dominant-negativen Mutante in eukaryotischen Zellen bindet diese GTPase an zelluläre GEF-Proteine, wodurch endogen vorhandene GTPasen nicht mehr aktiviert werden können. Dagegen bewirkt der Aminosäureaustausch von Threonin nach Leucin an der Position 61 (T61L) eine Erhöhung der intrinsischen GTPase-Aktivität und diese Proteinvariante ist damit

konstitutiv-aktiv (Feig, 1999; Ridley, 2001b). Mithilfe dieser Proteinvarianten konnte u. a. gezeigt werden, dass in allen eukaryotischen Zellen eine der wichtigsten Funktionen dieser GTPasen die Reorganisation des Aktinzytoskeletts ist (Hall, 1994; Nobes und Hall, 1995; Hall, 1998). So spielt RhoA vor allem bei der Bildung kontraktiler Stressfasern und fokaler Adhäsionen eine wichtige Rolle (Ridley et al., 1992a). Die Aktivierung von Rac1 führt zur Bildung von Lamellipodien und Membranumstülpungen (Ridley et al., 1992b), wohingegen aktiviertes Cdc42 die Ausbildung von Filopodien fördert (Nobes und Hall, 1995; Kozma et al., 1995). Es bestehen jedoch enge Verbindungen zwischen den Ras- und den einzelnen Mitgliedern der Rho-GTPasen. So kann Ras wie auch Cdc42 über die Aktivierung von Rac1 die Bildung von Lamellipodien induzieren. Rac1 wiederum ist in der Lage, RhoA zu aktivieren und damit die Ausbildung von Stressfasern zu fördern (Ridley et al., 1992b, Nobes und Hall, 1995). Obwohl die Rolle der Rho-GTPasen bei der Umorganisation des Aktinzytoskeletts am besten in Fibroblastenzellen untersucht wurde, ist heute auch bekannt, dass die Aktivität dieser Proteine in neuronalen Zellen ebenfalls von großer Wichtigkeit ist (Hall, 1998).

3.2 Rho-GTPasen bei der neuronalen Morphogenese

Neurone sind hochspezialisierte Zellen, die die Grundeinheit des gesamten Nervensystems bilden und deren Hauptfunktion die Verarbeitung, Weiterleitung und Speicherung von Informationen ist. Die Entwicklung eines Neurons beginnt mit der Wanderung einer neuronalen Vorläuferzelle in neu entstehendes Nervengewebe (Hatten, 1999). Dort differenzieren sich die Zellen, indem sich Axone (Neuriten) und Dendriten bilden, die über Synapsen mit anderen Zielzellen Kontakte ausbilden. Diese Prozesse gehen mit einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts einher. So finden sich auch in Neuronen zu Fibroblasten strukturell analoge Aktinstrukturen (Abb. 5).



Abb. 5: Verschiedene Aktinstrukturen eines neuronalen Wachstumskegels

Filopodien sind lange, fingerförmige Membranausstülpungen und beinhalten parallel angeordnete Aktinfilamente. Dazwischen liegende Lamellipodien sind aus einem dichten Aktin-Netzwerk aufgebaut. Aktin-basierende Strukturen sind rot gefärbt [verändert nach Luo (2000), Nat.Rev.Neurosci. 1, 173-180].

Neuronale Wachstumskegel ("neuronal growth cones") an den Spitzen der Axone sind hochmobile Strukturen, die eine Sensorfunktion für attraktive und repulsive Signale einnehmen und somit das gerichtete Auswachsen eines Axons regulieren können. Auch diese Strukturen bilden Filopodien und Lamellipodien aus, durch deren kontinuierlichen Auf- und Abbau sie die Umgebung abtasten und somit bei der Wegfindung eine wichtige Rolle spielen (Heidemann, 1996; Luo et al., 1996). Vor allem die Initiation, das Wachstum und die Wegfindung von Neuriten wird durch die Aktivität von Rho-GTPasen reguliert. In neuronalen Zellsystemen und neuronalen Primärkulturen wurde gezeigt, dass Cdc42 und Rac1 das Wachstum von Neuriten positiv regulieren. Auch hier führt eine Aktivierung von Cdc42 zur Bildung von Filopodien, wohingegen aktiviertes Rac1 die Lamellipodienbildung stimuliert. Dagegen hemmt aktiviertes RhoA das Auswachsen von Neuriten, stimuliert die Verkürzung bereits gebildeter Neuriten und übernimmt somit eine negative Regulatorfunktion. Vergleichbare Funktionen für Rac1, Cdc42 und RhoA wurden auch bei der Bildung von Dendriten beobachtet (Luo et al.; 2000, Govek et al., 2005). Dendriten sind zytoplasmatische Zellfortsätze, die stark verzweigt sind und durch die Ausbildung dendritischer Dornen ("dendritic spines") mit Neuriten anderer Zellen Synapsen ausbilden können. Unreife dendritische Dornen ähneln Filopodien und bilden erst nach Reifung eine charakteristische Pilzform aus (Harris, 1999). Die Bildung und Morphogenese dieser Aktin-reichen Strukturen ist ebenfalls abhängig von einer regulierten Reorganisation des Aktinzytoskeletts, bei der auch Rho-GTPasen eine wichtige Rolle spielen. So führt die konstitutive Aktivierung von RhoA zu einer Verkürzung der Dornenlänge und einer Abnahme der Dichte, während konstitutiv aktives Rac1 die Dornendichte erhöht (Nakayama et al. 2000; Tashiro et al., 2000; Pilpel und Segal, 2004). Man geht davon aus, dass die gegensätzlichen

Wirkungsweisen der Rho-GTPasen für die Regulation des Aktinzytoskeletts bei fast allen Vorgängen der neuronalen Morphogenese unerlässlich sind (Govek et al., 2005). Diese Vermutung wird dadurch bestätigt, dass Mutationen in einigen Genen, die für Proteine des Rho-GTPase-Zyklus kodieren, zu einer vererbten geistigen Behinderung (MR; "mental retardation") führen. Bis heute sind fünf entsprechende Gene, die alle Xchromosomal lokalisiert sind, bekannt (Ropers, 2006): OPHN1 kodiert für das Rho-GAP-Protein Oligophrenin-1 (Billuart et al. 1998; Faucherau et al., 2003) und PAK3 für ein Effektorprotein aktivierter Rho-GTPasen (Allen et al., 1998; Bienvenu et al., 2000; Gedeon et al., 2003). FGD1, ARHGEF9 und ARHGEF6 kodieren für Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (Pasteris et al., 1994; Kutsche et al., 2000; Harvey et al. 2004). Diese Daten zeigen, dass auch Veränderungen, die die Regulation der Aktivität von Rho-GTPasen betreffen, möglicherweise Auswirkungen auf die neuronale Morphogenese haben. So konnte für verschiedene Rho-GEFs bereits eine wichtige Funktion während der neuronalen Entwicklung nachgewiesen werden, denn als regulatorisch wirkende Proteine können sie zeitlich und räumlich auf die Aktivität der GTPasen einwirken (Schmidt und Hall, 2002).

ARHGEF6/αPIX – ein Rac1/Cdc42-spezifischer Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor

Die Identifizierung des ersten Säugetier-GEFs erfolgte aus Zellen eines diffusen B-Zell-Lymphoms und wurde aufgrund dessen als **Dbl** ("diffuse B-cell lymphoma") bezeichnet (Eva and Aaronson, 1985). Nachfolgend konnte gezeigt werden, dass Dbl den Nukleotidaustausch an der GTPase Cdc42 stimuliert (Hart et al., 1991). Bis heute wurden beim Menschen 69 Mitglieder der Dbl-Familie identifiziert, zu der fast alle Rho-GEFs zählen (Rossman et al., 2005). Durch die Fähigkeit der GEFs, GTPasen zu aktivieren, stellen sie wichtige Schnittpunkte vieler intrazellulärer Signalwege dar. Das X-chromosomal lokalisierte **ARHGEF6**-Gen (<u>"alpha rho guanine nucleotide exchange</u> factor 6") kodiert für ein in der Literatur als αPIX (" αPAK interacting exchange factor") oder **Cool-2** (<u>"cloned out of library-2"</u>) beschriebenes Protein, das ebenfalls der Familie der GEFs für Rho-GTPasen zugeordnet wird. Mutationen in ARHGEF6 führen zu einer nicht-syndromalen Form der X-chromosomal vererbten, mentalen Retardierung (NS-XLMR) (Kutsche et al., 2000). Eine der zwei identifizierten Mutationen in ARHGEF6 führte beim Spleißvorgang zu einem präferentiellen Überspringen des Exons 2, das hat. keine Leserasterverschiebung zur Folge Dem aberranten Protein (ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83) fehlen lediglich 28 Aminosäuren im N-Terminus. Immunfluoreszenzstudien in CHO-K1-Zellen ergaben, dass diese Deletion zu einer veränderten subzellulären Lokalisation des Proteins führt, wodurch es u. U. nicht mehr

zur Aktivierung von Rac1 und Cdc42 kommt (Rosenberger et al., 2003). Arhgef6-Knockout-Mäuse zeigen keine offensichtlichen morphologischen Auffälligkeiten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Durch verschiedene Verhaltenstests wurden jedoch Defizite im Lernvermögen dieser Tiere festgestellt. Es wird vermutet, dass dies auf die beobachtete Abwesenheit von Arhgef6/ α Pix und der damit verbundenen verminderten Rac1- und Cdc42-Aktivierung im Hippocampus zurückzuführen ist (Kuchenbecker, 2006).

4.1 Expression und Spleißvarianten

Das humane ARHGEF6/ α PIX-Gen ist ubiquitär exprimiert (Manser et al., 1998). Die Expression von murinem Arhgef6/aPix ist ebenfalls ubiquitär, eine starke Expression konnte jedoch in der Milz, eine vergleichsweise schwache Expression im adulten Gehirn beobachtet werden. Es wurde eine Funktion von Arhgef6/ α Pix bei der Embryonalentwicklung vermutet, da Arhgef6/αPix-mRNA in frühen Entwicklungsstadien der Maus nachgewiesen werden konnte (Kutsche und Gal, 2001; Kohn et al., 2004). Neueste Analysen an der Arhgef6/ α Pix-Knockout-Maus bestätigen das ubiquitäre Vorkommen des Arhgef6/aPix-Proteins (Kuchenbecker, 2006). Des Weiteren gibt es Hinweise auf das Vorhandensein verschiedener Spleißvarianten. So konnten auf Proteinebene in verschiedenen Geweben sechs putative Arhgef6/aPix-Isoformen detektiert werden, wovon eine auf cDNA-Ebene charakterisiert wurde (Kuchenbecker, 2006). Die genauere Analyse verschiedener Gehirnbereiche ergab eine Arhgef6/αPix-Expression in Hippocampus und Cortex, auf zellulärer Ebene konnte das Protein in Neuronen und Astrozyten nachgewiesen werden. Diese Daten sowie der Nachweis von Arhgef6/ α Pix in der postsynaptischen Dichte (PSD) lassen eine wichtige Rolle des Proteins während der neuronalen Entwicklung und bei der Bildung von Synapsen und dendritischen Dornen vermuten (Kuchenbecker, 2006).

4.2 Domänenstrukur und Interaktionspartner

Wie alle GEFs setzt sich auch ARHGEF6/ α PIX aus mehreren funktionellen Domänen zusammen (Abb. 6).





Die funktionellen Proteindomänen sind als farbige Kästchen dargestellt. Die Pfeile zeigen auf die mit der jeweiligen Domäne interagierenden Proteine. CH/ : <u>calponin homology; SH3/ : Src homology 3; DH/ : Dbl homology; PH/ : pleckstrin homology; GBD/ : GIT1-binding domain; CC/ : coiled-coil.</u>

Am N-Terminus des ARHGEF6/αPIX-Proteins befindet sich eine CH-Domäne ("calponin homology"). Proteine mit zwei in Tandem angeordneten CH-Domänen sind in der Lage F-Aktin zu binden (Gimona et al., 2002); die Funktion einer einzelnen CH-Domäne konnte bisher jedoch noch nicht vollständig geklärt werden. Bei ARHGEF6/ α PIX wird die Interaktion mit β -Parvin u. a. über die CH-Domäne vermittelt (Rosenberger et al., 2003). Die Integrität der CH-Domäne von ARHGEF6/aPIX scheint auch bei der Lokalisation des Proteins in der Zelle notwendig zu sein, denn eine Deletion von 28 Aminosäuren innerhalb der CH-Domäne führt zu einer veränderten subzellulären Lokalisation im Vergleich zum Wildtyp-Protein (Rosenberger et al., 2003). C-terminal von der CH-Domäne besitzt ARHGEF6/αPIX eine SH3-Domäne ("Src homology domain 3"), über welche Interaktionen mit prolinreichen Sequenzen anderer Proteine vermittelt werden. ARHGEF6/aPIX interagiert über die SH3-Domäne mit **PAK** ("p21-activated kinases") (Manser et al., 1998; Bagrodia et al., 1998) und Cbl ("Casitas <u>B-lymphoma"</u>) (Flanders et al., 2003). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Rac1 an diese Domäne binden kann (ten Klooster et al., 2006a). In einer aktuellen Arbeit wurde SAP, ein SLAM (signalling lymphocyte activation molecule) assoziiertes Protein, als weiterer Interaktionspartner der PIX-SH3-Domäne identifiziert (Gu et al., 2006). Im zentralen Bereich des Proteins weist ARHGEF6/aPIX, wie alle Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren der Dbl-Familie, eine DH-Domäne ("Dbl homology") und eine C-terminal benachbarte PH-Domäne ("pleckstrin homology") auf, welche die katalytische Einheit des Proteins darstellen. Während die DH-Domäne den Nukleotidaustausch katalysiert, bindet die PH-Domäne an Inositol-Phospholipide (PIPs) und reguliert somit vermutlich die intrazelluläre Lokalisation des Proteins

(Rebecci und Scarlata, 1998; Lemmon und Ferguson, 2000). Im C-terminalen Bereich der PH-Domäne konnte ebenfalls eine Rac1-Interaktionsseguenz identifiziert werden (Feng et al., 2004). Studien über die Regulation der GEF-Aktivität ergaben, dass dimerisiertes ARHGEF6/ α PIX in der Lage ist, Rac1 zu aktivieren, während ARHGEF6/aPIX-Monomere sowohl Rac1 als auch Cdc42 aktivieren können (Feng et al., 2004; Baird et al., 2005). Für ARHGEF6/aPIX konnte kürzlich gezeigt werden, dass für die Interaktion mit Calpain 4, der kleinen Untereinheit der Protease Calpain, das Domänenmodul SH3-DH-PH notwendig ist (Rosenberger et al., 2005). Am C-Terminus von ARHGEF6/aPIX befindet sich eine **GBD-Domäne** ("GIT1-binding"), welche für die Interaktion mit GIT1 (<u>"G</u> protein-coupled receptor kinase interacting target <u>1</u>"), auch unter der Bezeichnung CAT-1 ("cool-associated tyrosine phosphorylated protein 1") bekannt, notwendig ist (Bagrodia et al., 1999; Turner et al., 1999). Als multifunktionelle Proteine spielen Mitglieder der GIT-Familie bei verschiedenen zellulären Prozessen, wie der Regulation des Aktinzytoskeletts, Vesikeltransport und der Aktivierung verschiedener Signalmoleküle, eine Rolle (Hoefen und Berk, 2006). Über die CC-**Domäne** ("coiled-coil") am carboxyterminalen Ende des ARHGEF6/aPIX-Proteins wird vermutlich die Interaktion mit CC-Domänen anderer Proteine vermittelt. Manser et al. (1998) konnten zeigen, dass ARHGEF6/aPIX und das sehr homologe Protein ARHGEF7/βPIX Heterodimere bilden. Aber auch eine Homodimerisierung von ARHGEF6/aPIX, vermittelt über die CC-Domäne, wurde nachgewiesen (Rosenberger, 2003; Feng et al., 2004). Durch die Interaktion mit einer Vielzahl verschiedener Proteine ist ARHGEF6/aPIX in der Zelle in verschiedenste Signalwege involviert (Rosenberger und Kutsche, 2006).

4.3 ARHGEF6/ α PIX spielt mit β -Parvin und Calpain eine wichtige regulatorische Rolle während der Bildung fokaler Adhäsionen

Nach der Kontaktaufnahme einer Zelle mit Proteinen der extrazellulären Matrix haftet sich diese an das Substrat an (**Adhäsion**) und beginnt sich auszubreiten (**Zellausbreitung**). Dieser Prozess erfordert die kontinuierliche Neubildung und Remodellierung fokaler Adhäsionen und ist abhängig von Integrinen, die die Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und dem Aktinzytoskelett herstellen (Rottner et al., 1999; Abbi und Guan, 2002). Kürzlich wurde gezeigt, dass die Überexpression von ARHGEF6/ α PIX zu einer Verstärkung der Integrin-abhängigen Zellausbreitung führt (Rosenberger et al., 2005). β -Parvin ist ein fokales Adhäsionsprotein mit zwei tandemförmigen CH-Domänen, wobei über die N-terminale CH-Domäne die Interaktion mit ARHGEF6/ α PIX vermittelt wird (Mishima et al. 2004; Sepulveda und Wu, 2006). Calpain 4 ist die kleine regulatorische Untereinheit der

calciumabhängigen Cystein-Proteasen m- und μ -Calpain. Einige ihrer Substrate, wie z.B. α -Actinin und β -Integrine, spielen bei der Zelladhäsion und Zellfortbewegung eine Rolle (Glading et al., 2002; Sato und Kawashima, 2002). ARGHEF6/ α PIX kolokalisiert mit β -Parvin und Calpain sowie mit β 1-Integrin und ILK (<u>"integrin-linked kinase"</u>) in frühen Integrin-haltigen Komplexen, welche sich direkt nach der Zellausbreitung bilden. Dies deutet auf eine Beteiligung von ARHGEF6/ α PIX bei Integrin-abhängigen Signalwegen, wie Zelladhäsion, -ausbreitung und -migration hin (Rosenberger et al., 2003; 2005; Rosenberger und Kutsche, 2006) (Abb. 7).





Abb. 7: Modell eines Signalwegs während der Integrin-abhängigen Zellausbreitung

Während der Adhäsion an die extrazelluläre Matrix bilden sich frühe Integrin-haltige Komplexe. Durch β-Parvin, das über ILK an Integrine gebunden ist, könnte ARHGEF6/aPIX zusammen mit Calpain zu frühen Integrin-haltigen Komplexen rekrutiert werden. Calpain könnte dort fokale Adhäsionsproteine abbauen. ARHGEF6/αPIX führt vermutlich durch die Aktivierung von Rac1 und Cdc42 in der Umgebung der fokalen Adhasionskomplexe zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts [verändert nach Rosenberger und Kutsche (2006), Eur.J.Cell.Biol., 85, 265-274].

4.4 ARHGEF6/αPIX, PAK und GIT1 sind Teil eines Proteinkomplexes, der sich zwischen Endosomen und der Plasmamembran hin- und herbewegt

Die **p21-aktivierten Kinasen** (**PAK**s) gehören zur Familie der Serin/Threonin-Proteinkinasen, gut charakterisierte Effektorproteine von Rho-GTPasen (Manser et al., 1994). Gleichzeitig kann PAK über eine prolinreiche Region direkt mit der SH3-Domäne von ARHGEF6/ α PIX bzw. ARHGEF7/ β PIX interagieren (Manser et al., 1998; Obermeier et al., 1998). So ist PAK auch in den Signalweg oberhalb der GTPasen involviert und kann durch Bindung an ARHGEF7/ β PIX zur Lamellipodienbildung führen (Obermeier et al., 1998). Diese Interaktion scheint auch bei der Bildung fokaler Adhäsionen eine wichtige regulatorische Funktion einzunehmen (Stofega et al., 2004). **GIT1**, ein weiterer Interaktionspartner von ARHGEF6/ α PIX, hat eine komplexe Domänenstruktur und ist in der Lage, mit vielen Proteinen zu interagieren. Über eine mögliche Funktion der ARHGEF7/ β PIX mehr Daten vorliegen. Man geht davon aus, dass GIT- und PIX-Proteine in der Zelle Komplexe ausbilden (Premont et al., 2004), zu welchen PAK über die direkte Interaktion mit PIX rekrutiert werden kann (Premont et al., 2000; Zhao et al., 2000). Diese GIT-PIX-PAK-Komplexe können zwischen verschiedenen zellulären Kompartimenten zur Regulation der Bildung fokaler Adhäsionen wechseln (zusammengefasst in Rosenberger und Kutsche, 2006). Eine wichtige Funktion kommt diesem Signalkomplex auch bei der Neuritenbildung zu. So ist in PC12-Zellen für die Translokation dieses Komplexes an die Zellperipherie und für die Bildung von Neuriten eine Phosphorylierung von ARHGEF7/ β PIX durch PAK notwendig (Shin et al., 2002). In Neuronen wird ARHGEF7/ β PIX durch GIT1 an die Zellperipherie rekrutiert. Auch hier kommt dem Komplex bestehend aus GIT-ARHGEF7/ β PIX-PAK-Rac1 eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung dendritischer Synapsen zu (Bagrodia et al., 1999; Manabe et al., 2002; Zhang et al., 2003). Da ARHGEF6/ α PIX und ARHGEF7/ β PIX sehr homologe Proteine sind, ist es möglich, dass sie bei verschiedenen zellulären Prozessen eine vergleichbare Funktion übernehmen können.

4.5 ARHGEF6/αPIX interagiert im Hefesystem mit dem neuronalen Adaptorprotein FE65

Das **FE65**-Protein, auch als APBB1 ("amyloid- β precursor protein-binding family B 1") bekannt, ist ein neuronales Adaptorprotein, das im gesamten Gehirn, im speziellen in Neuronen, stark exprimiert ist (Kesavapany et al., 2002; Sabo et al., 2003). Es besitzt drei bekannte Protein-Protein-Interaktionsdomänen, über welche die Bindung an andere Proteine vermittelt werden kann. So ist FE65 durch Interaktion mit APP ("amyloid-β precursor protein") und Mena ("mammalian enabled") in Lamellipodien und neuronalen Wachstumskegeln an der Regulation des Aktinzytoskeletts beteiligt (Sabo et al., 2001; 2003). Mena gehört zur Ena/VASP-Proteinfamilie ("enabled/vasolidator stimulated phosphoprotein"), deren Mitglieder an der Regulation des Aktinzytoskeletts, insbesondere bei der Ausbildung von Lamellipodien beteiligt sind. Dabei spielen sie bei der Rekrutierung von Profilin-Aktin-Komplexen zur Plasmamembran eine wichtige Rolle (Hüttelmaier et al., 1998; Bear et al., 2002; Cramer, 2002). Für FE65 ist eine weitere Funktion im Kern bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass FE65 dort zusammen mit dem zytoplasmatischen Teil von APP, der Histonacetyltransferase Tip60 und verschiedenen anderen Proteinen einen Multiproteinkomplex bildet und dadurch die Transkription bestimmter Gene reguliert (Cao und Sudhof, 2001; von Rotz et al., 2004). In Abb. 8 sind beide Funktionen von FE65 vereinfacht dargestellt.



Abb. 8: Modell für die Funktion von FE65 an der Zellmembran und im Zellkern

(A) An der Zellmembran interagiert FE65 innerhalb eines Multiproteinkomplexes mit dem zytoplasmatischen Teil des Transmembranproteins APP. Gleichzeitig bindet es an Mena, das die Aktinpolymerisation in Verbindung mit anderen Proteinen reguliert [verändert nach Sabo et al. (2001), J.Cell.Biol., 153, 1403-1414]. (B) FE65 interagiert mit der C-terminalen, intrazellulären (iz) Domäne von APP im Zytoplasma der Zelle. Nach Abspaltung des intrazellulären Teils von APP durch eine γ -Secretase, transloziert FE65 mit APP (iz) in den Zellkern. Dort regulieren sie zusammen mit der Histonacetyltransferase Tip60 und verschiedenen anderen Proteinen die Transkription bestimmter Gene.

Neuere Studien lassen vermuten, dass FE65 eine wichtige Rolle während der Gehirnentwicklung spielt, denn im Mausmodell resultiert die *Fe65*-Defizienz in heteround homozygoten Tieren in einer signifikant verminderten Lernfähigkeit (Wang et al., 2004). Aktuell wird davon ausgegangen, dass die Ursachen einer mentalen Retardierung in Störungen während der Synapsenbildung und der Differenzierung von Neuriten und Dendriten liegen (Newey et al., 2005; Govek et al., 2005). Ein wichtiges Ziel für die Zukunft wird sein, die physiologischen Aspekte der geistigen Behinderung mit molekularen und zellbiologischen Aspekten in Verbindung zu bringen (Newey et al., 2005). Hierbei wird neben der Analyse von Tiermodellen ein Fokus auf zell- bzw. neurobiologischen Ansätzen liegen, wobei man sich verschiedene *in vitro*-Modellsysteme zunutze macht.

5. PC12-Zellen – ein neuronales Zellsystem

PC12-Zellen (<u>"Phaeochromocytoma"</u>) wurden in den siebziger Jahren aus dem Nebennierentumor einer bestrahlten Ratte isoliert (Greene und Tischler, 1976). Die Zellen dieser hieraus entstandenen Zelllinie haben die Fähigkeit, durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren reversibel neuritenähnliche Zellfortsätze auszubilden. Aufgrund dessen werden sie auch als Modellsystem zur Untersuchung neuronaler Differenzierung und Entwicklung angesehen. Die Stimulation kann mit verschiedenen

Wachstumsfaktoren erfolgen, wobei am häufigsten der Nervenwachstumsfaktor NGF ("nerve growth factor") verwendet wird (Abb. 9).



Abb. 9: Morphologie von PC12-Zellen während der Kultivierung in Ab- und Anwesenheit von NGF

Das obere Bild zeigt die lichtmikroskopische Aufnahme von PC12-Zellen in Kultur ohne stimulierende Faktoren wie NGF im Medium. Die Zellen sind klein und weisen eine kugelige Morphologie auf. Im unteren Bild sind mehrere Tage in Anwesenheit von NGF kultivierte PC12-Zellen dargestellt. Der Zellkörper bleibt klein und kugelig, die Zellen bilden jedoch neuritenähnliche lange, dünne Zellausläufer, die ein Netzwerk ausbilden (Quelle: www.med.ufl.edu/biochem/dlpurich).

Der Ausbildung neuritenähnlicher Zellfortsätze liegt eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts zugrunde. So konnte bereits in mehreren Studien eine Rolle verschiedener Rho-GTPasen bei der Differenzierung von PC12-Zellen beschrieben werden. RhoA reguliert auch in diesem Zellsystem das Neuritenwachstum negativ, wohingegen Rac1 und Cdc42 an der Ausbildung von Neuriten beteiligt sind (Jalink et al., 1994; Lamoureux et al., 1997; Katoh et al., 1998). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass hierbei die räumliche und zeitliche Aktivierung von Rac1 und Cdc42 eine wichtige Rolle spielt (Aoki et al., 2004). In diesem Fall ist die Aktivierung jedoch abhängig von der Aktivität der PI3-Kinase ("phosphatidylinositol 3-kinase") und der Rac1/Cdc42spezifischen GEFs Vav1 und Vav2 (Aoki et al., 2005). Die NGF-Bindung an den NGF Rezeptor in PC12-Zellen führt u.a. zur Aktivierung der PI3-Kinase (Kobayashi et al., 1997). In nicht neuronalen Zellen konnte bereits für ARHGEF6/aPIX eine wichtige Rolle in einem PI3-Kinase-abhängigen Signalweg nachgewiesen werden. Man dass ARHGEF6/αPIX PAK aktiviert und dieser Signalweg vermutet. zur Zellausbreitung führt (Yoshii et al., 1999). Bis heute ist noch wenig über eine Funktion von ARHGEF6/aPIX während der NGF-induzierten Neuritenbildung in PC12-Zellen bekannt. ARHGEF7/βPIX interagiert mit PAK in PC12-Zellen und führt so zur verstärkten Lamellipodienbildung (Obermeier et al., 1998). Aufgrund der starken Homologie zu ARHGEF7/aPIX könnte für ARHGEF6/aPIX eine vergleichbare Funktion postuliert werden.

6. Ziel der Arbeit

Ein vorrangiges Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung einer Funktion von ARHGEF6/aPIX während der Bildung von Zellausläufern. Hierfür sollte zunächst das neuronale PC12-Zellsystem etabliert werden, mithilfe dessen vor allem der Einfluss von ARHGEF6/aPIX während der Differenzierung und Entwicklung neuritenähnlicher Zellfortsätze sollte. Die untersucht werden Auswirkungen verschiedener ARHGEF6/αPIX-Deletionsmutanten sowie die bekannter ARHGEF6/αPIX-Interaktionspartner auf die Zellmorphologie von PC12-Zellen sollten Hinweise auf mögliche Signalwege geben, die an der Regulation der Neuritenbildung beteiligt sind.

Bei Patienten mit mentaler Retardierung wurde eine Spleißmutation im Intron 1 des ARHGEF6/αPIX-Gens gefunden, wodurch eine mutante ARHGEF6/aPIX-Proteinvariante mit einer Deletion in der N-terminalen CH-Domäne entsteht. Nach Überexpression ist dieses mutante Protein in zellulären runden Strukturen innerhalb des Zytoplasmas lokalisiert, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden sollten. Aufgrund der Morphologie wurde vermutet, dass es sich hierbei möglicherweise um vesikuläre Strukturen wie z.B. Endosomen handeln könnte. Deshalb sollten mit Antikörpern gegen spezifische endosomale Markerproteine Immunfluoreszenzanalysen für mögliche Kolokalisationen mit dem mutanten ARHGEF6/aPIX-Protein durchgeführt werden. Von weiterem Interesse war auch, ob die gleichzeitige Expression verschiedener Rac1- bzw. Cdc42-Proteinvarianten Auswirkungen auf die subzelluläre Lokalisation dieses aberranten Proteins hat. Neben der Charakterisierung dieser Strukturen sollte durch die Überexpression weiterer ARHGEF6/aPIX-Proteinvarianten untersucht werden, welche Rolle möglicherweise andere Domänen bei der subzellulären Lokalisation des Proteins spielen.

Von weiterem Interesse im Rahmen dieser Arbeit war die Verifizierung der im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierten Interaktion von ARHGEF6/αPIX mit FE65. Hierbei sollten verschiedene biochemische Methoden angewandt werden, mittels derer auch die für die Interaktion notwendigen Proteindomänen bestimmt werden sollten. Die Analyse der subzellulären Lokalisation beider Proteine sollte mögliche Hinweise auf die Funktion dieser Interaktion geben, wobei aufgrund der starken Expression von FE65 im Gehirn die Lokalisation im neuronalen Zellsystem von besonderem Interesse war.

III. Material und Methoden

1. Material

Reagenzien, Chemikalien und Enzyme wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen im Reinheitsgrad "reinst" oder "p.a." bezogen: BD Biosciences (München), Biorad (München), Fermentas (St. Leon-Roth), Fluka (Neu-Ulm), GE Healthcare (Freiburg), Genomed (Löhne), Invitrogen/Gibco (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Millipore (Eschborn), Molecular Probes (Göttingen), Pierce/Perbio (Bonn), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen), Stratagene (Heidelberg), Vector Laboratories (Burlingame, USA).

1.1 Materialien für molekularbiologische Methoden

1 Kb DNA Leiter Invitrogen (Karlsruhe) 100 Bp DNA-Leiter Invitrogen (Karlsruhe) ABI Prism Big Dye Terminator Applied Biosystems (Weiterstadt) Agarose Invitrogen (Karlsruhe) Alkalische Phosphatase Roche (Mannheim) Ampicillin Sigma (Taufkirchen) Ethidiumbromid Merck (Darmstadt) Gateway LR Clonase Enzym Mix Invitrogen (Karlsruhe) JETQUICK PCR Product Purification Spin Kit Genomed (Löhne) Kanamycinsulfat Fluka (Steinheim) Orange-G Sigma (Taufkirchen) pENTR Directional TOPO® Cloning Kit Invitrogen (Karlsruhe) PfuUltra[™] HF DNA Polymerase Stratagene (Heidelberg) Qiagen Plasmid Maxi Kit Qiagen, Hilden Qiagen Plasmid Midi Kit Qiagen, Hilden Quick T4 DNA Ligase New England Biolabs (Frankfurt) Restriktionsendonukleasen Promega (Mannheim) Fermentas (St. Leon-Roth) RNase A Roche (Mannheim) Invitrogen (Karlsruhe) T4 DNA Ligase

1.2 Materialien für proteinbiochemische Methoden

Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BAA, 30 %/0,8 %) Ammoniumpersulfat (APS) Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk Bradford Protein Assay Bromphenolblau Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten Coomassie[®] Brilliant Blue R 250 ECL Plus[™] Western Blotting Detection Reagenzien ECL[™] Western Blotting Detection Reagenzien Ezview[™]Rot ANTI-FLAG[®]M2 Affinitäts Gel Glutathione Sepharose[®]4B Hyperfilm ECL Röntgenfilme N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) Natrium-Dodecylsulfat (SDS) Nonidet P40 / Igepal No-Weigh[™] Dithiothreitol (DTT) Pefabloc SC Pepstatin Phenylmethyl Sulphonyl Fluoride (PMSF) Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20) Precision Plus Protein[™] Standard **PVDF Western Blotting Membranen Restore Western Blot Stripping Puffer** SimplyBlue[™] Safe Stain β-Mercaptoethanol Triton X-100 Whatman-3MM-Chromatographie-Papier

Biorad (München) Sigma (München) Biorad (München) Biorad (München) Sigma (Taufkirchen) Roche (Mannheim) Serva (Heidelberg) GE Healthcare (Freiburg) GE Healthcare (Freiburg) Sigma (Taufkirchen) GE Healthcare (Freiburg) GE Healthcare (Freiburg) Sigma (Taufkirchen) Sigma (Taufkirchen) ICN (Eschwege) Pierce/Perbio (Bonn) Roche (Mannheim) Roche (Mannheim) Roche (Mannheim) Sigma (Taufkirchen) Biorad (München) Roche (Mannheim) Pierce (Bonn) Invitrogen (Karlsruhe) Merck (Darmstadt) Sigma (Taufkirchen) Whatman (Dassel)

1.3 Materialien für zellbiologische Methoden

100 mm Polystyrol-Zellkulturschalen 10x Trypsin-EDTA (0,5 %) 12-Loch und 24-Loch-Platten für die Zellkultur Albumin aus Rinderserum (BSA) Collagen-Lösung (Typ1) Dimethylsulfoxid (DMSO) Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) F-12 Nutrient Mixture (Ham) Fötales Rinderserum (FBS) Glassplättchen 13 mm und 18 mm Lipofectamin[™]2000-Reagenz LY 294002 (PI3-Kinase Inhibitor) Nerve growth factor-2,5S (aus Glandula submaxillaris, Maus) **Optimem1 Transfektionsmedium** Paraformaldehyd Penicillin/Streptomycin Pferdeserum (HS) Phosphatpuffer (PBS, pH 7,4) Phosphatpuffer^{+/+} (PBS^{+/+}) Poly-L-Lysin Polyvinylalkohol 488 (Mowiol 488) Propylgallate **RPMI 1640 TrypLE Express** VECTASHIELD® Mounting Medium Hard Set

Ziegen-Serum

Sarstedt (Nürnbrecht) Gibco (Karlsruhe) Sarstedt (Nürnbrecht) Sigma (Taufkirchen) Sigma (Taufkirchen) Merck (Darmstadt) Gibco (Karlsruhe) Gibco (Karlsruhe) Gibco (Karlsruhe) Assistent (Sontheim) Invitrogen (Karlsruhe) Sigma (Taufkirchen)

Sigma (Taufkirchen) Gibco (Karlsruhe) Sigma (Taufkirchen) Gibco (Karlsruhe) Gibco (Karlsruhe) Gibco (Karlsruhe) Sigma (Taufkirchen) Fluka (Neu-Ulm) Fluka (Neu-Ulm) Gibco (Karlsruhe) Gibco (Karlsruhe) Vector Laboratories (Burlingame, USA) Sigma (Taufkirchen)

1.4 Sonstige Chemikalien

Bacto Tryptone	BD Pharmingen (Heidelberg)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck (Darmstadt)
di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck (Darmstadt)
Ethanol (CH ₃ CH ₂ OH)	Merck (Darmstadt)
Ethylendinitrilotetraessisäure, Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Hefeextrakt	Sigma (Taufkirchen)
Isopropanol (C ₄ H ₁₀ O)	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCI)	Sigma (Taufkirchen)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydroxid (KOH)	Sigma (Taufkirchen)
Lithiumsulfat (Li ₂ SO ₄)	Sigma (Taufkirchen)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma (Taufkirchen)
Magnesiumsulfat (MgSO₄)	Sigma (Taufkirchen)
Methanol (CH ₃ OH)	Merck (Darmstadt)
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	Sigma (Taufkirchen)
Natriumchlorid (NaCl)	Baker (Deventer, NL)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma (Taufkirchen)
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma (Taufkirchen)
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄₎	Merck (Darmstadt)
Rubidiumchlorid (RbCl)	Sigma (Taufkirchen)
Salpetersäure (HNO ₃)	Merck (Darmstadt)
Salzsäure (HCI)	Merck (Darmstadt)
Tetraborat	Merck (Darmstadt)
Trichloressigsäure (TCA)	Merck (Darmstadt)
TRIZMA [®] BASE (Tris)	Sigma (Taufkirchen)

1.5 Bakterienstämme

Tab. I: Verwendete Bakterienstämme

Angegeben sind jeweils der Name, die Eigenschaften und die Herkunft der verwendeten Bakterienstämme.

Name	Eigenschaften	Herkunft
DH10B	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80d/acZ Δ M15 Δ /acX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 ga/U ga/K λ - rpsL (Str ^R) nupG	Invitrogen (Karlsruhe)
TOP10	F- Δ (<i>mrr-hsd</i> RMS- <i>mcr</i> BC) Φ80d/ <i>acZ</i> Δ M15 Δ / <i>ac</i> X74 <i>de</i> oR recA1 <i>ara</i> D139 Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>gal</i> U <i>gal</i> K <i>rps</i> L (Str ^R) <i>end</i> A1 <i>nup</i> G	Invitrogen (Karlsruhe)

1.6 Zelllinien

Tab. II: Verwendete Zelllinien

Angegeben sind jeweils der Name, die Eigenschaften, die Herkunft und eine Referenz der verwendeten Zelllinien. (DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; CLS = Cell Line Service; AG = Arbeitsgruppe)

Name	Eigenschaften	Herkunft	Referenz
CHO-K1	Adhärente Fibroblasten; Ovarien, Chinesischer Hamster	DSMZ (Braunschweig) AC 110	Puck et al., 1965
PC12	Schwach adhärente Zellen; Phäochromocytom, Niere, Ratte	CLS (Heidelberg)	Weber E et al., 1976
COS7	Fibroblasten-ähnliche Zellen; Niere, Afrikanische grüne Meerkatze	DSMZ (Braunschweig)	Gluzman et al., 1981
HeLa	Adhärente epithelienähnliche Zellen; Cervix Karzinom, Mensch	AG Braulke, UKE (Hamburg)	Gey et al., 1952; Scherer et al., 1953

1.7 Plasmide

1.7.1 Zur Verfügung gestellte Konstrukte für die eukaryotische Expression

Tab. III: Konstrukte für die eukaryotische Expression, die bereits vorlagen

Angegeben sind jeweils der Name des Konstrukts, Eigenschaften des kodierten Proteins, die Anzahl der Aminosäuren sowie die Herkunft des Konstrukts.

Name	Konstrukt	Protein	Amino- säuren	Herkunft
αΡΙΧ	pMT2SM-HA- ARHGEF6/αPIX	"full length" αPIX (AF 207831)	2-776	AG Kutsche, UKE, Hamburg
	pMT2SM-HA- ARHGEF6/αPIX∆CC	α PIX mit Deletion der CC-Domäne	2-686	AG Kutsche, UKE, Hamburg
	pMT2SM-HA- ARHGEF6/αPIXΔGBDΔCC	α PIX mit deletierter GBD- und CC- Domäne	2-611	AG Kutsche, UKE, Hamburg
	pMT2SM-HA- ARHGEF6/αPIX∆CH	αPIX mit deletierter CH-Domäne	154-776	AG Kutsche, UKE, Hamburg
	pMT2SM-HA- ARHGEF6/αPIX∆AS56-83	α PIX mit Deletion der Aminosäuren 56-83	2-5,84- 776	AG Kutsche, UKE, Hamburg
	pMT2SM-HA- ARHGEF6/αPIX-ΔDH	αPIX mit Deletion der DH-Domäne	2-240, 428-776	AG Kutsche, UKE, Hamburg
	pFLAG-CMV4- ARHGEF6/αPIX	"full length" αPIX (AF 207831)	2-777	AG Kutsche, UKE, Hamburg
FE65	pFLAG-CMV4-DEST-FE65	"full length" FE65 (NM_001164)	2-710	AG Kutsche, UKE, Hamburg
	pDEST27-FE65	"full length" FE65 (NM_001164)	2-710	AG Kutsche, UKE, Hamburg
Rac1	pRK5-MYC-Rac1	Wildtyp-Rac1 (NM_006908)	2-192	A. Schmidt, London, UK
	pRK5-FLAG-Rac1L61	Konstitutiv-aktives Rac1 mit Aminosäure- austausch T61L	2-192	A. Schmidt, London, UK
	pRK5-MYC-Rac1N17	Dominant-negatives Rac1 mit Aminosäure- austausch S17N	2-192	A. Schmidt, London, UK
Cdc42	pRK5-MYC-Cdc42	Wildtyp-Cdc42 (NM_044472)	2-191	A. Schmidt, London, UK
	pRK5-MYC-Cdc42L61	Konstitutiv-aktives Cdc42 mit Amino säureaustausch T61L	2-191	A. Schmidt, London, UK
	pRK5-MYC-Cdc42N17	Dominant-negatives Cdc42 mit Aminosäureaustausch S17N	2-191	A. Schmidt, London, UK
PAK1	pCMV6-MYC-PAK1	"full length" PAK1 (NM_002576)	1-545	G. Bokoch, San Diego, USA
βΡΑΚ	рХЈ40-НА-РАКЗ	"full length" PAK3 (NM_019210)	1-544	E. Manser, Singapur
βΡΙΧ	pFLAG-CMV4-DEST- ARHGEF7/βPIX	"full length" βPIX	2-646	AG Kutsche, UKE, Hamburg

Name	Konstrukt	Eigenschaften	Amino- säuren	Herkunft
GIT	pBK(∆)-GIT1-FLAG	"full length" GIT1	1-771	R.T. Premont, USA
β-Parvin	pFLAG-CMV4-DEST- PARVB	"full length" β-Parvin (AF237769)	2-365	AG Kutsche, UKE, Hamburg

1.7.2 Zur Verfügung gestellte Eingangskonstrukte für das GATEWAY™-System

Tab. IV: Eingangskonstrukte für das GATEWAY™-System, die bereits vorhanden waren

Angegeben sind jeweils der Name des Konstrukts, seine Eigenschaften, die Anzahl der kodierten Aminosäuren sowie die Herkunft des Konstrukts.

Name	Konstrukt	Eigenschaften	Amino- säuren	Herkunft
αΡΙΧ	pENTR/D-TOPO- ARHGEF6/αPIX	"full length" αPIX (AF 207831)	2-776	AG Kutsche, UKE, Hamburg
	pENTR/D-TOPO- ARHGEF6/αPIX∆AS56-83	αPIX mit Deletion der Aminosäuren 56-83	2-55; 84-776	AG Kutsche, UKE, Hamburg
	pENTR/D-TOPO- ARHGEF6/αPIX∆SH3	α PIX mit deletierter SH3-Domäne	2-157, 223-776	AG Kutsche, UKE, Hamburg
FE65	pENTR/D-TOPO-FE65	"full length" FE65 (NM_001164)	2-710	AG Kutsche, UKE, Hamburg

1.7.3 Ausgangsvektoren für Klonierungen

Tab. V: Ausgangsvektoren zur Herstellung neuer Konstrukte

Angegeben sind jeweils die Vektorfunktion, der Name, die Eigenschaften, die Herkunft der Vektoren und falls bekannt, Referenzen.

Vektorfunktion	Name	Eigenschaften	Herkunft	Referenzen
Eukaryotische Expressions- vektoren	pMT2SM-HA	Amp ^r , HA-Epitop	Reza M. Ahmadian (Dortmund)	Kaufman et al., 1987
	pFLAG-CMV-4	Amp ^r , Neo ^r , FLAG-Epitop	Sigma (Taufkirchen)	
GATEWAY™- Vektoren	pFLAG-CMV4-DEST	Amp ^r , Neo ^r , FLAG-Epitop	AG Kutsche, UKE, Hamburg	
	pMT2SM-HA-DEST	Amp ^r , HA-Epitop	AG Kutsche, UKE, Hamburg	
	pDEST27	Amp ^r , Cm ^r , <i>ccd</i> B,GST- Epitop	Invitrogen (Karlsruhe)	
	pDEST53	Amp ^r , Cm ^r , <i>ccd</i> B,GFP- Epitop	Invitrogen (Karlsruhe)	
	pENTR/D-TOPO	Km ^r , <i>ccd</i> B	Invitrogen (Karlsruhe)	

1.7.4 Mit Hilfe der GATEWAY™-Technologie hergestellte Eingangskonstrukte

Tab. VI: Mittels Topoisomerase-Reaktion hergestellte GATEWAY™-Eingangskonstrukte

Angegeben sind jeweils der Name des Konstrukts, die zur Vervielfältigung mittels PCR verwendeten Oligonukleotide, das Template für die PCR und die Anzahl der kodierten Aminosäuren.

Name	Konstrukt	Oligonukleotide	Template	Aminosäuren
αΡΙΧ	pENTR/D-TOPO- ARHGEF6/αPIXΔCC	aPIX-fC-pET aPIX_dCC_R_Topo	pMT2SM-HA- ARHGEF6/αPIX∆CC	2-685
	pENTR/D-TOPO- ARHGEF6/αPIX∆CH	aPIX-rCpET aPIXdCH_F_Topo	pMT2SM-HA- ARHGEF6/αPIX∆CH	154-776
	pENTR/D-TOPO- ARHGEF6/αPIX-DN	aPIX-fC-pET aPIX-rCpET	pMT2SM-HA- ARHGEF6/αPIX-DN	2-776
	pENTR/D-TOPO- ARHGEF6/αPIX∆GBD	aPIX-fC-pET aPIX-rCpET	pMT2SM-HA- ARHGEF6/αPIX∆GBD	2-607, 682- 776
	pENTR/D-TOPO- ARHGEF6/αPIX∆PH	aPIX-fC-pET aPIX-rCpET	pMT2SM-HA- ARHGEF6/αPIX∆PH	2-443, 559- 776
	pENTR/D-TOPO- ARHGEF6/αPIX∆DH	aPIX-fC-pET aPIX-rCpET	pMT2SM-HA- ARHGEF6/αPIX∆DH	2-240, 428- 776
FE65	pENTR/D-TOPO- FE65_N-WW	FE65-F1-Topo FE65-R3-Topo	pENTR/D-TOPO [®] -FE65	2-305
	pENTR/D-TOPO- FE65_C_PTB1+2	FE65-F3-Topo FE65-R1-Topo	pENTR/D-TOPO [®] -FE65	524-710
	pENTR/D-TOPO- FE65_WW	FE65-WW-F2-Topo FE65-WW-R2-Topo	pENTR/D-TOPO [®] -FE65	238-297
	pENTR/D-TOPO- FE65_∆N	FE65-WW-F2-Topo FE65-R1-Topo	pENTR/D-TOPO [®] -FE65	238-710
	pENTR/D-TOPO- FE65_N	FE65-F1-Topo FE65-N-R6-Topo1	pENTR/D-TOPO [®] -FE65	2-254
	pENTR/D-TOPO- FE65_N1	FE65-F1-Topo FE65-N-R7-Topo1	pENTR/D-TOPO [®] -FE65	2-142
	pENTR/D-TOPO- FE65_N2	FE65-N-F6-Topo FE65-R6-Topo1	pENTR/D-TOPO [®] -FE65	136-254
	pENTR/D-TOPO- FE65_N3	FE65_N_F7-Topo FE65_N-R8-Topo	pENTR/D-TOPO [®] -FE65	67-215

1.7.5 Hergestellte Konstrukte für die eukaryotische Expression

Tab. VII: Konstrukte für die eukaryotische Expression

Die Klonierung dieser Konstrukte erfolgte durch Restriktion und anschließende Ligation. Angegeben sind jeweils der Name des Konstrukts, die für die PCR eingesetzten Oligonukleotide und Templates sowie die Anzahl der kodierten Aminosäuren. Für das Template ist die Eintragsnummer für die Datenbank GenBank bzw. das als Template benutzte Plasmid angegeben. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden jeweils aufgereinigt, durch Restriktionsenzyme geschnitten und in den Vektor ligiert.

Konstrukt	Oligonukleotide	Template (Genbank)	Amino- säuren
pMT2SM-HA- ARHGEF6/αΡΙΧ∆ΡΗ	aPIXf.INotI-pMT2SMHA aPIX-dPH-rev2 aPIX-Cter-EcoRI-pMT2SMHA aPIX-dPH-fw	KIAA0006 (D25304)	2-443, 559-776
pMT2SM-HA- ARHGEF6/αPIX∆SH3	aPIXf.INotI-pMT2SMHA aPIX-dSH3-rev1 aPIX-Cter-EcoRI-pMT2SMHA aPIX-dSH3-fw	KIAA0006 (D25304)	2-157, 223-776
pMT2SM-HA- ARHGEF6/αPIX∆GBD	aPIXf.INotI-pMT2SMHA aPIX-dGBD-rev1 aPIX-Cter-EcoRI-pMT2SMHA aPIX-dGBD-fw	KIAA0006 (D25304)	2-607, 682-776

1.7.6 Mit Hilfe der GATEWAY™-Technologie hergestellte Zielkonstrukte

Tab. VIII: Mithilfe der GATEWAY™-Technologie hergestellte Zielkonstrukte für die Expression in eukaryotischen Zellen

Angegeben sind jeweils die Bezeichnung des Konstrukts, die Herstellung, das Ausgangskonstrukt sowie die Anzahl der Aminosäuren.

Name	Konstrukt	Herstellung	Amino- säuren
αΡΙΧ	pFLAG-CMV4-DEST- ARHGEF6/αPIXΔCC	Rekombination aus pENTR/D-Topo- ARHGEF6/αPIX∆CC	2-685
	pFLAG-CMV4-DEST- ARHGEF6/αPIXΔCH	Rekombination aus pENTR/D-Topo- ARHGEF6/αPIX∆CH	153-776
	pFLAG-CMV4-DEST- ARHGEF6/αPIX-DN	Rekombination aus pENTR/D-Topo- ARHGEF6/αPIX-DN	2-776
	pFLAG-CMV4-DEST-	Rekombination aus pENTR/D-Topo-	2-607,
	ARHGEF6/αPIXΔGBD	ARHGEF6/αPIX∆GBD	682-777
	pFLAG-CMV4-DEST-	Rekombination aus pENTR/D-Topo-	2-443,
	ARHGEF6/αPIXΔPH	ARHGEF6/αPIXΔPH	559-776
	pFLAG-CMV4-DEST-	Rekombination aus pENTR/D-Topo-	2-157,
	ARHGEF6/αPIXΔSH3	ARHGEF6/αPIXΔSH3	223-776
	pFLAG-CMV4-DEST-	Rekombination aus pENTR/D-Topo-	2-241,
	ARHGEF6/αPIXΔDH	ARHGEF6/αPIXΔDH	428-776
	pFLAG-CMV4-DEST-	Rekombination aus pENTR/D-Topo-	2-55,
	ARHGEF6/αPIX∆AS56-83	ARHGEF6/αPIXΔAS56-83	84-776
Name	Konstrukt	Herstellung	Amino- säuren
------	---------------------------	--	------------------
	pDEST53- ARHGEF6/αPIX	Rekombination aus pENTR/D-Topo- ARHGEF6/αPIX	2-776
FE65	pDEST27-FE65_N-WW	Rekombination aus pENTR/D-Topo- FE65_N-WW	2-305
	pDEST27-FE65_WW	Rekombination aus pENTR/D-Topo- FE65_ WW	238-297
	pDEST27- FE65_C_PTB1+2	Rekombination aus pENTR/D-Topo- FE65_C_PTB1+2	524-710
	pDEST27-FE65_∆N	Rekombination aus pENTR/D-Topo- FE65_∆N	238-710
	pDEST27-FE65_N	Rekombination aus pENTR/D-Topo- FE65_N	2-254
	pDEST27-FE65_N1	Rekombination aus pENTR/D-Topo- FE65_N1	2-142
	pDEST27-FE65_N2	Rekombination aus pENTR/D-Topo- FE65_N2	136-254
	pDEST27-FE65_N3	Rekombination aus pENTR/D-Topo- FE65_N3	67-215
	pMT2SM-HA-DEST-FE65	Rekombination aus pENTR/D-Topo-FE65	2-711

1.8 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firm Sigma oder MWG bezogen. Die zur Generierung von cDNA-Fragmenten für Klonierungen verwendeten Oligonukleotide wurden durch HPLC ("high pressure liquid chromatography") aufgereinigt. Oligonukleotide zur DNA-Sequenzierung wurden entsalzt. Vor Verwendung wurden die lyophylisierten Oligonukleotide in 1x TE gelöst und entsprechend den Herstellerangaben auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt. Für den Gebrauch wurden aus diesen Stammlösungen mit H₂O bidest. Gebrauchslösungen mit einer Endkonzentration von 10 pmol/µl hergestellt.

1.8.1 Oligonukleotide für Klonierungen

Name	Sequenz	Herkunft
aPIXf.INotI- pMT2SMHA	5'-GAAAAAAGCGGCCGCAAATCCAGAAGAACAAATCG TGACATGG-3'	AG Kutsche, Hamburg
aPIX-Cter-EcoRI- pMT2SMHA	5'-CCGGAATTCCTCATTATGGAAGAATTGAGGTCTTG CTAC-3'	AG Kutsche, Hamburg
aPIX-dGBD-fw	5'-AGACCATCAGCAGCACTAGGTGATTCCATTCCACA AGTCCTACTCCCTGAG-3'	Diese Arbeit
aPIX-dGBD-rev1	5'-AGGGAGTAGGACTTGTGGAATGGAATCACCTAGTG CTGCTGATGGTCTAAGTGGAG-3'	Diese Arbeit
aPIX-dPH-fw	5'-CAGGCATGGGAAGGAGAAGATACCTCATCGTCATC ATGTAGTGCT-3'	Diese Arbeit
aPIX-dPH-rev2	5'-TGATGTACTACTGCTACTCCATAGAAGAGGAAGGG TACGGACTTATCCAAG-3'	Diese Arbeit
aPIX-dSH3-fw	5'-TCAAAGACAGTGGAGATGACGGAACCTCTCTCCCC AAAAGCCGTCAAAGGA-3'	Diese Arbeit
aPIX-dSH3-rev1	5'-TTTGACGGCTTTTGGGGGAGAGAGGTTCCGTCATCT CCACTGTCTTTGACTGCCTTTGC-3'	Diese Arbeit
aPIX-fC-pET	5'-CACCAATCCAGAAGAACAAATCGTGACATGG-3'	AG Kutsche, Hamburg
aPIX-rCpET	5'-TCATTATGGAAGAATTGAGGTCTTGCTAC-3'	AG Kutsche, Hamburg
aPIXdCH_F_ Topo	5'-CACCATGACGGAAAATGGAAGTCATCAG-3'	Diese Arbeit
aPIX_dCC_R_ Topo	5'-TCATTATGGAATGGAATCTTTTCGAGTACT-3'	Diese Arbeit
FE65-F1-Topo	5'-CACCTCTGTTCCATCATCACTGAGCCAG-3'	Diese Arbeit
FE65-WW-F2- Topo	5'-CACCGAGGACACAGATTCCTTCTGGAA C-3'	Diese Arbeit
FE65-F3-Topo	5'-CACCTGGAAGGATGAACCCAGTGATGAG-3'	Diese Arbeit
FE65-N-F6-Topo	5'-CACCCTGATCATCAGCACTCAAGAGCAG-3'	Diese Arbeit

Tab. IX: Verwendete Oligonukleotide für Klonierungen

Name	Sequenz	Herkunft
FE65_N_F7- Topo	5'-CACCAAGTGGCTAAAAGAGGGCCAGAAC-3'	Diese Arbeit
FE65-R1-Topo	5'-TCATTATCATGGGGTATGGGCCCCCAGCCG-3'	Diese Arbeit
FE65-WW-R2- Topo	5'-TCATTAAAAACCTGTCCAGGTGAGCTGGGA-3'	Diese Arbeit
FE65-R3-Topo	5'-TCATTATTCCTTCAGTCCCAGCTCCATTGG-3'	Diese Arbeit
FE65-N-R6- Topo1	5'-TCATTAGTCGGAATCCGTCTCGAAGGCGTTG-3'	Diese Arbeit
FE65-N-R7- Topo1	5'-TCATTATTGAGTGCTGATGATCAGGCCAGG-3'	Diese Arbeit
FE65_N-R8-Topo	5'-TCATTAACTGTTCCGCATGCCAAACAGGAG-3'	Diese Arbeit

1.8.2 Oligonukleotide für Klonierungen

Tab. X: Verwendete Oligonukleotide für Klonierungen

Name	Sequenz	Herkunft
aPIXf.INotl- pMT2SMHA	5'-GAAAAAAGCGGCCGCAAATCCAGAAGAACAAATCG TGACATGG-3'	AG Kutsche, Hamburg
aPIX-Cter-EcoRI- pMT2SMHA	5'-CCGGAATTCCTCATTATGGAAGAATTGAGGTCTTG CTAC-3'	AG Kutsche, Hamburg
aPIX-dGBD-fw	5'-AGACCATCAGCAGCACTAGGTGATTCCATTCCACA AGTCCTACTCCCTGAG-3'	Diese Arbeit
aPIX-dGBD-rev1	5'-AGGGAGTAGGACTTGTGGAATGGAATCACCTAGTG CTGCTGATGGTCTAAGTGGAG-3'	Diese Arbeit
aPIX-dPH-fw	5'-CAGGCATGGGAAGGAGAAGATACCTCATCGTCATC ATGTAGTGCT-3'	Diese Arbeit
aPIX-dPH-rev2	5'-TGATGTACTACTGCTACTCCATAGAAGAGGAAGGG TACGGACTTATCCAAG-3'	Diese Arbeit
aPIX-dSH3-fw	5'-TCAAAGACAGTGGAGATGACGGAACCTCTCTCCCC AAAAGCCGTCAAAGGA-3'	Diese Arbeit
aPIX-dSH3-rev1	5'-TTTGACGGCTTTTGGGGGAGAGAGGGTTCCGTCATCT CCACTGTCTTTGACTGCCTTTGC-3'	Diese Arbeit
aPIX-fC-pET	5'-CACCAATCCAGAAGAACAAATCGTGACATGG-3'	AG Kutsche, Hamburg
aPIX-rCpET	5'-TCATTATGGAAGAATTGAGGTCTTGCTAC-3'	AG Kutsche, Hamburg
aPIXdCH_F_ Topo	5'-CACCATGACGGAAAATGGAAGTCATCAG-3'	Diese Arbeit
aPIX_dCC_R_ Topo	5'-TCATTATGGAATGGAATCTTTTCGAGTACT-3'	Diese Arbeit
FE65-F1-Topo	5'-CACCTCTGTTCCATCATCACTGAGCCAG-3'	Diese Arbeit
E65-WW-F2- Topo	5'-CACCGAGGACACAGATTCCTTCTGGAA C-3'	Diese Arbeit
FE65-F3-Topo	5'-CACCTGGAAGGATGAACCCAGTGATGAG-3'	Diese Arbeit
FE65-N-F6-Topo	5'-CACCCTGATCATCAGCACTCAAGAGCAG-3'	Diese Arbeit
FE65_N_F7- Topo	5'-CACCAAGTGGCTAAAAGAGGGCCAGAAC-3'	Diese Arbeit
FE65-R1-Topo	5'-TCATTATCATGGGGTATGGGCCCCCAGCCG-3'	Diese Arbeit
FE65-WW-R2- Topo	5'-TCATTAAAAACCTGTCCAGGTGAGCTGGGA-3'	Diese Arbeit
FE65-R3-Topo	5'-TCATTATTCCTTCAGTCCCAGCTCCATTGG-3'	Diese Arbeit

Name	Sequenz	Herkunft
FE65-N-R6- Topo1	5'-TCATTAGTCGGAATCCGTCTCGAAGGCGTTG-3'	Diese Arbeit
FE65-N-R7- Topo1	5'-TCATTATTGAGTGCTGATGATCAGGCCAGG-3'	Diese Arbeit
FE65_N-R8-Topo	5'-TCATTAACTGTTCCGCATGCCAAACAGGAG-3'	Diese Arbeit

1.8.3 Oligonukleotide für Sequenzierungen

Tab. XI: Verwendete Oligonukleotide für Sequenzierungen

Name	Sequenz	Herkunft
pMT2_seq	5'-CACTCCCAGGTCCAACTGCATAAG-3'	AG Kutsche, Hamburg
pFLAG-CMV-N	5'-AATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGAC GC-3'	AG Kutsche, Hamburg
pFLAG-CMV-C	5'-TATTAGGACAAGGCTGGTGGGCAC-3'	AG Kutsche, Hamburg
pDEST-N	5'-GCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAG-3'	AG Kutsche, Hamburg
pDEST-C	5'-CCAGTCACGACGTTGTAAAACGACG-3'	AG Kutsche, Hamburg
c-KIA 16	5'-CTATCAGAAAGACCATGTGGACG-3'	AG Kutsche, Hamburg
KIA 40	5'-AGAGACCTCTCTCCCCAAAAGCC-3'	AG Kutsche, Hamburg
KIA 28frag	5'-GATGAGTTGGAACAATTCATGG-3'	AG Kutsche, Hamburg
KIA 20	5'-CGAACCTATTCAGGCATGGGAAG-3'	AG Kutsche, Hamburg
KIA 13	5'-CAATAGCAGGAACGGTGGGTGAC-3'	AG Kutsche, Hamburg
KIA 9	5'-CAGCAGCACTAGGTTATAAAGAG-3'	AG Kutsche, Hamburg
KIA 6	5'-CATCATTGAAGAAACCAGAAGC-3'	AG Kutsche, Hamburg
KIA 49	5'-GCTTTGTTGACAGCTAAAAGAGTACTCAG-3'	AG Kutsche, Hamburg
FE65-1	5'-GCTGACCCAGATGCTCAAGTGCCACG-3;	AG Kutsche, Hamburg
FE65-2	5'-CGTGGGCAGAGATGTCCACACGTTTGC-3'	AG Kutsche, Hamburg
FE65-3	5'-CTGACCAGGCCCTGCCAATGCCAAC-3'	AG Kutsche, Hamburg
FE65-4	5'-GCTGCCTGAGCCCCTGGAGAGTGTGG-3'	AG Kutsche, Hamburg
FE65-5	5'-GACCTTCCCAGCTCAGAGCTTCAGC-3'	AG Kutsche, Hamburg
FE65-6rev	5'-CCACACTCTCCAGGGGCTCAG-3'	AG Kutsche, Hamburg
FE65-7rev	5'-CCAGAAGGAATCTGTGTCCTCTG-3'	AG Kutsche, Hamburg
PAK1-1	5'-GCTTGCTTCAGACATCAAATATCAC-3'	AG Kutsche, Hamburg
PAK1-2	5'-CACTCCAACTCGGGACGTGGCTAC-3'	AG Kutsche, Hamburg
PAK1-3	5'-CAAGACCCCAAACATTGTGAATTAC-3'	AG Kutsche, Hamburg
PAK1-4	5'-GGAACCCCATACTGGATGGCCCCAG-3'	AG Kutsche, Hamburg
PAK1-5	5'-GAGAAGAGAGGTTCAGCTAAAGAG-3'	AG Kutsche, Hamburg
M13 uni	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	AG Kutsche, Hamburg
M13 rev	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	AG Kutsche, Hamburg
cDNAT7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	AG Kutsche, Hamburg

1.9 Antikörper

1.9.1 Primärantikörper

Tab. XII: Verwendete Primärantikörper

Angegeben sind die Bezeichnung des Antikörpers, das Immunogen, das zur Immunisierung verwendete Tier sowie die Bezugsfirma. In den Experimenten eingesetzte Verdünnungen sind für Western-Blot (WB) und/oder Immunfluoreszenz (IF) beschrieben.

Antikörper	Antigen	Tier	Verdünnung	Hersteller
anti-HA	Hämagglutinin des humanen Influenza- Virus	Kaninchen	IF 1:300	Sigma (Taufkirchen)
anti-HA	Hämagglutinin des humanen Influenza- Virus	Maus	IF 1:1000	Eurogentec (Seraing)
anti-FLAGM2 monoklonaler Antikörper	synthetisches Flag- Peptid	Maus	IF 1:200	Sigma (Taufkirchen)
anti-FlagM2 polyklonaler Antikörper	synthetisches Flag- Peptid	Kaninchen	IF 1:100	Sigma (Taufkirchen)
anti-Fe65	murines Fe65	Maus	WB 1:1000 IF 1:500	Biomol (Hamburg)
anti-EEA1	humanes EEA1	Maus	IF 1:100	BD (Heidelberg)
anti-Adaptinγ	murines Adaptin γ	Maus	IF 1:100	BD (Heidelberg)
anti-Adaptin α	murines Adaptin α	Maus	IF 1:100	BD (Heidelberg)
anti-δSA4	Humanes Adaptin δ	Maus	IF 1:100	Hybridoma Bank (Iowa, USA)
anti-LAMP-1	humanes Lamp1	Maus	IF 1:100	Hybridoma Bank (Iowa, USA)
anti-LAMP-2	humanes Lamp2	Maus	IF 1:100	Hybridoma Bank (Iowa, USA)
anti-Rac1	humanes Rac1	Maus	IF 1:100	Biomol (Hamburg)
anti-Cdc42	humanes Cdc42	Maus	IF 1:100	BD (Heidelberg)

1.9.2 Sekundärantikörper und Farbstoffe

Tab. XIII: Angewandte Sekundärantikörper und Farbstoffe

Angegeben sind die Bezeichnung des Antiköpers bzw. Toxins, das Antigen und Konjugat, das zur Immunisierung verwendete Tier sowie die Bezugsfirma. Die in den Experimenten eingesetzten Verdünnungen sind für Western-Blot (WB) und Immunfluoreszenz (IF) beschrieben.

Antikörper/ Toxin	Antigen/Toxin	Konjugat	Tier	Verdün- nung	Hersteller
anti-HA-HRP, High Affinity (3F10)	humanes Hämagglutinin	Meerrettich- Peroxidase	Ratte	WB 1:4000	Roche (Mannheim)
anti-GST-HRP	Glutahion-S- Transferase (Schistosoma mansoni)	Meerrettich- Peroxidase	Ziege	WB 1:5000	Amersham Biosciences (Freiburg)
anti-FLAGM2- Peroxidase	synthetisches FLAG- Peptid	Meerrettich- Peroxidase	Maus	WB1:4000	Sigma (Taufkirchen)
anti-HA- Fluorescein High Affinity (3F10)	humanes Hämagglutinin	Fluorescein	Ratte	IF 1:25	Roche (Mannheim)
anti-FLAGM2- Cy3	synthetisches FLAG- Peptid	Cyanin 3	Maus	IF 1:200	Sigma (Taufkirchen)
anti-FLAGM2- Fluorescein	synthetisches FLAG- Peptid	Fluorescein	Maus	IF 1:200	Sigma (Taufkirchen)
anti-MYC-Cy3	humanes p62 c-myc	Cyanin 3	Maus	IF 1:200	Sigma (Taufkirchen)
AlexaFluor- 546 Ziege- anti- Kaninchen	Kaninchen Immun- globuline	Alexa-Fluor- 546	Ziege	IF 1:1000	Molecular Probes (Karlsruhe)
AlexaFluor- 488 Ziege- anti- Kaninchen	Kaninchen Immun- globuline	Alexa-Fluor- 488	Ziege	IF 1:1000	Molecular Probes (Karlsruhe)
AlexaFluor- 546 Ziege- anti-Maus	Maus Immun- globuline	Alexa-Fluor- 546	Ziege	IF 1:1000	Molecular Probes (Karlsruhe)
AlexaFluor- 488 Ziege- anti-Maus	Maus Immun- globuline	Alexa-Fluor- 488	Ziege	IF 1:1000	Molecular Probes (Karlsruhe)
TexasRot- Phalloidin	Phallotoxin (Amanita phalloides)	Texas Red	-	IF 1:40	Molecular Probes (Karlsruhe)
MFP488- Phalloidin	Phallotoxin (Amanita phalloides)	MFP488	-	IF 1:40	MoBiTec (Göttingen)

2. Molekularbiologische Methoden

2.1 Anzucht von E.coli

Für die Anzucht von *E.coli* wurden je nach Bedarf unterschiedliche Mengen LB-Medium mit Einzelkolonien von einer Agar-Platte oder mit Aliquots aus einer Flüssig-Vorkultur (1:50 bis 1:100 Verdünnung) beimpft und über Nacht (üN) bei 37°C und 220 Upm im Schüttelinkubator inkubiert. Zur Langzeit-Lagerung der Kulturen bei –80°C wurden üN-Kulturen von *E.coli* im Verhältnis 1:5 mit 100 % sterilem Glycerin versetzt.

LB-Medium (Luria Bertani)	
flüssig (1.000 ml):	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; pH 7 einstellen; autoklavieren und je nach Bedarf Antibiotikum dazugeben
Agar (1.000 ml):	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; 15 g Agar; pH 7 einstellen; autoklavieren und je nach Bedarf Antibiotikum dazugeben
Antibiotikakonzentrationen für	
<i>E.coli</i> -Medien und -Agar:	Ampicillin 150 μg/ml; Kanamycin 25 μg/ml

2.2 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli-*Zellen für die Transformation

Kompetente Bakterien (DH10B) wurden nach der Rubidium-Chlorid-Methode erzeugt. Dazu wurden 2 ml ψ B-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und üN bei 37°C geschüttelt. Von dieser Kultur wurde 1 ml in 100 ml ψ B-Medium verdünnt und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,3-0,4 bei 550 nm kultiviert. Aus dieser Kultur wurden 5 ml entnommen, erneut 100 ml ψ B-Medium angeimpft und bis zu einer OD₅₅₀=0,3-0,4 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension für 5 min in Eiswasser abgekühlt und für weitere 8 min bei 4°C und 2.500 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die pelletierten Bakterien in 15 ml eiskaltem Puffer TfBI resuspendiert und 30 min in Eiswasser inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt von 8 min bei 2.500 Upm und 4°C wurden die Zellen in 2 ml eiskaltem Puffer TfBII resuspendiert, auf 100 μ I Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80°C.

ψB-Medium (1.000 ml):	5 g Hefeextrakt; 20 g Trypton; 0,75 g KCl; pH7,6 einstellen mit KOH; autoklavieren; 34 ml steril filtriertes MgSO ₄ dazugeben
TfBI-Puffer (500 ml):	6,05 g RbCl; 4,95 g MnCl ₂ ; 1,47 g Kaliumacetat; 0,74 g CaCl ₂ ; 75 ml Glycerol; pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen; steril filtrieren und bei 5°C lagern
TfBII-Puffer (100 ml):	10 ml MOPS (100 mM, pH 7); 0,12 g RbCl; 1,1 g CaCl ₂ ; 15 ml Glycerol; pH 8 mit KOH einstellen; steril filtrieren und bei 5°C im Dunkeln lagern

2.3 Transformation kompetenter E.coli-Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Transformation von *E.coli* wurden jeweils 100 µl chemisch kompetente Bakterien pro Ansatz auf Eis aufgetaut und mit 10-300 ng DNA versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Temperaturschock von 42°C für 60-90 s. Danach wurde der Ansatz für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 700 µl SOC-Medium wurde die Suspension für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert. Diese wurden dann üN in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert.

SOC-Medium (1.000 ml):

20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,5 g NaCl; mit H_2O bidest. auf 970 ml auffüllen; pH 7 einstellen; autoklavieren; Zugabe von jeweils 10 ml sterilfiltriertem 1 M MgSO₄, 1 M MgCl₂ und 40 % Glukose

2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli

2.4.1 Minipräparation

Für analytische Zwecke wurde Plasmid-DNA mittels der Minipräparations-Methode (Birnboim und Doly, 1979) isoliert, welche auf dem Prinzip der alkalischen Lyse beruht. Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli wurden 2 ml Kultur üN angezogen. 1,5 ml dieser Kultur wurden für 5 min bei 8.000 Upm abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 100 µl kalter Lösung I durch Vortexen resuspendiert. Danach wurde 200 µl Lösung II zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Nach Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 300 µl Lösung III. Der Ansatz wurde gut gemischt, für 5-10 min auf Eis inkubiert und erneut 5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde in ein neues Gefäß überführt, die Plasmid-DNA mit 350 µl Isopropanol gefällt und anschließend 5 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Um aus dem Plasmid-DNA-Sediment die gleichzeitig isolierte RNA zu eliminieren, wurde dieses mit 100 µl TE/RNase-Puffer versetzt und 10-15 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 120 µl 88 % Isopropanol/0,2 M K-Acetat, vortexen und 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Plasmid-DNA erneut gefällt. Der Ansatz wurde noch einmal für 5 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet 5-10 min bei 37°C getrocknet. Schließlich wurde die isolierte Plasmid-DNA in H₂O bidest. aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Lösung I:	50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA
Lösung II:	0,2 N NaOH; 1 % SDS
Lösung III:	4 M Kaliumacetat; 2 M Essigsäure
1x TE:	10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7,5
TE/RNase-Puffer:	100 μg/ml RNase A in 1x TE

2.4.2 Maxi- und Midipräparation

Plasmid-DNA zur Transfektion eukaryotischer Zellen oder Langzeit-Lagerung wurde nach der alkalischen Lyse der Zellen durch Ionenaustausch-Chromatografie mit den Materialien und laut Herstellerangaben (Qiagen) aufgereinigt. Es wurden sowohl Maxi- als auch Midi-Präparationen durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in H₂O bidest. resuspendiert und bei –20°C aufbewahrt.

2.5 Restriktion von DNA (Smith und Birnstiel, 1976)

Restriktionsenzyme spalten DNA durch Hydrolyse des Desoxyribose-Phosphat-Rückgrats an spezifischen Erkennungssequenzen. Endonukleasen vom Typ II erkennen spezifische palindromische DNA-Sequenzen bestehend aus 4-8 Nukleotiden, und schneiden diese in Anwesenheit von MgCl₂. Sie erzeugen dabei enzymabhängig einzelsträngige, überstehende (,,sticky") oder doppelsträngige, glatte (,,blunt") Enden. Die enzymatische Hydrolyse von DNA wurde mit Enzymen der Firmen Promega, Fermentas oder New England Biolabs (NEB) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen für die Restriktionsendonukleasen wurden den Herstellerangaben entsprechend gewählt. Doppelrestriktionen erfolgten bei identischen Bedingungen (Puffer und Temperatur) gleichzeitig, bei unterschiedlichen Bedingungen nacheinander. Pro Ansatz wurden für analytische Zwecke 0,2-1 µg und für präparative Zwecke 1-3 µg DNA bei einem Reaktionsvolumen von 20 µl und 0,5-1 U Enzym pro µg DNA eingesetzt. Die Analyse der Restriktionen erfolgte mittels horizontaler Agarosegelelektrophorese.

2.6 Dephosphorylierung von 5'-Phosphat-DNA-Enden

Durch die Dephosphorylierung vektorieller DNA-Enden wird die Rezirkularisierung der durch Restriktionsenzyme gespaltenen Vektor-DNA unterbunden, wodurch sich die *in-vitro*-Neukombination von DNA-Fragmenten steigert. Es wurde eine alkalische Phosphatase aus Kälberdarm der Firma Roche und der zugehörige Reaktionspuffer verwendet. Bei einem Reaktionsvolumen von 30 µl wurde 1 µg DNA mit 3 µl 10x Puffer und 2 µl alkalischer Phosphatase versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Enzyminaktivierung erfolgte eine weitere Inkubation des Ansatzes bei 65°C für 20 min.

2.7 Ligation von DNA

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Zwischen den freien 3'-OH- und 5'-PO₄-Gruppen der Molekülenden werden Esterbindungen geknüpft. Durch diese Reaktion können DNA-Fragmente in Plasmide eingeführt und kovalent verbunden werden. Die Vektor-DNA sollte für die Ligation in dephosphoryliertem Zustand vorliegen, dagegen muss die Insert-DNA an ihren Enden Phosphatgruppen aufweisen. Für eine Ligation wurde die durch Restriktionsenzyme linearisierte Vektor-DNA zusammen mit einem 3- bis 5-fach molaren Überschuss eines entsprechend geschnittenen DNA-Fragments eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte mittels 1 U T4-DNA-Ligase und Ligasepuffer bei 16°C üN oder durch Verwendung von 1 U Quick T4-DNA-Ligase und Ligasepuffer (NEB) bei Raumtemperatur für 20 min nach Herstellerangaben.

2.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung von DNA-Konzentrationen erfolgte durch Bestimmung der Absorption (A) bei 260 nm. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Eine Absorptionseinheit entspricht dabei 50 mg/ml DNA. Die Bestimmung der Absorption bei 280 nm und die Bildung des Quotienten aus beiden Werten gibt einen Anhaltspunkt bezüglich der Reinheit der Präparation. Eine ausreichend reine Präparation sollte einen Quotienten A260/A280 von 1,8 - 2,0 aufweisen.

2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Megaprime-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, "polymerase chain reaction") ist ein in vitro-Verfahren zur selektiven Vervielfältigung von DNA. Hierfür werden hitzestabile DNA-Polymerasen sowie zwei Startoligonukleotide ("Primer"), die zu je einem Abschnitt der zu amplifizierenden DNA (Template) komplementär sind (Mullis und Faloona, 1987), benötigt. Die PCR wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten sowie zur Erzeugung von Deletionen bzw. Punktmutationen in DNA-Konstrukten verwendet. In der Regel wurden 10-500 pg Template-DNA mit je 10 pmol eines 5'- bzw. 3'-Primers und 0,2 µl (1 U) Polymerase eingesetzt. Diese wurden mit 10x PCR Puffer, Desoxynukleotiden (2,5 mM je Nukleotid) und H₂O auf ein Reaktionsvolumen von 25 µl gebracht. Nach Denaturierung des PCR-Ansatzes (1 min, 94°C) wurden 30 Zyklen aus Denaturierung (30 s, 94°C), Anlagerung der Primer ("annealing", 30 s, 48-68°C) und Polymerisation (1-5 min, 72°C) durchlaufen. Die Anlagerungstemperatur richtet sich nach den Schmelztemperaturen der beiden verwendeten Primer, die Zeitdauer für die Polymerisation nach der Länge des herzustellenden DNA-Fragments, wobei Polymerasen etwa 500-1.000 Basenpaare ("bp") pro Minute polymerisieren können. Zur Erhöhung der Spezifität des entstehenden Produkts wurde in gewissen Fällen eine so genannte "Touch-Down"-PCR durchgeführt. Hierbei wurde die Anlagerungstemperatur zu Beginn hoch gewählt, dann jedoch zweimal nach je drei Zyklen um 2°C gesenkt. Zur Klonierung wurden hitzeresistente DNA-Polymerasen mit Korrektureigenschaften ("proofreading") verwendet, wie die PfuUltra™-DNA-Polymerase (Stratagene). Die Pufferbedingungen wurden gemäß den Herstellerempfehlungen gewählt. Die Reaktionen wurden in einem PTC-200 Thermocycler der Firma MJ Research (Waltham, MA, USA) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind im Materialteil (0) aufgelistet. Die gezielte Einführung von Deletionen in DNA-Sequenzen wurde durch die "Megaprime-PCR" erzielt (Ito et al., 1991). Dazu wurden zwei etwa 45 Bp überlappende DNA-Fragmente in zwei PCR-Reaktionen mit spezifischen Oligonukleotiden getrennten durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden so designed, dass der zu deletierende Bereich ausgespart blieb und sich die Oligonukleotide dadurch vor und hinter dem zu deletierenden Bereich anlagern konnten. Den beiden PCR-Produkten fehlte sodann der gewünschte Bereich. Im weiteren Verlauf wurden diese PCR-Produkte in einer weiteren PCR als Template-DNA eingesetzt. Jeweils 3 µl der beiden PCR-Produkte, Puffer, dNTPs und Polymerase wurden in den Reaktionsansatz gegeben und drei Zyklen unterworfen (Programm 1). Danach erfolgte die Zugabe der 5'- und 3'-Oligonukleotide, um das Gesamtfagment zu amplifizieren, und Durchlaufen von 19 weiteren Zyklen (Programm 2). Das Produkt enthielt nun die gewünschte Deletion und konnte nach Aufreinigung und Restriktionsverdau in einen geeigneten Vektor kloniert werden. Zur Überprüfung der DNA-Sequenz wurden die Plasmidinserts sequenziert.

Megaprime PCR-Ansatz	Programm 1:
3 µl PCR Produkt 1	95°C / 3 min
3 µl PCR Produkt 2	95°C / 15 s
0,5 μl dNTP's (10 pmol/μl)	40°C / 20 s
2,5 µl 10x PCR-Puffer	72°C / 5 min (für Konstrukte >2kb)
0,2 µl Polymerase	goto 2 / 2 times
H_2O auf 25 µl auffüllen	end
Zugabe der Primer	Programm 2:
Zugabe der Primer (direkt in PCR Reaktion)	Programm 2: 95°C / 3 min
Zugabe der Primer (direkt in PCR Reaktion) +1 µl Primer 1 (10 pmol/µl)	Programm 2: 95°C / 3 min 95°C / 15 s
Zugabe der Primer (direkt in PCR Reaktion) +1 µl Primer 1 (10 pmol/µl) +1 µl Primer 2 (10 pmol/µl)	Programm 2: 95°C / 3 min 95°C / 15 s 55°C / 10 s
Zugabe der Primer (direkt in PCR Reaktion) +1 µl Primer 1 (10 pmol/µl) +1 µl Primer 2 (10 pmol/µl)	Programm 2: 95°C / 3 min 95°C / 15 s 55°C / 10 s 72°C / 4 min
Zugabe der Primer (direkt in PCR Reaktion) +1 µl Primer 1 (10 pmol/µl) +1 µl Primer 2 (10 pmol/µl)	Programm 2: 95°C / 3 min 95°C / 15 s 55°C / 10 s 72°C / 4 min goto 2 / 19 times
Zugabe der Primer (direkt in PCR Reaktion) +1 µl Primer 1 (10 pmol/µl) +1 µl Primer 2 (10 pmol/µl)	Programm 2: 95°C / 3 min 95°C / 15 s 55°C / 10 s 72°C / 4 min goto 2 / 19 times 72°C / 10 min

2.10 Agarosegelelektrophorese

Die Analyse von Plasmiden sowie die Überprüfung von Restriktionsreaktionen erfolgte über horizontale Agarosegelelektrophorese. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Agarose-Konzentrationen von 0,8 oder 1,5 % (w/v) eingesetzt. Die Agarose wurde in 1x TBE-Puffer aufgekocht, unter Rühren auf etwa 50°C abgekühlt und in einen geeigneten Gelträger mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/4 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Als Größenstandard diente die 1 Kb DNA-oder die 100 Bp-DNA Leiter. Die Elektrophorese erfolgte bei 10-15 V/cm. Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad ca. 10 min inkubiert. Ethidiumbromid ist ein fluoreszierender Farbstoff der in DNA interkaliert, sodass Anregung mit UV-Licht (254 nm) die DNA durch die resultierende Fluoreszenz nachweisbar macht.

Ladepuffer:	25 ml Glycerol; 25 ml 1x TBE; ~20 mg Orange-G
10x TBE:	890 mM Tris; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA
Ethidiumbromid:	1:1.000 verdünnt; 1 µl/10 ml Gel

2.11 Aufreinigung von PCR- und Restriktionsprodukten

Um für weitere Arbeitsschritte störende Primer, Enzyme, Nukleotide und kleinere DNA-Fragmente aus PCR- und Restriktionsprodukten zu entfernen, wurde zur Aufreinigung der Produkte das "Jetquick PCR Product Purification Spin Kit" nach Herstellerangaben verwendet.

2.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1977) mit dem ABI Prism Dye Terminator Kit und dem Sequenzierungsgerät ABI Prism 377 DNA Sequencer der Firma PE Applied Biosystems durchgeführt.

2.13 Klonierung mittels TOPO-Cloning-Technologie als Basis für das Gateway-System

Die TOPO[™]-Klonierungs-Technologie der Firma Invitrogen bietet die Möglichkeit der direkten Insertion eines, mit einer Polymerase amplifizierten PCR-Produkts in Plasmidvektoren und ist in einem Schritt durchführbar. Diese Technologie macht sich die Eigenschaft des Enzyms Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus zunutze, welches sowohl als Restriktionsenzym als auch als Ligase wirken kann. Es erkennt spezifische Nukleotidabfolgen der Vektor-DNA, spaltet spezifisch einen Einzelstrang und bindet dabei kovalent an die Vektor-DNA. Anschließend wird die Bindung der Topoisomerase vom Vektor gelöst und gleichzeitig das PCR-Produkt in den Vektor ligiert. Bei dem für diese Arbeit verwendeten pENTR[™] Directional TOPO®-Cloning Kit wird ein PCR-Produkt mittels der Topoisomerase-abhängigen Reaktion in einen für das GATEWAY[™]-System verwendbaren Eingangsvektor ("entry vector") ligiert. Dieser Eingangsklon ("entry clone") kann als Ausgangsvektor für verschiedene Zielvektoren ("destination vector") des GATEWAY[™]-Systems verwendet werden.

2.14 Klonierung mittels GATEWAY[™]-Technologie

Die GATEWAY™-Technologie ersetzt herkömmliches Klonieren über Restriktion und Ligation durch Rekombinationsreaktionen, mittels derer ein DNA-Insert in einen gewünschten Vektor überführt wird. Diese Rekombinationen basierten auf ortsspezifischen der Rekombinationsreaktion des Bakteriophagen λ in *E.coli*, durch die er im Rahmen des lysogenen Zykluses in das Genom des Bakteriums integrieren kann. Dazu werden zwei spezifische, kurze DNA-Sequenzen, die so genannten Att-Stellen ("attachment sites"), und spezifische Enzyme benötigt. Als Voraussetzung für die Nutzung dieses Systems muss das zu klonierende DNA-Fragment zuerst zwischen zwei Att-Stellen in einen Eingangsvektor gebracht werden. Dies kann durch herkömmliche Klonierung mittels Restriktion und Ligation oder durch eine Topoisomerase-Reaktion erfolgen. Ausgehend von diesem Eingangsklon ist die Rekombination des DNA-Fragments in jeden beliebigen Zielvektor über eine LR-Reaktion möglich, bei der die Insert-DNA des Eingangsvektors in einen Zielvektor rekombiniert. Zielvektoren besitzen äquivalente Att-Stellen, welche ebenfalls als Erkennungssequenzen für die Rekombinationsreaktion dienen. Es ist möglich, jeden beliebigen Vektor in einen Zielvektor zu überführen indem eine Gateway-Leserahmen-Kassette ("Gateway Reading Frame Cassette"), welche Att-Stellen enthält, eingebaut wird. In dieser Arbeit wurden alle GATEWAY™-Reaktionen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3. Proteinbiochemische Methoden

3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mithilfe der diskontinuierlichen, eindimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Durch die Verwendung von Polyacrylamid als Trägermedium lässt sich die Porengröße des Gels leicht variieren und somit an die Größe der Proteine anpassen. Der Zusatz von SDS zum Proteingemisch bewirkt, dass praktisch alle nicht kovalent gebundenen Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört werden und es zur Bildung eines SDS-Protein-Komplexes kommt, dessen stark negative Ladung zum Molekulargewicht des Proteins proportional ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins in SDS-haltigen Gelen wird somit durch das Molekulargewicht eines unmodifizierten Proteins und durch den Vernetzungsgrad des Gels bestimmt. Zur Gelelektrophorese wurde die Polyacrylamid-Gellösung (Trenngel) nach der unten angegebenen Rezeptur hergestellt, zwischen zwei Glasplatten in eine Mini-Gelapparatur (BioRad) gegossen und mit 200 µl Isopropanol oder H₂O bidest. überschichtet. Nach der Polymerisation wurde die überschichtete Flüssigkeit vollständig entfernt und nachfolgend ein Sammelgel mit Geltaschen überschichtet, welches der Fokussierung der SDS-Protein-Komplexe vor der eigentlichen Auftrennung im Trenngel dient. Die Proteinproben wurden mit 4x Probenauftragspuffer (Laemmli-Puffer) versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert, kurz abzentrifugiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Dabei wurden pro Proteinprobe jeweils 10-30 µg Gesamtprotein verwendet. Alternativ wurden die Proben aus Koimmun- oder GST-Präzipitationen aufgetragen. Der Gellauf in 1x SDS-Laufpuffer erfolgte bei 120 V. Es wurde immer ein Proteingrößenstandard mit aufgetragen.

Tab. XIV: Zusammensetzung verschiedener Trenn- und Sammelgele

Angegeben sind die Zusammensetzungen der Trenn- und Sammelgele. Mengenangaben sind für ein Proteingel berechnet (APS=Ammoniumpersulfat; AA/BisAA=Acrylamid/Bisacrylamid)

	Trenngel		Sammelge	Sammelgel		
	12,5 %	10 %	3,9 %	5,0 %		
bidest H ₂ O [ml]	1,65	2,1	2,1	1,95		
4x Trenngelpuffer [ml]	1,25	1,25	0,84	0,84		
30 % AA/BisAA(37,5:1) [ml]	2,10	1,70	0,45	0,6		
TEMED [µI]	5	5	5	5		
10 % (w/v) APS [μΙ]	85	85	85	85		

4x Trenngelpuffer (500 ml):

4x Sammelgelpuffer (500 ml):

10x SDS-Laufpuffer (20 ml):

4x Probenauftragspuffer:

2 g SDS; 91 g Tris; pH 8,8 einstellen mit H_3PO_4

2 g SDS; 30,3 g Tris; pH 6,8 einstellen mit H_3PO_4

50,6 g Tris; 288,4 g Glycin; 40 g SDS; pH 8,3

33 % Glycerol; 0,3 M DTT; 6,7 % SDS; 0,01 % Bromphenolblau; 80 mM Tris-HCl (pH 6,8); (anstatt DTT kann auch 12,5 % β -Mercaptoethanol verwendet werden)

3.2 Coomassie-Blaufärbung von Proteingelen

Zur schnellen Anfärbung der durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine, wurde das Verfahren der Coomassie-Blau-Färbung angewendet. Das Polyacrylamidgel wurde hierzu etwa 60 min bei RT mit SimplyBlue™-SafeStain (Invitrogen, Karlsruhe) laut den Herstellerangaben gefärbt und anschließend mit H₂O entfärbt. Zur weiteren Lagerung bei 4°C wurde das Gel in eine Plastikhülle eingeschweißt.

3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration in Lösung wurde durch die Bradford-Methode bestimmt (Bradford, 1976). Die Messung basiert auf der Absorptionsänderung des gebundenen Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau im Vergleich zum freien Farbstoff bei einer Wellenlänge λ =595 nm in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Der Farbstoff bindet dabei an basische (Ausnahme Arginin) und aromatische Aminosäurereste. Als Referenz der gemessenen Proteinkonzentration der Probe diente die Eichkurve des Standardproteins BSA (Bovines Serum Albumin) mit verschiedenen bekannten Konzentrationen (20, 40, 60, 80, 100, 120 und 140 µg/ml). Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde die Bradford-Reagenzlösung (Bradford Protein Assay; BIORAD) im Verhältnis 1:5 mit H₂O verdünnt, davon 5 ml mit 1-10 µl der zu untersuchenden Proteinprobe vermischt und 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde die OD₅₉₅ bestimmt, der erhaltene Messwert mit den Daten der Eichkurve verglichen und dadurch die Proteinkonzentration ermittelt.

3.4 Western-Blot

Der Transfer der Proteine aus Polyacrylamid-Gelen erfolgte auf eine PVDF-(Polyvinylidendifluorid) Membran, wofür die negative Ladung der durch die SDS-PAGE entstandenen SDS-Proteinkomplexe genutzt wird (Elektro-Blot). Hierfür wurde eine Semi-Dry-Blot-Apparatur (Biometra, Göttingen) verwendet.

Eine PVDF-Membran wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten und für 1 min in 100% Methanol, für 2 min in H₂O bidest. und für 5 min in Transferpuffer inkubiert. Sechs Blatt 1 mm Whatman-Papier wurden ebenfalls auf Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Die Polyacrylamidgele wurden aus der Elektrophoresekammer entnommen und zur Entfernung störender Salze gleichfalls in Transferpuffer für 5 min äquilibriert. Der Blot wurde wie folgt in der Blot-Apparatur luftblasenfrei aufgeschichtet: Anode - drei Blatt Whatman-Papier - PVDF-Membran - PAA-Gel - drei Blatt Whatman-Papier - Kathode. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass dieser Stapel in genügend Transferpuffer getränkt war. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei konstanter Stromstärke (4-5 mA/cm² Gelfläche) und je nach Proteingröße für 25-45 min. Nach dem Transfer wurde das Gel zur Effizienzkontrolle des Blots mit SimplyBlue™-SafeStain gefärbt. Nach Kennzeichnung der Membran erfolgte die Immundetektion der Proteine.

Transferpuffer:

25 mM Tris-HCl (pH 8,3); 150 mM Glycin; 10 % (v/v) Methanol

3.5 Immunologische Detektion immobilisierter Proteine auf Membranen

Dem spezifischen Nachweis immobilisierter Proteine auf Membranen liegt die Reaktion eines primären Antikörpers (AK) mit seinem Antigen zugrunde. An diesen Komplex bindet in einer zweiten Antikörperreaktion ein sekundärer Antikörper, an welchen ein Peroxidase-Enzym gekoppelt ist. Dieses Enzym katalysiert eine Lichtreaktion (Chemilumineszenz), welche mit einem Röntgenfilm detektiert wird und dadurch die gebildeten Komplexe nachgewiesen werden können. Nach erfolgtem Semi-Dry-Blot wurden freie Bindungskapazitäten auf der PVDF-Membran mit 4 % (w/v) Milchpulver in 1x TBST für mindestens 30 min bei RT oder bei 4°C üN abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären protein- oder peptidspezifischen Antikörper erfolgte in TBSTM für 1-2 Stunden bei RT bzw. üN bei 4°C. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Membran mit 1x TBST für je 10 min entfernt. Die Detektion des primären Antikörpers erfolgte mit einem gegen diesen gerichteten HRP-konjugierten Sekundärantikörper (HRP, "Horse Radish Peroxidase", Meerrettich-Peroxidase). Nach 1 Stunde Inkubation bei RT wurde die Membran dreimal 15 min mit 1x TBST gewaschen. Die Identifikation der vom Antikörper erkannten Proteine erfolgte über die Umsetzung eines Substrates durch HRP, wobei Chemilumineszenz entsteht. Hierfür wurden ECL™ oder ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagenzien nach Anweisung des Herstellers eingesetzt. Die erzeugte Chemilumineszenz wurde durch Exposition der Membran auf ECL-Hyperfilm sichtbar gemacht und durch die Entwicklung des Röntgenfilms in einem Entwicklergerät (X-Ray Film Processor, Fa. Optimax) dokumentiert. Falls der primäre Antikörper direkt mit HRP konjugiert war, konnte bereits nach Inkubation mit diesem und Waschen mit TBST die Chemilumineszenz-Reaktion durchgeführt werden. In einigen Fällen wurden die Antikörper anschließend durch Inkubation mittels Restore™ Western Blot Stripping Puffer laut den Herstellerangaben von der Membran gelöst, und es konnte eine erneute Immundetektion mit einem anderen Antikörper durchgeführt werden.

10x TBST-Puffer (1.000 ml):	1,5 M Natriumchlorid; 200 mM Tris-HCl (pH 7,4 1 % Tween 20);
1x TBSTM-Puffer:	0,4 % (w/v) Milchpulver in 1x TBST	

3.6 GST-Pulldown-Experimente

Mit dieser Methode können Protein-Protein-Interaktionenu.a. *in vivo* untersucht werden. Hierbei nutzt man die sehr hohe Affinität von Glutathion-S-Transferase (GST) und Glutathion. Eines der beiden zu untersuchenden Proteine (Protein A) wird an ein GST-Peptid fusioniert. Dieses Fusionsprotein (GST-Protein A) wird zusammen mit dem putativen interagierenden Protein B in eukaryotischen Zellen exprimiert. Das Gesamtproteinlysat wird dann mit Glutathion-konjugierten Sepharose-Kügelchen inkubiert, wobei GST hochaffin an Glutathion bindet. Nach Präzipitation der Sepharose-Kügelchen wird somit das GST-Fusionsprotein A im Präzipitat angereichert. Im Falle einer Interaktion der beiden Proteine A und B kann im Präzipitat auch Protein B nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden immer zwei Proteine in einem Zellsystem gleichzeitig exprimiert, wovon eines ein GST-Peptid enthielt.

Vorbehandlung der Gluthation-Sepharose-Kügelchen

Pro Ansatz wurden 75 µl der gelösten Gluthation-konjugierten Sepharose-Kügelchen in vorgekühlte Eppendorfgefäße pipettiert und mit 6.800 Upm bei 4°C für 1 min zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl kaltem TBS, Mischen durch mehrmaliges Invertieren und einem erneuten Zentrifugationsschritt für 1 min mit 6.800 Upm bei 4°C wurde der Überstand verworfen. Dieser Waschschritt wurde noch zweimal wiederholt. Zuletzt wurde TBS hinzugegeben, sodass eine 50%ige Lösung entstand.

Zelllyse

CHO-K1-Zellen (1,4 x 10⁶) wurden in 100 mm Zellkulturschalen kultiviert und bei etwa 90 % Konfluenz mittels Liposomen-vermittelter Transfektion kotransfiziert. 20 – 24 Stunden später wurden sie auf Eis zweimal mit 10 ml kaltem 1x PBS^{+/+} gewaschen, in 1 ml Lysepuffer von der Zellkulturschale abgeschabt, durch Pipettieren homogenisiert und in ein kaltes Eppendorfgefäß überführt. Zur besseren Lyse wurden die Zellhomogenate während eines 20-minütigen Inkubationsschrittes auf Eis mehrmals durch Pipettieren durchmischt. Zur Abtrennung der Zelltrümmer und Zellkerne erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 14.000 Upm und 4°C für 10 min. Der Überstand wurde direkt für die GST-Präzipitation weiterverwendet.

GST-Pulldown

Vom Überstand wurden 50 µl entnommen, in separate Eppendorfgefäße überführt und mit 17 µl 4x SDS-Probenauftragspuffer [mit 12,5 % (v/v) β -Mercaptoethanol] vermischt, 5 min bei 95°C denaturiert und bei -20°C gelagert ("Rohlysat"). Der Rest des Überstands wurde zu den gereinigten Sepharose-Kügelchen gegeben und mindestens 3 h bzw. üN bei 4°C mit 15-20 Upm auf einem Überkopfrotator inkubiert. Danach wurden die Proben 1 min mit 10.000 Upm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde mit 500 µl TBS versetzt, 3 min auf einem Überkopfrotator (15-20 Upm) bei 4°C gemischt und wieder abzentrifugiert (1 min, 10.000 Upm, 4°C). Der Überstand wurde wieder verworfen und dieser Waschschritt mit TBS noch zweimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand bis auf 20 µl abgenommen. Anschließend wurde 4x SDS-Probenauftragspuffer [mit 12,5 % (v/v) β -Mercaptoethanol] hinzugefügt, kurz gevortext, bei 95°C für 5 min denaturiert und zusammen mit dem Rohlysat mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immundetektion analysiert.

TBS:	
Lysepuffer:	

50 mM Tris-HCI (pH 7,4), 150-250 mM NaCI

50 mM Tris-HCl (pH 8); 1x PBS^{+/+}; 50 mM NaCl; 0,5 mM CaCl₂; 1mM MgCl₂; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; pH 7,4 mit HCl einstellen; 1 mM EDTA; 0,5 % NP-40 (Igepal); 1 Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail; 0,7 μ g/ml Pepstatin; 1 mM PMSF oder Pefabloc

3.7 Koimmunpräzipitation

Eine weitere Methode zum Nachweis einer direkten Interaktion zweier Proteine stellt die Koimmunpräzipitation dar, bei der ebenfalls ein Gesamt-Proteinlysat als Ausgangsmaterial dient. Der bei der Koimmunpräzipitation zu dem Zelllysat gegebene Antikörper ist spezifisch gegen das Epitop eines der beiden zu untersuchenden Proteine (Protein A) gerichtet und bindet über seine F_{ab}-Region an dieses. Dieser Antikörper (anti-Protein A) bindet gleichzeitig über seine F_c-Region an speziell beschichtete Agarosekügelchen. Nach einer Inkubation erfolgt ein Zentrifugationsschritt, bei dem die Agarosekügelchen sedimentiert werden. Durch die Bindung an anti-Protein A wird das zu untersuchende Protein A ebenfalls präzipitiert. Interagiert ein Protein (Protein B) mit Protein A, so wird dieses durch die Zentrifugation gleichfalls in das Sediment gezogen und kann dort durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde für die Koimmunpräzipitations-Experimente das Exview™Rot-ANTI-FLAG®M2-Affinitäts-Gel verwendet. So konnten ektopisch exprimierte FLAG-Fusionsproteine im Sediment angereichert werden. Gleichzeitig konnte untersucht werden, ob sich im Sediment ebenfalls der endogene bzw. überexprimierte Interaktionspartner nachweisen ließ. Hierfür wurde das CHO-K1-Zellsystem verwendet.

Vorbehandlung der Agarosekügelchen

50 µl der bereits mit anti-FLAG-Antikörper gekoppelten Agarosekügelchen wurden pro Ansatz in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 500 µl TBS und vorsichtigem Mischen durch Invertieren wurden die Kügelchen bei 8.700 Upm bei 4°C für 30 s abzentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt. Zelllyse

CHO-K1-Zellen (1,2-1,4 x 10⁶) wurden in 100 mm Zellkulturschalen kultiviert und bei etwa 90% Konfluenz mithilfe von Lipofectamin[™] 2000 transfiziert. 20-24 h später wurden die Zellen auf Eis zweimal mit 10 ml eiskaltem 1x PBS^{+/+} gewaschen, in 1 ml Lysepuffer von der Zellkulturschale abgeschabt, durch Pipettieren homogenisiert und in ein kaltes Eppendorfgefäß überführt. Während der anschließenden 20-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellhomogenate mehrmals durch Pipettieren gemischt. Zur Abtrennung der Zelltrümmer und Zellkerne erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 14.000 Upm und 4°C für 10 min. Der Überstand wurde direkt für die Koimmunpräzipitation eingesetzt.

Koimmunpräzipitation

50 µl des Überstandes wurden in separate, vorgekühlte Eppendorfgefäße überführt und mit 17 µl 4x SDS-Probenauftragspuffer [mit 12,5 % (v/v) β -Mercaptoethanol] versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und bei -20°C gelagert ("Rohlysat"). Der verbleibende Überstand wurde zu den vorbehandelten Agarosekügelchen gegeben und für 2-6 h bei 4°C auf einem Überkopfrotator (15-20 Upm) inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 1 min bei 10.000 Upm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Im weiteren Verlauf wurde das Sediment folgendem Waschschritt unterzogen: es wurden 0,5-1 ml kaltes TBS zum Sediment gegeben, die Probe für 3-5 min auf einem Überkopfrotator (15-20 Upm) bei 4°C inkubiert und anschließend bei 10.000 Upm für 1 min erneut zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschritt wurde der Überstand bis auf 20 µl abgezogen. Das Präzipitat wurde mit 7 µl SDS-Probenauftragspuffer [mit 12,5 % (v/v) β -Mercaptoethanol] versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend zusammen mit dem Rohlysat mittels Western-Blot analysiert. TBS: Lysepuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150-250 mM NaCl

50 mM Tris-HCl (pH 8); 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5 % NP-40 (Igepal); 1 Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail; 0,7 μg/ml Pepstatin; 1 mM PMSF oder Pefabloc

4. Zellbiologische Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Für die Zellkulturexperimente wurden CHO-K1-, COS7-, HeLa- und PC12-Zellen verwendet. Diese Zellen wurden in Begasungsbrutschränken bei 37°C, 95 % relativer Feuchte und 5 % CO₂ kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt. CHO-K1-, COS7- und HeLa-Zellen wurden als Adhäsionskulturen auf Polystyrol-Zellkulturschalen gehalten. Für Immunfluoreszenzstudien wurden die Zellen auf Glas-Deckgläschen in 24-Loch-Kulturplatten kultiviert. PC12-Zellen wurden als Adhäsionskulturen auf Collagen-beschichteten (0,1%ige Lösung) Polystyrol-Zellkulturschalen, für Immunfluoreszenzstudien auf Poly-L-Lysin (1 mg/ml) beschichteten Glas-Deckgläschen kultiviert.

<u>CHO-K1</u>

CHO-K1-Zellen wurden in F-12 Nutrient Mixture (Ham) mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS) und 100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin gehalten.

COS7, HeLa

COS7- und HeLa-Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS) und 100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin kultiviert.

PC12

Die Kultivierung von PC12-Zellen erfolgte in RPMI-Medium mit 10% Pferdeserum (HS), 5% fötalem Rinderserum (FBS) und 100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin. Diese Zusammensetzungen werden im folgenden Vollmedium genannt.

4.1.2 Collagenbeschichtung von Zellkulturschalen

Auf eine 100 mm Zellkulturschale wurde 150 µl Collagenlösung (0,1 %) gegeben und mit einer gebogenen Glas-Pasteurpipette (23 mm, Fa. Assistent) gleichmäßig verteilt. Die beschichteten Zellkulturschalen wurden dann unter der sterilen Werkbank für 30 min getrocknet und anschließend bei RT gelagert. Zur Entfernung des überschüssigen Collagens wurden die Platten vor Benutzung zweimal mit 10 ml 1x PBS gespült.

1x PBS:	8,1 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 137 mM NaCl
	2,7 mM KCI; pH 7,3 mit HCI einstellen

4.1.3 Sterilisation der Deckgläschen

Vor Beschichtung der Glasdeckgläschen mit Poly-L-Lysin wurden diese zuvor sterilisiert. Hierzu wurden 200-300 Glasdeckgläschen (18 mm, Fa. Assistent) in einem Erlenmeyerkolben (3 l) mit 200 ml 100 % Ethanol für ca. 4 h auf einem Schüttler inkubiert. Nach 2 h wurde das 100 % Ethanol gewechselt. Danach wurde das Ethanol verworfen und die Glasdeckgläschen mehrmals mit H₂O bidest. schüttelnd gewaschen. Anschließend wurden die Glasdeckgläschen auf Glaspetrischalen vereinzelt und in einem Trockenschrank für 8 h bei 180°C sterilisiert. Die sterilen Glasdeckgläschen wurden in ein steriles Gefäß überführt und bis zur Verwendung bei RT gelagert.

4.1.4 Poly-L-Lysin-Beschichtung von Deckgläschen

Für Immunfluoreszenz-Experimente wurden PC12-Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Glasdeckgläschen (18 mm) in 12-Loch-Kultur-Platten kultiviert. Zur Beschichtung wurden die sterilen Glasdeckgläschen in 12-Loch-Platten überführt und mit je 1 ml Poly-L-Lysin-Lösung (1 mg/ml) überschichtet. Die Inkubation erfolgte für 12-24 h bei 4°C. Danach wurde die Lösung abgezogen und die beschichteten Deckgläschen zweimal mit sterilem H₂O bidest. gewaschen. Zur weiteren Lagerung bei 4°C wurde erneut steriles H₂O bidest. Überschichtet, um Austrocknung zu vermeiden. Direkt vor Kultivierung der Zellen wurde das H₂O bidest. abgezogen und die Zellen auf die beschichteten Glasdeckgläschen ausgesät.

Poly-L-Lysin-Lösung:	100 mg Poly-L-Lysin in 0,1 M Boratpuffer lösen (Endkonzentration: 1 mg/ml), sterilfiltrieren, Lagerung bei $-20^{\circ}C$
0,1 M Boratpuffer (500 ml):	1,55 g Borsäure, 2,375 g Tetraborat, lösen in $\rm H_2O$ bidest., pH 8,5 einstellen; autoklavieren

4.1.5 Passagieren von Zellen

CHO-K1, COS7, HeLa

Die Zellen wurden alle zwei bis vier Tage bei einer Konfluenz von etwa 90 % auf neue Kulturschalen überführt. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit 5-10 ml 1x PBS gewaschen, um die im Serum enthaltenen Proteaseinhibitoren zu entfernen. Die Zellen wurden dann durch Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA bzw. TrypLE Express der Firma Gibco und 2-5 minütiger Inkubation bei 37°C von der Kulturschale abgelöst und je nach Wachstumsgeschwindigkeit und gewünschter Verdünnung im Verhältnis 1:2 bis 1:20 in eine neue Kulturschale mit 10 ml Vollmedium überführt.

<u>PC12</u>

Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage bei einer Konfluenz von etwa 70 % auf neue Kulturschalen überführt. Hierfür wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal vorsichtig mit 5 ml 1x PBS gespült. Danach wurden die Zellen mit 7-10 ml 1x PBS abgespült, in ein 15 ml Zentrifugationsgefäß überführt und für 3 min bei 900 Upm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und die sedimentierten Zellen in 1 ml frischem Vollmedium

resuspendiert. Zur weiteren Vereinzelung der Zellen wurden diese ein bis zweimal durch eine Kanüle gepresst (Sterican, Gr. 12, Fa. Braun) und im Verhältnis 1:2 auf neue Collagenbeschichtete Kulturschalen mit Vollmedium überführt.

4.1.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff oder bei -152°C (Ultra Low, Fa. Sanyo) gelagert und bei Bedarf wieder aufgetaut. Zum Einfrieren wurden die CHO-K1-, COS7- und HeLa-Zellen zunächst mittels Trypsin/EDTA bzw. TrypLE Express von der Kulturschale gelöst und in Suspension gebracht. Die Trypsinreaktion wurde nach ca. 3 min durch Zugabe von Vollmedium gestoppt. PC12-Zellen wurden durch Abspülen mit 1x PBS von der Platte gelöst. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 900 Upm, RT) pelletiert. Das Zellpellet wurde zur Vermeidung von Eiskristallen in Einfriermedium resuspendiert, sodass eine Konzentration von etwa 10⁶ Zellen pro ml Einfriermedium entstand. Diese Zellsuspension wurde in 2 ml Kryoröhrchen (Nunc) aliquotiert, für 20 min bei 4°C in einem Eisbad inkubiert, danach für 1-3 Tage bei -80°C gelagert und anschließend in Lagertanks mit flüssigem Stickstoff oder in die 152°C Tiefkühltruhe überführt. Zum Auftauen der Zellen wurden die gefrorenen Zellaliquots in einem 37°C Wasserbad auf 4°C erwärmt und sofort mit 10 ml vorgewärmtem Vollmedium vermischt. Nach Zentrifugation bei 900 Upm für 2 min bei RT und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet erneut in 10 ml Vollmedium aufgenommen und zur Kultivierung in Kulturschalen überführt.

Einfriermedium (10 ml): 9 ml Vollmedium; 1 ml DMSO

4.1.7 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Die bei dieser Arbeit verwendete Transfektionsmethode mit dem Lipofectamin[™]2000-Reagenz beruht auf dem Prinzip der Lipofektion. Dabei werden kationische Lipide eingesetzt, die über ionische Interaktion mit der eingesetzten DNA Lipid-DNA-Komplexe bilden. Diese Komplexe werden dann von den Zellen durch Endozytose aufgenommen, wodurch die Plasmid-DNA in die Zelle gelangt. Das optimale Verhältnis von DNA und Lipofectamin[™]2000-Reagenz wurde für die jeweiligen Plasmide und Zelllinien ausgetestet.

CHO-K1-, COS7- und HeLa-Zellen

Bei Einzeltransfektionen wurden 1,2 x 10⁶, bei Kotransfektionen 1,4 x 10⁶ Zellen am Tag vor der Transfektion auf 100 mm Polystyrol-Zellkulturschalen ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion etwa eine Konfluenz von 80–90% erreicht hatten. Zur Transfektion wurden Lösung I (400 μ I Optimem1; 4-8 μ g Plasmid-DNA) und Lösung II (400 μ I Optimem1; 8-32 μ I Lipofectamin[™]2000-Reagenz) hergestellt, 5 min bei RT inkubiert und dann durch Pipettieren gemischt. Diese Transfektionslösung wurde dann für weitere 20-30 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die zu transfizierenden Zellen mit 10 ml 1x PBS gewaschen und mit 3,2 ml vorgewärmtem Optimem1 überschichtet. Es folgte eine Inkubation von 5-10 min bei 37°C und 5% CO₂. Danach wurde die Transfektionslösung auf die Zellen aufgetropft, die Kulturgefäße leicht geschwenkt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach fünf bis sechs

Stunden wurde die Transfektionslösung abgesaugt, die Zellen in 10 ml Vollmedium für weitere 18-28 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und diese sodann in die entsprechenden Experimenten eingesetzt. Bei transienten Transfektionen für Immunfluoreszenzexperimente wurden Zellen auf Glasdeckgläschen in 24-Loch-Kulturplatten angezogen. Hierfür wurden einen Tag vor der Transfektion 30.000-80.000 Zellen je Deckgläschen ausgesät. Für Lösung I wurde 50 µl Optimem1 mit 0,5-1 µg Plasmid-DNA und für Lösung II 50 µl Optimem1 mit 1-2 µl Lipofectamin™2000 versetzt. Die Zellen wurden gewaschen, mit 400 µl Optimem1 überschichtet und nach 20-30 min wurde die Transfektionslösung aufgetropft. 5-6 h nach der Transfektion wurde die Transfektionslösung durch 500 µl Vollmedium ersetzt. Die Immunfluoreszenz-Analyse erfolgte 24-30 h nach der Transfektion.

PC12-Zellen

Für Immunfluoreszenz-Experimente wurden PC12-Zellen einer 50-70 % konfluenten 100 mm-Zellkulturschale einen Tag vor der Transfektion auf 12-24 Poly-L-Lysin-beschichtete 18 mm Deckgläschen in Medium ohne Antibiotika (PC12-oAB) ausgesät. Für die Transfektion wurden Lösung I (100 µl Optimem1; 1,5-3 µg Plasmid-DNA) und Lösung II (100 µl Optimem1; 3-8 µl Lipofectamin[™]2000-Reagenz) hergestellt, 5 min bei RT inkubiert und dann durch Pipettieren gemischt. Diese Transfektionslösung wurde für weitere 20-30 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die zu transfizierenden Zellen mit 1 ml 1x PBS vorsichtig gewaschen und mit einer Lösung aus 400 ul vorgewärmten Optimem1 und 100 ul vorgewärmtem Medium ohne Antibiotika (PC12-oAB) überschichtet. Danach erfolgte noch eine Zugabe von 100 ng/ml NGF ("nerve growth factor"). Anschließend wurde die Transfektionslösung aufgetropft, die Kulturgefäße leicht geschwenkt und 20-24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die PC12-Zellen fixiert (4.2). Alternativ wurde das Transfektionsmedium durch Differenzierungsmedium (PC12-Diff) mit 100 ng/ml NGF ersetzt und die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ weiterhin inkubiert. Das Differenzierungsmedium mit 100 ng/ml NGF wurde alle 48 Stunden gewechselt. Die Fixierung und anschließende Immunfluoreszenz-Analyse (4.2) erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten. Bei PI3-Kinase-Hemmstoffversuchen wurde der Hemmstoff LY294002 (Endkonzentration 10 µM) direkt zum Transfektionsansatz und bei allen folgenden Mediumwechsel dazugegeben.

PC12-oAB:	RPMI-Medium; Rinderserum	1(0%	Pferdese	erum;	5%	6	fötales
PC12-Diff:	RPMI-Medium; 100 µg/ml Strep	2% tomy	Pferd /cin	eserum;	100	U/ml	Peni	icillin /

4.2 Immunfluoreszenz-Analysen

CHO-K1, COS7, HeLa

Die subzelluläre Lokalisation von Proteinen und Kolokalisationsstudien wurden mittels Immunfluoreszenz-Färbungen untersucht. CHO-K1-, COS7- oder HeLa-Zellen wurden auf Glas-Deckgläschen in 24-Loch-Kulturplatten ausgesät und am folgenden Tag transient transfiziert. Weitere 24 Std. danach erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung. Die Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS^{+/+} gespült und dann mit 500 µl PFA-Lösung 10 min auf einem Taumelschüttler fixiert. Nach 3x 10 min Waschen mit PBS^{+/+} wurden die Zellen in 500 µl Blockierungs-Lösung zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen für 30-60 min bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Inkubation mit den jeweiligen primären Antikörpern in 30 µl Antikörper-Lösung erfolgte für 2-3 Std. bei RT in einer dunklen feuchten Kammer. Hierfür wurde je Ansatz 30 µl Antikörperlösung mit den jeweiligen Antikörpern auf einen in der feuchten Kammer liegenden Parafilm-Streifen aufgetropft und die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf die Lösung gelegt. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen in die 24-Loch-Kulturplatten zurückgegeben und zweimal 10 min mit 1 ml Hoch-Salz-PBS^{+/+} und zweimal für 10 min mit 1 ml PBS^{+/+} im Dunkeln bei RT gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen in 30 µl Antikörperlösung mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten sekundären Antikörpern für 1 h bei RT im Dunkeln, ebenfalls in der feuchten Kammer, inkubiert und dreimal für jeweils 10 min mit PBS^{+/+} gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Mowiol-488 oder VECTASHIELD® Mounting Medium Hard Set auf Objektträgern eingebettet. Erfolgte die Immunfärbung mit einem direkt Fluoreszenz-markierten Antikörper, so wurden die Zellen für 1,5 h in der feuchten Kammer inkubiert und nach je zweimal 10 min Waschen mit Hoch-Salz-PBS^{+/+} und PBS^{+/+} direkt eingebettet.

PBS ^{+/+} :	1x PBS; 0,5 mM CaCl ₂ ; 1 mM MgCl ₂
Hoch-Salz-PBS ^{+/+} :	PBS ^{+/+} ; 500 mM NaCl
PFA-Lösung:	4% Paraformaldehyd (w/v) in $PBS^{*/*};$ sterilfiltrieren; aliquotieren und bei -20°C lagern; bei 4°C ist diese Lösung nur ca. eine Woche stabil
Blockierungs-Lösung:	2% BSA; 3% Ziegen-Serum; 0,5% Igepal (Nonidet P-40)
Antikörper-Lösung:	3% Ziegen-Serum; 0,1% Igepal (Nonidet P-40)

<u>PC12</u>

Das Neuritenwachstum von PC12-Zellen wurde ebenfalls mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. PC12-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten 18 mm Deckgläschen in 12-Loch-Kulturplatten ausgesät und am folgenden Tag transfiziert. Nach 24-72 h erfolgte die Fixierung mit 4% PFA und ein dreimaliges Waschen mit PBS^{+/+} für jeweils 10 min. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1% Triton X-100 (v/v) für 5 min permeabilisiert und erneut dreimal für 5 min mit PBS^{+/+} gewaschen. Blockierung und Immundetektion mit spezifischen Antikörpern erfolgte wie bereits oben beschrieben.

Permeabilisierungs-Lösung PC12: 0,1% Triton X-100 (v/v) in PBS^{+/+} lösen und bei 4°C dunkel lagern

Blockierungs-Lösung PC12: Antikörper-Lösung PC12: 2% BSA; 3% Ziegen-Serum 3% Ziegen-Serum

Falls TexasRot Phalloidin oder MFP488-Phalloidin zur F-Aktin-Färbung verwendet wurde, wurde das entsprechende Reagenz in einer Konzentration von 0,165 µM direkt in die jeweilige Antikörper-Lösung gegeben. Phalloidin ist das tödliche Gift des Knollenblätterpilzes (Amanita phalloides) und interagiert höchst spezifisch mit F-Aktin, nicht aber mit G-Aktin. Die simultane Darstellung zweier Proteine, wodurch Kolokalisationen untersucht werden können, wird durch die Verwendung von Primärantikörpern aus verschiedenen Spezies ermöglicht. Mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Sekundärantikörper dienen hierbei zur Erkennung der Primärantikörper. Die Auswertung der Präparate erfolgte entweder an dem Fluoreszenzmikroskop Leica DM RA (Leica Mikrosysteme, Bensheim) und mittels der CytoVision™-Software (Applied Imaging, Newcastle, GB) oder an dem konfokalen Laserscanning Inversmikroskop Leica TCS-NT (Leica Mikrosysteme, Bensheim) mit der entsprechenden Leica TCS-Software ("TCS confocal software"). Wurde für den Nachweis eines Proteins ein Cy3- oder Alexa-Fluor546-konjugierter Antikörper verwendet, so wurde dieser mit Hilfe eines TexasRot-Filters (Leica; Anregung 576 nm, Emission 628 nm) bzw. eines Helium-Neon-Lasers (Anregung 543 nm, Emission 570 nm) visualisiert. Erfolgte der Nachweis eines Proteins über einen Fluorescein- oder Alexa-Fluor488-konjugierten Antikörper, so wurde für dessen Visualisierung ein L5-Filter (Leica; Anregung 480 nm, Emission 505 nm) bzw. ein Argon-Laser (Anregung 488 nm, Emission 515-525 nm) verwendet. Es wurde überwiegend die konfokale Laserscanningmikroskopie verwendet, da diese die Darstellung definierter Zellebenen ermöglicht. Die Aufnahmen wurden anschließend mit dem Programm Jasc Paint Shop Pro™ Version 7.0 (Jasc Software, Panningen, NL) weiterbearbeitet.

Name	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge
Fluorescein	488 nm	515 nm
Alexa-Fluor [®] 488	495 nm	519 nm
Cy3 (Cyanin3)	552 nm	568 nm
Alexa-Fluor [®] 546	556 nm	573 nm
Texas [®] Rot	591 nm	608 nm
MFP [®] 488	488 nm	519 nm

Tab. XV: Verwendete Fluoreszenzkonjugate

Angegeben sind der Name des Fluoreszenzkonjugats sowie dessen Anregungs- und Emissionswellenlänge.

IV. Ergebnisse

1. Biochemische und zellbiologische Experimente zur Charakterisierung der Protein-Protein-Interaktion von ARHGEF6/αPIX und FE65

1.1 Vorbemerkungen

Im Rahmen der Dissertation von Herrn Dr. Georg Rosenberger wurde nach neuen Interaktionspartnern von ARHGEF6/αPIX gesucht, wofür er das SOS-Recruitment System, ein Hefe-Zwei-Hybrid-System, verwendete, mittels dessen sieben neue Protein-Interaktionspartner von ARHGEF6/αPIX identifiziert wurden (Rosenberger, 2004). Eines dieser im Hefesystem interagierenden Proteine war das neuronale Adaptorprotein FE65/APBB1 (im Folgenden mit FE65 bezeichnet).

1.2 Analyse der Interaktion zwischen ARHGEF6/αPIX und FE65 durch GST-Pulldown-Experimente

Um die Interaktion von ARHGEF6/aPIX mit FE65 zu bestätigen, wurde diese mit Hilfe von GST-Pulldown-Experimenten weiter untersucht. Für die Transfektionen wurden die Plasmide pDEST27-FE65 (GST-FE65) und pMT2SM-HA-ARHGEF6/aPIX (HA-ARHGEF6/aPIX) verwendet. Nach Expression befinden sich beide Fusionspeptide jeweils am N-terminalen Ende des exprimierten Proteins. CHO-K1-Zellen wurden mit beiden Konstrukten transient kotransfiziert und die Zelllysate für die GST-Pulldown-Experimente verwendet. Als Negativkontrolle wurden CHO-K1-Zellen mit pMT2SM-HA-ARHGEF6/aPIX und dem pDEST27-Vektor kotransfiziert und das hergestellte Zelllysat ebenfalls in die GST-Pulldown-Experimente eingesetzt. Die Analyse erfolgte mittels Western-Blot (Abb. 10).



Abb. 10: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von ARHGEF6/αPIX und FE65 und Darstellung der Interaktion zwischen GST-FE65 und HA-ARHGEF6/αPIX durch GST-Pulldown-Experimente und Western-Blots

In (A) ist die Domänenstruktur von ARHGEF6/αPIX und FE65 schematisch dargestellt. CH/ calponin homology; SH3/ : Src homology 3; DH/ :Dbl homology; PH/ : pleckstrin homology; GBD/ : GIT1-binding domain; CC/ : coiled-coil; WW/ : Tryptophan (W)-Tryptophan (W); PTB/ : "Phosphotyrosine-binding". (B) CHO-K1-Zellen wurden mit den oberhalb der Blots angegebenen Konstrukten kotransfiziert. Als Negativkontrolle wurde der GST-Vektor (pDEST27) verwendet. Die Blots in der oberen Reihe zeigen den Nachweis von HA-ARHGEF6/αPIX in den Rohlysaten (Spalten 1 und 2) und im Präzipitat (Spalte 4). Auf den unteren Blots ist die Expression des GST-FE65-Fusionsproteins sowohl im Rohlysat (Spalte 2) als auch angereichert im Präzipitat (Spalte 4, obere Bande) dargestellt. In den Negativkontrollen ist die Expression des GST-Proteins gezeigt (Spalten 1 und 3). Links sind einige Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards angegeben.

Die Expression von HA-ARHGEF6/αPIX konnte mit einem anti-HA-Antikörper in beiden Rohlysaten nachgewiesen werden (Abb. 10B, Spalten 1 und 2). HA-ARHGEF6/αPIX wurde im Präzipitat der Zellen detektiert, die auch GST-FE65 exprimierten (Abb. 10B, Spalte 4), wohingegen HA-ARHGEF6/αPIX nicht im Präzipitat von Zellen nachgewiesen werden konnte, die mit dem GST-Vektor und pMT2SM-HA-ARHGEF6/αPIX kotransfiziert waren (Abb. 10B, Spalte 3). Durch das Verwenden eines anti-GST-Antikörpers wurden sowohl die Rohlysate als auch die Präzipitate auf das Vorhandensein von GST bzw. GST-FE65 getestet (Abb. 10, Spalten 1-4, untere Reihe). Bei der ebenfalls durch den anti-GST-Antikörper detektierten kleineren Bande mit einer Größe von ungefähr 60 KDa handelt es sich wahrscheinlich um ein spezifisches Abbauprodukt von FE65, da diese Bande stets bei allen durchgeführten Experimenten auftrat (Abb. 10B, Spalte 4, untere Bande). Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass HA-ARHGEF6/αPIX vermutlich *in vivo* mit FE65 interagiert.

1.3 Identifizierung der mit FE65 interagierenden Domänen von ARHGEF6/αPIX mithilfe von GST-Pulldown-Experimenten

Um die mit FE65 interagierende Domäne von ARHGEF6/αPIX zu bestimmen, wurden weitere GST-Pulldown-Experimente verschiedenen Deletionsmutanten von ARHGEF6/αPIX durchgeführt (Abb. 11B).



Abb. 11: Eingrenzung des interagierenden Bereichs von ARHGEF6/αPIX mit FE65 mithilfe von GST-Pulldown-Experimenten

(A) Die Domänenstruktur der verschiedenen ARHGEF6/αPIX-Proteine ist schematisch dargestellt. **(B)** CHO-K1-Zellen wurden mit pDEST27 (GST-Vektor) als Negativkontrolle bzw. pDEST27-FE65 und jeweils einem pMT2SM-HA-ARHGEF6/αPIX-Konstrukt [siehe (A)] kotransfiziert. Die Expression der HA-ARHGEF6/αPIX-Fusionsproteine ist in den Rohlysaten (obere Reihe) dargestellt. Der Nachweis von HA-ARHGEF6/αPIX in den Präzipitaten ist in der mittleren Reihe gezeigt. Die Anreicherung der GST-FE65-Fusionsproteine wurde in den Präzipitaten nachgewiesen (untere Reihe, jeweils rechte Spalte). In den Negativkontrollen konnte die Expression des GST-Proteins detektiert werden (untere Reihe, jeweils linke Spalte). Links neben den Blots sind die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards angegeben.

In allen Rohlysaten und Präzipitaten konnte die Expression bzw. Anreicherung der GST-Fusionsproteine bzw. GST-Proteine mithilfe eines anti-GST-Antikörpers nachgewiesen werden (Abb. 11B, untere Reihe; für Rohlysate Daten nicht gezeigt). Die Expression der verschiedenen HA-ARHGEF6/αPIX-Fusionsproteine konnte durch einen anti-HA-Antikörper in allen Rohlysaten gezeigt werden (Abb. 11B, obere Reihe). In den Präzipitaten konnten mithilfe des anti-HA-Antikörpers nur die Fusionsproteine HA-ARHGEF6/αPIX-WT, HA-ARHGEF6/αPIXΔCH und HA-ARHGEF6/αPIXΔDH detektiert werden. Die beiden Fusionsproteine HA-ARHGEF6/αPIXΔGBDΔCC und HA-ARHGEF6/αPIXΔCC wurden in den Präzipitaten nicht nachgewiesen (Abb. 11B, mittlere Reihe, jeweils rechte Spalte). Die Daten aus diesen GST-Pulldown-Experimenten weisen darauf hin, dass der C-terminale Bereich von ARHGEF6/αPIX, der die beiden Proteindomänen "Git1-binding domain" (GBD) und "coiled-coil" (CC) enthält, für die Interaktion mit FE65 notwendig ist.

1.4 Eingrenzung des interagierenden Bereichs von FE65 mit ARHGEF6/αPIX mittels GST-Pulldown-Versuchen

Zur Eingrenzung des interagierenden Bereichs von FE65 mit ARHGEF6/αPIX wurden ebenfalls GST-Pulldown-Experimente durchgeführt. Hierfür wurden zunächst mithilfe des GATEWAY-Systems verschiedene cDNA-Konstrukte von FE65 in dem eukaryotischen Expressionsvektor pDEST27 hergestellt, wodurch nach Expression ein N-terminal mit GST gekoppeltes Fusionsprotein entsteht. Die Domänenstruktur der zu exprimierenden FE65-Proteine ist in Abb. 12 dargestellt.



Abb. 12: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der zu exprimierenden FE65-Proteine

Die Domänenstruktur der verschiedenen FE65-Proteine ist schematisch dargestellt. WW/ Tryptophan (<u>W</u>)-Tryptophan (<u>W</u>); PTB/ : "Phosphotyrosine-binding". Die Aminosäuren (AS) sind in Klammern angegeben.

Für die GST-Pulldown-Versuche wurden CHO-K1-Zellen mit dem pDEST27-Vektor bzw. den verschiedenen pDEST27-FE65-Konstrukten, zusammen mit pMT2SM-HA-ARHGEF6/αPIX transient transfiziert (Abb. 13A).



Abb. 13: Eingrenzung des interagierenden Bereichs von FE65 für die Assoziation mit ARHGEF6/αPIX mittels GST-Pulldown-Experimenten und Western-Blots

(A) Die Domänenstruktur der exprimierten FE65-Proteine ist schematisch dargestellt. (B) CHO-K1-Zellen wurden mit dem jeweiligen FE65-Konstrukt in pDEST27 (Spalten 2-6 und 8-14) bzw. pDEST27 (GST-Vektor, Spalten 1 und 7) und pMT2SM-HA-ARHGEF6/ α PIX kotransfiziert. Dargestellt ist die Detektion von HA-ARHGEF6/ α PIX in den Rohlysaten und Präzipitaten (obere beiden Reihen). Der Nachweis der Expression der GST-Fusionsproteine in den Rohlysaten sowie in den Präzipitaten ist gezeigt (untere beiden Reihen). Die Präzipitate von FE65-N3 und FE65- Δ N wurden in den Präzipitaten vertauscht (unterste Reihe, Spalte13: FE65- Δ N; Spalte 14: FE65-N3). In den Negativkontrollen konnte das GST-Protein nachgewiesen werden (unterste Reihe, Spalten 1 und 7). Links neben den Western-Blots sind die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards angegeben. Die Expression des HA-ARHGEF6/aPIX-Proteins konnte durch die Detektion mit einem anti-HA-Antikörper in allen Rohlysaten gezeigt werden (Abb. 13B, oberste Reihe). In den Präzipitaten konnte HA-ARHGEF6/ α PIX nur in den Proben nachgewiesen werden, die folgende FE65-Fusionsproteine koexprimierten (Abb. 13, zweite Reihe von oben): FE65 (Spalten 6 und 8), FE65-N-WW (Spalten 2 und 9), FE65-N (Spalte 10) und FE65-N2 (Spalte 12) (Abb. 13B, zweite Reihe von oben). Die schwache Interaktion von ARHGEF6/aPIX mit FE65-WW, FE65-C-PTB1+2 und FE65-N1 (Abb. 13B, Spalten 3, 4 und 11) konnte in wiederholten Versuchen nicht bestätigt werden. In allen Rohlysaten konnte mittels eines anti-GST-Antikörpers die Expression und in allen Präzipitaten die Anreicherung der verschiedenen GST-FE65-Fusionsproteine nachgewiesen werden (Abb. 13B, untere beiden Reihen). Bei den kleineren Banden, die durch den anti-GST-Antikörper ebenfalls detektiert wurden, handelt es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte der FE65-Fusionsproteine, die stets bei allen durchgeführten GST-Pulldown-Versuchen auftraten (Abb. 13B, beide untere Reihen). Die Resultate dieser GST-Pulldown-Experimente deuten daraufhin, dass die Protein-Protein-Interaktion zwischen FE65 und ARHGEF6/aPIX über den N-Terminus von FE65, direkt vor der WW-Domäne (AS 136-254), vermittelt werden könnte.

1.5 Untersuchung der Interaktion zwischen ARHGEF6/αPIX und FE65 durch Koimmunpräzipitation

Zur weiteren Untersuchung der Bindung von ARHGEF6/αPIX an FE65 wurden Koimmunpräzipitations-Experimente durchgeführt. Es wurde zunächst versucht, überexprimiertes FLAG-FE65 zu präzipitieren und endogenes ARHGEF6/αPIX mithilfe eines spezifischen Antikörpers im Sediment nachzuweisen. Der gegen ARHGEF6/αPIX gerichtete, kommerziell erhältliche anti-SH3-Antikörper erkennt sowohl ARHGEF6/αPIX als auch das dazu sehr homologe ARHGEF7/βPIX (Manser et al., 1998; Koh et al., 2001). Die cDNA von FE65 wurde in den eukaryotischen Expressionsvektor pFLAG-CMV4-DEST kloniert, sodass nach Expression ein FLAG-Peptid N-terminal an FE65 fusioniert vorliegt (Abb. 14).



Abb. 14: Western-Blot nach Koimmunpräzipitation von FLAG-FE65 mit endogenem ARHGEF6/αPIX aus CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden mit den jeweils angegebenen Konstrukten transfiziert, als Negativkontrolle diente die Transfektion mit pFLAG-CMV4-DEST (FLAG-Vektor, Spalten 1 und 2). Der obere Western-Blot zeigt den Nachweis von endogenem ARHGEF6/ α PIX mittels des anti-SH3-Antikörpers. Rohlysate (R) und Präzipitate (P) wurden wie angezeigt jeweils nebeneinander aufgetragen. Die Detektion von FLAG-FE65 im unteren Western-Blot erfolgte mit Hilfe eines anti-FLAG-Antikörpers in Rohlysaten und Präzipitaten. Durch Pfeile rechts ist die Zuordnung der Banden zu ARHGEF6/ α PIX bzw. ARHGEF7/ β 1PIX gezeigt. Links sind einige Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards angezeigt.

Durch die Verwendung eines anti-FLAG-Antikörpers konnte die Expression des FLAG-FE65-Fusionsproteins in den Rohlysaten (Abb. 14, untere Reihe, Spalten 3 und 7) sowie im Präzipitat der Probe (Abb. 14, untere Reihe, Spalte 5) nachgewiesen werden. Nach ektopischer Expression der FE65-Fusionsproteine wurde im Western-Blot neben dem erwarteten Fusionsprotein mit einer Größe von ~120 KDa noch eine weitere Bande (~100 KDa) sichtbar (Abb. 14, untere Reihe, Spalten 3, 5 und 7). In den Spalten 1 und 2 konnte kein Signal mit dem anti-FLAG-Antikörper detektiert werden, da das FLAG-Peptid zu klein ist, um unter den gegebenen Bedingungen auf einem Western-Blot nachgewiesen zu werden. In der Negativkontrolle (Präzipitation mit IgG1-Antikörper) wurde kein angereichertes FLAG-FE65 im Präzipitat nachgewiesen (Abb. 14, untere Reihe, Spalte 8). Mit dem anti-SH3-Antikörper konnte in allen Rohlysaten (Abb. 14, obere Reihe, Spalten 1, 3 und 7) endogenes ARHGEF6/αPIX (87 kDa) nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten zwei Isoformen des im Zelllysat vorhandenen endogenen homologen ARHGEF7/BPIX-Proteins, ARHGEF7/B1PIX (78 kDa) und ARHGEF7/ β 2PIX (68 kDa, Daten nicht gezeigt) detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte in keinem der Präzipitate endogenes ARHGEF6/ α PIX detektiert werden (Abb. 14, obere Reihe, Spalten 2, 5 und 8). Demnach ist FLAG-FE65 nicht in der Lage, endogenes ARHGEF6/ α PIX kozupräzipitieren.

einem zweiten Versuchsansatz wurde Koimmunpräzipitation In eine nach Überexpression beider Proteine durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die Kodierregion von **FE65** mittels der GATEWAY-Technologie in den eukarvotischen Expressionsvektor pMT2-SM-HA-DEST eingebracht. Mithilfe desselben Systems wurde die cDNA von ARHGEF6/aPIX in den Vektor pFLAG-CMV4-DEST kloniert. Die Experimente wurden wie bereits beschrieben durchgeführt (Abb. 15).



Abb. 15: Western-Blots nach Koimmunpräzipitations-Experimenten von HA-FE65 mit FLAG-ARHGEF6/αPIX in CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden mit pMT2SM-HA-DEST-FE65 und pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIX bzw. pFLAG-CMV4-DEST (FLAG-Vektor) als Negativkontrolle transfiziert. Auf dem oberen Western-Blot ist die Detektion von HA-FE65 in den Rohlysaten (R) und Präzipitaten (P) gezeigt. Im unteren Western-Blot ist der Nachweis von FLAG-ARHGEF6/αPIX durch Verwendung eines anti-FLAG-Antikörpers in den Rohlysaten und Präzipitaten dargestellt. Links neben den Blots sind einige Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards angegeben.

Mit einem anti-HA-Antikörper wurde die HA-FE65-Expression in den Rohlysaten überprüft und auch hier konnte neben dem erwarteten Fusionsprotein von 120 KDa ebenfalls ein wahrscheinlich spezifisches Abbauprodukt von etwa 100 KDa detektiert werden (Abb. 15, obere Reihe, Spalten 1, 3 und 7). Jedoch konnte in keinem der Präzipitate der Nachweis von HA-FE65 erbracht werden (Abb. 15, obere Reihe, Spalten 2, 5 und 8). Mittels eines anti-FLAG-Antikörpers wurde sowohl in den Rohlysaten (Abb. 15, untere Reihe, Spalten 3 und 7) als auch im Präzipitat (Abb. 15, Spalte 5) das FLAG-ARHGEF6/ α PIX-Fusionsprotein detektiert. Wie bereits erwähnt, konnte in der Vektor-Negativkontrolle das FLAG-Peptid unter den gegebenen Bedingungen nicht dargestellt werden (Abb. 15, untere Reihe, Spalten 1 und 2). Zusammengefasst ergeben die erzielten Daten keinen Hinweis darauf, dass FE65 und ARHGEF6/ α PIX in Koimmunpräzipitations-Experimenten unter den untersuchten Bedingungen miteinander interagieren.

1.6 Immunzytochemische Untersuchungen zur Protein-Protein-Interaktion von ARHGEF6/αPIX und FE65

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung einer Protein-Protein-Interaktion ist die Durchführung von Immunfluoreszenz-Experimenten. Der Nachweis beider Proteine in räumlicher Nähe, eine so genannte Kolokalisation, kann ein weiterer Hinweis auf Interaktion sein.

1.6.1 Analyse der subzellulären Lokalisation von ARHGEF6/ α PIX und FE65 in CHO-K1- und PC12-Zellen

Bevor eine mögliche Kolokalisation untersucht wurde, wurde die subzelluläre Lokalisation beider Proteine analysiert. Hierbei war zusätzlich von Interesse zu untersuchen, ob die subzelluläre Lokalisation der beiden überexprimierten Proteine in verschiedenen eukaryotischen Zelllinien übereinstimmt.

Subzelluläre Lokalisation von ARHGEF6/aPIX in CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden mit pMT2SM-HA-ARHGEF6/αPIX transient transfiziert und anschließend das HA-ARHGEF6/αPIX-Fusionsprotein mit einem Fluoresceinkonjugierten anti-HA-Antikörper detektiert. Gleichzeitig wurde die Lokalisation von F-Aktin durch TexasRot-konjugiertes Phalloidin sichtbar gemacht, um mögliche Veränderungen des Aktinzytoskeletts nachzuweisen. Die Auswertung der Immunfluoreszenzexperimente erfolgte mithilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie (Abb. 16). Auf morphologische Auswirkungen der Überexpression von ARHGEF6/αPIX wird in einem späteren Kapitel im Rahmen dieser Arbeit eingegangen (Kapitel 3).



Abb. 16: Subzelluläre Lokalisation von HA-ARHGEF6/αPIX und Kolokalisation mit F-Aktin in CHO-K1-Zellen durch Immunfluoreszenz

CHO-K1-Zellen wurden mit pMT2SM-HA-ARHGEF6/αPIX transient transfiziert und anschließend mit einem Fluorescein-konjugierten anti-HA-Antikörper angefärbt (grün; A). Gleichzeitig wurde F-Aktin durch die Verwendung von TexasRot-konjugiertem Phalloidin sichtbar gemacht (rot; B). Durch Überlagerung der einzelnen Bilder entsteht eine gelbe Pseudofärbung an den Stellen, an denen beide Proteine kolokalisieren (C). Diese Stellen sind durch weiße Pfeile markiert und deuten auf die Zellperipherie, an der es zur Bildung von Lamellipodien, Filopodien und Membranumstülpungen kommt.

HA-ARHGEF6/ α PIX ist vor allem im Zytoplasma lokalisiert. An der Zellperipherie, an der es zur Ausbildung von Lamellipodien, Filopodien und Membranumstülpungen kommt, kommt es jedoch zu einer deutlichen Konzentration von HA-ARHGEF6/aPIX (Abb. 16A). F-Aktin als Bestandteil des Aktinzytoskeletts findet sich vor allem an den dünnen Aktinfasern innerhalb des Zytoplasmas, akkumuliert jedoch auch verstärkt an der Zellperipherie. Beim Vergleich von transfizierten und nicht-transfizierten Zellen konnte kein Unterschied in der Morphologie des Aktin-Zytoskeletts beobachtet werden (Abb. 16B). Eine Kolokalisation von HA-ARHGEF6/αPIX mit F-Aktin konnte vor allem an der Zellperipherie, im Bereich von Lamellipodien, Filopodien und Membranumstülpungen beobachtet werden (Weißer Pfeil in Abb. 16C).

Subzelluläre Lokalisation von ARHGEF6/aPIX in PC12-Zellen

Um die Funktion von ARHGEF6/αPIX in einem neuronalen Kontext zu untersuchen, wurde dessen subzelluläre Lokalisation in PC12-Zellen analysiert. Das PC12-Zellsystem wird als neuronales Modellsystem angesehen, da diese Zellen in der Lage sind, nach Stimulation mit einem Wachstumsfaktor ("nerve growth factor", NGF) neuritenähnliche Ausläufer zu bilden (Kapitel 3).

PC12-Zellen wurden in Gegenwart von NGF mit pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIX transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion fixiert bzw. für weitere 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurde das FLAG-ARHGEF6/αPIX-Fusionsprotein mittels eines Fluorescein-konjugierten anti-FLAG-Antikörpers sichtbar gemacht. Gleichzeitig wurde F-Aktin mit TexasRot-konjugiertem Phalloidin angefärbt. Die in Abb. 17 gezeigten Bilder wurden mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Auf morphologische Veränderungen der PC12-Zellen nach einer ARHGEF6/αPIX-Überexpression wird in Kapitel 3 dieser Arbeit eingegangen.



Abb. 17: Subzelluläre Lokalisation von ARHGEF6/αPIX und partielle Kolokalisation mit F-Aktin in PC12-Zellen nach verschiedenen Fixierungszeitpunkten

PC12-Zellen wurden mit pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIX transfiziert und anschließend mit einem Fluorescein-konjugierten anti-FLAG-Antikörper angefärbt (grün; A, D). Gleichzeitig wurde F-Aktin durch die Verwendung von TexasRot-konjugiertem Phalloidin sichtbar gemacht (rot; B, E). Durch Überlagerung der einzelnen Bilder entsteht eine gelbe Pseudofärbung an den Stellen, an denen beide Proteine kolokalisieren (C, F). Diese Stelle ist durch einen weißen Pfeil markiert und deuten auf die Zellperipherie, an der es z.T. zur Ausbildung von Zellfortsätzen kommt.

Die subzelluläre Lokalisation von FLAG-ARHGEF6/aPIX in PC12-Zellen ist vergleichbar mit der in CHO-K1-Zellen. FLAG-ARHGEF6/αPIX konnte vor allem im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden, wohingegen es zu einer schwachen Akkumulation des Proteins an der Zellperipherie kommt (Abb. 17A und D). PC12-Zellen bilden im Vergleich zu den vorher gezeigten CHO-K1-Zellen das Zytoskelett nicht so stark aus. Deshalb lässt sich F-Aktin vor allem an den Randbereichen der PC12-Zellen detektieren (Abb. 17B und E). Nach Überlagerung der Bilder zeigte sich in einigen Zellen eine schwache Kolokalisation von ARHGEF6/ α PIX mit F-Aktin an der Zellperipherie [Abb. 17C (weißer Pfeil) und F]. In diesen Bereichen beginnen die Zellen mit der Bildung von Zellausläufern wie Neuriten und deren Vorläufern, den Filopodien. Der Fixierungszeitpunkt der PC12-Zellen hatte keine Auswirkungen auf die subzelluläre Lokalisation von FLAG-ARHGEF6/aPIX. Durch diese Immunfluoreszenz-Analysen konnte gezeigt werden, dass die subzelluläre Lokalisation von ARHGEF6/aPIX in zwei eukaryotischen Zelllinien vergleichbar ist und dass die Überexpression dieses Proteins keine auffälligen strukturellen Veränderungen des F-Aktins zur Folge hat.

Subzelluläre Lokalisation von FE65 in CHO-K1-Zellen

Im Rahmen dieser Immunfluoreszenz-Versuche sollte neben der subzellulären Lokalisation von FE65 auch die Spezifität eines neuen, kommerziell erhältlichen Antikörpers gegen FE65 überprüft werden. Dieser Antikörper wurde hergestellt, indem die im zentralen Bereich des Proteins gelegene WW-Domäne zur Immunisierung verwendet wurde (Sabo et al., 1999).

CHO-K1-Zellen wurden mit pMT2SM-HA-DEST-FE65 transfiziert. Die Detektion des HA-FE65-Fusionsproteins erfolgte entweder mittels eines Fluorescein-gekoppelten anti-HA-Antikörpers oder durch die Verwendung des anti-Fe65-Antikörpers gefolgt von einem Alexa-Fluor-488-konjugierten Zweitantikörper. Auch hier wurde durch die Verwendung von TexasRot-konjugiertem Phalloidin F-Aktin sichtbar gemacht (Abb.



Abb. 18: Subzelluläre Lokalisation von HA-FE65 und Kofärbung mit F-Aktin in CHO-K1-Zellen durch Immunfluoreszenzanalysen

CHO-K1-Zellen wurden mit pMT2SM-HA-DEST-FE65 transfiziert und anschließend mit einem anti-Fe65-Primärantikörper, gefolgt von einem AlexaFluor-488-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörper gefärbt (Grün, A). Alternativ wurden transfizierte CHO-K1-Zellen mit einem Fluorescein-konjugierten anti-HA-Antikörper angefärbt (grün; D). In allen Zellen wurde F-Aktin, durch die Verwendung von TexasRot-konjugiertem Phalloidin sichtbar gemacht (rot; B, E). Durch Überlagerung der einzelnen Bilder entsteht eine gelbe Pseudofärbung an den Stellen, an denen beide Proteine kolokalisieren (C, F). Die Analysen erfolgten durch Immunfluoreszenzmikroskopie.

HA-FE65 ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, gleichzeitig ließ es sich auch diffus verteilt im Zytoplasma nachweisen. Eine verstärkte Lokalisation an der Zellperipherie konnte jedoch nicht gezeigt werden. Die Detektion des HA-FE65-Fusionsproteins unter Verwendung eines anti-Fe65-Antikörpers zeigte keine Unterschiede zur subzellulären
Verteilung unter Anwendung eines gegen das N-terminale HA-Peptid gerichteten Antikörpers (Abb. 18A und D). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass der kommerziell erhältliche anti-Fe65-Antikörper überexprimiertes FE65 spezifisch erkennt. Auch hier ließen sich keine morphologischen Unterschiede des Aktinzytoskeletts zwischen nichttransfizierten und transfizierten Zellen feststellen (Abb. 18B und E). Nach Überlagerung der Bilder konnte keine Kolokalisation von HA-FE65 mit F-Aktin nachgewiesen werden (Abb. 18C und F).

Subzelluläre Lokalisation von FE65 in PC12-Zellen

Um FE65 ebenfalls in einem neuronalen Zellsystem zu charakterisieren, wurde dessen subzelluläre Lokalisation in PC12-Zellen untersucht. Diese wurden in Gegenwart von NGF mit pFLAG-CMV4-DEST-FE65 transfiziert und nach 24 bzw. 48 h fixiert. Bei der anschließenden Immunfluoreszenzfärbung wurde die FLAG-FE65-Expression durch einen Fluorescein-konjugierten anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen. Gleichzeitig wurden diese Zellen mit TexasRot-Phalloidin gefärbt (Abb. 19).



Abb. 19: Subzelluläre Lokalisation von FE65 und Kofärbung mit F-Aktin in PC12-Zellen zu verschiedenen Fixierungszeitpunkten

PC12-Zellen wurden mit pFLAG-CMV4-DEST-FE65 transfiziert und anschließend mit einem Fluorescein-konjugierten anti-FLAG-Antikörper angefärbt (grün; A, D, G). Weiße Pfeilspitzen zeigen auf auffallende FE65-positive Strukturen (D). Gleichzeitig wurde F-Aktin durch die Verwendung von TexasRot konjugiertem Phalloidin sichtbar gemacht (rot; B, E, H). Durch Überlagerung der einzelnen Bilder entsteht, angezeigt durch weiße Pfeile, eine gelbe Pseudofärbung an den Stellen, an denen beide Proteine kolokalisieren (C, F, I).

In PC12-Zellen ist das FLAG-FE65-Fusionsprotein ebenso wie in CHO-K1-Zellen sowohl im Kern als auch diffus im Zytoplasma und in den Zellausläufern lokalisiert D. G). Ungefähr die Hälfte der analysierten FLAG-FE65-(Abb. 19A, überexprimierenden PC12-Zellen zeigten punktförmige, klar abgrenzbare Strukturen im Zellkern (Abb. 19D, weiße Pfeilspitzen, nach 48h Daten nicht gezeigt). Die Zahl dieser punktförmigen Ansammlungen beläuft sich auf zwei bis fünf pro Kern. Auch die Fixierung der transfizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten hatte weder einen Einfluss auf die Bildung dieser Strukturen im Kern noch auf die subzelluläre Lokalisation von FLAG-FE65. Beim Vergleich der F-Aktin-Färbungen waren keine morphologischen Unterschiede zwischen transfizierten und nicht-transfizierten PC12-Zellen erkennbar (Abb. 19B, E, H). Nach Überlagerung der Bilder konnte eine partielle Kolokalisation von FE65 und F-Aktin, vor allem in den Spitzen der Zellausläufer, in denen F-Aktin akkumuliert, nachgewiesen werden (Abb. 19C, F, I, weiße Pfeile). Die Überexpression von FE65 in CHO-K1- und PC12-Zellen hat gezeigt, dass dessen subzelluläre Lokalisation in diesen Zelllinien vergleichbar ist.

1.6.2 Analyse der Kolokalisation von ARHGEF6/αPIX und FE65 in CHO-K1- und PC12-Zellen

Um eine mögliche Kolokalisation von FE65 mit ARHGEF6/αPIX nachweisen zu können, wurden Koimmunfluoreszenz-Experimente sowohl an CHO-K1- als auch an PC12-Zellen durchgeführt.

Subzelluläre Verteilung von ARHGEF6/aPIX und FE65 in CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden mit pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIX und pMT2SM-HA-DEST-FE65 transient kotransfiziert. HA-FE65 wurde durch Verwendung eines Fluorescein-konjugierten anti-HA-Antikörpers (grün), FLAG-ARHGEF6/αPIX mittels eines Cy3-gekoppelten anti-FLAG-Antikörpers (rot) nachgewiesen. Alternativ wurde ein Teil der Immunfärbungen mit einem spezifischen anti-Fe65- und einem anti-FLAG-Primärantikörper durchgeführt, gefolgt von einer Inkubation mit einem AlexaFluor-488konjugierten (grün) und einem AlexaFluor-546-gekoppelten (rot) Sekundärantikörper. Der Nachweis der Lokalisation erfolgte durch konfokale Laserscanmikroskopie (Abb. 20).



Abb. 20: Kolokalisation von FLAG-ARHGEF6/αPIX und HA-FE65 in kotransfizierten CHO-K1-Zellen durch Immunfluoreszenz

CHO-K1-Zellen wurden mit pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIX und pMT2SM-HA-DEST-FE65 kotransfiziert. Die Detektion von FLAG-ARHGEF6/αPIX erfolgte durch einen Cy3konjugierten anti-FLAG-Antikörper (rot, A) bzw. durch einen anti-FLAG als Primär- und einen Ziege-anti-Kaninchen-AlexaFluor-546 als Sekundärantikörper (rot, E). HA-FE65 wurde mit einem Fluorescein-gekoppelten anti-HA-Antikörper (grün, B) bzw. mit einem anti-Fe65 als Primär- und einem Ziege-anti-Maus-AlexaFluor-488 als Sekundärantikörper sichtbar gemacht (grün, F). Nach Überlagerung der Bilder wird die gelbe Pseudofarbe zum Nachweis der Kolokalisation beider Proteine im Zytoplasma und verstärkt an der Zellperipherie deutlich (C, G, weiße Pfeilspitzen). In der Vergrößerung von Teilbereichen der Zelle wird deutlich, dass es sich dabei um Lamellipodien-ähnliche Strukturen bzw. Membranumstülpungen handelt (D, H).

Wie beschrieben, lokalisiert FLAG-ARHGEF6/ α PIX im Zytoplasma und auch an der Zellperipherie (Abb. 20A, E). Koexprimiertes HA-FE65 zeigt eine Lokalisation im Zellkern, im Zytoplasma und verstärkt an der Zellmembran (Abb. 20B, F). Da eine verstärkte Membranlokalisation von nur FE65-exprimierenden Zellen nicht beobachtet werden konnte (Abb. 18), könnte FE65 durch ARHGEF6/ α PIX an die Membran transloziert werden. Eine Kolokalisation beider Proteine konnte einerseits im Zytoplasma und andererseits verstärkt in Lamellipodien-ähnlichen Strukturen an der Zellmembran beobachtet werden (Abb. 20C, G, weiße Pfeile). Dies wird vor allem in den Ausschnittsvergrößerungen dieser Bereiche deutlich (Abb. 20D, H). Diese Daten deuten daraufhin, dass es in der Zelle zu einer Assoziation zwischen ARHGEF6/ α PIX und FE65 kommt. Die Konzentration beider Proteine an der Zellperipherie lässt vermuten, dass die Interaktion von ARHGEF6/ α PIX mit FE65 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Bildung von Zellausläufern spielen könnte.

Subzelluläre Lokalisation von ARHGEF6/aPIX und FE65 in PC12-Zellen

Um einen weiteren zellbiologischen Hinweis auf eine Interaktion von ARHGEF6/αPIX und FE65 zu bekommen, wurden die entsprechenden Experimente an PC12-Zellen durchgeführt. PC12-Zellen wurden in Anwesenheit von NGF mit pDEST53-

ARHGEF6/αPIX und pFLAG-CMV4-DEST-FE65 kotransfiziert und für zwei Tage kultiviert. Nach Expression von pDEST53-ARHGEF6/αPIX kommt es zur Bildung eines GFP-("green fluorescent protein") ARHGEF6/αPIX-Fusionsproteins, das durch Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm grünes Licht emittiert. FLAG-FE65 wurde durch die Verwendung eines Cy3-konjugierten anti-FLAG-Antikörpers nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte mithilfe von konfokaler Laserscanmikroskopie (Abb. 21).



Abb. 21: Kolokalisation von GFP-ARHGEF6/αPIX und FLAG-FE65 in PC12-Zellen mittels Immunfluoreszenz

PC12-Zellen wurden mit pDEST53-ARHGEF6/αPIX und pFLAG-CMV4-DEST-FE65 in Gegenwart von NGF kotransfiziert und für 48 h kultiviert. Die subzelluläre Lokalisation von FLAG-FE65 ist durch Immunfärbung mittels eines Cy3-gekoppelten anti-FLAG-Antikörpers gezeigt (rot; B, F). Die durch Autofluoreszenz von GFP dargestellte subzelluläre Lokalisation von GFP-ARHGEF6/αPIX ist in A und E dargestellt. Kolokalisation beider Proteine wird durch die pseudogelben Bereiche in der Überlagerung angezeigt (C, G). Die weißen Pfeile zeigen auf die Kolokalisationsbereiche an der Zellmembran bzw. in den Spitzen der Ausläufer. In der Vergrößerung sind ausgewählte Bereiche der Kolokalisation dargestellt (D, H).

Nach Kotransfektion ist die subzelluläre Lokalisation von GFP-ARHGEF6/ α PIX (Abb. 21A und E) und FLAG-FE65 (Abb. 21B und F) mit der nach den entsprechenden Einzeltransfektionen vergleichbar (siehe Kapitel 1.6.1).

Da auch in diesem Zellsystem die beiden Proteine partiell im Zytoplasma und verstärkt in den Zellausläufern kolokalisieren (Abb. 21C und D, G und H), könnte dies ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Assoziation und gleichzeitig wichtige Rolle von ARHGEF6/αPIX und FE65 bei der Bildung neuritenähnlicher Zellfortsätze sein.

2. Auswirkungen von Deletionen verschiedener Bereiche von ARHGEF6/αPIX auf die subzelluläre Lokalisation in verschiedenen eukaryotischen Zelllinien

ARHGEF6/αPIX besteht aus verschiedenen funktionellen Proteindomänen. Es ist bekannt, dass über einige dieser Domänen Interaktionen mit anderen Proteinen vermittelt werden. Bisher konnte jedoch noch nicht abschließend geklärt werden, welcher Bereich von ARHGEF6/αPIX für die korrekte subzelluläre Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle verantwortlich ist. So führt die Überexpression eines ARHGEF6/αPIX-Proteins, dem 28 Aminosäuren in der N-terminalen CH-Domäne fehlen (ARHGEF6/αPIXΔAS56-83), in CHO-K1-Zellen zu einer punktförmigen Verteilung des Proteins im Zytoplasma (Rosenberger et al., 2003). Dies deutet auf eine möglicherweise wichtige Funktion der CH-Domäne bei der Lokalisation von ARHGEF6/αPIX innerhalb der Zelle hin.

2.1 Analyse der subzellulären Lokalisation verschiedener ARHGEF6/αPIX-Proteine in CHO-K1- und PC12-Zellen

Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Analysen sollte untersucht werden, ob bestimmte Domänen von ARHGEF6/aPIX für die subzelluläre Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle wichtig sind. Aufgrund der bereits erläuterten veränderten Lokalisation von ARHGEF6/adAS56-83 sollte, neben diesem Fusionsprotein, auch die subzelluläre Lokalisation von ARHGEF6 α PIX Δ CH, bei welchem die gesamte N-terminale CH-Domäne deletiert wurde, untersucht werden. Von weiterem Interesse war, ob die Deletion der C-terminalen Dimerisierungsdomäne ebenfalls Auswirkungen auf die subzelluläre Lokalisation von ARHGEF6/aPIX hat. Hierzu wurde zunächst die cDNA von ARHGEF6/aPIXACH bzw. ARHGEF6/aPIXACC mittels einer Topoisomerase-Reaktion in den Vektor pENTR-D-TOPO eingebracht. Die Kodierregion von ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 bzw. ARHGEF6/ α PIX lag bereits im pENTR-D-TOPO vor. Über eine Rekombinationsreaktion wurde die jeweilige cDNA in den eukaryotischen Expressionsvektor pFLAG-CMV4-DEST überführt. Die Domänenstruktur der verwendeten ARHGEF6/ α PIX-Proteinvarianten ist in Abb. 22 erläutert.



Abb. 22: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von ARHGEF6/ α PIX, ARHGEF6/ α PIX Δ CH, ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 und ARHGEF6/ α PIX Δ CC

Die Domänenstruktur ist schematisch dargestellt: CH/ : <u>c</u>alponin <u>h</u>omology; SH3/ : <u>Src</u> <u>homology</u> <u>3</u>; DH/ : <u>Dbl homology</u>; PH/ : <u>Pleckstrin homology</u>; GBD/ : <u>Git1-binding</u> <u>domain</u>; CC/ : <u>coiled-coil</u>. Die Aminosäuren (AS) sind in Klammern angegeben.

CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden mit den bereits oben erwähnten Konstrukten transfiziert. Die Expression der Fusionsproteine wurde mithilfe eines Fluorescein-gekoppelten anti-FLAG-Antikörpers nachgewiesen. Gleichzeitig wurde zum Nachweis möglicher Veränderungen des Aktinzytoskeletts F-Aktin durch Verwendung von TexasRedgekoppeltem Phalloidin sichtbar gemacht. Anschließend erfolgte die Auswertung mithilfe von Fluoreszenz- bzw. konfokaler Laserscanmikroskopie (Abb. 23).



Abb. 23: Subzelluläre Lokalisation von ARHGEF6/αPIX, ARHGEF6/αPIXΔCH, ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 bzw. ARHGEF6/αPIXΔCC in CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden mit **(A)** pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIX, **(B)** pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIXΔCH, **(C)** pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 oder **(D)** pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIXΔCC transfiziert. Die subzelluläre Lokalisation der FLAG-Fusionsproteine wurde mittels eines Fluorescein-gekoppelten anti-FLAG-Antikörpers dargestellt (A-D, jeweils linkes Bild). Durch die Verwendung von Phalloidin-TexasRed wurde in allen Zellen F-Aktin sichtbar gemacht (A-D, jeweils mittleres Bild). Nach Überlagerungen weißt die pseudogelbe Färbung auf Bereiche der Kolokalisation hin (A-D, jeweils rechtes Bild, weiße Pfeile).

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel beschrieben, ist FLAG-ARHGEF6/ α PIX vor allem im Zytoplasma und verstärkt an der Zellperipherie lokalisiert (Abb. 23A, FLAG- α PIX). Damit verglichen resultiert die Überexpression der anderen untersuchten Fusionsproteine in einer veränderten subzellulären Verteilung: FLAG-

ARHGEF6/ α PIX Δ CH ist ebenfalls im Zytoplasma und an der Zellperipherie lokalisiert, jedoch kommt es zur Bildung eines leicht punktierten Musters, welches vor allem an der Zellperipherie konzentriert ist (Abb. 23B, FLAG-αPIXΔCH). Die Überexpression von FLAG-ARHGEF6/αPIX∆AS56-83 führt zur Bildung größerer punktförmiger Strukturen, die auch über das gesamte Zytoplasma verteilt sind, jedoch nicht an der Zellperipherie akkumulieren (Abb. 23C, FLAG- α PIX Δ AS56-83). Im Gegensatz dazu ist überexprimiertes FLAG-ARHGEF6/ α PIX Δ CC fast ausschließlich im Zellkern lokalisiert, allerdings ist auch eine schwache Expression im Zytoplasma zu beobachten (Abb. 23 D, FLAG- α PIX Δ CC). Anhand der Färbung von F-Aktin wird deutlich, dass die Überexpression von FLAG-ARHGEF6/αPIX, FLAG-ARHGEF6/αPIXΔCC bzw. FLAG-ARHGEF6/aPIXAAS56-83 keine strukturellen Veränderungen des Aktinzytoskeletts zur Folge hat (Abb. 23A, C und D, F-Aktin), während die ARHGEF6/ α PIX Δ CHexprimierenden CHO-K1-Zellen deutlich weniger Stressfasern aufweisen und F-Aktin teilweise in punktförmigen Ansammlungen vorkommt (Abb. 23B, F-Aktin). Nach Überlagerung der einzelnen Bilder kann bei FLAG-ARHGEF6/aPIX eine deutliche Kolokalisation mit F-Aktin an der Zellperipherie, an der sich Zellausläufer bilden, nachgewiesen werden (Abb. 23 A, Überlagerung, weißer Pfeil). Die Kolokalisation von F-Aktin mit FLAG-ARHGEF6/ α PIX Δ CH ist auf punktuelle Ansammlungen an der Zellperipherie begrenzt (Abb. 23B, Überlagerung, weißer Pfeil), während FLAG-ARHGEF6/aPIXAAS56-83 bzw. FLAG-ARHGEF6/aPIXACC weder an der Peripherie noch im Zytoplasma der Zellen mit F-Aktin kolokalisieren (Abb. 23C und D, Überlagerung).

PC12-Zellen

Um die beobachteten veränderten Lokalisationen der aberranten ARHGEF6/αPIX-Proteine in PC12-Zellen zu charakterisieren, wurden diese auch in diesem Zellsystem ektopisch exprimiert. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert und die Fusionsproteine wie bereits beschrieben detektiert. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Abb. 24).





PC12-Zellen wurden in Anwesenheit von NGF mit (A) pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/aPIX, pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIXΔCH. pFLAG-CMV4-DEST-(C) **(B)** ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 oder (D) pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIXΔCC transfiziert und für 48 h kultiviert. Die subzelluläre Lokalisation der FLAG-Fusionsproteine wurde durch Immunfärbung mittels eines Fluorescein-konjugierten anti-FLAG-Antikörpers sichtbar gemacht.

Die subzelluläre Lokalisation aller untersuchter Fusionsproteine ist mit der in CHO-K1-Zellen vergleichbar: Während FLAG-ARHGEF6/aPIX vor allem im Zytoplasma und verstärkt an der Zellperipherie lokalisiert ist (Abb. 24A), ist FLAG-ARHGEF6/ α PIX Δ CH ebenfalls im Zytoplasma und verstärkt in punktförmigen Ansammlungen an der Zellperipherie nachweisbar (Abb. 24B). FLAG-ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 ist in punktförmigen Strukturen im gesamten Zytoplasma lokalisiert (Abb. 24C), wohingegen FLAG-ARHGEF6/αPIXΔCC fast ausschließlich im Kern detektierbar ist (Abb. 24D). Die gleichzeitig durchgeführte Färbung von F-Aktin hat gezeigt, dass keins der überexprimierten Proteine zu sichtbaren Veränderungen des Aktinzytoskeletts führt (Daten nicht gezeigt). Die Daten aus diesen Immunfluoreszenz-Experimenten lassen vermuten, dass sowohl die N-terminale CH-Domäne als auch die C-terminale coiledcoil-Domäne eine wichtige Funktion bei der Lokalisation von ARHGEF6/aPIX innerhalb der Zelle haben.

2.2 Immunzytochemische Untersuchungen zur Identifizierung der ARHGEF6/αPIXΔAS56-86-positiven Strukturen in verschiedenen eukaryotischen Zelllinien

Durch das punktförmige Muster und die gleichmäßige Verteilung der ARHGEF6/aPIXAAS56-83-positiven Strukturen innerhalb des gesamten Zytoplasmas der Zellen lag die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um vesikuläre Zellkompartimente, wie beispielsweise Endosomen, handeln könnte. In verschiedenen Veröffentlichungen wurde bereits über einen Zusammenhang zwischen der PIX-Proteinfamilie und dem vesikulären Transport berichtet (Di Cesare et al., 2000, Matafora et al., 2001; Manabe et al., 2002). Aufgrund dessen wurden zunächst Kolokalisations-Experimente mit verschiedenen Endosomen-spezifischen Proteinen in CHO-K1-Zellen durchgeführt.

Untersuchungen an CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden mit pMT2SM-HA-ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 transient transfiziert. Die Expression von HA-ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 wurde mittels eines primären anti-HA-Antikörpers und eines sekundären AlexaFluor-488-konjugierten Antikörpers nachgewiesen. Gleichzeitig erfolgte die Detektion der zu untersuchenden endogenen Markerproteine mittels eines jeweils spezifischen primären Antikörpers und eines AlexaFluor-546-gekoppelten Sekundärantikörpers (Abb. 25).



Abb. 25: Subzelluläre Lokalisation von HA-ARHGEF6/αPIX∆AS56-83 und Kofärbung mit verschiedenen endogenen, Endosomen-spezifischen Proteinen in CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden mit pMT2SM-HA-ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 transfiziert. Die subzelluläre Lokalisation von HA-ARHGEF6/aPIXAAS56-83 wurde durch Verwendung eines primären anti-HA-Antikörpers und eines sekundären AlexaFluor-488-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörpers dargestellt (A-D, grün). In den überlagerten Bildern deuten pseudogelbe Bereiche auf Kolokalisation hin. Die weißen Quadrate zeigen die vergrößerten Ausschnitte an (A-D, Überlagerung und Vergrößerung). (A) Zusätzlich zu HA-ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 wurde endogenes EEA1 mittels eines primären anti-EEA1- und eines sekundären AlexaFluor-546 gekoppelten anti-Maus-Antikörpers nachgewiesen (rot). (B) Neben HA-ARHGEF6/aPIXAAS56-83 wurde endogenes γ-Adaptin durch Verwendung eines anti-γ-Adaptin-Antikörpers als Primärund eines anti-Maus-AlexaFluor-546 als Sekundärantikörper sichtbar gemacht (rot). (C) Gleichzeitig mit HA-ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 wurde endogenes α -Adaptin mittels eines primären anti-aAdaptin- und eines sekundären AlexaFluor-546-anti-Maus-Antikörpers detektiert (rot). (D) Mittels eines primären anti-δSA4-Antikörpers und durch Verwendung eines sekundären Alexa-Fluor546-konjugierten anti-Maus-Antikörpers neben wurde HA-ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 endogenes δ -Adaptin nachgewiesen (rot). Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Laserscanmikroskopie.

Frühe Endosomen, detektiert durch endogenes EEA1 ("early endosome antigen 1"), sind ebenfalls in einem punktierten Muster innerhalb des gesamten Zytoplasmas verteilt. Auch hier ist eine leichte Akkumulation an der Zellperipherie zu sehen (Abb. 25A, EEA1). Nach Überlagerung kommt es im Zytoplasma der Zelle zu keiner gelben Pseudofärbung, was auch in der Ausschnittsvergrößerung deutlich wird (Abb. 25A, Überlagerung und Vergrößerung). Aufgrund der starken Konzentration von EEA1 in der Kernperipherie, wahrscheinlich im Golgi-Apparat, kommt es zu einer gelben Pseudofärbung in diesem Bereich, welche jedoch als unspezifisch gewertet wurde (Abb. 25A, Überlagerung). Die weiterhin verwendeten Antikörper erkennen jeweils Untereinheiten heterotetramerer Adaptorkomplexe, die alle bei Transportprozessen Clathrin-bedeckter Vesikel eine Rolle spielen. y-Adaptin, eine Untereinheit des AP1-Komplexes, lokalisiert in einem punktförmigen Muster innerhalb des gesamten Zytoplasmas und verstärkt an der Zellperipherie (Abb. 25B, γ -Adaptin). Nach Kolokalisation Überlagerung konnte eine partielle von γ-Adaptin und ARHGEF6/aPIXAAS56-83, vor allem in Bereichen der Zellperipherie, nachgewiesen werden (Abb. 25B, Überlagerung). In der Vergrößerung wird jedoch deutlich, dass die Mehrheit der ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83-positiven Strukturen nicht mit γ -Adaptin kolokalisiert (Abb. 25B, Vergrößerung). Endogenes α -Adaptin, ein Markerprotein des AP-2 Komplexes, liegt ebenfalls punktförmig im Zytoplasma verteilt vor (Abb. 25C, α-Adaptin). Überlagerung und Ausschnittsvergrößerung zeigen, dass α -Adaptin und ARHGEF6/αPIX∆AS56-83 nicht kolokalisieren (Abb. 25C, Überlagerung und Vergrößerung). δ-Adaptin, eine Untereinheit des AP-3-Komplexes, liegt innerhalb des Zytoplasmas, aber vor allem in der Kernperipherie ebenfalls in einem punktförmigen Muster vor (Abb. 25D, δ -Adaptin). Die Überlagerung zeigt auch hier, dass dieses FLAG-ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 kolokalisiert mit Protein nicht (Abb. 25D. Überlagerung und Vergrößerung). An PC12-Zellen wurden vergleichbare Experimente durchgeführt und auch hier konnte nur mit γ -Adaptin eine partielle Kolokalisation mit FLAG-ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83, allem Bereich Zellausläufer, vor im der nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Untersuchungen an HeLa-Zellen

Weitere vesikuläre, von einer eigenen Membran umschlossene Zellkompartimente sind die Lysosomen. Aufgrund der ebenfalls punktförmigen Verteilung von Lysosomen innerhalb Zelle der sollte untersucht werden. ob es sich bei den ARHGEF6/aPIXAAS56-83-positiven Strukturen um diese handelt. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper erkennen spezifisch humane lysosomale Proteine, weshalb von ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 die subzelluläre Lokalisation und mögliche Kolokalisation mit Lysosomen an HeLa-Zellen untersucht wurde. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit pMT2SM-HA-ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 transient transfiziert und die Expression von HA-ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 mithilfe eines primären anti-HA- und

eines sekundären AlexaFluor-488 gekoppelten Antikörpers nachgewiesen. Die subzelluläre Lokalisation der untersuchten lysosomalen Proteine wurde durch die Verwendung von spezifischen Erstantikörpern und AlexaFluor-546-konjugierten Zweitantikörpern sichtbar gemacht (Abb. 26).



Abb. 26: Kofärbung von HA-ARHGEF6/αPIX∆AS56-83 mit LAMP-1 bzw. LAMP-2 in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden mit pMT2SM-HA-ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 transfiziert. Exprimiertes HAαPIXΔAS56-83 wurde mittels anti-HA- als Primär- und anti-Kaninchen-AlexaFluor-488 als Sekundärantikörper nachgewiesen (A und B, HA-αPIXΔAS56-83). In **(A)** wurde neben HA-ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 endogenes LAMP-1 durch Verwendung eines primären anti-LAMP-1 und eines sekundären AlexaFluor-546-konjugierten anti-Maus-Antikörpers detektiert (LAMP-1). **(B)** Die subzelluläre Lokalisation von endogenem LAMP-2 wurde mithilfe eines anti-LAMP-2 als Primär- und eines Alexa-Fluor-546-anti-Maus als Sekundärantikörpers zusätzlich zu HA-ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 sichtbar gemacht (LAMP-2). Nach Überlagerung kam es zu keiner Pseudogelbfärbung. Die weißen Kästchen deuten die vergrößerten Ausschnitte an (A und B, Überlagerung, Vergrößerung). Die Analyse erfolgte am konfokalen Laserscanmikroskop.

Die Überexpression von HA-ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 führt auch in HeLa-Zellen zu der bekannten punktierten subzellulären Lokalisation des Fusionsproteins (Abb. 26A und B, HA- α PIX Δ AS56-83). Der Nachweis der endogenen lysosomalen Markerproteine LAMP-1 und LAMP-2 ("lysosomal-associated membrane proteins 1 and 2") zeigt, dass auch diese in einem punktförmigen Muster im Zytoplasma, jedoch vor allem in der Peripherie des Zellkerns vorliegen (Abb. 26A und B). In den überlagerten Bildern und auch in den Ausschnittsvergrößerungen wird deutlich. dass HA-ARHGEF6/αPIX∆AS56-83 weder mit LAMP-1 noch mit LAMP-2 kolokalisiert (Abb. 26A und B, Überlagerung und Vergrößerung). Auch in COS7-Zellen konnte keine Kolokalisation von ARHGEF6/αPIX∆AS56-83 mit LAMP-1 und LAMP-2 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Daten zeigen, dass es sich bei den ARHGEF6/aPIXAAS56-83-positiven Strukturen mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um Lysosomen handelt.

2.3 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von ARHGEF6/αPIX∆AS56-83 in CHO-K1-Zellen bei Koexpression verschiedener Rac1- bzw. Cdc42-Proteinvarianten

Die partielle Kolokalisation von ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 und γ-Adaptin in CHO-K1und PC12-Zellen, insbesondere an der Zellperipherie gibt einen Hinweis darauf, dass es sich bei den ARHGEF6/αPIXΔAS56-83-positiven Strukturen möglicherweise um AP1-Komplex-assoziierte Vesikel handeln könnte. Da noch nicht vollständig geklärt werden konnte, in welchen subzellulären Kompartimenten sich das mutierte ARHGEF6/αPIX-Protein befindet, sollte nun untersucht werden, ob eine Koexpression verschiedener Rac1- bzw. Cdc42-Proteinvarianten zu einer veränderten subzellulären Lokalisation des ARHGEF6/αPIXΔAS56-83-Proteins führt. Dies konnte bereits für andere Proteine des Rho-GTPase-Zyklus gezeigt werden (Matafora et al., 2001).

Hierfür standen cDNAs der verschiedener Rac1- bzw. Cdc42-Proteinvarianten in dem eukaryotischen Expressionsvektor pRK5-MYC bzw. pRK5-FLAG zur Verfügung. CHO-K1-Zellen wurden mit pMT2SM-HA-ARHGEF6/aPIX bzw. pMT2SM-HA-ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 und pRK5-MYC-Rac1 bzw. pRK5-MYC-Cdc42 kotransfiziert. Die subzelluläre Lokalisation der HA-ARHGEF6/aPIX-Fusionsproteine wurde durch die Verwendung eines Fluorescein-konjugierten anti-HA-Antikörpers dargestellt. Der Nachweis exprimierter MYC-Rac1- bzw. MYC-Cdc42-Fusionsproteine erfolgte mithilfe eines Cy3-gekoppelten anti-MYC-Antikörpers (Abb. 27). Die Auswertung wurde mithilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie durchgeführt.



Abb. 27: Subzelluläre Lokalisation von HA-ARHGEF6/αPIX bzw. HA-ARHGEF6/αPXΔAS56-83 und MYC-Rac1 bzw. MYC-Cdc42 in kotransfizierten CHO-K1-Zellen mittels Immunfluoreszenz

CHO-K1-Zellen wurden mit **(A)** pMT2SM-HA-ARHGEF6/ α PIX und pRK5-MYC-Rac1, **(B)** pMT2SM-HA-ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 und pRK5-MYC-Rac1, **(C)** pMT2SM-HA-ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 und pRK5-MYC-Cdc42 bzw. **(D)** pMT2SM-HA-ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 und pRK5-MYC-Cdc42 kotransfiziert. Exprimierte HA-Fusionsproteine wurden mit einem Fluorescein-gekoppelten anti-HA-Antikörper (A-D, HA- α PIX bzw. HA- α PIX Δ AS56-83), MYC-Fusionsproteine mit einem Cy3-konjugierten anti-MYC-Antikörper (A-D, MYC-Rac1 bzw. MYC-Cdc42) detektiert. Nach Überlagerung weißt die pseudogelbe Färbung auf Kolokalisation hin. Weiße Kästchen zeigen die Ausschnittsvergrößerungen an.

Die Lokalisation von HA-ARHGEF6/ α PIX ist sowohl nach Koexpression mit MYC-Cdc42 als auch mit MYC-Rac1 unverändert (Abb. 27A und C, HA- α PIX). Auch HA-ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 liegt bei gleichzeitiger MYC-Rac1- bzw. MYC-Cdc42-Expression, wie nach Einzeltransfektion, in einem punktierten Muster vor (Abb. 27B und D, HA- α PIX Δ AS56-83), allerdings fiel bei Koexpression mit MYC-Cdc42 eine

geringere Anzahl dieser ARHGEF6/aPIX-positiven Strukturen auf (Abb. 27D, HA- α PIX Δ AS56-83). Überexprimiertes MYC-Rac1 ist hauptsächlich im Zytoplasma, jedoch auch verstärkt an der Zellperipherie, an der sich Zellfortsätze bilden, nachweisbar (Abb. 27A und B, MYC-Rac1). Das starke Signal im Zellkern, das bei allen im Rahmen dieser Experimente untersuchten MYC-Fusionsproteine auftritt, ist wahrscheinlich auf eine Kreuzreaktion des Antikörpers zurückzuführen. Da MYC als eukaryotischer Transkriptionsfaktor im Kern vorhanden ist, könnte der verwendete Antikörper auch die im Kern vorhandenen endogenen Proteine erkennen. Auch MYC-Cdc42 ist im Zytoplasma und verstärkt an der Zellmembran lokalisiert, wo es zur Bildung von Ausläufern wie Lamellipodien und Filopodien kommt (Abb. 27C und D, MYC-Cdc42). Vor allem in diesen Bereichen kommt es zur Kolokalisation von HA-ARHGEF6/aPIX und MYC-Rac1 bzw. MYC-Cdc42 (Abb. 27A und C, Überlagerung und Vergrößerung). Dagegen ist nach Überlagerung von HA-ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 mit MYC-Rac1 oder mit MYC-Cdc42 keine Kolokalisation zu beobachten, was vor allem in den Ausschnittsvergrößerungen deutlich wird (Abb. 27B und D, Überlagerung und Vergrößerung).

Eine Koexpression von HA-ARHGEF6/αPIX bzw. HA-ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 mit dominant-negativen Rac1- bzw. Cdc42-Proteinvarianten, deren Lokalisation sich nicht von der der Wildtyp-Proteine unterschied, hatte keine Auswirkungen auf die subzelluläre Lokalisation der HA-ARHGEF6-Proteine (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu führte die Koexpression der konstitutiv-aktiven Proteinvarianten FLAG-Rac1L61 bzw. MYC-Cdc42L61 zu Veränderungen in der Lokalisation der untersuchten ARHGEF6/αPIX-Proteine (Abb. 28).



Abb. 28: Kolokalisation von HA-ARHGEF6/αPIX bzw. HA-ARHGEF6/αPIX∆AS56-83 mit konstitutiv-aktivem FLAG-Rac1L61 bzw. MYC-Cdc42L61 in CHO-K1-Zellen durch Immunfluoreszenz

CHO-K1-Zellen wurden mit (A) pMT2SM-HA-ARHGEF6/ α PIX und pRK5-FLAG-RacL61 oder mit (B) pMT2SM-HA-ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 und pRK5-FLAG-Rac1L61 kotransfiziert. In (C) wurden die Zellen mit pMT2SM-HA-ARHGEF6/ α PIX und pRK5-MYC-Cdc42L61 und in (D) mit pMT2SM-HA-ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 und pRK5-MYC-Cdc42L61 kotransfiziert. Exprimierte HA-Fusionsproteine wurden mit einem Fluorescein-gekoppelten anti-HA-Antikörper (A,C, HA- α PIX oder B, D, HA- α PIX Δ AS56-83) nachgewiesen. Die Detektion von FLAG-RacL61 erfolgte mithilfe eines Cy3-konjugierten anti-FLAG-Antikörpers (A-B, FLAG-Rac1L61). MYC-Cdc42L61 wurde mittels eines Cy3-konjugierten anti-MYC-Antikörpers sichtbar gemacht (C, D, MYC-Cdc42L61). Die Entstehung von Pseudogelb zeigt Bereiche von Kolokalisation an. Weiße Quadrate verweisen auf die vergrößerten Ausschnitte.

Die Koexpression mit konstitutiv-aktivem Rac1 führt zu einer vor allem an der Zellperipherie und im Bereich der Zell-Zell-Kontakte verstärkten Konzentration von HA-ARHGEF6/ α PIX (Abb. 28A, HA- α PIX). Da FLAG-Rac1L61 ebenfalls in diesen Bereichen lokalisiert ist (Abb. 28A, FLAG-Rac1L61), zeigt dort nach Überlagerung die

Pseudogelbfärbung eine Kolokalisation dieser Proteine an (Abb. 28A, Überlagerung und Vergrößerung). Nach Koexpression von HA-ARHGEF6/ α PIX mit konstitutivaktivem MYC-Cdc42L61 sind beide Proteine im Zytoplasma und auch verstärkt an der Zellperipherie lokalisiert (Abb. 28C, HA- α PIX und MYC-Cdc42L61), weshalb auch in diesen Bereichen eine Kolokalisation zu beobachten ist (Abb. 28C, Überlagerung und Vergrößerung). Im Gegensatz zu den vorhergehenden Experimenten bewirkt die Koexpression von konstitutiv-aktivem FLAG-Rac1L61 bzw. MYC-Cdc42L61 die fast vollständige Auflösung der HA-ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83-positiven zellulären Strukturen. Das aberrante Protein HA-ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 ist demnach, wie auch HA-ARHGEF6/ α PIX, gleichmäßig im Zytoplasma und verstärkt an der Zellperipherie nachweisbar (Abb. 28B und D, HA- α PIX Δ AS56-83), wo es sowohl mit FLAG-Rac1L61 als auch mit MYC-Cdc42L61 kolokalisiert (Abb. 28B und D, Überlagerung und Vergrößerung).

Die durch diese Immunfluoreszenz-Experimente erhaltenen Daten haben gezeigt, dass die konstitutiv-aktiven Proteinvarianten von Rac1 (Rac1L61) und Cdc42 (Cdc42L61) in der Lage sind, die subzelluläre Lokalisation von HA-ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 zu verändern.

3. Untersuchungen zur Funktion von ARHGEF6/αPIX bei der Differenzierung von PC12-Zellen

Für ARHGEF7/ β PIX konnte zusammen mit dem PIX-Interaktionspartner PAK ("p21 aktivated kinase") und der GTPase Rac1 eine wichtige Funktion beim Auswachsen von Neuriten in PC12-Zellen nachgewiesen werden (Obermeier et al., 1998; Shin et al., 2002; 2004). Aufgrund dessen und aufgrund der bei Patienten mit mentaler Retardierung gefundenen Mutationen in *ARHGEF6/* α *PIX* sollte der Einfluss von ARHGEF6/ α PIX auf das Neuritenwachstum in einem neuronalen Zellsystem untersucht werden.

3.1 Etablierung eines Zellsystems zur Untersuchung der Neuritenbildung

Um die Bildung von Zellfortsätzen untersuchen zu können, musste zunächst ein geeignetes Zellsystem etabliert werden. PC12-Zellen stammen aus einem Nebennierentumor der Ratte (Greene und Tischler, 1976) und werden auch als Modellsystem zur Untersuchung neuronaler Differenzierung und Entwicklung angesehen, da sie durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren neuritenähnliche Zellfortsätze reversibel ausbilden können.

Nach der Transfektion wurden die Zellen für 1-3 Tage in Anwesenheit von NGF kultiviert und die überexprimierten Fusionsproteine mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffkonjugierten Antikörpern detektiert. Gleichzeitig wurde F-Aktin des Aktinzytoskeletts mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem Phalloidin gefärbt, um den Phänotyp der nicht transfizierten mit dem der transfizierten Zellen vergleichen zu können. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop, und es wurde zwischen ausgebreiteten Zellen und nicht ausgebreiteten Zellen unterschieden. Eine Zelle wurde als "ausgebreitet" gewertet, wenn der Zellkörper abgeflacht war, der Zelldurchmesser mindestens das Doppelte des Kerndurchmessers angenommen hatte und sich lamellipodienähnliche Ausläufer gebildet hatten. Im Gegensatz dazu wurden Zellen, die einen kleinen, rundlichen Zellkörper hatten und dünne Zellfortsätze bildeten, als "nicht ausgebreitet"

Zur Analyse nicht-transfizierter Zellen wurden PC12-Zellen auf Poly-L-Lysinbeschichteten Glasdeckgläschen in Anwesenheit von NGF kultiviert und nach 24, 48 bzw. 72 Stunden fixiert (Abb. 29).



Abb. 29: Morphologie von NGF-stimulierten PC12-Zellen zu verschiedenen Fixierungszeitpunkten und quantitative Auswertung des Phänotyps

PC12-Zellen wurden in Anwesenheit von NGF auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. In (A) wurden die Zellen mit TexasRot-Phalloidin gefärbt. Dargestellt sind PC12-Zellen aus drei unterschiedlichen Experimenten nach den angegebenen Kultivierungszeiträumen. (B) Quantifizierung des Phänotyps der PC12-Zellen. Im Diagramm sind jeweils die prozentualen Mittelwerte für ausgebreitete und nicht ausgebreitete Zellen aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt, wobei jeweils 70-100 Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie ausgewertet wurden (: nicht ausgebreitet; : ausgebreitet). Oberhalb der Balken sind die jeweiligen Prozentwerte angegeben.

Die Mehrzahl der PC12-Zellen begannen 24 Stunden nach NGF-Stimulation mit der Bildung von Zellausläufern, wobei der Zellkörper klein und kugelig blieb und sich die Anzahl neuritenartigen Zellausläufer auf eins bis sechs pro Zelle belief (Abb. 29A obere Reihe). Ein Teil der Zellen bildete jedoch keine solchen Ausläufer, flachten sich ab und bildeten eher lamellipodienähnliche Strukturen (Abb. 29A, untere Reihe). 65% der Zellen zeigten bereits nach 24 Stunden einen nicht ausgebreiteten Phänotyp, während 35% abgeflacht waren und eine ausgebreitete Morphologie aufwiesen (Abb. 29B, 24h NGF). Nach 48 Stunden in Kultur waren 61% der PC12-Zellen nicht ausgebreitet, wobei deren neuritenähnliche Zellfortsätze teilweise mehrere Verzweigungen hatten. Dagegen bildeten 39% der PC12-Zellen eher lamellipodienähnliche Strukturen aus und zeigten so einen ausgebreiteten Phänotyp (Abb. 29B, 48h NGF). Wurden die Zellen für drei Tage kultiviert, so waren 59% nicht ausgebreitet, wohingegen 41% abgeflacht und ausgebreitet waren (Abb. 29B, 72h NGF). Die neuritenähnlichen Zellausläufer der nicht ausgebreiteten Zellen waren zu diesem Zeitpunkt in den meisten Fällen mehrmals verzweigt und bildeten mit benachbarten Zellausläufern Netzwerk-ähnliche Kontakte (Abb. 29A, 72h NGF).

3.2 Charakterisierung der morphologischen Veränderungen während des NGF-induzierten Neuritenwachstums von PC12-Zellen nach Überexpression von ARHGEF7/βPIX bzw. verschiedener ARHGEF6/αPIX-Proteinvarianten

Da für ARHGEF7/βPIX im PC12-Zellsystem bereits gezeigt werden konnte, dass dessen Überexpression eine verstärkte Lamellipodienbildung induziert (Obermeier et al., 1998), sollte untersucht werden, welchen Einfluss die ektopische Expression von ARHGEF6/αPIX auf den Phänotyp NGF-stimulierter PC12-Zellen hat. Durch Überexpression verschiedener ARHGEF6/αPIX-Deletionsmutanten sollte geklärt werden, welche Rolle einzelne Proteindomänen bei der Bildung von Zellfortsätzen spielen. In Abb. 30 ist die Domänenstruktur der hierfür verwendeten FLAG-Fusionsproteine dargestellt.



Abb. 30: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von ARHGEF7/βPIX und den verschiedenen ARHGEF6/αPIX-Proteinvarianten

Die Domänenstruktur der zu exprimierenden Proteine ist schematisch dargestellt. In Klammern sind jeweils die deletierten oder ausgetauschen Aminosäuren (AS) angegeben. Die beiden vertikalen Striche in der DH-Domäne von ARHGEF6/ α PIX-DN (<u>d</u>ominant-<u>n</u>egativ) kennzeichnen die Position der Aminosäureaustausche.

Das Konstrukt pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF7/βPIX lag bereits vor. Die kodierenden Bereiche für ARHGEF6/αPIX, ARHGEF6/αPIXΔSH3 und ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 lagen bereits im Eingangsvektor pENTR-D-TOPO kloniert vor und wurden über eine Rekombinationreaktion in den Zielvektor pFLAG-CMV4-DEST überführt. Zur Herstellung der anderen Konstrukte wurde die Insert-DNA der entsprechenden Konstrukte aus dem eukaryotischen Expressionsvektor pMT2SM-HA mittels PCR amplifiziert, in den Eingangsvektor pENTR-D-TOPO eingeführt und anschließend über eine Rekombinationsreaktion in den Zielvektor pFLAG-CMV4-DEST überführt.

Überexpression von ARHGEF7/βPIX

PC12-Zellen wurden in Anwesenheit von NGF mit pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF7/βPIX transient transfiziert, in NGF-haltigem Medium weiterkultiviert und zu definierten Zeitpunkten fixiert. FLAG-ARHGEF7/βPIX wurde mithilfe eines Fluoresceingekoppelten anti-FLAG-Antikörpers detektiert und F-Aktin wurde mit TexasRotkonjugiertem Phalloidin sichtbar gemacht (Abb. 31).



Abb. 31: Phänotypische Auswirkungen NGF-stimulierter PC12-Zellen nach ektopischer Expression von FLAG-ARHGEF7/βPIX und quantitative Analyse

PC12-Zellen wurden mit pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF7/βPIX in Anwesenheit von NGF transient transfiziert und bis zu den angegebenen Zeitpunkten kultiviert. (A) Nach Fixierung wurde die Expression von FLAG-ARHGEF7/βPIX mittels eines Fluorescein-konjugierten anti-FLAG-Antikörpers (grün, obere Reihe) überprüft. Die Detektion von F-Aktin erfolgte mithilfe von TexasRot-Phalloidin (rot, untere Reihe). (B) Quantitative Auswertung des Phänotyps. Zur Erstellung des Diagramms wurden jeweils die prozentualen Mittelwerte für ausgebreitete und nicht ausgebreitete, transfizierte PC12-Zellen aus drei unabhängigen Versuchen zusammengefasst. Pro Versuch wurden 80-100 transfizierte Zellen ausgebreitet; ∎:ausgebreitet). Die Zellen wurden am Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Bereits nach 24 h fiel auf, dass die Mehrheit der FLAG-ARHGEF7/βPIXexprimierenden Zellen bereits abgeflacht war und sich breite lamellipodienähnliche Zellausläufer bildeten (Abb. 31A, 24h NGF). Auch nach 48 und 72 Stunden wiesen nur sehr wenige FLAG-ARHGEF7/βPIX-exprimierende PC12-Zellen neuritenähnliche Zellfortsätze auf. Die Zellen waren abgeflacht, der Zellkörper größer als der doppelte Kerndurchmesser, und es kam zur Bildung breiter Zellausläufer an der Peripherie (Abb. 31A, 48h und 72h NGF). Die Überexpression von FLAG-ARHGEF7/βPIX bewirkte keine auffälligen Veränderungen des Aktinzytoskeletts (Abb. 31A, Phalloidin). Nach quantitativer Auswertung wurde deutlich, dass die Überexpression von FLAG-ARHGEF7/βPIX, im Vergleich zu untransfizierten Kontrollzellen, in einer Umkehr des Verhältnisses ausgebreiteter zu nicht ausgebreiteten PC12-Zellen resultierte. Nach 24 Stunden waren 44% nicht ausgebreitet und 56% ARHGEF7/βPIX-exprimierende PC12-Zellen ausgebreitet (Abb. 31B, 24h NGF). Auch 48 und 72 Stunden nach Transfektion war der größere Anteil transfizierter Zellen ausgebreitet (Abb. 31B, 48h NGF und 72h NGF).



<u>Überexpression von ARHGEF6/αPIX</u>

Abb. 32: Auswirkungen der ektopischen Expression von FLAG-ARHGEF6/αPIX auf die durch NGF induzierte Bildung von Zellfortsätzen in PC12-Zellen und quantitative Auswertung des Phänotyps

PC12-Zellen wurden mit pFLAG-CMV4-DEST-ARHEF6/αPIX in Anwesenheit von NGF transient transfiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert. (A) FLAG-ARHGEF6/αPIX wurde mithilfe eines Fluorescein-gekoppelten anti-FLAG-Antikörpers (grün, obere Reihe) detektiert. F-Aktin wurde durch TexasRot-Phalloidin (rot, untere Reihe) sichtbar gemacht. (B) Das Diagramm zeigt jeweils die prozentualen Mittelwerte für ausgebreitete und nicht ausgebreitete FLAG-ARHGEF6/αPIX-exprimierende Zellen aus drei unabhängigen Versuchen. Pro Versuch wurden 75-100 Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (■ : nicht ausgebreitet; ■ :ausgebreitet). Die prozentualen Werte sind direkt oberhalb der Balken angegeben.

Der Effekt der FLAG-ARHGEF6/αPIX-Überexpression in PC12-Zellen ist mit dem von FLAG-ARHGEF7/βPIX vergleichbar und hat ebenfalls keine morphologisch sichtbaren Veränderungen des Aktinzytoskeletts zur Folge (Abb. 32A, Phalloidin). Auch hier zeigte die Mehrheit der transfizierten PC12-Zellen einen ausgebreiteten Phänotyp, welcher bereits 24 Stunden nach Transfektion beobachtet werden konnte. Alle ausgebreiteten Zellen bildeten keine Neuriten oder Filopodien, sondern es wurde häufig die Bildung großer flächiger Lamellipodien beobachtet (Abb. 32A, 24h, 48h und 72h NGF). Die quantitative Auswertung zu allen Zeitpunkten bestätigte, dass auch die ektopische Expression von FLAG-ARHGEF6/αPIX das Verhältnis von nicht ausgebreiteten zu

ausgebreiteten PC12-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen umkehrte. Bereits nach 24 h blieben war die Mehrheit der FLAG-ARHGEF6/αPIX-exprimierenden PC12-Zellen ausgebreitet (Abb. 32B, 24h NGF). Nach 48 und 72 Stunden nach Transfektion wurde dieser Effekt noch deutlicher, denn es konnte noch eine leichte Erhöhung des Anteils ausgebreiteter PC12-Zellen beobachtet werden (Abb. 32B, 48h und 72h NGF).

Überexpression von ARHGEF6/αPIXΔSH3

Um zu untersuchen, ob die SH3-Domäne eine Rolle bei der Ausbildung des ARHGEF6/αPIX-vermittelten Phänotyps in PC12-Zellen spielt, wurde auch diese Proteinvariante ektopisch exprimiert (Abb. 33).



Abb. 33: Morphologische Auswirkungen der ektopischen Expression von FLAG-ARHGEF6/αPIX∆SH3 in PC12-Zellen und quantitative Analyse des Phänotyps

PC12-Zellen wurden in Anwesenheit von NGF mit pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIX∆SH3 transient transfiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert. (A) FLAG-ARHGEF6/αPIX wurde durch Anwendung eines Fluorescein-konjugierten anti-FLAG-Antikörpers detektiert (grün, obere Reihe). TexasRot-Phalloidin wurde zum Nachweis von F-Aktin verwendet (rot, untere Reihe). (B) Quantitative Auswertung des Phänotyps FLAG-ARHGEF6/αPIX∆SH3-überexprimierender PC12-Zellen. Im Diagramm sind jeweils die prozentualen Mittelwerte für ausgebreitete und nicht ausgebreitete Zellen aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils 100-150 analysierten Zellen zusammengefasst (■ : nicht ausgebreitet; ■ :ausgebreitet). Oberhalb der Balken sind die genauen Prozentwerte angezeigt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

FLAG-ARHGEF6/αPIXΔSH3-Expression in PC12-Zellen führte zu einem mit FLAG-ARHGEF6/αPIX vergleichbaren Phänotyp. Auch hier konnte keine sichtbare Veränderung des Aktinzytoskeletts festgestellt werden (Abb. 33A). Die quantitative Analyse ergab, dass auch die Expression von FLAG-ARHGEF6/αPIXΔSH3, verglichen mit Kontrollzellen zu einer Umkehr des Verhältnisses ausgebreiteter zu nicht ausgebreiteten Zellen führte. Zu allen drei Fixierungszeitpunkten zeigte die deutliche Mehrheit der PC12-Zellen einen ausgebreiteten Phänotyp (Abb. 33B).

<u>Überexpression von ARHGEF6/aPIXADH, ARHGEF6/aPIX-DN, ARHGEF6/aPIXAPH</u> und ARHGEF6/aPIXAGBD





Abb. 34: Auswirkungen der Überexpression von FLAG-ARHGEF6/αPIXΔDH, FLAG-ARHGEF6/αPIX-DN, FLAG-ARHGEF6/αPIXΔPH bzw. FLAG-ARHGEF6/αPIXΔGBD auf die NGF-induzierte Neuritenbildung in PC12-Zellen und Quantifizierung des Phänotyps mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie

PC12-Zellen wurden mit pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIX△DH, pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIX△DN, pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIX△PH oder pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIX△GBD in Gegenwart von NGF transient transfiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert. (A) Die Expression der verschiedenen FLAG-Fusionsproteine wurde mittels eines Fluorescein-gekoppelten anti-FLAG-Antikörpers überprüft. (B) Quantitative Auswertung der transfizierten PC12-Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten. Das Diagramm beruht auf den jeweiligen prozentualen Mittelwerten für ausgebreitete und nicht ausgebreitete Zellen aus zwei unabhängigen Versuchen. Pro Versuch wurden jeweils 80-100 transfizierte Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (■ : nicht ausgebreitet; ■ :ausgebreitet). Die einzelnen Prozentwerte sind über den jeweiligen Balken angegeben. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

Die Überexpression dieser vier FLAG-ARHGEF6/αPIX-Proteinvarianten führte in keinem Falls zu einer verstärkten Bildung lamellipodienähnlicher Zellausläufer. FLAG-

ARHGEF6/aPIXADH und FLAG-ARHGEF6/aPIX-DN-exprimierende Zellen zeigten bereits 24 Stunden nach Transfektion dünne neuritenähnliche Zellfortsätze, während die Zellkörper eher rund blieben (Abb. 34A, FLAG- α PIX Δ DH, FLAG- α PIX-DN, 24h NGF). Nach 48 Stunden NGF-Stimulation konnte bei diesen Zellen eine Verlängerung der Fortsätze beobachtet werden, deren Anzahl zwischen 2 und 6 pro Zelle variierte (Abb. 34A, FLAG-αPIXΔDH, FLAG-αPIX-DN, 48h NGF). Auch nach 72 Stunden in Kultur kam es zu einer weiteren Verlängerung und teilweise mehrfachen Verzweigung dieser Zellausläufer (Daten nicht gezeigt). Die Quantifizierung ergab, dass nach Expression beider FLAG-ARHGFE6/aPIX-Proteinvarianten zu allen drei Fixierungszeitpunkten die deutliche Mehrheit der transfizierten PC12-Zellen einen nicht ausgebreiteten Phänotyp zeigte (Abb. 34B, FLAG- α PIX Δ DH, FLAG- α PIX-DN). FLAGαPIXΔPH-exprimierende PC12-Zellen zeigten bereits 24 Stunden nach Transfektion erste dünne Zellfortsätze, die sich nach 48 und 72 Stunden bereits verlängert hatten (Abb. 34A, FLAG- α PIX Δ PH, für 72h Daten nicht gezeigt). Allerdings zeigte sich nach quantitativer Auswertung, dass sowohl zwei als auch drei Tage nach Transfektion der Anteil nicht ausgebreiteter PC12-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen etwas erhöht war, was nach 24 Stunden noch nicht beobachtet werden konnte (Abb. 34B, FLAG- α PIX Δ PH). Einige der FLAG-ARHGEF6/ α PIX Δ GBD-exprimierenden PC12-Zellen wiesen nach 48 Stunden eine leicht erhöhte Anzahl an Verzweigungen der Zellausläufer auf (Abb. 34A, FLAG- α PIX Δ GBD). Die guantitative Analyse ergab, dass auch diese Zellen in der Mehrzahl nicht ausgebreitet waren (Abb. 34B, FLAGαPIX∆GBD).

Die Überexpression der Proteinvarianten FLAG-ARHGEF6/ α PIX Δ CH, FLAG-ARHGEF6/aPIXAAS56-83 und FLAG-ARHGEF6/aPIXACC führte, wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben, zu einer veränderten subzellulären Lokalisation dieser Proteine im Vergleich zu FLAG-ARHGEF6/αPIX. Nach quantitativer Auswertung führte jedoch keine dieser Proteinvarianten zu einer Umkehr der Verhältnisse ausgebreiteter zu nicht ausgebreiteten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (Daten nicht gezeigt). In Abb. 35 sind die quantitativen Auswertungen von ARHGEF7/BPIX und allen untersuchten ARHGEF6/αPIX-Proteinvarianten in einem Übersichtsdiagramm dargestellt. Hierfür wurden die prozentualen Mittelwerte für ausgebreitete und nicht ausgebreitete PC12-Zellen zu verschiedenen Fixierungszeitpunkten zusammengefasst.



Abb. 35: Übersicht über die Anteile ausgebreiteter und nicht ausgebreiteter nach quantitativer Auswertung der ARHGEF7/βPIX- und verschiedener ARHGEF6/αPIX-Proteinvarianten exprimierenden PC12-Zellen

Im Diagramm sind für untransfizierte Kontrollzellen, ARHGEF7/βPIX- und alle untersuchten ARHGEF6/αPIX-Varianten-exprimierenden PC12-Zellen die berechneten prozentualen Mittelwerte aller drei Fixierungszeitpunkte für ausgebreitete und nicht ausgebreitete Zellen dargestellt. Hierfür wurden die Daten von drei (Balken 1-4) bzw. zwei (Balken 5-11) unabhängigen Versuchen zusammengefasst (■ : nicht ausgebreitet, ■ : ausgebreitet). Direkt auf den Balken sind die jewwiligen Prozentwerte angegeben.

Die Überexpression der beiden Wildtyp-Proteine ARHGEF7/βPIX und ARHGEF6/αPIX ARHGEF6/αPIXΔSH3 sowie der Proteinvariante resultierte. verglichen mit untransfizierten Kontrollzellen, in einer Umkehrung des Verhältnisses von nicht ausgebreiteten zu ausgebreiteten PC12-Zellen (Abb. 35, Balken 2, 3 und 4). Wurden die mutanten Proteinvarianten mit einer Deletion der DH- oder GBD- oder eines Teils der CH-Domäne bzw. mit zwei Missense-Mutationen (FLAG-ARHGEF6/αPIX-DN) ektopisch exprimiert, so führte dies zu einem ähnlichen Anteil ausgebreiteter bzw. nicht ausgebreiteter PC12-Zellen wie bei Kontrollzellen (Abb. 35, Balken 5, 6, 8 und 10). Dagegen bewirkten Deletionen der PH-, CH- bzw. CC-Domäne ein vermehrtes Auftreten von nicht ausgebreiteten Zellen im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen (Abb. 35, Balken 7, 9 und 11). Die Ergebnisse dieser Experimente deuten an, dass in PC12-Zellen nach NGF-Stimulation sowohl ARHGEF7/βPIX als auch ARHGEF6/αPIX eine wichtige Funktion bei der Regulation der Ausbildung neuritenähnlicher Zellausläufer einnehmen könnten. Die Analyse der verschiedenen Deletionsmutanten weist auf eine möglicherweise wichtige regulatorische Funktion der SH3-Domäne hin.

3.3 Analyse eines PI3-Kinase-Hemmstoffes auf die Morphologie von ARHGEF6/αPIX- und ARHGEF6/αPIXΔSH3 überexprimierenden PC12-Zellen

Die Bindung von NGF an den NGF-Rezeptor kann eine Vielzahl von Signalwegen innerhalb der Zelle aktivieren. So konnte bereits von Raffioni und Bradshaw (1992) gezeigt werden, dass die PI3-Kinase ("Phosphatidylinositol 3-Kinase") durch NGF, aber auch durch andere Wachstumsfaktoren, aktiviert werden kann. Neben einer Vielzahl an PI3-Kinase-Effektorproteinen konnte bereits eine enge Verbindung zwischen der PI3-Kinase und den Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 nachgewiesen werden (Aoki et al. 2005), und für ARHGEF6/ α PIX konnte eine Aktivierung durch direkte Interaktion mit der PI3-Kinase gezeigt werden (Yoshii et al., 1999).

Aufgrund dieser Erkenntnisse war von Interesse, ob die morphologischen Veränderungen nach Überexpression von ARHGEF6/αPIX über einen von der PI3-Kinase aktivierten Signalweg vermittelt werden. Daher wurde der Einfluss des PI3-Kinase-Hemmstoffs LY294002 auf die morphologischen Veränderungen NGFstimulierter, ARHGEF6/αPIX- bzw. ARHGEF6/αPIXΔSH3-exprimierender PC12-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen untersucht. Hierfür wurden PC12-Zellen in Anwesenheit von NGF und LY294002 mit pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIX oder pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIXΔSH3 transfiziert und für 24 bzw. 48 h kulitviert. Als Kontrolle wurden PC12-Zellen mit den angegebenen Konstrukten in Anwesenheit von NGF und DMSO bzw. gar nicht transfiziert (Abb. 36).



Abb. 36: Einfluss des PI3-Kinase-Hemmstoffs LY294002 auf die Bildung ausgebreiteter PC12-Zellen nach FLAG-ARHGEF6/αPIX- und FLAG-ARHGEF6/αPIX∆SH3-Überexpression

Im Diagramm sind für untransfizierte Kontrollzellen, FLAG-ARHGEF6/αPIX- oder FLAG-ARHGEF6/αPIX∆SH3-überexprimierende PC12-Zellen nach NGF-Stimulation die berechneten prozentualen Mittelwerte 24 bzw. 48 h nach Transfektion für ausgebreitete und nicht ausgebreitete Zellen aus zwei unabhängigen Versuchen mit je 75-100 ausgewerteten Zellen zusammengefasst (■: nicht ausgebreitet, ■: ausgebreitet). Die einzelnen Prozentwerte sind oberhalb der Balken angezeigt.

Die Hemmung der PI3-Kinase führte sowohl bei untransfizierten Kontrollzellen als auch bei FLAG-ARHGEF6/αPIX- bzw. FLAG-ARHGEF6/αPIXΔSH3-exprimierenden PC12-Zellen unter den experimentellen Bedingungen zu keiner signifikanten Änderung des Verhältnisses von ausgebreiteten zu nicht ausgebreiteten Zellen (Abb. 36). Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der PI3-Kinase

durch den spezifischen Hemmstoff LY294002 zu den untersuchten Zeitpunkten keine Auswirkung auf den ARHGEF6/ α PIX-vermittelten Phänotyp in PC12-Zellen hat.

4. Untersuchungen zur Rolle von ARHGEF6/αPIX und dessen Interaktionspartnern bei der Ausbildung von Zellfortsätzen in verschiedenen eukaryotischen Zelllinien

Die durch ARHGEF6/aPIX induzierten morphologischen Veränderungen in PC12-Zellen lassen eine Rolle dieses Proteins bei der Ausbildung von Zellfortsätzen vermuten. Dies sollte im Zusammenhang mit bekannten Interaktionspartnern und Proteinen des Rho-GTPase-Zyklus in verschiedenen eukaryotischen Zellsystemen näher analysiert werden.

4.1 Auswirkungen auf die Zellmorphologie von CHO-K1- und PC12-Zellen nach ektopischer Expression verschiedener ARHGEF6/αPIX-Interaktionspartner sowie nach Koexpression von ARHGEF6/αPIX bzw. ARHGEF6/αPIXΔSH3

Zur weiteren Aufklärung des möglichen Signalwegs, der nach Überexpression von ARHGEF6/αPIX bzw. ARHGEF6/αPIXΔSH3 zur verstärkten Bildung lamellipodienähnlicher Zellausläufer führt, sollte nun untersucht werden, ob die einiger bereits bekannter ektopische Expression Interaktionspartner von ARHGEF6/aPIX in morphologischen Veränderungen eukaryotischer Zellen resultiert. Zunächst wurden PC12-Zellen mit pCMV6-MYC-PAK1, pXJ40-HA-PAK3, pFLAG-CMV4-DEST-PARVB (β -Parvin) oder pBK(Δ)-GIT1-FLAG in Gegenwart von NGF transfiziert. Nach Expression befindet sich im Fall von pBK(△)-GIT1-FLAG das FLAG-Peptid am C-Terminus des GIT1-Proteins, wohingegen die anderen Proteine ein Nterminales Fusionspeptid aufweisen. 24 bzw. 48 Stunden nach Transfektion wurden die PC12-Zellen fixiert und exprimierte Fusionsproteine sowie F-Aktin sichtbar gemacht. Die Analyse erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 37).



Abb. 37: Auswirkungen der Überexpression verschiedener ARHGEF6/αPIX-Interaktionspartner auf die Bildung von Zellfortsätzen in PC12-Zellen und quantitative Analyse des Phänotyps

PC12-Zellen wurden in Anwesenheit von NGF mit pCMV6-MYC-PAK1, pXJ40-HA-PAK3, pFLAG-CMV4-DEST-PARVB oder pBK(△)-GIT1-FLAG transient transfiziert und nach 24 h bzw. 48 h fixiert. (A) PC12-Zellen jeweils 48 h nach Expression des oberhalb angegebenen Fusionsproteins. Die Expression von MYC-PAK1 wurde mittels eines Cy3-konjugierten anti-MYC-Antikörpers nachgewiesen. Durch Verwendung eines Fluorescein-gekoppelten anti-HA-Antikörpers wurde überexprimiertes HA-PAK3 detektiert. Der Nachweis von FLAG-PARVB und FLAG-GIT1 erfolgte mithilfe eines Fluorescein-konjugierten anti-FLAG-Antikörpers. (B) Im Diagramm sind für nicht-transfizierte Kontrollzellen, MYC-PAK1-, HA-PAK3-, FLAG-PARVB- und FLAG-GIT1-exprimierende PC12-Zellen die prozentualen Anteile ausgebreiteter und nicht ausgebreiteter Zellen dargestellt. Hierfür wurden die prozentualen Mittelwerte 24 und 48 Stunden nach Transfektion aus zwei unabhängigen Versuchen mit je 50-80 ausgewerteten Zellen zusammengefasst (■: nicht ausgebreitet;] : ausgebreitet). Die einzelnen Prozentwerte sind oberhalb der Balken angezeigt.

Die Überexpression aller untersuchter ARHGEF6/αPIX-Interaktionspartner führte, verglichen mit untransfizierten Kontrollzellen, in keinem Fall zu einer vermehrten Bildung ausgebreiteter PC12-Zellen. Dennoch hatte die ektopische Expression einiger untersuchter Proteine morphologische Auswirkungen. So bildeten eine Vielzahl der PAK1- bzw. PAK3-exprimierenden PC12-Zellen 48 Stunden nach Transfektion verstärkt Filopodien aus. Vergleichbare Beobachtungen konnten bereits nach 24 h gemacht werden (Daten nicht gezeigt). MYC-PAK1-exprimierende PC12-Zellen zeigten häufig bäumchenartige Zellausläufer mit engen Verzweigungen (Abb. 37A, MYC-PAK1), während HA-PAK3-Expression eher zur Bildung dünner, nur sehr selten verzweigter Filopodien führte (Abb. 37A, HA-PAK3). Diese Zellen wurden aufgrund des Fehlens lamellipodienähnlicher Zellausläufer als nicht ausgebreitet gewertet. Nach

Überexpression von FLAG-PARVB konnten im Vergleich zu Kontrollzellen keine morphologischen Auffälligkeiten beobachtet werden. (Abb. 37A, FLAG-PARVB). Auch nach ektopischer Expression von FLAG-GIT1 bildeten sich sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden dünne, neuritenähnliche Zellfortsätze aus (Abb. 37A, FLAG-GIT1 und Daten nicht gezeigt). Die quantitative Auswertung zeigte, dass PC12-Zellen, die untersuchten Fusionsproteine exprimierten, sich in der Mehrheit nicht ausbreiteten (Abb. 37B).

Aufgrund der beobachteten verstärkten Filopodienbildung nach MYC-PAK1- bzw. HA-PAK3-Expression in PC12-Zellen war nun von Interesse zu untersuchen, welche Auswirkungen die Überexpression von MYC-PAK1 in CHO-K1-Zellen hatte (Abb. 38).



Abb. 38: Morphologische Effekte nach PAK1-Expression in CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden mit pCMV6-MYC-PAK1 transient transfiziert. MYC-PAK1 wurde mithilfe eines Cy3-gekoppelten anti-MYC-Antikörpers und F-Aktin mit MFP488-Phalloidin angefärbt. Die Auswertung erfolgte mit konfokaler Laserscanmikroskopie.

Auch in CHO-K1-Zellen führte die Überexpression von MYC-PAK1 zur verstärkten Ausbildung langer dünner filopodienähnlicher Zellfortsätze, während der Zellkörper dieser Zellen eher klein blieb (Abb. 38, anti-MYC). An der F-Aktin-Färbung fiel weiter auf, dass diese Zellen im Vergleich mit untransfizierten Kontrollzellen kaum noch Stressfasern ausbildeten, während an der Zellperipherie weiterhin akkumuliertes F-Aktin nachgewiesen werden konnte (Abb. 38, F-Aktin).

Da die Überexpression von PAK1 und die von ARHGEF6/aPIX in beiden Zellsystemen zu gegensätzlichen morphologischen Veränderungen führt, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Koexpression beider Proteine morphologische Veränderungen im Vergleich zu den Einzelexpressionen bewirkt. Die Deletion der PAK1-Bindedomäne von ARHGEF6/αPIX (ARHGEF6/αPIXΔSH3) hat in PC12-Zellen keinen Einfluss auf den durch ARHGEF6/aPIX vermittelten Phänotyp. Deshalb sollte auch durch Koexpression von PAK1 und ARHGEF6/ α PIX Δ SH3 untersucht werden, ob dies Auswirkungen auf den Zell-Phänotyp hat, wenn diese beiden Proteinen nicht mehr miteinander interagieren können. Zunächst wurden PC12-Zellen, wie in der Legende zu Abb. 39 beschrieben, transfiziert. Nach 48 Stunden erfolgte die Auswertung mithilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie.



Abb. 39: Morphologie von PC12-Zellen nach Koexpression von PAK1 und ARHGEF6/αPIX bzw. ARHGEF6/αPIXΔSH3 und quantitative Analyse des Phänotyps

PC12-Zellen wurden in Anwesenheit von NGF mit (A) pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIX und pCMV6-MYC-PAK1 oder mit (B) pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/αPIX∆SH3 und pCMV6-MYC-PAK1 transient transfiziert. Nach 48 Stunden erfolgte der Nachweis von MYC-PAK1 mithilfe eines CY3-konjugierten anti-MYC-Antikörpers, die exprimierten FLAG-ARHGEF6/αPIX-Proteine wurden mittels eines FLAG-Fluorescein-Antikörpers detektiert. (C) Im Diagramm sind die prozentualen Mittelwerte für ausgebreitete und nicht ausgebreitete Zellen aus zwei unabhängigen Versuchen dargestellt. Pro Versuch wurden 35-50 Zellen analysiert. Die jeweils exprimierten Fusionsproteine sind unterhalb, die einzelnen Prozentwerte oberhalb der Balken angegeben (■ : nicht ausgebreitet; ■ : ausgebreitet).

Die Koexpression von FLAG-ARHGEF6/αPIX und MYC-PAK1 führte zu keinem durch die jeweilige Einzelexpression hervorgerufenen Phänotyp (Kapitel 4.1, Abb. 37B; Kapitel 3.2, Abb. 4B und 5B). Die Mehrheit der PC12-Zellen hatte nach 48 Stunden wenige dünne Zellausläufer gebildet, deren Länge bereits den Zelldurchmesser überschritt (Abb. 39A). Dieser Phänotyp war vergleichbar mit dem untransfizierter Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu zeigte ein Großteil der FLAG-ARHGEF6/aPIXASH3- und MYC-PAK1-koexprimierenden Zellen eine Morphologie, die ARHGEF6/αPIXbzw. ARHGEF6/αPIXΔSH3-vermittelten Phänotyp mit dem vergleichbar ist. Die Zellen flachten sich ab und bildeten flächige, lamellipodienähnliche Ausläufer. Jedoch konnte bei einem Großteil dieser Zellen die Bildung von Filopodien an den Enden dieser Ausläufer beobachtet werden (Abb. 39B). Zum besseren Vergleich für die guantitative Auswertung der PC12-Zellen wurden die Daten nach der jeweiligen Einzelexpression aus den vorangegangenen Versuchen in das Diagramm mit aufgenommen. Wie bereits in Kapitel 3.2 beschrieben, führte die alleinige Expression von FLAG-ARHGEF6/ α PIX zu einer Umkehr des Verhältnisses von ausgebreiteten zu nicht ausgebreiteten PC12-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 39C, FLAG- α PIX). Die Koexpression mit PAK1 resultierte in einer Aufhebung dieses Effektes, denn die Mehrzahl der koexprimierenden PC12-Zellen zeigte wieder einen nicht ausgebreiteten Phänotyp (Abb. 39C, FLAG- α PIX+MYC-PAK1). In vorangegangenen Versuchen (Kapitel 3.2) wurde deutlich, dass die Überexpression von FLAG-ARHGEF6/ α PIX Δ SH3 ebenfalls zur vermehrten Bildung ausgebreiteter PC12-Zellen im Vergleich mit Kontrollzellen führte (Abb. 39C, FLAG- α PIX Δ SH3). Hier hatte die Koexpression von FLAG-ARHGEF6/ α PIX Δ SH3 mit MYC-PAK1 keine Auswirkung auf das Verhältnis von ausgebreiteten zu nicht ausgebreiteten PC12-Zellen. Die Mehrheit dieser Zellen breitete sich aus (Abb. 39C, FLAG- α PIX Δ SH3+MYC-PAK1).

Vergleichbare Experimente wurden auch an CHO-K1-Zellen durchgeführt. Dabei wurden zuerst die phänotypischen Effekte der ARHGEF6/αPIXΔSH3-Expression in CHO-K1-Zellen analysiert (Abb. 40).



Abb. 40: Phänotypische Auswirkungen der Expression von AHRGEF6/αPIX∆SH3 und Koexpression von MYC-PAK1 und ARHGEF6/αPIX bzw. ARHGEF6/αPIX∆SH3 in CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden mit **(A)** pMT2SM-HA-ARHGEF6/ α PIX Δ SH3 transfiziert. Exprimiertes HA-ARHGEF6/ α PIX Δ SH3 wurde durch einen anti-HA-Fluorescein-Antikörper detektiert. F-Aktin wurde mit TexasRot-Phalloidin sichtbar gemacht. **(B)** CHO-K1-Zellen wurden mit pMT2SM-HA-ARHGEF6/ α PIX Δ SH3 und pCMV6-MYC-PAK1 bzw. mit **(C)** pMT2SM-HA-ARHGEF6/ α PIX und pCMV6-MYC-PAK1 transient transfiziert. Die MYC-Fusionsproteine wurden mittels eines Cy3-anti-MYC-, die HA-Fusionsproteine mittels eines Fluorescein-anti-HA-Antikörpers nachgewiesen. Die Analyse erfolgte mit konfokaler Laserscanmikroskopie.

Wie bereits nach ektopischer Expression in PC12-Zellen beobachtet werden konnte, kam es nach Überexpression von HA-ARHGEF6/αPIX∆SH3 auch in CHO-K1-Zellen zu einer leicht verstärkten Bildung von Lamellipodien (Abb. 40A, anti-HA), was vor allem im Vergleich mit nicht-transfizierten Kontrollzellen deutlich wurde (Abb. 40A, F-Aktin). Auch die Koexpression von HA-ARHGEF6/αPIX∆SH3 mit MYC-PAK1 resultierte hauptsächlich in der Bildung großflächiger Lamellipodien. Filopodien an der Spitze dieser Lamellipodien, wie in PC12-Zellen, konnten hier nicht beobachtet werden (Abb. 40B). Die Koexpression von HA-ARHGEF6/αPIX mit MYC-PAK1 führte bei der Mehrzahl der Zellen auch zur Bildung lamellipodienähnlicher Strukturen (Abb. 40C). Diese Zellen unterschieden sich jedoch von Kontrollzellen durch eine eher polare Zellmorphologie (Abb. 40C).

4.2 Analyse des Phänotyps von PC12- und CHO-K1-Zellen nach Expression verschiedener Rac1- bzw. Cdc42-Proteinvarianten und Koexpression mit ARHGEF6/αPIX

Durch die bisherigen Untersuchungen konnte noch nicht geklärt werden, ob der nach Überexpression von ARHGEF6/αPIX beobachtete Phänotyp auf die Aktivierung der Rho-GTPase Rac1 oder Cdc42 zurückzuführen ist. Deshalb sollten zunächst deren Effekte auf die Morphologie NGF-stimulierter PC12-Zellen bzw. auf die von CHO-K1-Zellen untersucht werden. Neben den beiden Wildtyp-Proteinvarianten wurden auch die Effekte der dominant-negativen bzw. konstitutiv-aktiven Proteinvarianten analysiert. PC12-Zellen wurden zunächst in Anwesenheit von NGF mit pRK5-MYC-Rac1, pRK5-MYC-Rac1N17 bzw. pRK5-FLAG-RacL61 transfiziert und für 24 bzw. 48 Stunden weiter kultiviert. Exprimierte Fusionsproteine wurden mithilfe spezifischer MYC- bzw. FLAG-Antikörper, F-Aktin mittels MFP488-gekoppeltem Phalloidin detektiert. CHO-K1-Zellen wurden mit denselben Konstrukten transfiziert, allerdings wurden die exprimierten Rac1-Proteinvarianten durch einen spezifischen anti-Rac1-Antikörper und F-Aktin durch TexasRot-Phalloidin sichtbar gemacht. Die Auswertung der Experimente erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie bzw. konfokale Laserscanmikroskopie (Abb. 41).



Abb. 41: Morphologische Veränderungen NGF-stimulierter PC12-Zellen bzw. von CHO-K1-Zellen nach ektopischer Expression verschiedener Rac1-Proteinvarianten und Quantifizierung des Phänotyps

PC12-Zellen wurden mit (A) pRK5-MYC-Rac1 bzw. (B) pRK5-MYC-Rac1N17 in Gegenwart von NGF transient transfiziert und in Anwesenheit von NGF für 24 oder 48 Stunden kultiviert. Nach Fixierung wurde die Expression der Fusionsproteine unter Anwendung eines Cy3-gekoppelten anti-MYC-Antikörpers überprüft. Der Nachweis von F-Aktin erfolgte durch MFP488-Phalloidin. CHO-K1-Zellen wurden mit (C) pRK5-MYC-Rac1 bzw. (D) pRK5-MYC-Rac1N17 transient transfiziert. Die exprimierten Fusionsproteine wurden mittels eines primären anti-Rac1- und eines sekundären AlexaFluor-488-konjugierten anti-Maus-Antikörpers detektiert. Die Färbung von F-Aktin erfolgte durch Anwendung von TexasRot-Phalloidin. (E) Im Diagramm sind für untransfizierte Kontrollzellen, MYC-Rac1-, MYC-Rac1N17- und FLAG-Rac1L61-exprimierende PC12-Zellen die prozentualen Anteile ausgebreiteter und nicht ausgebreiteter Zellen dargestellt. Es wurden die prozentualen Mittelwerte 24 und 48 Stunden nach Transfektion aus zwei unabhängigen Versuchen mit je 50-80 ausgewerteten Zellen zusammengefasst. (■ : nicht ausgebreitet; ■ : ausgebreitet). Jeweilige Prozentwerte sind direkt oberhalb der Balken angegeben.

Die Überexpression der MYC-Rac1-Proteinvarianten in PC12-Zellen führte zu beiden untersuchten Zeitpunkten zu eindeutigen morphologischen Veränderungen im Vergleich zu Kontrollzellen. MYC-Rac1-exprimierende PC12-Zellen bildeten hauptsächlich lamellipodienähnliche Zellfortsätze aus. Gleichzeitig konnte eine leicht
erhöhte Anzahl an Filopodien beobachtet werden, die sich an den Spitzen dieser flächigen Ausläufer bildeten (Abb. 41A, 24 h und 48 h NGF). Die Überexpression von konstitutiv-aktivem FLAG-Rac1L61 in PC12-Zellen führte zu einem vergleichbaren Phänotyp, denn auch diese Zellen bildeten verstärkt Lamellipodien und an deren Spitzen Filopodien aus (Daten nicht gezeigt). Die Überexpression der dominantnegativen Proteinvariante MYC-Rac1N17 in PC12-Zellen führte hingegen zu keiner verstärkten Bildung lamellipodienähnlicher Zellausläufer. An diesen Zellen konnten bereits 24 Stunden nach Transfektion filopodienähnliche Zellfortsätze beobachtet werden, deren Bildung sich nach 48 Stunden an der Zellperipherie verstärkt hatte (Abb. 41B, 24 und 48 h NGF). In CHO-K1-Zellen waren die Effekte der Überexpressionen weniger deutlich als in PC12-Zellen. MYC-Rac1-exprimierende Zellen zeigten jedoch auch eine leicht erhöhte Anzahl von Lamellipodien (Abb. 41C, anti-Rac1). Das Aktinzytoskelett dieser Zellen blieb im Vergleich mit Kontrollzellen offensichtlich unverändert (Abb. 41C, F-Aktin). Auch FLAG-Rac1L61-exprimierende CHO-K1-Zellen wiesen eine leicht erhöhte Anzahl an Lamellipodien auf. Zusätzlich konnte bei diesen Zellen eine verstärkte Bildung von Stressfasern beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). In MYC-Rac1N17-exprimierenden CHO-K1-Zellen konnte ebenfalls eine verstärkte Bildung kurzer Filopodien an der Zellperipherie beobachtet werden (Abb. 41D, anti-Rac1). Diese Zellen blieben kleiner und runder als untransfizierte Kontrollzellen (Abb. 41D, F-Aktin). Die quantitative Auswertung der PC12-Phänotypen ergab, dass sich sowohl nach Expression von MYC-Rac1 als auch nach Expression von konstitutiv-aktivem MYC-Rac1L61 das Verhältnis von ausgebreiteten zu nicht ausgebreiteten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen umkehrte, da sich die große Mehrheit dieser Zellen ausgebreitet hatte (Abb. 41E, MYC-Rac1 und FLAG-Rac1L61). Im Gegensatz dazu blieb die deutliche Mehrheit der MYC-Rac1N17-exprimierenden Zellen nicht ausgebreitet (Abb. 41E, MYC-Rac1N17).

Analog hierzu wurden Überexpressionen mit den jeweiligen Cdc42-Proteinvarianten durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bzw. am konfokalen Laserscanmikroskop (Abb. 42).



B MYC-Cdc42N17 24h NGF 48h NGF



PC12-Zellen wurden mit (A) pRK5-MYC-Cdc42 oder (B) pRK5-MYC-Cdc42N17 in Anwesenheit von NGF transient transfiziert und nach 24 h bzw. 48 h fixiert. MYC-Fusionsproteine wurden mittels eines Cy3-konjugierten anti-MYC-Antikörpers, F-Aktin mittels MFP488-gekoppeltem Phalloidin detektiert. CHO-K1-Zellen wurden mit (C) pRK5-MYC-Cdc42 bzw. (D) pRK5-MYC-Cdc42N17 transient transfiziert. Exprimierte Cdc42-Proteinvarianten wurden mithilfe eines anti-Cdc42-Primär- und eines AlexaFluor-488-anti-Maus Sekundärantikörpers, F-Aktin durch TexasRot-Phalloidin nachgewiesen.

MYC-Cdc42-exprimierende PC12-Zellen zeigten bereits 24 Stunden nach Transfektion eine vermehrte Bildung von Filopodien, die radial um den Zellkörper angeordnet waren (Abb. 42A, 24h NGF). Weitere 24 Stunden später besaß der Großteil dieser Zellen eine Vielzahl filopodienähnlicher Zellausläufer, die ebenfalls radial am Zellkörper angeordnet, jedoch selten länger als dieser waren (Abb. 42A, 48 h NGF). PC12-Zellen, die dominant-negatives MYC-Cdc42N17 exprimierten, zeigten hingegen eine weniger stark ausgeprägte Filopodienbildung, allerdings war die Anzahl der Filopodien im Vergleich zu Kontrollzellen nach 24 und 48 Stunden leicht erhöht. Die Filopodien waren an der Zellperipherie deutlich voneinander abgrenzbar, doch auch hier konnte keine Ausbildung lamellipodienähnlicher Zellausläufer beobachtet werden (Abb. 42B). Die MYC-Cdc42-Expression in CHO-K1-Zellen resultierte ebenfalls in einer verstärkten Bildung von Filopodien, die radial um den meist polar wachsenden Zellkörper angeordnet waren (Abb. 42C, anti-Cdc42). Im Zytoplasma der Zellen konnte oftmals die Akkumulation von F-Aktin nachgewiesen werden (Abb. 42C, F-Aktin). Dagegen bildeten MYC-Cdc42N17-exprimierende CHO-K1-Zellen keine filopodienähnlichen Zellausläufer aus (Abb. 42D, anti-Cdc42). Diese Zellen unterschieden sich phänotypisch kaum von nicht-transfizierten Zellen, jedoch konnte auch hier teilweise im Zytoplasma akkumuliertes F-Aktin nachgewiesen werden (Abb. 42D, F-Aktin). In beiden Zellsystemen führte die Überexpression von konstitutiv-aktivem MYC-Cdc42L61 zu phänotypischen Veränderungen, die mit denen nach MYC-Cdc42-Expression vergleichbar waren (Daten nicht gezeigt). Eine quantitative Auswertung der Cdc42-überexprimierenden PC12-Zellen wurde nicht durchgeführt, da deren Zellmorphologie nicht mit der von Rac1- bzw. ARHGEF6/αPIX-überexprimierenden PC12-Zellen vergleichbar war und sich somit nicht in die Kategorien "ausgebreitet" und "nicht ausgebreitet" einteilen ließ.

Da durch die bisherigen Untersuchungen noch nicht gezeigt werden konnte, in welchem Zusammenhang ARHGEF6/aPIX in diesem Signalweg mit den Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 steht, sollte im Folgenden untersucht werden, welche Effekte die Koexpression dieser Proteine auf die Ausbildung von Zellfortsätzen hat. Um Hinweise zu bekommen, ob ARHGEF6/aPIX im Signalweg möglicherweise unterhalb der GTPasen eine Rolle spielt, sollte neben Rac1 auch dominant-negatives Rac1N17 zusammen mit ARHGEF6/aPIX koexprimiert werden. Hierfür wurden zunächst CHO-K1- und PC12-Zellen mit den bereits beschriebenen Rac1-Konstrukten und pMT2SM-HA-ARHGEF6/aPIX bzw. pFLAG-CMV4-DEST-ARHGEF6/aPIX eingesetzt (Abb. 43). Die Auswertung erfolgte mit Fluoreszenz- bzw. konfokaler Laserscanmikroskopie.



Abb. 43: Phänotyp von CHO-K1-Zellen nach gleichzeitiger Expression von ARHGEF6/αPIX und Rac1 bzw. dominant-negativem Rac1N17 und Quantifizierung des Phänotyps in PC12-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden mit (A) pMT2SM-HA-ARHGEF6/αPIX und pRK5-MYC-Rac1 bzw. (B) pMT2SM-HA-ARHGEF6/αPIX und pRK5-MYC-Rac1N17 kotransfiziert. Die exprimierten Rac1-Proteinvarianten wurden mittels eines primären anti-Rac1-Antikörpers und eines sekundären AlexaFluor-546-Ziege-anti-Maus-Antikörpers detektiert. HA-ARHGEF6/αPIX wurde unter Anwendung eines primären anti-HA- und eines sekundären AlexaFluor-488-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörpers nachgewiesen. (C) Das Diagramm zeigt die prozentualen Mittelwerte von ausgebreiteten und nicht ausgebreiteten PC12-Zellen nach ektopischer Expression der angegebenen Fusionsproteine. Diese Daten wurden aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils 40-60 ausgezählten Zellen ermittelt (■ : nicht ausgebreitet;). Direkt oberhalb der Balken sind die dazugehörigen prozentualen Werte angegeben.

Die Morphologie MYC-Rac1- und HA-ARHGEF6/αPIX-koexprimierender CHO-K1-Zellen war mit der von MYC-Rac1-exprimierenden Zellen vergleichbar, denn auch diese Zellen zeigten eine leicht erhöhte Bildung von Lamellipodien (Abb. 43A). Aber auch die Koexpression von dominant-negativem MYC-Rac1N17- und HA-ARHGEF6/αPIX in CHO-K1-Zellen führte zu einer verstärkten Lamellipodienbildung (Abb. 43B), was bei MYC-Rac1N17-exprimierenden CHO-K1-Zellen nicht beobachtet werden konnte (Abb. 41D). Die Quantifizierung der Phänotypen nach Koexpression von MYC-RacN17 und HA-ARHGEF6/αPIX im Vergleich zu MYC-Rac1N17-Expression in PC12-Zellen untermauerte diese Beobachtungen. Nach alleiniger Überexpression von dominant-negativem Rac1N17 zeigte der deutlich geringere Anteil der Zellen einen ausgebreiteten Phänotyp. Bei gleichzeitiger FLAG-ARHGEF6/αPIX-Expression konnte ein deutlicher Anstieg des Anteils ausgebreiteter PC12-Zellen beobachtet werden (Abb. 43C). Analog hierzu wurden diese Expressionen auch mit den bereits beschriebenen Cdc42-Proteinvarianten und HA-ARHGEF6/αPIX durchgeführt (Abb. 44). Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Laserscanmikroskopie.



Abb. 44: CHO-K1-Zellen nach Koexpression von HA-ARHGEF6/αPIX und MYC-Cdc42 bzw. MYC-Cdc42N17

CHO-K1-Zellen wurden mit **(A)** pMT2SM-HA-ARHGEF6/αPIX und pRK5-MYC-Cdc42 bzw. **(B)** pMT2SM-HA-ARHGEF6/αPIX und pRK5-MYC-Cdc42N17 transient transfiziert. Exprimierte Cdc42-Proteine wurden durch einen primären Cdc42- und einen sekundären AlexaFluor-546-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörper nachgewiesen. HA-ARHGEF6/αPIX wurde mit einem anti-HA-Primär- und eines AlexaFluor-488-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen Sekundärantikörpers detektiert.

Koexpression von HA-ARHGEF6/ α PIX und MYC-Cdc42 in CHO-K1-Zellen führte zur Aufhebung der durch MYC-Cdc42-induzierten verstärkten Filopodienbildung. Diese Zellen zeigten viele breite flächige Zellausläufer, an deren Spitzen jedoch teilweise feine Filopodien ansetzten (Abb. 44A). Ein vergleichbarer Phänotyp in CHO-K1-Zellen konnte auch nach gleichzeitiger Expression von dominant-negativem MYC-Cdc42N17 und HA-ARHGEF6/ α PIX beobachtet werden, denn auch diese Zellen bildeten Lamellipodien an der Zellperipherie aus (Abb. 44B).

In der nachfolgenden Tabelle wurden die nach Überexpression einzelner bzw. mehrerer Proteine erhaltenen zellmorphologischen Auswirkungen zur besseren Übersichtlichkeit zusammengefasst (Tab. XVI). Die exprimierten Fusionsproteine sind den jeweiligen Phänotypen zugeordnet. In Klammern ist angegeben, in welchen Zellen die Untersuchungen durchgeführt wurden (P: PC12-Zellen; C: CHO-K1-Zellen).

	Zellmorphologie					
	"ausgebreitet"		"nicht ausgebreitet"		Verstärkte Filopodienbildung	
zelexpression	ARHGEF6/αPIX	(P/C)	ARHGEF6/αPIX∆DH	(P)	PAK1	(P/C)
	ARHGEF6/αPIX∆SH3	(P/C)	ARHGEF6/αPIX-DN	(P)	PAK3	(P)
	Rac1	(P/C)	ARHGEF6/αPIX∆PH	(P)	Rac1N17	(P/C)
	Rac1L61	(P/C)	ARHGEF6/αPIX∆GBD	(P)	Cdc42	(P/C)
	ARHGEF7/βPIX	(P)	GIT1	(P)	Cdc42L61	(P/C)
Ξ			PARVB (β-Parvin)	(P)		
			Cdc42N17	(P/C)		
Koexpression	ARHGEF6/αPIX∆SH3 +PAK1	(P/C)	ARHGEF6/αPIX +PAK1	(P/C)		
	ARHGEF6/αPIX +Rac1N17	(P/C)				
	ARHGEF6/αPIX +Rac1	(C)				
	ARHGEF6/αPIX +Cdc42	(C)				
	ARHGEF6/αPIX +Cdc42N17	(C)				

V. Diskussion

1. Mögliche Interaktion von ARHGEF6/αPIX und dem neuronalen Adaptorprotein FE65 und dessen mögliche funktionelle Bedeutung

Durch GST-Pulldown-Experimente nach ektopischer Expression von ARHGEF6/aPIX und FE65 konnte die im Hefesystem gefundene Interaktion in CHO-K1-Zellen bestätigt werden. Nach Eingrenzung der für die Interaktion notwendigen Domänen im GST-Pulldown-System hat sich gezeigt, dass diese Interaktion über die C-terminale coiledcoil-Domäne von ARHGEF6/aPIX vermittelt wird. ARHGEF6/aPIX ist in der Lage über die coiled-coil-Domäne Homodimere aber auch Heterodimere mit ARHGEF7/BPIX zu bilden (Manser et al., 1998; Rosenberger, 2003; Feng et al., 2004). Dies könnte bedeuten, dass die Interaktion mit FE65 über eine Dimerisierung reguliert werden kann. So könnte durch die Interaktion von ARHGEF6/αPIX und FE65 möglicherweise die Homodimerisierung von ARHGEF6/aPIX verhindert werden, wodurch das ARHGEF6/αPIX-Dimeren Gleichgewicht von zu ARHGEF6/aPIX-Monomeren beeinflusst wird. Es konnte gezeigt werden, dass ARHGEF6/ α PIX-Monomere Rac1 und Cdc42 aktivieren können, wohingegen ARHGEF6/aPIX-Dimere ausschließlich Austauschaktivität gegenüber Rac1 aufweisen, wobei angenommen wird, dass in der Zelle das Verhältnis von ARHGEF6/ α PIX-Dimeren zu ARHGEF6/ α PIX-Monomeren bei der Regulation der GEF-Aktivität eine entscheidende Rolle spielt (Feng et al., 2004). Dieses Verhältnis kann durch Interaktion von ARHGEF6/aPIX mit anderen Proteinen beeinflusst werden. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung von PAK an ARHGEF6/ α PIX, im Komplex mit der G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheit, die Dissoziation der ARHGEF6/αPIX-Dimere stimuliert. ARHGEF6/αPIX-Monomere wodurch mehr entstehen. Dadurch verschiebt sich das Verhältnis von ARHGEF6/αPIX-Monomeren zu -Dimeren, was zu einer regulierten GEF-Aktivität führt (Feng et al., 2004; Baird et al., 2005). Somit wäre denkbar, dass die Interaktion mit FE65 aufgrund der postulierten Hemmung der Homodimerisierung ebenfalls das Verhältnis von ARHGEF6/ α PIX-Monomeren zu -Dimeren beeinflussen und infolgedessen die GEF-Aktivität regulieren könnte. Ebenso könnte die Interaktion die Heterodimerisierung von ARHGEF6/aPIX mit ARHGEF7/BPIX beeinflussen. Koh et al. (2001) konnten nachweisen, dass die Bildung dieser Heterodimere für die subzelluläre Lokalisation und für die Ausbildung bestimmter Membranausstülpungen essentiell ist. Aufgrund dessen könnte FE65 durch

Bindung an ARHGEF6/ α PIX die Heterodimerisierung mit ARHGEF7/ β PIX und somit die Aktivierung bestimmter Signalwege regulieren.

GST-Pulldown-Experimente zur Eingrenzung des interagierenden Bereichs von FE65 ergaben, dass ARHGEF6/αPIX an den N-Terminus von FE65, genauergesagt an die AS 136-254, die sich direkt vor der WW-Domäne befinden, bindet. In diesem Bereich des Proteins befindet sich keine bekannte Protein-Protein-Interaktionsdomäne. Interessanterweise kann FE65 in diesem Bereich (AS 171-220) proteolytisch gespalten werden (Hu et al., 2005). Die dadurch entstehende N-terminal verkürzte Isoform stabilisiert die Interaktion mit bekannten FE65-Interaktionspartnern der beiden PTB-Domänen, wie APP oder Tip60 in vitro, weshalb davon ausgegangen wird, dass dadurch die Interaktion mit anderen Proteinen reguliert werden kann. Die für die Spaltung verantwortliche Protease konnte bisher nicht identifiziert werden (Hu et al., 2005). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass ARHGEF6/ α PIX mit einer Untereinheit der durch Calcium regulierten Protease Calpain interagiert (Goll et al., 2003; Rosenberger et al., 2005). Aufgrund dieser Erkenntnisse wäre es vorstellbar, dass ARHGEF6/ α PIX als Adaptorprotein für die Rekrutierung von Calpain an die Protease-Erkennungsstelle im N-Terminus von FE65 fungiert. Somit könnte ARHGEF6/aPIX die proteolytische Spaltung und dadurch die Interaktion von FE65 mit den oben erwähnten Proteinen regulieren. Diese Hypothese wird durch das Vorhandensein einer Folge saurer Aminosäuren mit starker Affinität zu Calciumionen, direkt vor der putativen Protease-Erkennungsstelle, in FE65 gestützt (Longo et al., 2003).

Auf Basis dieser Hypothese ließe sich auch die nicht nachgewiesene ARHGEF6/αPIX-FE65-Interaktion durch Koimmunpräzipitation erklären, da die Peptide zur Antikörpererkennung jeweils an den N-Terminus der Proteine fusioniert waren.

Es ist jedoch auch denkbar, dass die Interaktion von ARHGEF6/aPIX und FE65 zeitlich und räumlich begrenzt stattfindet und gezielt durch zelluläre Regulationsmechanismen, wie beispielsweise Ubiquitinylierung reguliert wird. Mitglieder der Cbl-Proteinfamilie nehmen dabei und bei dem nachfolgenden Proteasom-vermittelten Proteinabbau in der Zelle eine Schlüsselrolle ein (Thien und Langdon, 2005). Hierbei ist es interessant zu erwähnen, dass Cbl-b, ein Mitglied der Cbl-Proteinfamilie, an die SH3-Domäne von ARHGEF6/aPIX bzw. ARHGEF7/BPIX binden kann (Flanders et al., 2003; Wu et al., 2003) und neueste Arbeiten zeigen konnten, dass Cbl die Degradation von ARHGEF7/BPIX stimuliert (Schmidt et al., 2006). Aber auch der WW-Domäne von wurde eine Rolle bei der Ubiquitin-abhängigen Proteindegradation FE65 zugeschrieben (Bedford et al., 2000), weshalb spekuliert werden kann, dass die Interaktion von ARHGEF6/ α PIX und FE65 durch gezielte Ubiquitinylierung reguliert

wird und deshalb zeitlich begrenzt ist. Dies würde auch erklären, warum die Interaktion nach Koimmunpräzipitation nicht nachgewiesen werden konnte, vermutlich, weil die Inkubation des Lysats über einen zu langen Zeitraum erfolgte. Die im Gegensatz dazu durch GST-Pulldown-Experimente nachgewiesene Interaktion könnte auf die Fusion des GST-Proteins zurückzuführen sein. Es ist bekannt, dass ein GST-Fusionsprotein eine erhöhte Stabilität aufweist und vor dem Abbau durch intrazelluläre Proteasen sowie durch Ubiquitinylierung geschützt wird (Terpe, 2003).

Durch Immunfluoreszenzanalysen an CHO-K1- und PC12-Zellen konnte überexprimiertes FE65 im Kern, Zytoplasma und an der Zellperipherie nachgewiesen werden, was mit der bereits beschriebenen dualen Funktion von FE65 in diesen zellulären Kompartimenten übereinstimmt.

In zahlreichen PC12-Zellen lokalisierte FE65 zusätzlich in nukleären, klar abgrenzbaren punktförmigen Strukturen. Es ist bekannt, dass FE65 auch im Kern von PC12-Zellen in die Transkriptions- und Zellzyklusregulation involviert ist, jedoch ist bis heute über die Lokalisation in subnukleären Strukturen nichts beschrieben (Minopoli et al., 2001; Bruni et al., 2002). Die Morphologie der FE65-positiven Strukturen ließ die Vermutung aufkommen, dass es sich um Subkompartimente des Zellkerns, so genannte "Cajal bodies", handeln könnte. Eine Kolokalisation von FE65 mit einem Markerprotein für Cajal bodies konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der Morphologie könnte es sich bei den beobachteten Strukturen auch um andere subnukleäre Kompartimente, wie z.B. "Speckles", handeln, in welchen prä-mRNA-Spleißfaktoren akkumulieren (Spector, 2001). Auch das könnte durch spezifische Immunfluoreszenz-Analysen untersucht werden. Es wäre jedoch auch denkbar, dass es sich bei den beobachteten Strukturen um Proteinaggregate handelt, da dies auch nach Überexpression anderer Fusionsproteine, wie Gephyrin, im Kern von Neuronen beobachtet werden konnte (Dr. Kerstin Berhörster, persönliche Mitteilung).

In beiden untersuchten Zellsystemen konnte an der Zellperipherie eine partielle Kolokalisation von FE65 mit Aktin nachgewiesen werden, was auf eine Funktion von FE65 bei der Regulation des Aktinzytoskeletts hinweisen könnte. Nach Koexpression in PC12- und CHO-K1-Zellen kolokalisierte FE65 mit ARHGEF6/αPIX im Zytoplasma und an der Zellperipherie. Interessanterweise wurde dabei eine verstärkte Lokalisation von FE65 an der Zellmembran in CHO-K1-Zellen beobachtet, was auf eine ARHGEF6/αPIX-vermittelte Translokation von FE65 hindeuten könnte. Bis heute ist über eine Funktion von ARHGEF6/αPIX bei der Rekrutierung von Proteinen wenig bekannt, wohingegen für das zu ARHGEF6/αPIX sehr homologe Protein ARHGEF7/βPIX mehr Daten vorliegen. Manser et al. (1998) konnten nachweisen, dass ARHGEF7/βPIX für die Rekrutierung von PAK zu fokalen Adhäsionen notwendig ist.

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass ARHGEF7/βPIX auch die Rekrutierung von GIT1, einem weiteren Interaktionspartner, an zelluläre Membranen wie Endosomen und Plasmamembran stimuliert (Za et al., 2006; Botrugno et al., 2006). Dieser Komplex, in dem außer ARHGEF7/BPIX und GIT auch PAK und Rac vorhanden sind, spielt in Neuronen bei der Morphogenese der dendritischen Dornen eine wichtige Rolle (Zhang et al., 2003; 2005). In Neuronen wurde nachgewiesen, dass ARHGEF7/βPIX über die Interaktion mit dem neuronalen Adaptorprotein Shank in der PSD (postsynaptischen Dichte) PAK an die Synapsen rekrutiert (Park et al., 2003). Spätere Studien konnten zeigen, dass dies und die lokale Aktivierung der GTPasen für die Entwicklung dendritischer Dornen essentiell ist (Park et al., 2003; Zhang et al., 2005). So fungiert ARHGEF7/BPIX einerseits als Adaptorprotein, um verschiedene Proteine in räumliche Nähe zueinander zu bringen und reguliert andererseits durch Aktivierung der GTPasen die Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Aktuelle Studien an nicht neuronalen Zellen bestätigen diese Funktion. Während der Integrin-vermittelten Bildung fokaler Adhäsionen rekrutiert ARHGEF7/BPIX inaktives, GDI-gebundenes Rac1 über eine Interaktion mit der SH3-Domäne, nicht der katalytischen Domäne, an die Plasmamembran, um erst dort lokal die Aktivierung von Rac1 zu stimulieren (ten Klooster et al., 2006).

Aufgrund dieser Erkenntnisse und der Homologie zu ARHGEF7/BPIX könnte auch ARHGEF6/aPIX in der Lage sein, FE65 durch Protein-Protein-Interaktion an die Zellmembran zu rekrutieren. Obwohl allein aufgrund der Kolokalisation beider Proteine an der Zellmembran noch nicht bestimmt werden kann, in welchem Signalweg diese mögliche Protein-Protein-Interaktion eine Rolle spielt, lassen Kolokalisationen beider Proteine mit β -Integrin an der Zellperipherie eine Funktion von ARHGEF6/ α PIX während der Zellmigration vermuten (Rosenberger et al., 2003; 2005; Sabo et al., 2001). Während der Fortbewegung einer Zelle wird durch die Bildung von Lamellipodien und Filopodien immer wieder Kontakt zum Substrat aufgenommen. Dort bilden sich fokale Adhäsionen bzw. fokale Kontakte aus (Nobes und Hall, 1995). Integrine verbinden hier als Transmembranproteine die extrazelluläre Matrix (ECM) mit Proteinen des Aktinzytoskeletts (Schönwälder und Burridge, 1999). Sowohl für ARHGEF6/aPIX als auch für FE65 wurde bereits eine Lokalisation an Kontaktstellen der Zelle mit der ECM beschrieben. ARHGEF6/aPIX ist über ILK ("integrin linked kinase") und β-Parvin indirekt mit β-Integrinen assoziiert und führt dort durch die Aktivierung von Rac1 und Cdc42 zur lokalen Reorganisation des Aktinzytoskeletts (Rosenberger et al., 2005; Filipenko et al., 2005). Auch der FE65-APP-Mena-Komplex kolokalisiert mit β -Integrin, vor allem in fokalen Komplexen sich bildender Lamellipodien (Sabo et al, 2001). Es wurde vermutet, dass FE65 direkt über eine der

Phosphotyrosin-Bindedomänen (PTB) mit der intrazellulären Domäne von β -Integrin interagieren kann (Sabo et al., 2001), da dies bereits für einige andere Proteine mit PTB-Domänen beschrieben wurde (Calderwood et al., 2003). Man geht davon aus, dass Mena durch die Interaktion mit FE65 ebenfalls Teil des Proteinkomplexes ist und in Verbindung mit Profilin, einem aktinbindenden Protein, die F-Aktin-Polymerisation positiv beeinflusst (Sabo et al., 2001).

Aufgrund der hier erläuterten Erkenntnisse könnten bestimmte Proteine durch die Interaktion von ARHGEF6/aPIX und FE65 in räumliche Nähe zueinander gebracht werden, wodurch lokal bestimmte Signalwege aktivieren werden können. Ein solcher Mechanismus ist bereits für Tiam1, ebenfalls ein GEF der Dbl-Familie, bekannt. Tiam1 interagiert mit dem Adaptorprotein JIP2, das wie FE65 auch über eine PTB-Domäne mit APP interagieren kann (Taru et al., 2002). Durch die lokale Tiam1-vermittelte Aktivierung von Rac1 wird ein mit JIP2 interagierendes Rac1-Effektorprotein (MLK3) aktiviert, wodurch spezifisch die p38-MAP-Kinase-Signalkaskade aktiviert werden kann (Buchsbaum et al., 2002). So reguliert Tiam1 durch die Interaktion mit einem Adaptorprotein die zeitliche und räumliche Aktivierung eines bestimmten Signalweges. Die Interaktion von ARHGEF6/aPIX mit dem Adaptorprotein FE65 könnte eine ähnliche Funktion erfüllen. Es wäre denkbar, dass FE65 durch ARHGEF6/ α PIX an die Zellmembran rekrutiert wird. Dort könnten ARHGEF6/aPIX interagierende Proteine in räumliche Nähe zu mit FE65 assoziierten Proteinen gelangen. Die dortige lokale Aktivierung der GTPasen Rac1 und Cdc42 durch ARHGEF6/aPIX könnte bestimmte Signalwege aktivieren. Bis heute wurden keine direkt mit FE65 interagierenden Effektorproteine der aktiven GTPasen Rac1 und Cdc42 identifiziert, jedoch könnte die Aktivierung indirekt erfolgen. Interessanterweise kann IRSp53 ("insulin receptor substrate of 53 kDa"), ein ubiquitär exprimiertes Multidomänenprotein, von aktiviertem Rac1 bzw. Cdc42 aktiviert werden (Miki et al., 2000; Krugmann et al., 2001). IRSp53 interagiert mit F-Aktin assoziierten Proteinen wie Mena, wodurch vermutet wird, dass dadurch die Profilin-vermittelte Aktinpolymerisation gefördert wird (Berhörster, 2006). Da FE65 ebenfalls mit Mena interagiert (Ermekova et al., 1997), könnte man vermuten, dass durch die ARHGEF6/αPIX-vermittelte Aktivierung der GTPase Rac1 bzw. Cdc42 über die Bindung an IRSp53 und Mena die Aktinpolymerisation während der Reorganisation des Aktinzytoskeletts reguliert wird. Die von Cdc42 über Mena induzierte Bildung von Filopodien sowie die Kolokalisation des FE65-APP-Mena-Proteinkomplexes mit Rac1 an der Membran von Lamellipodien unterstützen diese Hypothese (Krugmann et al., 2001; Sabo et al., 2001). Ein entsprechendes Modell ist in Abb. 45 dargestellt.



Abb. 45: Modell für die mögliche Interaktion von ARHGEF6/ α PIX und FE65 an der Zellmembran

2. Verschiedene ARHGEF6/αPIX-Domänen sind wichtig für dessen subzelluläre Lokalisation

In der vorliegenden Arbeit konnte nach Expression verschiedener ARHGEF6/aPIX-Deletionsmutanten gezeigt werden, dass sowohl die N-terminale CH-Domäne als auch die coiled-coiled-Domäne am C-Terminus eine wichtige Funktion bei der subzellulären Lokalisation von ARHGEF6/aPIX einnimmt. Die Überexpression von ARHGEF6/aPIX mit einer Deletion von 28 Aminosäuren in der N-terminalen CH-Domäne (ARHGEF6/aPIXΔAS56-83) führte in CHO-K1- und PC12-Zellen zu einer punktförmigen Verteilung dieser Proteinvariante im Zytoplasma, wodurch die Beobachtungen von Rosenberger et al. (2003) in CHO-K1-Zellen bestätigt wurden. Interessanterweise hatte die Deletion der gesamten CH-Domäne geringere Auswirkungen, da die ektopische Expression von ARHGEF6/aPIXΔCH in beiden Zellsystemen zwar ebenfalls in der Bildung punktförmiger Strukturen resultierte, allerdings waren diese kleiner und auf Bereiche an der Zellperipherie beschränkt.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Deletion von 28 Aminosäuren innerhalb der CH-Domäne weder die Homodimerisierung noch die Heterodimerisierung mit ARHGEF6/βPIX beeinflusst wird (Rosenberger et al., 2003). Es wird jedoch vermutet, dass die Homo- bzw. Heterodimerisierung mit mutanten ARHGEF6/αPIX-Proteinvarianten dominant-negative Auswirkungen auf zelluläre Signalwege haben könnte, die nach Dimerisierung aktiviert werden (Koh et al., 2001; Rosenberger et al.,

Während der Zellanhaftung bilden sich integrinhaltige Komplexe. Über die Interaktion mit β -Parvin befindet sich auch ARHGEF6/ α PIX in diesen Komplexen und kann wiederum FE65 rekrutieren. An der Plasmamembran könnte FE65 mit Mena interagieren. ARHGEF6/ α PIX aktiviert Rac1 bzw. Cdc42 und reguliert dadurch die Bindung an IRSp53, wodurch letztlich die Aktinpolymerisation stimuliert werden könnte.

2003). So interagiert ARHGEF6/ α PIX über die CH-Domäne mit β -Parvin und wird darüber vermutlich zu fokalen Adhäsionen an die Zellmembran rekrutiert (Rosenberger et al., 2003). Da diese Interaktion mit ARHGEF6/ α PIX Δ CH und ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Rosenberger et al., 2003), wäre es möglich, dass diese Proteinvarianten aufgrund dessen nicht mehr rekrutiert werden können und im Zytoplasma verbleiben.

Die weitere Analyse der ARHGEF6/αPIX-Deletionsvarianten ergab, dass die C-terminal trunkierte Proteinvariante (ARHGEF6/αPIXΔCC) hauptsächlich im Kern und diffus im Zytoplasma lokalisiert ist. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Homo- bzw. Heterodimerisierung von ARHGEF6/αPIX eine wichtige Rolle bei der subzellulären Lokalisation spielt, wie es auch für ARHGEF7/βPIX beobachtet werden konnte (Koh et al., 2001). Es wurde kürzlich gezeigt, dass die Aktivierung von Rac1 und Cdc42 durch ARHGEF6/αPIX ebenfalls über eine Dimerisierung reguliert werden kann (Feng et al., 2004; Baird et al., 2005). Aus diesen Beobachtungen wird deutlich, dass ARHGEF6/αPIX über Dimerisierung sowohl die GTPase-Affinität, als auch die subzelluläre Lokalisation beeinflussen kann. Die Translokation in den Zellkern könnte jedoch auch auf den Verlust der Interaktion mit anderen Proteinen zurückzuführen sein, da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass ARHGEF6/αPIX vermutlich über die coiled-coil-Domäne mit FE65 interagiert.

Aufgrund der Morphologie der nach Überexpression von ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 beobachteten zellulären Strukturen wurde vermutet, dass es sich hierbei bspw. um Endosomen handeln könnte. Da für ARHGEF6/aPIX, wie für ARHGEF7/BPIX bekannt, eine Funktion bei endosomalen Transportprozessen postuliert wird (Rosenberger und Kutsche, 2006), sollten durch Koimmunfluoreszenz-Experimente mit Antikörpern gegen spezifische endosomale Markerproteine die ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83-positiven Strukturen näher charakterisiert werden. Dabei konnte eine partielle Kolokalisation von ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 mit γ -Adaptin, einer Untereinheit des AP-1-Komplexes, nachgewiesen werden. AP-1-Komplexe sind mit Clathrin-beschichteten Vesikeln (CCVs) assoziiert, welche in Transportvorgänge zwischen dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und Endosomen involviert sind, aber auch zwischen TGN und Plasmamembran vermitteln können (Nakagawa et al., 2000). Daher könnte die Kolokalisation von ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 mit γ -Adaptin an der Zellperipherie möglicherweise auf eine Beteiligung von ARHGEF6/aPIX an Transportvorgängen zwischen TGN und Plasmamembran hindeuten. Im Gegensatz zu ARHGEF6/aPIX, dessen Lokalisation in endosomalen Kompartimenten noch nicht gezeigt werden konnte, wurde eine Assoziation von ARHGEF7/βPIX als Teil eines Proteinkomplexes mit endosomalen Membranen in verschiedenen Zellen nachgewiesen (Di Cesare et al., 2000; Matafora et al., 2000; Manabe et al., 2002; Za et al., 2006; Botrugno et al., 2006). Man geht davon aus, dass dieser Proteinkomplex während der Zellmigration zwischen Endosomen und der Plasmamembran hin- und her"shuttelt" und somit beim Transport von Proteinen, wie z.B. Transmembranrezeptoren, über endosomale Kompartimente zur Plasmamembran eine wichtige regulatorische Funktion einnimmt (Di Cesare et al., 2000; Matafora et al., 2001; Rosenberger und Kutsche, 2006). Aufgrund der Homologie zu ARHGEF7/βPIX könnte man für ARHGEF6/αPIX eine vergleichbare Lokalisation und Funktion vermuten, wobei es sich hierbei möglicherweise um einen eher transienten Übergangszustand handeln könnte. Die Mutation in ARHGEF6 und die daraus resultierende Deletion innerhalb der CH-Domäne von ARHGEF6/aPIX könnte aufgrund von beeinträchtigten Protein-Protein-Interaktionen diesen Übergangszustand beeinflussen, wodurch die Lokalisation am endosomalen Kompartiment vermutlich stabilisiert wird. Die mögliche Lokalisation an CCVs könnte bedeuten, dass ARHGEF6/aPIX als Teil eines postulierten Proteinkomplexes am endosomalen Transport von Proteinen zur Membran beteiligt ist. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass kürzlich gezeigt wurde, dass Mutationen im AP1S2-Gen, das für eine weitere Untereinheit des AP-1-Komplexes kodiert, zu X-chromosomal vererbter geistiger Behinderung führen (Tarpey et. al., 2006). Es wird vermutet, dass die Zerstörung des funktionellen Adaptorkomplexes Auswirkungen auf den Transport synaptischer Vesikel haben könnte (Horikawa et al., 2002; Kim et al., 2004). Auf Basis dieser Erkenntnisse wäre denkbar, dass Mutationen in ARHGEF6 ebenfalls zu Beeinträchtigungen des Vesikeltransports führen könnten. Es wird vermutet, dass Defekte im Transport synaptischer Vesikel zu Beeinträchtigungen in der synaptischen Aktivität führen können, einer der möglichen Ursachen einer geistigen Behinderung (Newey et al., 2005; Govek et al., 2005; Chelly et al., 2006).

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Koexpression von ARHGEF6/ α PIX Δ AS56-83 mit konstitutiv-aktivem Rac1 bzw. Cdc42 Auflösung der ARHGEF6/αPIX∆AS56-83-positiven Strukturen zur und zur Relokalisation von ARHGEF6/αPIX∆AS56-83 im Zytoplasma und insbesondere an der Zellmembran führt. Eine ähnliche Beobachtung wurde für den ARHGEF7/βPIXp95APP1-PAK-Komplex gemacht, dessen Translokation vom endosomalen Kompartiment an die Plasmamembran ebenfalls durch Rac1-GTP stimuliert werden kann (Manabe et al., 2002). p95-APP1 ist ein Mitglied der GIT-Proteinfamilie, die der GAP-Aktivität für ARF-GTPasen wichtige Regulatoren aufgrund des Vesikeltransports sind (Hoefen und Berk, 2006). Es wurde postuliert, dass die Translokation des Komplexes von den Endosomen an die Plasmamembran möglicherweise durch eine Interaktion von aktiviertem Rac1 und ARHGEF7/βPIX stimuliert werden könnte (zusammengefasst in Rosenberger und Kutsche, 2006). Die beobachtete Relokalisation von ARHGEF6/αPIXΔAS56-83 nach Koexpression mit aktiviertem Rac1 und Cdc42 stützt diese Hypothese, wobei es sich hier um eine Translokation von CCVs an die Plasmamembran handeln könnte. Es bleibt jedoch noch zu klären, ob diese Translokation über eine direkte Bindung von Rac1-GTP an ARHGEF6/αPIX oder eine indirekte Interaktion über andere, möglicherweise im Komplex vorhandene Proteine, wie PAK, reguliert wird, da auch PAK aktiviertes Rac1 bzw. Cdc42 binden kann (Bockoch, 2003). Aufgrund der hier beschriebenen Daten wäre eine mögliche Rolle von ARHGEF6/αPIX bei der Translokation eines Proteinkomplexes von CCVs an die Plasmamembran vorstellbar (Abb. 46).



Abb. 46: Modell für die Rolle von ARHGEF6/αPIX als Teil eines Proteinkomplexes, der mit Clathrin-beschichteten Vesikeln assoziiert ist und an die Plasmamembran transloziert wird

ARHGEF6/ α PIX ist Teil eines Multiproteinkomplexes, der mit AP-1-positiven Clathrinbeschichteten Vesikeln assoziiert ist. Die Bindung von aktiviertem Rac1 bzw. Cdc42 an ARHGEF6/ α PIX oder ein anderes Protein des Multiproteinkomplexes führt zur einer Translokation des Komplexes und des assoziierten CCVs an die Plasmamembran (CCV: "clathrin-coated vesicle"; PM: Plasmamembran).

Die weitere Aufklärung dieses Signalweges könnte zu neuen Erkenntnissen über die Funktion von ARHGEF6/αPIX für den Vesikeltransport und damit zum genaueren Verständnis der durch Mutationen in *ARHGEF6* bedingten mentalen Retardierung führen.

3. ARHGEF6/αPIX hat eine wichtige Funktion bei der Ausbildung von Zellfortsätzen in eukaryotischen Zellen

Die Ausbildung von Neuriten ist abhängig von der kontrollierten Reorganisation des Aktinzytoskeletts, bei der Rho-GTPasen und deren regulatorische Proteine eine essentielle Rolle spielen. Über die Funktion von ARHGEF6/aPIX während der Neuritenbildung in PC12-Zellen ist bis heute noch wenig bekannt, wohingegen für das homologe Protein ARHGEF7/BPIX mehr Daten vorliegen. Aufgrund dessen wurden die morphologischen Veränderungen von PC12-Zellen nach ARHGEF7/_{BPIX-} Überexpression weiter verfolgt, auch um sie mit denen nach ARHGEF6/ α PIX-Überexpression zu vergleichen. Es ist bekannt, dass ARHGEF7/βPIX in PC12-Zellen nach Bindung an PAK3 spezifisch Rac1 aktiviert und dadurch die Bildung von Lamellipodien fördert, weshalb nach stabiler Überexpression von ARHGEF7/βPIX eine verstärkte Zellausbreitung beobachtet werden konnte. Dabei waren die Zellen weiterhin noch in der Lage, Neuriten auszubilden (Obermeier et al., 1998). Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PC12-Zellen nach ektopischer Expression von ARHGEF7/βPIX ebenfalls einen ausgebreiteten Phänotyp mit verstärkter Bildung lamellipodienähnlicher Zellausläufer zeigen. Allerdings konnte auch drei Tage nach Transfektion kaum Neuritenbildung beobachtet werden. Diese Unterschiede könnten auf verschiedene experimentelle Bedingungen zurückzuführen sein, da die morphologischen Untersuchungen von Obermeier et al. (1998) an stabil ARHGEF7/BPIX-exprimierenden PC12-Zellen durchgeführt wurden, wodurch es möglich ist, diese länger zu kultivieren und infolgedessen zu späteren Zeitpunkten zu analysieren. Aufgrund der in dieser Arbeit angewandten transienten Transfektion war es nicht möglich, die Zellen über längere Zeiträume in Kultur zu halten, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass die ARHGEF7/βPIX-exprimierenden Zellen nach längerer Kultivierung in der Lage sind, Neuriten auszubilden. Die Überexpression von ARHGEF6/aPIX führte in PC12-Zellen ebenfalls zu einer vermehrten Zellausbreitung und die dabei beobachtete verstärkte Bildung lamellipodienähnlicher Zellfortsätze war mit der nach ARHGEF7/βPIX-Expression vergleichbar. Diese Zellen bildeten auch 72 Stunden nach Expression nur selten kurze neuritenähnliche Zellausläufer aus, wohingegen Kontrollzellen bereits lange Neuriten mit Verzweigungen gebildet hatten. Auch in CHO-K1-Zellen konnte nach Überexpression von ARHGEF6/aPIX eine verstärkte Lamellipodienbildung nachgewiesen werden, wodurch die Beobachtungen von Rosenberger et al. (2003; 2005) bestätigt wurden. Die morphologischen nach ARHGEF6/aPIX-Expression Veränderungen in beiden eukaryotischen Zellsystemen sind ein Hinweis darauf, dass auch ARHGEF6/aPIX eine wichtige Rolle

bei der Ausbildung von Zellfortsätzen spielt. Die verstärkte Bildung breiter, flächiger, lamellipodienähnlicher Zellausläufer nach ARHGEF6/aPIX-Überexpression lässt vermuten, dass diese auf eine erhöhte Rac1-Aktivierung zurückzuführen ist. Es ist bekannt, dass aktiviertes Rac1 zur Lamellipodienbildung führt, wohingegen verstärkte Cdc42-Aktivierung die Ausbildung von Filopodien fördert (Ridley et al., 1992b; Nobes und Hall, 1995; Kozma et al., 1995). Auch in PC12-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass NGF-Stimulation zur lokalen Aktivierung von Rac1 und zur Ausbildung breiter Zellausläufer und Membranumstülpungen an der Zellperipherie führt (Yasui et al., 2001). Übereinstimmend mit diesen Erkenntnissen führte die Überexpression von Rac1 und konstitutiv-aktivem Rac1 sowohl in PC12- als auch in CHO-K1-Zellen zu einer verstärkten Bildung von Lamellipodien. Überexprimiertes Rac1 ist in beiden Zellsystemen vor allem an der Zellperipherie lokalisiert, was unabhängige Studien bestätigten (Yasui et al., 2001; del Pozo et al., 2002; Aoki et al., 2004). Auch ARHGEF6/aPIX konnte im Rahmen dieser Arbeit in beiden Zellsystemen verstärkt an der Zellmembran nachgewiesen werden, wodurch die Vermutung. der ARHGEF6/aPIX-vermittelte Phänotyp könnte auf eine erhöhte Rac1-Aktivierung zurückzuführen sein, weiter gestützt wird. Da für die Ausbildung von Zellfortsätzen, wie Neuriten, die zeitliche und räumliche Regulation der Rac1- bzw. Cdc42-Aktivierung essentiell ist, übernehmen regulatorische Proteine wie GEFs auch hier eine Schlüsselfunktion (Aoki et al., 2004; 2005). Viele GEFs besitzen Austauschaktivität gegenüber mehreren GTPasen, weshalb auch diese reguliert werden muss. So ist bekannt, dass die GEF-Aktivität von ARHGEF6/αPIX komplexen Regulationsmechanismen unterliegt. Wie bereits in den vorhergehenden Kapiteln erläutert, unterscheiden sich ARHGEF6/aPIX-Monomere und -Dimere hinsichtlich ihrer Affinität bzw. Austauschaktivität gegenüber Rac1 und Cdc42, welche zusätzlich durch das intrazelluläre Verhältnis von ARHGEF6/aPIX-Monomeren zu -Dimeren beeinflusst werden kann (Feng et al., 2004). Hierbei spielen Proteine, die an die SH3-Domäne von ARHGEF6/aPIX binden, wie PAK und Cbl, eine wichtige regulatorische Rolle (Feng et al., 2004; Baird et al., 2005). Auch für ARHGEF7/BPIX konnte kürzlich gezeigt werden, dass dessen GEF-Aktivität über Protein-Protein-Interaktionen mit der SH3-Domäne reguliert wird (ten Klooster et al., 2006). Während der Bildung fokaler Adhäsionen rekrutiert ARHGEF7/βPIX inaktives Rac1 aus dem Zytoplasma an die Zellperipherie, welches dort durch ARHGEF7/BPIX lokal aktiviert wird. Interessanterweise erfolgt diese Rekrutierung nicht über die katalytische DH-Domäne, sondern über eine Interaktion von Rac1 mit der SH3-Domäne von ARHGEF7/βPIX. PAK1, ein weiteres mit der SH3-Domäne interagierendes Protein, greift regulierend ind die Interaktion zwischen ARHGEF7/βPIX und Rac1 ein und bestimmt somit u.a. die lokale Rac1Aktivierung. Da Rac1 und PAK1 um die Bindung an die SH3-Domäne von ARHGEF7/BPIX konkurrieren, kann Rac1 erst nach Dissoziation von PAK1 an ARHGEF7/BPIX binden. PAK1 wirkt also in diesem Fall als negativer Regulator der Rac1-Aktivierung (ten Klooster et al., 2006). Ein ähnlicher Mechanismus wäre aufgrund der Homologie zu ARHGEF7/ β PIX auch für ARHGEF6/ α PIX vorstellbar, wobei eine direkte Interaktion von Rac1 mit der SH3-Domäne von ARHGEF6/aPIX noch nicht nachgewiesen wurde. Es ist jedoch bekannt, dass ARHGEF6/aPIX neben der katalytischen DH-Domäne weitere Rac1-Bindestellen aufweist. So konnte einerseits gezeigt werden, dass am C-Terminus der PH-Domäne von ARHGEF6/aPIX eine spezifische Rac1-Bindestelle (RSID, "Rac-specific interaction domain") lokalisiert ist (Feng et al., 2004), andererseits wurde kürzlich nachgewiesen, dass sowohl ARHGEF6/aPIX als auch ARHGEF7/BPIX über die C-terminale GBD-Domäne mit Rac1 interagieren können (Shin et al., 2006). Nach Überexpression der mutanten ARHGEF6/αPIX-Proteine ARHGEF6/ α PIX Δ DH, ARHGEF6/ α PIX-DN, ARHGEF6/aPIXAPH bzw. ARHGEF6/aPIXAGBD in PC12-Zellen wurde keine verstärkte Lamellipodienbildung und Zellausbreitung beobachtet, was darauf hinweist, dass dafür sowohl die katalytische DH-Domäne als auch die spezifisch Rac1bindenden PH- und GBD-Domänen notwendig sind. Aufgrund dieser Erkenntnisse wäre vorstellbar, dass ARHGEF6/αPIX ebenfalls über eine dieser Domänen Rac1 rekrutieren und anschließend über die katalytische DH-Domäne lokal aktivieren kann. Auf Grundlage dieser Daten wäre folgendes Modell für die Funktion von ARHGEF6/aPIX bei der Ausbildung von Zellfortsätzen vorstellbar (Abb. 47).



Abb. 47: Modell der SH3-abhängigen Regulation der GEF-Aktivität von ARHGEF6/αPIX

Während der Neuritenbildung wird ARHGEF6/ α PIX vermutlich über Protein-Protein-Interaktionen zur Membran rekrutiert. In der Zelle herrscht ein Gleichgewicht zwischen ARHGEF6/ α PIX-Dimeren und –Monomeren. Nach Bindung von PAK- oder Cbl kann monomeres ARHGEF6/ α PIX sowohl Rac1 als auch Cdc42 aktivieren. ARHGEF6/ α PIX-Dimere können Rac1 an die Zellmembran rekrutieren. Dort kann Rac1 lokal aktiviert werden. Die koordinierte Aktivierung von Rac1 und Cdc42 führt zur Neuritenbildung (PM: Plasmamembran).

Nach ektopischer Expression ist ARHGEF6/αPIX in der Zelle im Überschuss vorhanden, wodurch die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass sich vermehrt ARHGEF6/αPIX-Dimere ausbilden. Diese ARHGEF6/αPIX-Dimere können wie bereits erwähnt spezifisch Rac1 an die Zellperipherie rekrutieren und dort lokal aktivieren. Endogene PAK- bzw. Cbl-Proteine können an die SH3-Domäne von wenigen, als Monomere vorliegenden ARHGEF6/PIX-Moleküle binden und Rac1 bzw. Cdc42 aktivieren. Auf Basis dieses Modells lässt sich die verstärkte Lamellipodienbildung und Zellausbreitung nach Überexpression von ARHGEF6/αPIX erklären (Abb. 48).



Abb. 48: Modell der Regulation der ARHGEF6/αPIX-GEF-Aktivität nach Überexpression von ARHGEF6/αPIX

Das in der Zelle nach ektopischer Expression im Überschuss vorliegendes ARHGEF6/ α PIX kann wahrscheinlich vermehrt dimerisieren. Endogen vorhandene PAK/Cbl-Proteine können nur wenige ARHGEF6/ α PIX-Monomere binden. Die durch ARHGEF6/ α PIX-Dimere vermittelte verstärkte Rekrutierung von Rac1 an die Zellmembran und die daraus resultierende verstärkte lokale Rac1-Aktivierung führt zu erhöhter Lamellipodienbildung und ausgebreiteter Zellmorphologie (PM: Plasmamembran).

Nach Deletion der SH3-Domäne (ARHGEF6/αPIXΔSH3) konnte nach Überexpression in beiden untersuchten Zellsystemen weiterhin eine verstärkte Zellausbreitung beobachtet werden. Dies könnte bedeuten, dass dieser Effekt von einer Interaktion anderer Proteine mit der ARHGEF6/aPIX-SH3-Domäne unabhängig ist. Man geht jedoch heute davon aus, dass SH3-Domänen, wie sie in vielen GEFs vorkommen, eine zentrale Rolle bei der Regulation der GEF-Aktivität einnehmen (Schiller et al., 2006). Bis heute sind vier verschiedene, mit der SH3-Domäne von ARHGEF6/aPIX interagierende Proteine bekannt, von denen für die Proteine PAK und Cbl bereits eine Funktion bei der Regulation der ARHGEF6/aPIX-GEF-Aktivität nachgewiesen wurde (Feng et al., 2004; 2005). Vor diesem Hintergrund lassen sich auch die morphologischen Daten von Obermeier et al. (1998) erklären: die Autoren konnten nachweisen, dass die Hemmung der Interaktion von PAK3 mit ARHGEF7/BPIX in PC12-Zellen zu keiner verstärkten Lamellipodienbildung führt. So kann nach heutigen Kenntnissen allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass diese morphologischen Veränderungen auf Bindung anderer SH3-Bindepartner, wie bspw. Cbl, zurückzuführen ist, da die verwendete ARHGEF7/βPIX-Variante Punktmutationen in der SH3-Domäne aufwies, die nur auf Bindedefizienz für PAK3 überprüft wurde (Manser et al., 1998). Wie bereits erläutert, konkurrieren Rac1 und PAK1 um die Bindung an die SH3-Domäne von ARHGEF7/βPIX, wodurch PAK1 die spezifische Rac1-Aktivierung negativ reguliert (ten Klooster et al., 2006). Aufgrund der Annahme, dass der Regulation der GEF-Aktivierung von ARHGEF6/aPIX ein ähnlicher Mechanismus zugrunde liegt, lässt beobachtete Zellausbreitung sich auch die nach Überexpression von ARHGEF6/aPIXASH3 erklären. So kann nach Deletion der SH3-Domäne PAK oder Cbl nicht mehr an ARHGEF6/ α PIX Δ SH3 binden, wodurch sich vermutlich, wie nach Überexpression von ARHGEF6/ α PIX-Wildtyp vermehrt ARHGEF6/ α PIX-Dimere ausbilden. Da anzunehmen ist, dass die spezifische Rekrutierung von Rac1 durch ARHGEF6/aPIX nicht direkt über die SH3-Domäne, sondern möglicherweise über die RSID bzw. die GBD-Domäne erfolgt, ist eine Rekrutierung von Rac1 an die Zellperipherie nach Deletion der SH3-Domäne und damit Zellausbreitung möglich (Abb. 49). Trotzdem ist bei diesem Mechanismus eine regulierende Funktion SH3interagierender Proteine nicht auszuschließen, da auch die Rac1-Interaktion mit der ARHGEF7/βPIX-GBD-Domäne durch PAK reguliert werden kann (Shin et al., 2002; 2006).



Abb. 49: Modell der SH3-abhängigen Regulation der ARHGEF6/αPIX-GEF-Aktivität nach Überexpression der Deletionsmutante ARHGEF6/αPIXΔSH3

ARHGEF6/ α PIX Δ SH3 liegt in der Zelle nach Überexpression im Überschuss vor. Die Wahrscheinlichkeit der ARHGEF6/ α PIX Δ SH3-Dimerbildung ist hoch, wobei zusätzlich die Bindung von Proteinen an die SH3-Domäne aufgrund der Deletion verhindert wird. Die vermehrt vorliegenden ARHGEF6/ α PIX Δ SH3-Dimere können wiederum Rac1 zur Zellmembran rekrutieren und dort aktivieren, was zu einer verstärkten Rac1-Aktivierung und infolgedessen zu erhöhter Lamellipodienbildung und ausgebreiteter Zellmorphologie führt (PM: Plasmamembran).

Aufgrund der erwähnten Rolle von PAK1 als Negativregulator der ARHGEF7/βPIX vermittelten Rac1-Aktivierung sollten Koexpressionen Hinweise auf dessen Rolle bei der Regulation der GEF-Aktivität von ARHGEF6/αPIX geben. Erstaunlicherweise zeigte die Mehrzahl der PC12-Zellen nach Koexpression von ARHGEF6/αPIX und

PAK1 keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu Kontrollzellen und es konnte normales Neuritenwachstum beobachtet werden. Diese Revertierung der nach ARHGEF6/aPIX-Überexpression alleiniger beobachteten ausgebreiteten Zellmorphologie ist ein weiterer Hinweis auf eine regulatorische Funktion von PAK1. Unter Annahme des postulierten Modells könnte durch die gleichzeitige Expression von PAK1 und ARHGEF6/ α PIX das intrazelluläre Gleichgewicht von ARHGEF6/ α PIX-Monomeren zu -Dimeren, welches für die normale Zellmorphologie wichtig ist, wiederhergestellt werden (s. Abb. 47). Auch in CHO-K1-Zellen konnte nach Koexpression von PAK1 eine Reduktion der durch ARHGEF6/aPIX-vermittelten erhöhten Lamellipodienbildung beobachtet werden, allerdings zeigten diese Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen ein eher polares Wachstum. Dies könnte bedeuten, dass die Überexpression von PAK1 und ARHGEF6/aPIX auch die Zellpolarität beeinflusst. Eine Funktion für die Zellpolarität wurde sowohl für ARHGEF6/aPIX als auch für PAK1 beschrieben (Bockoch, 2003; Li et al., 2003; Cau und Hall, 2005). Im Gegensatz dazu konnte durch Koexpression von PAK1 und des mutierten ARHGEF6/aPIXASH3beiden Zellsystemen die verstärkte Lamellipodienbildung Proteins in und Zellausbreitung, wie nach Einzelexpression von ARHGEF6/ α PIX Δ SH3 beobachtet, nicht aufgehoben werden, wodurch die postulierte negative Regulatorfunktion von PAK1 weiter untermauert wird. Da in diesem Fall die direkte Interaktion von PAK1 mit ARHGEF6/aPIXASH3 nicht mehr möglich ist, ist es wahrscheinlich, dass es zur verstärkten ARHGEF6/ α PIX Δ SH3-Dimerbildung kommt, wodurch. wie nach ARHGEF6/αPIXΔSH3-Expression, vermehrt Rac1 zur Zellmembran rekrutiert und aktiviert wird, was eine verstärkte Ausbildung von Lamellipodien zur Folge hat (Abb. 49). Diese Daten weisen daraufhin, dass PAK1 während der Ausbildung von Zellfortsätzen durch Interaktion mit der SH3-Domäne die Dimerisierung von ARHGEF6/aPIX verhindert und dadurch indirekt die ARHGEF6/aPIX-GEF-Aktivität reguliert. Erste Auswertungen der PC12-Zellmorphologie nach Überexpression einer ARHGEF6/aPIX-bindedefizienten PAK1-Mutante untermauern dessen regulatorische Funktion, denn diese Zellen breiteten sich ebenfalls verstärkt aus. Durch die Beobachtung, dass PAK1-defiziente Zellen ebenfalls eine verstärkte Zellausbreitung und eine erhöhte Rac1-Aktivierung zeigen, wird diese Annahme weiter gestützt (ten Klooster et al., 2006).

Um weitere Erkenntnisse über die Funktion der PAK1-ARHGEF6/αPIX-Interaktion zu erlangen, wurden im weiteren Verlauf die zellulären Auswirkungen nach Überexpression von PAK1 bzw. PAK3 untersucht. Diese führten in PC12-Zellen zu einem nach ARHGEF6/αPIX-Expression gegensätzlichen Phänotyp, nämlich einer

verstärkten Bildung von Filopodien. Interessanterweise führte die Überexpression von PAK1 bzw. PAK3 in primären Neuronen ebenfalls zu einer verstärkten Bildung langer dünner, filopodienförmiger dendritischer Ausläufer, den Vorläufern dendritischer Dornen (Zhang et al., 2005). In CHO-K1-Zellen hatte die Überexpression von PAK1 einen weniger starken Effekt, allerdings konnte auch hier eine verstärkte Bildung dünner Zellfortsätze beobachtet werden. Da in beiden Zellsystemen die ektopische Expression von Cdc42 ebenfalls zu erhöhter Filopodienbildung führte, könnte dies bedeuten, dass nach Überexpression von PAK-Proteinen verstärkt Cdc42 aktiviert wird. Eine wichtige Rolle von PAK1 bei der Aktivierung von Cdc42 konnte bereits während der Chemotaxis neutrophiler Zellen nachgewiesen werden, in welchen nach Interaktion von PAK1 mit ARHGEF6/aPIX spezifisch Cdc42 aktiviert wird. Allerdings ist dabei die vorherige Aktivierung von PAK1 durch Interaktion mit der G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheit (G $\beta\gamma$) notwendig (Li et al., 2003). Weitere Studien haben ergeben, dass PAK1 zusammen mit G $\beta\gamma$ die Dissoziation von ARHGEF6/ α PIX-Dimeren stimulieren kann. Die dadurch entstehenden ARHGEF6/αPIX-Monomere können Cdc42 bzw. Rac1 aktivieren, wobei der zugrunde liegende Mechanismus noch weitgehend unbekannt ist (Baird et al., 2005). Somit wäre vorstellbar, dass überexprimiertes PAK1 möglicherweise nach Interaktion mit monomerem ARHGEF6/aPIX spezifisch Cdc42 aktiviert. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die im Überschuss vorhandenen PAK-Proteine in Verbindung mit anderen Proteinen, möglicherweise weiteren GEFs, zusätzlich Cdc42 aktivieren. Der genaue Mechanismus bleibt jedoch noch aufzuklären. In unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Überexpression aktivierter, phosphorylierter PAK-Proteinvarianten ebenfalls zu einer verstärkten Bildung von Filopodien, wie in dieser Arbeit beobachtet, führt (Sells et al., 1997; Manser et al., 1997; Zhao et al., 1998; Koh et al., 2002). So könnte auch eine Aktivierung der PAK-Proteine bei der spezifischen Aktivierung von Cdc42 eine wichtige Rolle spielen (Abb. 50).



Abb. 50: Modell zur Regulation der SH3-abhängigen ARHGEF6/αPIX-GEF-Aktivität und spezifischen GTPase-Aktivierung bei Überexpression von PAK1

Überexprimiertes PAK1 liegt in der Zelle im Überschuss vor. Durch die Bindung an alle ARHGEF6/αPIX-Monomere wird durch einen unbekannten Mechanismus spezifisch Cdc42 aktiviert. Unabhängig davon können PAK1-Proteine, vermutlich indirekt über andere GEFs, weiter spezifisch Cdc42 aktivieren, was letztlich zu einer verstärkten Ausbildung von Filopodien führt (PM: Plasmamembran).

Heute ist bekannt, dass PAK-Proteine komplexen Regulationsmechanismen unterliegen. So konnten verschiedene Experimente zeigen, dass PAKs als Rac1- bzw. Cdc42-Effektorproteine im Signalweg unterhalb der GTPasen aktiviert werden (Manser et al., 1998; Daniels et al., 1998). Gleichzeitig können sie wiederum Rac1 aktivieren und somit im Signalweg oberhalb der GTPasen liegen (Obermeier et al., 1998). Auch ARHGEF6/ α PIX ist in Signalwege oberhalb und unterhalb der GTPase-Aktivierung involviert (Yoshii et al., 1999; Li et al., 2003; Rosenberger et al., 2003; 2005).

Um Hinweise zu bekommen, ob die in dieser Arbeit beobachtete ARHGEF6/ α PIXvermittelte Zellausbreitung im Signalweg oberhalb oder unterhalb der GTPasen lokalisiert ist, wurden die morphologischen Auswirkungen der Überexpression verschiedener GTPase-Proteinvarianten vor und nach Koexpression mit ARHGEF6/aPIX untersucht. Nach Überexpression von dominant-negativem Rac1N17 konnte in CHO-K1- und PC12-Zellen keine Lamellipodienbildung beobachtet werden, nach Koexpression mit ARHGEF6/aPIX diese Zellen wohingegen wieder Lamellipodien ausbildeten und sich vermehrt ausbreiteten. Die Expression der Cdc42-Proteinvariante dominant-negativen (Cdc42N17) resultierte in beiden Zellsystemen nicht, wie nach Überexpression der Wildtypvariante (Cdc42) beobachtet, in der verstärkten Bildung von Filopodien. Auch hier konnte in CHO-K1-Zellen gezeigt werden, dass die Koexpression von Cdc42 bzw. Cdc42N17 mit ARHGEF6/αPIX zu einem ausgebreiteten Phänotyp mit verstärkter Lamellipodienbildung führt. Die Erkenntnisse dieser Untersuchungen deuten auf eine Funktion von ARHGEF6/αPIX im Signalweg unterhalb der GTPasen hin. Dies bedeutet, dass auch in Anwesenheit der dominant-negativen Proteinvarianten ARHGEF6/αPIX über Protein-Protein-Interaktionen an die Zellmembran rekrutiert wird und sich wiederum aufgrund des Überschusses nach ARHGEF6/αPIX-Überexpression vermehrt ARHGEF6/αPIX-Dimere ausbilden können. Dadurch kann endogen vorhandenes Rac1 spezifisch an die Zellperipherie rekrutiert und lokal aktiviert werden, was zu einer verstärkten Lamellipodienbildung und Zellausbreitung führt (Abb. 51).



Abb. 51: Modell zur Rolle von ARHGEF6/αPIX bei der Ausbildung von Zellforsätzen im Signalweg unterhalb von Rac1 bzw. Cdc42

Nach Koexpression von ARHGEF6/aPIX und dominant-negativem Rac1 bzw. Cdc42 ist ARHGEF6/aPIX in der Lage, die Zellausbreitung zu stimulieren. Es ist wahrscheinlich, dass ARHGEF6/aPIX über Protein-Protein-Interaktionen an die Membran rekrutiert wird und dort vermehrt Dimere bildet. Dadurch kann endogen vorhandenes Rac1 spezifisch an die Zellperipherie rekrutiert werden und nach Aktivierung bilden sich verstärkt Lamellipodien und die Zellen breiten sich aus (DN: dominant-negativ; PM: Plasmamembran).

Auch für PAK1 konnte gezeigt werden, dass es in PC12-Zellen im Signalweg unterhalb von Rac1 bzw. Cdc42 die Neuritenbildung induzieren kann (Daniels et al., 1998). Damit könnte ARHGEF6/αPIX, möglicherweise in Verbindung mit PAK1, in eukaryotischen Zellsystemen während der Ausbildung von Zellfortsätzen im Signalweg unterhalb der GTPasen eine zentrale regulatorische Funktion übernehmen. Diese wichtige Rolle könnte besonders während der neuronalen Morphogenese von entscheidender Bedeutung sein.

VI. Literatur

- Abbi, S. and Guan, J.L. (2002) Focal adhesion kinase: protein interactions and cellular functions. Histol. Histopathol. 17, 1163-1171
- Allen, K.M., Gleeson, J.G., Bagrodia, S., Partington, M.W., MacMillan, J.C., Cerione, R.A. and Mulley, J.C. (1998) PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. Nat. Genet. 20, 25-30
- Aoki, K., Nakamura, T. and Matsuda, M. (2004) Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. J. Biol. Chem. 279, 713-719
- Aoki, K., Nakamura, T., Fujikawa, K. and Matsuda, M. (2005) Local Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate accumulation recruits Vav2 and Vav3 to activate Rac1/Cdc42 and initiate neurite outgrowth in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. Mol. Biol. Cell. 16, 2207–2217
- Bagrodia, S., Bailey, D., Lenard, Z., Hart, M., Guan, J.L., Premont, R.T., Taylor, S.J. and Cerione, R.A. (1999) A tyrosine-phosphorylat ed protein that binds to an important regulatory region on the cool family of p21-activated kinase-binding proteins. J. Biol. Chem. 274, 22393-22400
- Bagrodia, S., Taylor, S.J., Jordon , K.A., Van Aelst, L. and Cerione, R.A. (1998) A novel regulator of p21-activated kinases. J. Biol. Chem. 273, 23633-23636
- Bagrodia, S., Bailey, D., Lenard, Z., Hart, M., Guan, J.L., Premont, R.T., Taylor, S.J. and Cerione, R.A. (1999) A tyrosine-phosphorylated protein that binds to an important regulatory region on the cool family of p21-activated kinase-binding proteins. J. Biol. Chem. 274, 22393-22400
- Baird, D., Feng, Q. and Cerione, R.A. (2005) The Cool-2/alpha-Pix protein mediates a Cdc42-Rac signaling cascade. Curr.Biol. 15, 1–10
- Bear, J.E., Svitkina, T.M., Krause, M., Schafer, D.A., Loureiro, J.J., Strasser, G.A., Maly, I.V., Chaga, O.Y., Cooper, J.A., Borisy, G.G. and Gertler, F.B. (2002) Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. Cell 109, 509-521
- Bedford, M.T., Sarbassova, D., Xu, J., Leder, P. and Yaffe, M.B. (2000) A novel pro-Arg motif recognized by WW domains. J. Biol. Chem. 275, 10359-10369
- Berhörster, K. (2006) Die Funktion des Insulinrezeptorsubstratproteins von 53 kDa für Dendriten und Synapsen in der Maus (Mus musculus, Linné 1758). Dissertation Universität Hamburg
- Bienvenu, T., des Portes, V., McDonell, N., Carrie, A., Zemni, R., Couvert, P. and Ropers, H.H. (2000) Missense mutation in PAK3, R67C, causes X-linked nonspecific mental retardation. Am. J. Med. Genet. 93, 294-298
- Billuart, P., Bienvenu, T., Ronce, N., des Portes, V., Vinet, M.C., Zemni, R. and Roest-Crollius, H. (1998) Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. Nature 392, 923-926
- **Birnboim, H.C. and Doly. J., (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523

- Bockoch, G.M. (2003) Biology of the p21-activated kinases. Annu.Rev.Biochem. 72, 743-781
- Boguski, M.S. and McCormick, F. (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. Nature, 366, 643-654
- Botrugno, O.A., Paris, S., Za, L., Gualdoni, S., Cattaneo, A., Bachi, A. and de Curtis I. (2006) Characterization of the endogenous GIT1-betaPIX complex, and identification of its association to membranes. Eur. J. Cell. Biol. 85, 35-46
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254
- Bruni, P., Minopoli, G., Brancaccio, T., Napolitano, M., Faraonio, R., Zambrano, N., Hansen, U. and Russo, T. (2002) Fe65, a ligand of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein, blocks cell cycle progression by down-regulating thymidylate synthase. expression. J. Biol. Chem. 277, 35481-35488
- Buchsbaum, R.J., Connolly, B.A. and Feig, L.A. (2002) Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade. Mol. Cell. Biol. 22, 4073–4085
- Calderwood, D.A., Fujioka, Y., de Pereda, J.M., Garcia-Alvarez, B., Nakamoto, T., Margolis, B., McGlade, C.J., Liddington, R.C. and Ginsberg, M.H. (2003) Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 2272-2277
- Cao, H., Garcia F., and McNiven M.A. (1998) Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. Mol. Biol. Cell. 9, 2595–2609.
- Cao, X. and Sudhof, T.C. (2001) A transcriptionally active complex of APP with FE65 and histone acetyltransferase Tip60. Science 293, 115-120
- Cau, J. and Hall, A. (2005) Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways. J. Cell Sci. 118, 2579-2587
- Cerione, R.A., and Zheng, Y. (1996) The Dbl family of oncogenes. Curr.Opin. Cell Biol. 8, 216–222
- Chelly, J., Khelfaoui, M., Francis, F., Cherif, B., Bienvenu, T. (2006) Genetics and pathophysiology of mental retardation. Eur. J. Hum. Genet. 14, 701–713
- Cramer, L.P. (2002) Ena/VASP: solving a cell motility paradox. Curr. Biol. 12, R417-419
- Daniels, R.H., Hall, P.S. and Bokoch, G.M. (1998) Membrane targeting of p21-activated kinase 1 (PAK1) induces neurite outgrowth from PC12 cells. EMBO J. 17,754-764
- del Pozo, M.A., Kiosses, W.B., Alderson, N.B, Meller, N., Hahn, K.M, and Schwartz, M.A. (2002) Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. Nat. Cell Biol. 4, 232–239
- Di Cesare, A., Paris, S., Albertinazzi, C., Dariozzi, S., Andersen, J., Mann, M., Longhi, R. and de Curtis, I., (2000) p95-APP1 links membrane transport to Rac-mediated reorganization of actin. Nat. Cell Biol. 2, 521–530
- Dugaiczyk, A., Boyer, H.W. and Goodman, H.M. (1975) Ligation of EcoRI endonucleasegenerated DNA fragments into linear and circular structures. J. Mol. Biol. 96, 171-184

- Ermekova, K.S., Zambrano, N., Linn, H., Minopoli, G., Gertler, F., Russo, T. and Sudol, M. (1997) The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of Drosophila enabled. J. Biol. Chem. 272, 32869-32877
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. Nature 420, 629-635
- **Eva, A. and Aaronson, S.A. (1985)** Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-celllymphoma. Nature 316, 273-275.
- Fauchereau, F., Herbrand, U., Chafey, P., Eberth, A., Koulakoff, A., Vinet, M.C. and Ahmadian, M.R. (2003) The RhoGAP activity of OPHN1, a new F-actin-binding protein, is negatively controlled by its amino-terminal domain. Mol. Cell. Neurosci. 23, 574-586
- Feig, L. (1999) Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-familiy GTPases. Nat. Cell. Biol. 1, E25-E27
- Feng, Q., Albeck, J.G., Cerione, R.A. and Yang, W., (2002) Regulation of the Cool/Pix proteins: key binding partners of the Cdc42/Rac targets, the p21-activated kinases. J. Biol. Chem. 277, 5644–5650.
- Feng, Q., Baird, D. and Cerione, R.A. (2004) Novel regulatory mechanisms for the Dbl familiy guanine nucleotide exchange factor Cool-2/alpha-Pix. EMBO J. 23, 3492-3504
- Filipenko, N.R., Attwell, S., Roskelley, C. and Dedhar, S., (2005) Integrin-linked kinase activity regulates Rac- and Cdc42-mediated actin cytoskeleton reorganization via alpha-PIX. Oncogene 24, 5837–5849
- Flanders, J.A., Feng, Q., Bagrodia, S., Laux, M.T., Singavarapu, A. and Cerione, R.A. (2003) The Cbl proteins are binding partners for the Cool/Pix family of p21-activated kinase-binding proteins. FEBS Lett. 550, 119-123
- Gedeon, A.K., Nelson, J., Gecz, J. and Mulley, J.C. (2003) X-linked mild non-syndromic mental retardation with neuropsychiatric problems and the missense mutation A365E in PAK3. Am. J. Med. Genet. 120, 509-517
- Gimona, M., Djinovic-Carugo, K., Kranewitter, W.J. and Winder, S.J. (2002) Functional plasticity of CH domains. FEBS Lett. 513, 98-106
- Glading, A., Lauffenburger, D.A. and Wells, A. (2002) Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. Trends Cell Biol. 12, 46–54
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W. and Cong, J. (2003) The calpain system. Physiol. Rev. 83, 731-801
- Govek, E.E., Newey, S.E., Akerman, C.J., Cross, J.R., Van der Veken, L. and Van Aelst, L. (2004) The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. Nat. Neurosci. 7, 364-372
- Govek, E.E., Newey, S.E. and Van Aelst, L. (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. Genes and Development 19, 1-49
- Greene, L.A. and Tischler, A.S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2424-2428.
- Gu, C., Tangye, S.G., Sun, X., Luo, Y., Lin, Z. and Wu, J. (2006) The X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP associates with PAK-interacting exchange factor and participates in T cell activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 14447-14452

- Hall, A. (1994) Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. Annu. Rev. Cell. Biol. 10, 31-54
- Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. Science 279, 509-514
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J. Mol. Biol. 166, 557-580
- Harris, K.M. (1999) Structure, development and plasticity of dendritic spines. Curr. Opin. Neurobiol. 9, 343-348
- Hart, M.J., Eva, A., Evans, T., Aaronson and S.A., Cerione (1991) Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42HS protein by the dbl oncogene product. Nature 354, 311-314
- Harvey, K., Duguid, I.C., Alldred, M.J., Beatty, S.E., Ward, H., Keep, N.H., Lingenfelter, S.E., Pearce, B.R., Lundgren, J., Owen, M.J., Smart, T.G., Luscher, B., Rees, M.I. and Harvey, R.J. (2004) The GDP-GTP exchange factor collybistin: an essential determinant of neuronal gephyrin clustering. J. Neurosci. 24, 5816-5826
- Hatten, M.E. (1999) Central nervous system neuronal migration. Annu. Rev. Neuosci. 22, 511-539
- Hoefen, R.J. and Berk, B.C. (2006) The multifunctional GIT familiy of proteins. J.Cell.Sci. 119, 1469-1475
- **Horikawa, H.P., Kneussel, M., El Far, O. and Betz, H. (2002)** Interaction of synaptophysin with the AP-1 adaptor protein γ-adaptin. Mol. Cell. Neurosci. 21, 454–462
- Hu, Q., Wang, L., Yang, Z., Cool, B.H., Zitnik, G. and Martin, G.M. (2005) Endoproteolytic cleavage of FE65 converts the adaptor protein to a potent suppressor of the sAPPalpha pathway in primates. J. Biol. Chem. 280,12548-12558
- Huttelmaier, S., Mayboroda, O., Harbeck, B., Jarchau, T., Jockusch, B.M. and Rudiger, M. (1998) The interaction of the cell-contact proteins VASP and vinculin is regulated by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. Curr. Biol. 23, 479-488.
- Ito, W., Ishiguro, H., and Kurosawa, Y. (1991) A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. Gene 102, 67-70
- Jalink, K., van Corven, E.J., Hengeveld, T., Morii, N., Narumiya, S. and Moolenaar, W.H. (1994) Inhibition of Iysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho J. Cell Biol. 126, 801-810
- Katoh, H., Aoki, J., Ichikawa, A. and Negishi, M. (1998) p160 RhoA-binding Kinase ROKalpha Induces Neurite Retraction J. Biol. Chem. 273, 2489–2492
- Kesavapany, S., Banner, S.J., Lau, K.F., Shaw, C.E., Miller, C.C., Cooper, J.D., and McLoughlin, D.M. (2002) Expression of the Fe65 adapter protein in adult and developing mouse brain. Neuroscience 115, 951–960
- Kim, M.H., Hersh, L.B. (2004) The vesicular acetylcholine transporter interacts with clathrinassociated adaptor complexes AP-1 and AP-2. J Biol Chem., 279, 12580–12587
- Kirchhausen, T. (2000) Clathrin. Annu. Rev. Biochem. 69, 699-727
- Kobayashi, M., Nagata, S., Kita, Y., Nakatsu, N., Ihara, S., Kaibuchi, K., Kuroda, S., Ui, M., Iba, H., Konishi, H., Kikkawa, U., Saitoh, I. and Fukui, Y. (1997) Expression of a constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase induces process formation in rat PC12 cells. J. Biol. Chem. 272, 16089–16092

- Koh, C.G., Manser, E., Zhao, Z.S., Ng, C.P. and Lim, L. (2001) Beta1PIX, the PAK-interacting exchange factor, requires localization via a coiled-coil region to promote microvillus-like structures and membrane ruffles. J. Cell. Sci. 114, 4239-4251
- Koh, C.G., Tan, E.J., Manser, E. and Lim, L. (2002) The p21-activated kinase PAK is negatively regulated by POPX1 and POPX2, a pair of serine/threonine phosphatases of the PP2C familiy. Curr. Biol. 12, 317-321
- Kohn, M., Steinbach, P., Hameister, H. and Kehrer-Sawatzki, H. (2004) A comparative expression analysis of four MRX genes regulating intracellular signalling via small GTPases. Eur. J. Hum. Genet. 12, 29-37.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. and Lim, L. (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. Mol. Cell. Biol. 15, 1942-1952.
- Krause, M., Dent, E.W., Bear, J.E., Loureiro, J.J. and Gertler, F.B. (2003) Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. Annu. Rev. Cell. Dev. 19, 541-564
- Krugmann, S., Jordens, I., Gevaert, K., Driessens, M., Vandekerckhove, J. and Hall, A. (2001) Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. Curr. Biol. 11, 1645-1655
- **Kuchenbecker, K. (2006)** Expressionsanalyse des murinen αPix/Arhgef6-Proteins und funktionelle Charakterisierung der αPix/Arhgef6 -Knockout-Maus. Dissertation Universität Hamburg
- Kutsche, K., Yntema, H., Brandt, A., Jantke, I., Noth wang, H.G., Orth, U., Boavida, M.G., David, D., Chelly, J., Fryns, J.P., Moraine, C., Ropers, H.H., Hamel, B.C., van Bokhoven, H. and Gal, A. (2000) Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. Nat. Genet. 26, 247-250
- Kutsche, K. and Gal, A. (2001) The mouse Arhgef6 gene: cDNA sequence, expression analysis, and chromosome assignment. Cytogenet. Cell. Genet. 95, 196-201
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685
- Lamoureux, P., Altun-Gultekin, Z.F., Lin, C., Wagner, J.A., and Heidemann, S.R. (1997) Rac is required for growth cone function but not neurite assembly. J. Cell Sci. 110, 635-641
- Lemmon, M.A. and Ferguson, K.M. (2000) Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. Biochem. J. 350, 1-18
- Li, Z., Hannigan, M., Mo, Z., Liu, B., Lu, W., Wu, Y., Smrcka, A.V., Wu, G., Li, L., Liu, M., Huang, C.K. and Wu, D. (2003) Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42 Cell 114, 215-227
- Longo, O., Lamberti, A., Zambrano, N. and Arcari, P. (2003) A long acidic domain affects the chromatographic behaviour of a neuronal adaptor protein on DEAE-Sepharose. Biosci. Biotechnol. Biochem. 9, 2048-2050
- Luo, L., Jan, L. and Jan, Y.N. (1996) Small GTPases in axon outgrowth. Perspect. Dev. Neurobiol. 4, 199-204
- Luo, L. (2000) RhoGTPAses in neuronal morphogenesis. Nat. Rev. Neurosci. 1, 173-180

- Manabe, R., Kovalenko, M., Webb, D.J. and Horwitz, A.R. (2002) GIT1 functions in a motile, multi-molecular signalling complex that regulates protrusive activity and cell migration. J. Cell Sci. 115, 1497–1510
- Manser, E., Loo, T.H., Zhao, Z.S., Leung, T., Michael, G. and Lim, L. (1994) A brain serine/threonine protein activated by Cdc42 and Rac1. Nature 367, 40-46
- Manser, E., Huang, H.Y., Loo, T.H., Chen, X.Q., Dong, J.M., Leung, T. and Lim, L. (1997) Expression of constitutively active α-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. Mol. Cell. Biol. 17, 1129-1143
- Manser, E., Chong, C., Koh, C.G., Zhao, Z.S., Chen, X.Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T. and Lim, L. (1998) PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. Mol. Cell 1, 183–192
- Matafora, V., Paris, S., Dariozzi, S. and de Curtis, I. (2001) Molecular mechanisms regulating the subcellular localization of p95-APP1 between the endosomal recycling compartment and ites of actin organization at the cell surface. J. Cell Sci. 114, 4509–4520
- Merrifield, C.J., Moss, S.E., Ballestrem, C., Imhof, B.A., Giese, G., Wunderlich, I., and Almers, W. (1999) Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. Nat. Cell Biol. 1, 72-74
- Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S. and Takenawa, T. (2000) IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. Nature 408, 732-735
- Minopoli, G., de Candia, P., Bonetti, A., Faraonio, R., Zambrano, N. and Russo T. (2001) The beta-amyloid precursor protein functions as a cytosolic anchoring site that prevents Fe65 nuclear translocation. J. Biol. Chem. 276, 6545-6550
- Mishima, W., Suzuki, A., Yamaji, S., Yoshimi, R., Ueda, A., Kaneko, T., Tanaka, J., Miwa, Y., Ohno, S. and Ishigatsubo, Y (2004) The first CH domain of affixin activates Cdc42 and Rac1 through alphaPIX, a Cdc42/Rac1-specific guanine nucleotide exchange factor. Genes Cells 9, 193-204
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155, 335-350
- Nakagawa, T., Setou, M., Seog, D., Ogasawara, K., Dohmae, N., Takio, K., and Hirokawa,
 N. (2000) A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex. Cell 103, 569–581
- Nakatsu, F. and Ohno, H. (2003) Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. Cell. Struct. Funct. 28, 419-429.
- Nakayama, A.Y., Harms, M.B. and Luo, L. (2000) Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. J. Neurosci. 20, 5329-5338
- Newey, S.E., Velamoor, V., Govek, E.E. and Van Aelst, L. (2005) Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. J. Neurobiol. 64, 58-74
- Nobes, C.D. and Hall, A. (1995) Rho, Rac and Cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. Biochem. Soc. Trans. 23, 456-459
- Obermeier, A., Ahmed, S., Manser, E., Yen, S.C., Hall, C. and Lim, L. (1998) PAK promotes morphological changes by acting upstream of Rac. EMBO J. 17, 4328-4339
- Ohno, H. (2006) Clathrin-associated adaptor protein complexes. J. Cell Sci. 119, 3719-3721

- Owen, D.J., Collins, B.M. and Evans, P.R. (2004) Adaptors for clathrin coats: structure and function. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 20, 153-191
- Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein secretion. Science 189, 347-358
- Park, E., Na, M., Choi, J., Kim, S., Lee, J.R., Yoon, J., Park, D., Sheng, M. and Kim, E. (2003) The Shank family of postsynaptic density proteins interacts with and promotes synaptic accumulation of the beta PIX guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42. J. Biol. Chem. 278, 19220-19229
- Pasteris, N.G., Cadle, A., Logie, I.J., Porteus, M.E., Schwartz, C.E., Stevenson, R.E., Glover, T.W., Wilroy, R.S. and Gorski J.L. (1994) Isolation and charakterisation of the faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott-syndrome) gene: a putative Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor. Cell 79, 669-678
- Pilpel, Y. and Segal, M. (2004) Activation of PKC induces rapid morphological plasticity in dendrites of hippocampal neurons via Rac and Rho-dependent mechanisms. Eur. J. Neurosci. 19, 3151-3164
- Premont, R.T., Claing, A., Vitale, N., Perry, S.J. and Lefkowitz, R.J. (2000) The GIT family of ADP-ribosylation factor GTPase-activating proteins. Functional diversity of GIT2 through alternative splicing. J. Biol. Chem. 275, 22373–22380
- **Raffioni, S. and Bradshaw, R.A.(1992)** Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, and nerve growth factor in PC12 pheochromocytoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9121-9125
- Rebecci, M.J. and Scarlata, S. (1998) Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. Biophys. Biomol. Struct. 27, 503-528
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. and Hall, A. (1992a) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. Cell 70, 389-399
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. and Hall, A. (1992b) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. Cell 70, 401-410
- Ridley, A.J. (2001a) Rho family proteins: coordinating cell responses. Trends Cell Biol. 11, 471-477
- Ridley, A.J. (2001b) Rho proteins: Linking signalling with membrane trafficking. Traffic 2, 303-309
- Robinson, M.S. (2004) Adaptable adaptors for coated vesicles. Trends Cell. Biol. 14, 167-174
- **Ropers, H.H. (2006)** X-linked mental retardation: many genes for complex disorders. Curr. Opin. Genet. Dev. 16, 260-269
- Rosenberger, G. (2003)Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von neuenInteraktionspartnerndeshumanenGuanin-Nukleotid-AustauschfaktorsARHGEF6/αPIX. Dissertation Universität Hamburg
- Rosenberger, G., Jantke, I., Gal, A. and Kutsche, K. (2003) Interaction of alphaPIX (ARHGEF6) with beta-parvin (PARVB) suggests an involvement of alphaPIX in integrinmediated signaling. Hum. Mol. Genet. 12, 155-167

- Rosenberger, G., Gal, A. and Kutsche, K. (2005) AlphaPIX associates with calpain 4, the small subunit of calpain, and has a dual role in integrin-mediated cell spreading. J. Biol. Chem. 280, 6879-6889.
- Rosenberger, G., Kutsche, K. (2006) alphaPIX and betaPIX and their role in focal adhesion formation. Eur. J. Cell Biol. 85, 265-274
- Rossman, K.L., Der, C.J. and Sondek, J. (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 6,167-180
- Rottner, K., Hall, A. and Small, J.V., (1999) Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. Curr. Biol. 9, 640-648
- Rozelle, A.L., Machesky, L.M., Yamamoto, M., Driessens, M.H., Insall, R.H., Roth, M.G., Luby-Phelps, K., Marriott, G., Hall, A., and Yin, H.L. (2000) Phosphatidylinositol 4,5bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. Curr. Biol. 10, 311-320
- Sabo, S.L., Ikin, A.F., Buxbaum, J.D. and Greengard, P. (2001) The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. J. Cell Biol. 153, 1403-1414
- Sabo, S.L., Ikin, A.F., Buxbaum, J.D. and Greengard, P. (2003) The amyloid precursor protein and its regulatory protein, FE65, in growth cones and synapses in vitro and in vivo. J. Neurosci. 23, 5407-5415
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sc.i USA 74, 5463-5467
- Sato, K. and Kawashima, S. (2001) Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. Biol. Chem. 382, 743–751
- Schiller, M.R., Chakrabarti, K., King, F.G., Schiller, N.I., Eipper, B.A. and Maciejewski, M.W. (2006) Regulation of RhoGEF activity by intramolecular and intermolecular SH3 domain interactions. J. Biol. Chem. 281, 18774-18786
- Schmidt, A. and Hall, A. (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. Genes Dev. 16, 1587-1609
- Schmidt, M.H.H., Husnjak, K., Szymkiewicz, I., Haglund, K, and Dikic, I. (2006) Cbl excapes Cdc42-mediated inhibition by downregulation of the adaptor molecule βPIX. Oncogene 25, 3071-3078
- Schönwälder, S.M. and Burridge, K. (1999) Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. Curr. Opin. Cell. Biol. 11, 274-286
- Sells, M.A., Knaus, U.G., Bagrodia, S., Ambrose, D.M., Bockoch, G.M. and Chernoff, J. (1997) Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. Curr. Biol. 7, 202-210
- Sepulveda, J.L. and Wu, C. (2006) The parvins. Cell. Mol. Life Sci. 63, 25-35
- Shin, E.Y., Shin, K.S., Lee, C.S., Woo, K.N., Quan, S.H., Soung, N.K., Kim, Y.G., Cha, C.I., Kim, S.R., Park, D., Bokoch, G.M. and Kim, E.G. (2002) Phosphorylation of p85 beta PIX, a Rac/Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor, via the Ras/ERK/PAK2 pathway is required for basic fibroblast growth factor-induced neurite outgrowth. J. Biol. Chem. 277, 44417-44430

- Shin, E.Y., Woo, K.N., Lee, C.S., Koo, S.H., Kim, Y.G., Kim, W.J., Bae, C.D., Chang, S.I. and Kim, E.G. (2004) Basic fibroblast growth factor stimulates activation of Rac1 through a p85 betaPIX phosphorylation-dependent pathway. J. Biol. Chem. 279, 1994-2004
- Shin, E.Y, Lee, C.S., Cho, T.G., Kim, Y.G., Song, S., Juhnn, Y.S., Park, S.C., Manser, E. and Kim, E.G. (2006) betaPak-interacting exchange factor-mediated Rac1 activation requires smgGDS guanine nucleotide exchange factor in basic fibroblast growth factorinduced neurite outgrowth. J. Biol. Chem. 281, 35954-35964
- Smith, H.O. and Birnstiel, M.L. (1976) A simple method for DNA restriction site mapping. Nucleic Acids Res. 3, 2387-2398
- Spector, D.L. (2001) Nuclear domains. J. Cell Sci. 114, 2891-2893
- Stofega, M.R., Sanders, L.C., Gardiner, E.M. and Bokoch, G.M., (2004) Constitutive p21activated kinase (PAK) activation in breast cancer cells as a result of mislocalization of PAK to focal adhesions. Mol. Biol. Cell 15, 2965–2977
- Symons, M. and Settleman, J. (2000) Rho family GTPases: more than simple switches. Trends Cell Biol. 10, 415-419
- Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki ,T. (2001) Small GTP-binding proteins. Physiol. Rev. 81, 153-208
- Tarpey, P. S., Stevens, C., Teague, J., Edkins, S., O'Meara, S, Avis, T. et al. (2006) Mutations in the Gene Encoding the Sigma 2 Subunit of the Adaptor Protein 1 Complex, AP1S2, Cause X-Linked Mental Retardation. Am. J. Hum. Genet. 79, 1119-1125
- Taru, H., Iijima, K., Hase, M., Kirino, Y., Yagi, Y., and Suzuki, T. (2002) Interaction of Alzheimer's beta -amyloid precursor family proteins with scaffold proteins of the JNK signaling cascade J. Biol. Chem. 277, 20070-20078
- Tashiro, A. and Yuste, R. (2004) Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: evidence for two forms of spine motility. Mol. Cell. Neurosci. 26, 429-440
- ten Klooster, J.P., Jaffer, Z.M., Chernoff, J. and Hordijk, P. (2006) Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor ß-Pix. J. Cell Biol. 172, 759-769
- Terpe, K. (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60, 523–533
- Thien, C.B.F. and Langdon, W.Y. (2005) c-Cbl and Cbl-b ubiquitin ligases: substrat diversity and the negative regulation of signalling responses. Biochem. J. 391, 153-166
- Turner, C.E., Brown, M.C., Perrotta, J.A., Riedy, M.C., Nikolopoulos, S.N., Mc Donald, A.R., Bagrodia, S., Thomas, S. and Leventhal, P.S. (1999) Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. J. Cell Biol. 145, 851-863
- Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. (1997) Rho GTPases and signaling networks. Genes Dev. 11, 2295-2322.
- von Rotz, R.C., Kohli, B.M., Bosset, J., Meier, M., Suzuki, T., Nitsch, R.M. and Konietzko,
 U. (2004) The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. J. Cell Sci. 117, 4435-4448
- Wang, B., Hu, Q., Hearn, M.G., Shimizu, K., Ware, C.B., Liggit, D.H., Jin, L.W., Cool, B.H., Storm, D.R. and Martin, G.M. (2004) Isoform-specific knockout of FE65 leads to impaired learning and memory. J. Neurosci. Res. 75, 12-24

- Welch, M.D., Mallavarapu, A., Rosenblatt, J. and Mitchison, T.J. (1997) Actin dynamics in vivo. Curr. Opin. Cell. Biol. 9, 54-61
- Wu, W.J., Tu, S. and Cerione, R.A. (2003) Activated Cdc42 sequesters c-Cbl and prevents EGF receptor degradation. Cell 114, 715–725
- Yasui, H., Katoh, H., Yamaguchi, Y., Aoki, J., Fujita, H., Mori, K. and Negishi M. (2001) Differential responses to nerve growth factor and epidermal growth factor in neurite outgrowth of PC12 cells are determined by Rac1 activation systems. J. Biol. Chem. 276, 15298-15305
- Yoshii, S., Tanaka, M., Otsuki, Y., Wang, D.Y., Guo, R.J., , Y., Takeda, R., Hanai, H., Kaneko, E. and Sugimura, H. (1999) aPIX nucleotide exchange factor is activated by interaction with phosphatidylinositol 3-kinase. Oncogene 18, 5680–5690
- Za, L., Albertinazzi, C., Paris, S., Gagliani, M., Tacchetti, C. and de Curtis, I. (2006) {beta}PIX controls cell motility and neurite extension by regulating the distribution of GIT1. J. Cell Sci. 119, 2654-2666
- Zhang, H., Webb, D.J., Asmussen, H. and Horwitz, A.F. (2003) Synapse formation is regulated by the signaling adaptor GIT1. J. Cell Biol. 161, 131-142
- Zhang, H., Webb, D.J., Asmussen, H., Niu, S. and Horwitz, A.F. (2005) A GIT1/PIX/Rac/PAK signalling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. J. Neurosci. 25, 3379-3388
- Zhao, Z.S., manser, E., Chen, X.Q. Chong, C., Leung, T. and Lim, L. (1998) A conserved negative regulatory region in αPAK: Inhibition of PAK kinases reveals their morphological roles downstream of Cdc42 and Rac1. Mol. Cell. Biol. 18, 2153-2163
- Zhao, Z.S., Manser, E., Loo, T.H. and Lim, L. (2000) Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. Mol. Cell. Biol. 20, 6354–6363

Poster mit Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit wurden auf folgendem Kongress präsentiert:

Hertweck, V., Rosenberger, G. and Kutsche, K. Identification of FE65 as a novel binding partner of α PIX suggests a role of α PIX in neuronal development. Adhesion Meeting "Podosomes, Invadopodia, Focal Adhesions", April 2005, München
Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. Kerstin Kutsche für die engagierte und qualifizierte Betreuung dieser Arbeit sowie die fachlichen Diskussionen und Ratschläge, vor allem zum Ende dieser Arbeit, bedanken. Weiterhin bedanke ich mich für die schnelle und kritische Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Andreas Gal danke ich für das stete Interesse an dieser Arbeit, seine hilfreiche Unterstützung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Humangenetik. Des Weiteren danke ich für die schnelle Korrektur und Begutachtung dieser Dissertation.

Bei Frau Prof. Dr. Susanne Dobler bedanke ich mich für das Interesse an dieser Arbeit und die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Michaela Schweizer sei für die freundliche und geduldige Hilfestellung bei allen Fragen zur Konfokalmikroskopie gedankt.

Ein besonderes Dankeschön geht an Steffi Gottschalk, für die tatkräftige und hervorragende praktische Unterstützung, vor allem in der Zellkultur in der Endphase dieser Arbeit, sowie für die vielen Kleinigkeiten und ihre Freundschaft. Inka Jantke danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei den Klonierungen.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kutsche möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft bedanken, insbesondere bei Ben für die harmonische Zeit im Labor. Der "Küchencrew" danke ich für so viele fröhliche Mittagspausen und allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Instituts danke ich für die Freundlichkeit mit gegenüber.

"Dankeschön" Alex – für deine Freundschaft, den Unterschlupf und die vielen lieben Aufmerksamkeiten. Ich bin froh, Dich getroffen zu haben! Nina, es tat mir gut, Dich in meiner Nähe zu wissen und die "Miracoli-Abende" mit Dir werden mir sehr fehlen....

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden in Hamburg und weit entfernt, die mich immer unterstützt und zahlreich im hohen Norden besucht haben.

Das größte "Dankeschön" geht an Matze, dessen Nerven oft strapaziert wurden und der mich des Öfteren auf den Boden der Tatsachen zurückholen musste. Er hat mir während der ganzen Zeit immer wieder soviel Kraft gegeben und es dabei immer geschafft, mich zum Lachen zu bringen......j.ä.d.!