

**Analyse der Funktion des humanen
Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors α PIX bei der
Regulation des EGF-Rezeptor-Traffickings**

DISSERTATION

Zur Erlangung der Würde des
„Doktors der Naturwissenschaften“
des Fachbereichs Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

vorgelegt von
Fanny Kortüm
aus Bergen (Rügen)

Hamburg 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Prof. Dr. K. KUTSCHE
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Priv.-Doz. Dr. L. LÜTHJE
Tag der Disputation: 28. Januar 2011

Hamburg, den 13. Januar 2011



A. Temming
Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Fachbereichs Biologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

I.	Zusammenfassung	1
II.	Einleitung.....	3
1.	Die Rezeptor-Tyrosinkinasen	3
1.1	Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-Rezeptor).....	3
1.1.1	Das EGF-Rezeptor-Trafficking.....	3
1.1.2	EGF-Rezeptor-induzierte Signaltransduktion	6
2.	Das Ubiquitin-System und die Cbl-Proteine	7
3.	Die Rho-GTPasen	8
3.1	Die Rho-GTPasen Rac und Cdc42 spielen bei der Regulation von endozytischen Prozessen eine wichtige Rolle.....	9
4.	Die Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren α PIX und β PIX.....	10
4.1	Domänenstruktur der PIX-Proteine.....	11
4.2	Die Regulation der PIX-Proteine und die PIX-vermittelte Signalweiterleitung	12
4.3	Die Interaktion zwischen β PIX und Cbl reguliert die EGF-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion	13
5.	Ziel der Arbeit	14
III.	Material & Methoden	15
1.	Material.....	15
1.1	Chemikalien und Lösungsmittel.....	15
1.2	Kits, Enzyme, Nukleotide und Standards	16
1.3	Medien und Zusätze	17
1.3.1	Medien und Zusätze für molekularbiologische Arbeiten	17
1.3.2	Medien und Zusätze für zellbiologische Arbeiten	18
1.4	Puffer und Lösungen	18
1.4.1	Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten	18
1.4.2	Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten	19
1.4.3	Puffer und Lösungen für zellbiologische Arbeiten.....	20
1.5	Bakterienstämme und Zelllinien.....	22
1.6	Plasmide	23
1.6.1	Zur Verfügung gestellte Konstrukte	23
1.6.2	Ausgangsvektoren für die Herstellung neuer Konstrukte.....	23
1.6.3	Hergestellte Konstrukte.....	24

1.7	Oligonukleotide	25
1.7.1	Oligonukleotide für Klonierungen	25
1.7.2	Oligonukleotide für Sequenzierungen	26
1.8	Antikörper	27
1.8.1	Primärantikörper	27
1.8.2	Sekundärantikörper	28
1.9	Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien	28
2.	Molekularbiologische Methoden	29
2.1	Anzucht von Bakterien	29
2.2	Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> für die Transformation	29
2.3	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA	29
2.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	30
2.4.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	30
2.4.2	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	30
2.5	Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA	30
2.6	Dephosphorylierung von 5'-Phosphat-DNA-Enden	31
2.7	Ligation von DNA	31
2.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und PCR-vermittelte Mutagenese	31
2.9	Agarosegelelektrophorese	32
2.10	Aufreinigung von PCR- und Restriktionsprodukten	33
2.11	DNA-Sequenzierung	33
2.12	Klonierung mittels TOPO [®] Cloning-Technologie	33
2.13	Klonierung mittels GATEWAY [™] -Technologie	33
2.14	Quantifizierung von DNA mittels photometrischer Analyse	34
3.	Proteinbiochemische Methoden	34
3.1	Herstellung von Proteinlysaten aus Rattenhirn	34
3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	34
3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Test	35
3.4	Western-Blot	36
3.5	Immunologische Detektion auf PVDF-Membranen immobilisierter Proteine	36
3.6	Koimmunpräzipitation	37
4.	Zellbiologische Methoden	39
4.1	Zellkultur	39
4.1.1	Allgemeine Kulturbedingungen	39
4.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	39
4.1.3	Passagieren von Zellen	39
4.1.4	Poly-L-Lysin-Beschichtung von Glasdeckgläschen	40

4.1.5	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	40
4.1.6	Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen mit dem Flp-In™ System.....	41
4.2	Immunfluoreszenz-Analysen	42
4.3	Biotinylierungsassays	43
4.3.1	Biotinylierung und Detektion von zelloberflächenständigen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGF-Rezeptor)	43
4.3.2	Biotinylierung von zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren und Quantifizierung der EGF-Rezeptor-Endozytose	44
4.3.3	Biotinylierung von zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren und Quantifizierung des EGF-Rezeptors-Recyclings	45
4.3.4	Biotinylierung der zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren von degradierungs-inhibierten Zellen und Quantifizierung der EGF-Rezeptor- Recyclings	46
IV.	Ergebnisse.....	48
1.	Untersuchung der α PIX-Expression in verschiedenen Zelllinien mittels Western-Blot- Analyse	48
2.	Identifizierung von c-Cbl als Interaktionspartner von α PIX und Bestimmung der dafür essentiellen Proteinmotive und Aminosäuren.....	49
2.1	Koimmunpräzipitation von endogenem α PIX mit endogenem c-Cbl aus der humanen Neuroglia-Zelllinie H4	49
2.2	Koimmunpräzipitation von endogenem α PIX und endogenem c-Cbl aus Rattenhirnlysaten.....	50
2.3	Identifizierung der α PIX-Bindedomäne für c-Cbl mithilfe von Koimmunpräzipitationen	52
2.4	Identifizierung der für die α PIX::c-Cbl-Assoziation essentiellen Aminosäuren ...	54
2.5	Zellbiologische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von α PIX und c- Cbl	56
2.5.1	Analyse der subzellulären Lokalisation von HA- α PIX ^{WT} und c-Cbl ^{WT} sowie von HA- α PIX ^{W197K} , c-Cbl ^{R829A} und c-Cbl ^{C381A} in COS-7-Zellen	57
2.5.1	Analyse der subzellulären Lokalisation von endogenem α PIX und endogenem c-Cbl und deren Koloalokalisation.....	58
2.6	Biochemische Untersuchungen der Komplexbildung zwischen α PIX und c-Cbl und dessen Abhängigkeit vom epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)	60
2.6.1	Analyse der α PIX::c-Cbl-Assoziation in Abhängigkeit von der Dauer der EGF-Stimulation	60

2.6.2	Analyse der α PIX::c-Cbl-Assoziation in Abhängigkeit von der EGF-Konzentration	61
3.	Untersuchungen zur Funktion des α PIX::c-Cbl-Komplexes für den zellulären Proteinumsatz.....	62
3.1	Untersuchungen zum Proteinabbau von endogenem α PIX und endogenem c-Cbl nach EGF-Stimulation	62
3.1.1	Untersuchung eines von c-Cbl abhängigen Abbaus von α PIX.....	63
3.1.2	Untersuchung zum Proteinabbau von α PIX und c-Cbl in Abhängigkeit von der α PIX::c-Cbl-Assoziation	64
3.2	Untersuchungen zur Ubiquitylierung von α PIX durch die Ubiquitin-E3-Ligase c-Cbl	65
3.2.1	Untersuchung der α PIX-Ubiquitylierung mittels Immunpräzipitationen und Western-Blot-Analyse.....	66
3.2.2	Verifizierung der α PIX-Ubiquitylierung mittels Immunpräzipitation und Western-Blot-Analyse.....	67
4.	Die Rolle von α PIX bei der Regulation des EGF-Rezeptor-Traffickings.....	68
4.1	Immunzytochemische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von endogenem EGF-Rezeptor und endogenem α PIX	69
4.2	Einfluss der α PIX-Überexpression auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose von Fluoreszenz-markiertem epidermalem Wachstumsfaktor	70
4.3	Untersuchung der EGF-Rezeptor-Internalisierung in stabil α PIX ^{WT} -exprimierenden CHO-K1-Zellen mittels Rezeptor-Biotinylierungsassays.....	73
4.3.1	Auswirkungen der stabilen Expression verschiedener α PIX-Proteinvarianten auf die EGF-Rezeptor-Internalisierung.....	75
4.4	Bestimmung der Menge an EGF-Rezeptoren an der Zelloberfläche von stabil α PIX ^{WT} -exprimierenden CHO-K1-Zellen.....	76
4.5	Verifizierung des veränderten EGF-Rezeptor-Recyclings in α PIX ^{WT} -CHO-Zellen mithilfe von Recycling-Biotinylierungsassays	78
4.5.1	Untersuchung zum EGF-Rezeptor-Abbau in CAT- und α PIX ^{WT} -CHO-Zellen bei gleichzeitiger Inhibierung des EGF-Rezeptor-Recyclings	79
4.6	Untersuchungen zum EGF-Rezeptor-Recycling in CAT- und α PIX ^{WT} -CHO-Zellen bei gleichzeitiger Inhibierung des lysosomalen Proteinabbauweges.....	81
5.	Immunzytochemische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von endozytiertem EGF in CAT- und α PIX ^{WT} -CHO-Zellen.....	83
5.1	Untersuchung der Lokalisation von EGF in frühen Endosomen von CAT- und α PIX ^{WT} -CHO-Zellen	83

5.2	Untersuchung der Lokalisation von EGF in Rab7-positiven Zellkompartimenten von CAT- und α PIX ^{WT} -CHO-Zellen.....	85
5.3	Untersuchung der Lokalisation von EGF in Rab11-positiven Zellkompartimenten von CAT- und α PIX ^{WT} -CHO-Zellen.....	87
6.	Aktivierung der AKT-Kinase nach EGF-Stimulation in CAT-, α PIX ^{WT} -, α PIX ^{W197K} - und α PIX ^{GEF} -CHO-Zellen	89
V.	Diskussion.....	91
1.	Die EGF-stimulierte Interaktion von α PIX und c-Cbl beeinflusst wichtige zelluläre Prozesse wie EGF-Rezeptor-Degradierung und PI3-Kinase-vermittelte Signaltransduktion	91
2.	α PIX stimuliert, vermutlich in Abhängigkeit von der GEF-Aktivität, das EGF-Rezeptor-Recycling	97
VI.	Literaturverzeichnis	102
	Posterpräsentation.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
αPIX	<i>αPAK interacting exchange factor</i>
βPIX	<i>βPAK interacting exchange factor</i>
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
AP-2	Adaptorprotein-2
Arf	ADP-Ribosylierungsfaktor
ARHGEF6	<i>alpha rho guanine nucleotide exchange factor 6</i>
ARHGEF7	<i>alpha rho guanine nucleotide exchange factor 7</i>
AS	Aminosäure(n)
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
Bp	Basenpaare
Cbl	<i>Casitas B-lineage lymphoma</i>
CC	<i>coiled-coil</i> (Proteindomäne)
cDNA	<i>copy</i> -Desoxyribonukleinsäure
Cdc42	cell division cycle 42
CH	<i>calponin homology</i> (Proteindomäne)
CHO-K1	Adhärente Fibroblasten aus dem Ovarium des Chinesischen Hamsters
COS-7	Fibroblasten-ähnliche Nierenzellen (afrikanische grüne Meerkatze)
Cool-1/2	<i>cloned out of library-1/2</i>
C-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins
Dbl	<i>diffus B-cell lymphoma</i>
DH	<i>Dbl homology</i> (Proteindomäne)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Zellkulturmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP, ddNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat, Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EEA1	early endosome antigen-1
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (und Andere)
F12	Zellkulturmedium
F-Aktin	filamentöses Aktin
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
g, mg, μg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
G	Guanin
GAP	<i>GTPase activating protein</i> (GTPase-aktivierendes Protein)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3'-phosphat-Dehydrogenase
GBD	<i>Git1-binding domain</i> (Proteindomäne)
GDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i> (GTPase-bindendes Protein)
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GEF-	GEF-defizient (αPIX-Protein mit Aminosäureaustausche L386R/L387S)
GIT1	<i>G protein coupled receptor-kinase interactor1</i>
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	GDP/GTP-bindendes Protein mit GTPase-Aktivität
H4	Neuroglia-Zelllinie
h	<i>hour</i> , Stunde
HEK-293	humane embryonale Nierenzelllinie
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> (Chromatographieverfahren)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IF	Immunfluoreszenz

Kb	Kilobasen
KDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria-Broth-Medium
cm, mm, µm, nm	Centimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
mA	Milliampere
M	Mol
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
min	Minute
mol, mmol, nmol	Mol, Millimol, Nanomol
NP40	nichtionisches Detergenz P40
N-Terminus	Aminoterminus eines Proteins
OD	Optische Dichte
p21	GTPase-Protein mit ca. 21 kDa Molekulargewicht
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	<i>p21 activated kinase</i>
PCR	polymerase chain reaction
PBS	phosphate buffered saline
PH	<i>pleckstrin homology</i> (Proteindomäne)
PI3K	Phosphatidylinositol-3'-Kinase
PKPFPR	Proteinbindemotif in c-Cbl
ProR	<i>proline rich</i> (Proteindomäne)
PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
Rac	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
Rho	<i>Ras homologous member</i>
RPMI	Zellkulturmedium
RSID	<i>Rac-specific interaction domain</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s	Sekunde
SAP	<i>SLAM (signaling lymphocyte activation molecule)-associated protein</i>
SBP	Streptavidin-Biotin-Präzipitation
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SH3	<i>Src homology</i> (Proteindomäne)
Tab.	Tabelle
TKB	<i>tyrosine kinase binding</i> (Proteindomäne)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Ub	Ubiquitin
U	Units
UBA/LZ	<i>ubiquitin-associated/leucine zipper</i> (Proteindomäne)
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i>
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
XLMR/NS-XLMR	<i>X-linked mental retardation / non-syndromic X-linked mental retardation</i>

Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren:

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

I. Zusammenfassung

Mutationen im *ARHGEF6*-Gen verursachen eine Form der X-chromosomal vererbten, unspezifischen geistigen Behinderung (XLMR) beim Menschen. Bei der XLMR handelt es sich um eine sehr heterogene Erkrankung, für die bis heute mehr als 80 Krankheitsgene identifiziert wurden. Dementsprechend mannigfaltig sind auch die Funktionen der von diesen Genen kodierten Proteine. Einige davon sind in die Regulation des vesikulären Transports (Vesikel-Trafficking) involviert. Vesikel-Trafficking dient mittels membranumschlossener Vesikel dem Transport von Proteinen zwischen unterschiedlichen Zellorganellen sowie zwischen Zellen und ihrer Umgebung. Auch Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie etwa der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-Rezeptor), unterliegen einem kontrollierten intrazellulären Transport: Wachstumsfaktor-Bindung initiiert eine Vesikel-abhängige Internalisierung (Endozytose) des EGF-Rezeptors, worauf dieser entweder wieder an die Zelloberfläche zurücktransportiert (Recycling) oder in Lysosomen abgebaut (Degradierung) wird. Dieses Trafficking bestimmt maßgeblich die Weiterleitung von Signalen ausgehend von aktivierten EGF-Rezeptoren, so dass EGF-Rezeptor-Signaltransduktion und -Trafficking eng miteinander verknüpft sind.

Das XLMR-Gen *ARHGEF6* kodiert für den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) α PIX, ein Protein, das als Modulator der Aktivität von Rho-GTPasen gilt, indem es den Austausch von GDP nach GTP katalysiert. Rho-GTPasen sind kleine molekulare Schalter, die zwischen einem inaktiven, GDP-gebundenen und einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand wechseln können und zu den Schlüsselproteinen bei der Reorganisation des Aktinzytoskeletts zählen. In der vorliegenden Arbeit wird für α PIX erstmalig eine Doppelfunktion bei der Regulation des EGF-Rezeptor-Traffickings beschrieben.

Mittels Protein-Protein-Interaktionsstudien wurde sowohl in neuronalen als auch nicht-neuronalen Zelllinien eine direkte Interaktion von α PIX mit der Ubiquitin-E3-Ligase c-Cbl nachgewiesen. c-Cbl verknüpft das Markerprotein Ubiquitin kovalent an EGF-Rezeptoren und markiert diese somit für den lysosomalen Proteinabbau. Tryptophan 197 in der SH3-Domäne von α PIX und Arginin 829 im PKPFPR-Motiv von c-Cbl wurden als essentielle Aminosäuren für die α PIX::c-Cbl-Interaktion identifiziert. Immunfluoreszenzanalysen an H4-Neurogliazellen ergaben, dass endogenes α PIX nach EGF-Stimulation an die Plasmamembran rekrutiert wird und dort mit c-Cbl und dem EGF-Rezeptor kolokalisiert. Dieser Hinweis auf eine EGF-abhängige Regulation der Assoziation zwischen α PIX und c-Cbl konnte mittels Koimmunpräzipitationen erhärtet werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass es nach EGF-Stimulation zu einer Abnahme der absoluten α PIX- und c-Cbl-Proteinmengen kommt und diese Reduktion von der α PIX::c-Cbl-Interaktion und der Ubiquitin-Ligase-Aktivität von c-Cbl abhängig ist. Gut vereinbar mit dieser Beobachtung ergaben Ubiquitylierungsassays, dass

sowohl α PIX als auch c-Cbl ubiquityliert werden. Aufgrund dieser Daten wird vermutet, dass α PIX im Rahmen des EGF-Rezeptor-Traffickings c-Cbl temporär sequestriert und somit die Ubiquitin-E3-Ligase daran hindert, den EGF-Rezeptor für die Degradierung zu markieren. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits für das α PIX-homologe Protein β PIX vorgeschlagen.

Um die Auswirkungen von α PIX auf das EGF-Rezeptor-Trafficking im Detail zu untersuchen, wurden mit Hilfe des Flp-In-Systems Zelllinien generiert, die α PIX-Wildtyp bzw. mutierte α PIX-Varianten stabil exprimieren. In α PIX-überexprimierenden Zellen konnte mittels Zelloberflächen-Biotinylierungsexperimenten eine um ~65% verminderte EGF-Rezeptor-Degradierung festgestellt werden, die durch die bereits erwähnte α PIX-vermittelte c-Cbl-Sequestrierung erklärt werden könnte. Bemerkenswerterweise wurde jedoch noch ein zweiter, c-Cbl-unabhängiger α PIX-Einfluss auf das EGF-Rezeptor-Trafficking aufgedeckt: α PIX steigert nach EGF-Stimulation das Recycling von internalisierten EGF-Rezeptoren zurück an die Zelloberfläche um das 4-fache, wobei die GEF-Aktivität von α PIX für diesen Effekt entscheidend zu sein scheint. Durch Immunfluoreszenzanalysen konnte in α PIX-überexprimierenden Zellen eine Anreicherung von EGF in Recyclingvesikeln und ein sukzessives Verschwinden von EGF aus dem Zytoplasma bestätigt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass α PIX das Recycling des EGF-Rezeptors verstärkt, indem es als GEF die Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 aktiviert und so zeitlich und örtlich die Reorganisation des Aktinzytoskeletts reguliert. Diese Annahme steht im Einklang mit bereits beschriebenen Funktionen des Aktinzytoskeletts während des vesikulären Transports.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse legen für α PIX eine Rolle als bidirektionaler Schalter während des EGF-Rezeptor-Traffickings nahe: Auf der einen Seite beschleunigt α PIX das EGF-Rezeptor-Recycling, auf der anderen Seite hemmt α PIX den EGF-Rezeptor-Abbau. Diese neuen molekularen Funktionen von α PIX unterstreichen die Bedeutung von intrazellulären Transportmechanismen für eine normale Entwicklung der kognitiven Fähigkeiten beim Menschen.

II. Einleitung

1. Die Rezeptor-Tyrosinkinasen

Eine Vielzahl eukaryotischer Gene kodiert für zellmembranständige Rezeptoren, welche der Zelle die Kommunikation mit Nachbarzellen und die Reaktion auf spezifische Umweltreize ermöglichen. Eine Hauptklasse von Rezeptoren stellen die modulartig aufgebauten Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) dar, die auch als Wachstumsfaktorrezeptoren bezeichnet werden und eine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität aufweisen (Ullrich & Schlessinger, 1990). Die extrazellulären Liganden-Bindedomänen dieser Rezeptoren sind in der Regel mehrfach glykosyliert und über eine in der Membran verankerte helikale Domäne, eine juxtamembrane Regulatorregion mit der zytoplasmatischen Tyrosinkinase-Domäne und schließlich einem carboxyterminalen Bereich verbunden (Lemmon & Schlessinger, 2010). Die Bindung spezifischer Liganden an die extrazelluläre Domäne induziert über eine Rezeptor-Dimerisierung intermolekulare Autophosphorylierungen im carboxyterminalen Bereich und somit die Aktivierung der Rezeptoren. Aktivierte RTKs vermitteln wiederum die reversible Phosphorylierung von zahlreichen Signal- und Adaptorproteinen und aktivieren somit ein komplexes Netzwerk von Signalkaskaden, welche zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose, steuern (Schlessinger, 2000).

Die strukturellen Unterschiede der extrazellulären Domänen der bislang 58 identifizierten RTKs führten zur Klassifizierung von 20 verschiedenen Subfamilien (Lemmon & Schlessinger, 2010). Die zuerst identifizierte und derzeit am besten untersuchte Rezeptor-Tyrosinkinase ist der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-Rezeptor; *epidermal growth factor receptor*, Carpenter *et al.*, 1978). Der EGF-Rezeptor gehört zur RTK-Subfamilie I oder auch ErbB-Familie (Prenzel *et al.*, 2001), deren Mitglieder einen ähnlichen extrazellulären Proteindomänenaufbau aufweisen.

1.1 Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-Rezeptor)

1.1.1 Das EGF-Rezeptor-Trafficking

Der EGF-Rezeptor ist das am besten untersuchte Mitglied der ErbB-Familie und eine der am besten charakterisierten RTKs. Das 170 kDa große Glykoprotein wird von nahezu allen Epithel- und Stromazellen, aber auch von bestimmten Gliazellen exprimiert und ist dort gleichmäßig auf der Zelloberfläche verteilt (Michaelis *et al.*, 2008). Nach Stimulation werden EGF-Rezeptoren wie alle RTKs von der Zelloberfläche mittels Endozytose internalisiert und in der Regel der Degradierung im Lysosom zugeführt (Sorkin & Goh, 2008; Abb. 1). Der EGF-Rezeptor kann dabei abhängig von der EGF-Dosis über zwei verschiedene

Mechanismen internalisiert werden (Sigismund *et al.*, 2005; Abb. 1): Bei Stimulation mit geringen Dosen (≤ 2 ng/ml EGF) wird der Rezeptor ausschließlich über **Clathrin-vermittelte Endozytose (CME, *clathrin-mediated endocytosis*)** internalisiert, bei höheren Dosen (≥ 20 ng/ml EGF) erfolgt die Internalisierung hingegen nur noch zu 60% über CME und zu 40% über **Clathrin-unabhängige Endozytose (NCE, *non-clathrin endocytosis*)** (Sigismund *et al.*, 2005 und 2008). Bei der CME kommt es nach der Rezeptor-Aktivierung zu einer Anreicherung der EGF-Rezeptoren in Clathrin-bedeckten Einstülpungen (**CCPs, *clathrin-coated pits***), welche sich nach weiterer Invagination der Membran als **Clathrin-bedeckte Vesikel (CCV, *clathrin-coated vesicle*)** abschnüren (Waterman & Yarden, 2001). Die Formierung der CCVs ist ein stark regulierter Prozess, welcher die zeitlich und räumlich koordinierte Rekrutierung von Clathrin und verschiedener akzessorischer Proteine erfordert (Conner & Schmid, 2003). Die CCVs werden in der Zelle unter Energieverbrauch entlang von Mikrotubuli und mit Hilfe des Aktinzytoskeletts transportiert. Ein von Aktin abhängiger Vesikeltransport konnte bereits *in vivo* gezeigt werden (Merrifield *et al.*, 1999; Rozelle *et al.*, 2000). Nach der Internalisierung stellt die ATP-abhängige Entfernung der Clathrinhülle von den CCVs eine wichtige Voraussetzung für den weiteren Transport der Vesikel durch den endozytotischen Pathway dar (Rothman & Schmid, 1986; Conner & Schmid, 2003).

Jedes endozytische Kompartiment ist gekennzeichnet durch eine spezielle Ansammlung von Proteinen an der Membran, u.a. der Kompartiment-spezifischen Rab-GTPasen. Clathrin-freie Vesikel fusionieren mit frühen Endosomen, welche durch Anwesenheit der Rab-GTPase **Rab5** gekennzeichnet sind. Ein Großteil der über CME internalisierten EGF-Rezeptoren wird wieder zur Zellmembran zurücktransportiert (**Recycling**) und nur ein kleiner Teil wird in die Lysosomen transportiert und dort degradiert.

Frühe Endosomen sind hoch dynamisch und können sich zu unterschiedlichen Kompartimenten entwickeln: (1) Für einen schnellen Recyclingweg entstehen durch Abschnürung Recyclingvesikel, die durch die Anwesenheit der Rab-GTPasen **Rab4** und **Rab35** gekennzeichnet sind (Sorkin *et al.*, 1991). (2) Frühe Endosomen können durch Abschnürung tubulärer Ausstülpungen das so genannte ERC- (*endocytic recycling compartment*)-Kompartiment bilden, von dem ein langsamer Recyclingweg ausgeht, der durch Abschnürung **Rab11**-positiver Recyclingendosomen (RE) gekennzeichnet ist (Grant & Donaldson, 2009; Maxfield & McGraw, 2004). (3) Durch Reifung entstehen aus frühen Endosomen die **Rab7**-positiven multivesikulären Körperchen (*multivesicular bodies, MVB*; Katzmann *et al.*, 2002; Hurley *et al.*, 2008). Auch von diesem Kompartiment ist noch ein Recycling von EGF-Rezeptoren möglich (Sorkin & Goh, 2008). Da der Ligand EGF nicht merklich vom Rezeptor dissoziiert, kann ein intakter EGF::EGF-Rezeptor-Komplex zur Zellmembran transportiert (Sorkin *et al.*, 1991) und dort erneut internalisiert werden (Abb. 1). Jedoch werden EGF-Rezeptoren, die durch Ubiquitin modifiziert sind (siehe unten), schon in

frühen Endosomen durch die ESCRT- (*endosomal sorting complex required for transport*) Maschinerie erkannt (Slagsvold *et al.*, 2006; Woodman, 2009) und daraufhin durch Invagination in intraluminale Vesikel der gereiften MVBs eingeschlossen (Katzmann *et al.*, 2002; Hurley *et al.*, 2008). EGF-Rezeptoren, welche sich in den Membranen von intraluminalen Vesikeln befinden, können nicht mehr recycelt werden. Durch Fusion mit primären lysosomalen Vesikeln, die proteolytische Enzyme enthalten, entstehen aus den MVBs die Lysosomen, in welchen die ubiquitylierten EGF-Rezeptoren schließlich degradiert werden (Miller *et al.*, 1986; Futter *et al.*, 1996).

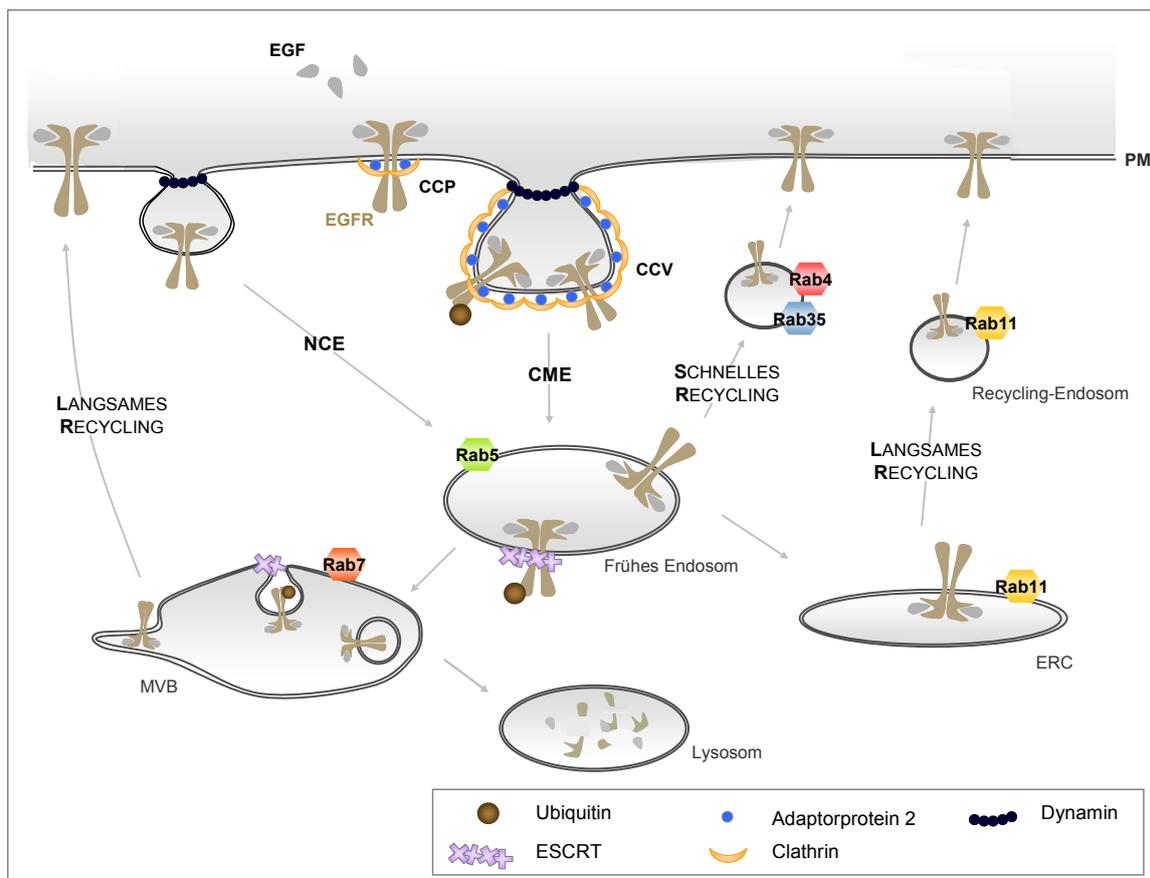


Abb. 1: Modell für das EGF-Rezeptor-Trafficking

Die schematische Darstellung zeigt die endozytotischen Transportwege des EGF-Rezeptors und seines Liganden EGF beginnend mit der Internalisierung des EGF::EGF-Rezeptor-Komplexes über Clathrin-vermittelte Endozytose (CME), ausgehend von *clathrin-coated pits* (CCP), oder Clathrin-unabhängige Endozytose (NCE), welche beide einen Abschnürungsschritt ermöglicht durch Dynamin einschließen. Ubiquitylierte und unmodifizierte Rezeptoren gelangen in Rab5-positive frühe Endosomen. Nicht-ubiquitylierte Rezeptoren im Komplex mit EGF können ausgehend von den frühen Endosomen über einen schnellen Transportweg, mittels Rab4- und Rab35-positiver Vesikel, zur Plasmamembran (PM) recycelt werden. Die frühen Endosomen können sich zu multivesikulären Körperchen (MVBs) oder zum *endocytic recycling compartment* (ERC) entwickeln, von wo jeweils langsame Recyclingwege für unmodifizierte EGF-Rezeptoren ausgehen. Ubiquitylierte EGF-Rezeptoren werden in den frühen Endosomen durch die ESCRT- (*endosomal sorting complex required for transport*) Maschinerie erkannt und gelangen in intraluminale Vesikel der MVBs. Aus MVBs entwickeln sich schließlich Lysosomen, in welchen intraluminal lokalisierte EGF-Rezeptoren degradiert werden.

1.1.2 EGF-Rezeptor-induzierte Signaltransduktion

Nach Liganden-induzierter Dimerisierung und Phosphorylierung der EGF-Rezeptoren wird ein Signal in ein komplexes Netzwerk von Signalkaskaden eingespeist (Abb. 2), was eine hohe Diversifizierung der Signalübertragung ermöglicht. Die Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors führt zur Rekrutierung von spezifischen Enzymen und Adaptormolekülen, welche zur Aktivierung mitogener und anti-apoptotischer Signalwege, wie dem *Mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase-Signalweg, den Phospholipase C γ -Kaskaden sowie dem Phosphatidylinositol-3'-Kinase- (PI3K)-AKT-Signalweg beitragen (Yarden & Sliwkowski, 2001).

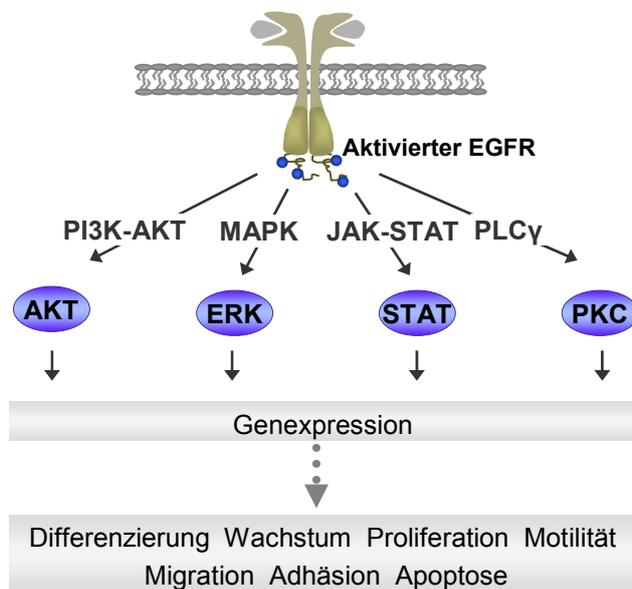


Abb. 2: EGF-Rezeptor-induzierte Signalwege

Die Bindung von Liganden an den EGF-Rezeptor resultiert in dessen Dimerisierung und Autophosphorylierung (•). Diese Aktivierung des Rezeptors führt zur Rekrutierung verschiedener Effektorproteine aus unterschiedlichen, meist mitogenen und anti-apoptotischen Signalwegen. Dazu zählen der PI3K-AKT-Signalweg, der zur Aktivierung der AKT-Kinase führt; die MAPK-Signalkaskade, die zur Aktivierung von ERK führt; der JAK-STAT-Signalweg, der in der Aktivierung von STAT resultiert; und die PLC γ -Kaskade, die zur Aktivierung der PKC führt. Über diese Signalwege wird in erster Linie die Genexpression differentiell reguliert und so die Kontrolle vieler zellulärer Prozesse ermöglicht. PI3K, Phosphatidylinositol-3'-Kinase; MAPK, *mitogen-activated protein kinase*; JAK, Janus-Kinase; STAT, *signal transducer and activator of transcription*; PLC γ , Phospholipase C γ ; PKC, Proteinkinase C.

Die Zellteilung-stimulierende MAPK-Signalkaskade wird durch Rekrutierung von Adaptorproteinen an den phosphorylierten EGF-Rezeptor initiiert. Sodann bindet der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Sos (*Son of sevenless*) und aktiviert Ras-GTPasen, welche eine Phosphorylierungskaskade in Gang setzen, die schließlich in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern resultieren (Prenzel *et al.*, 2001). Der PI3K-AKT-Signalweg wird durch indirekte Bindung der PI3K an den aktivierten EGF-Rezeptor ausgelöst und führt zur Aktivierung der AKT-Kinase. AKT phosphoryliert und inaktiviert dadurch in der Regel eine Vielzahl von Effektorproteinen und vermittelt so anti-apoptotische und proliferative Signale (Paez & Sellers, 2003). Weitere gut untersuchte, dem EGF-Rezeptor nachgeschaltete Signalkaskaden sind der JAK-STAT (Janus-Kinase-*signal transducer and activator of transcription*)-Signalweg (Henson & Gibson, 2006) sowie die PLC γ -PKC (Phospholipase C γ -Proteinkinase C)-Kaskade (Prenzel *et al.*, 2001; Schlessinger, 2000), welche beide ebenfalls zu Veränderungen in der Genexpression führen.

2. Das Ubiquitin-System und die Cbl-Proteine

Ubiquitin ist ein kleines 8,5 kDa schweres, globuläres Protein, welches ubiquitär exprimiert wird und kovalent an Proteine gebunden werden kann. Der Prozess der Übertragung von Ubiquitin auf Substrate wird als Ubiquitylierung oder Ubiquitinierung bezeichnet. Dabei handelt es sich um einen Mehrstufenprozess, der von drei Enzymen (E1, E2 und E3) katalysiert wird (Abb. 3). Das E1-Enzym ist ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym, welches ATP-abhängig die Bildung einer Thioesterbindung zwischen dem Ubiquitin und einem spezifischen Cysteinrest des E1-Enzyms stimuliert. Das aktivierte Ubiquitin wird daraufhin durch Umesterung auf ein Cysteinrest des E2-Enzyms (Ubiquitin-konjugierendes Enzym) übertragen (Fang & Weissman, 2004). Die Übertragung des Ubiquitins vom E2-Enzym auf das Zielprotein wird schließlich durch eine Ubiquitin-E3-Ligase (E3-Enzym) katalysiert.

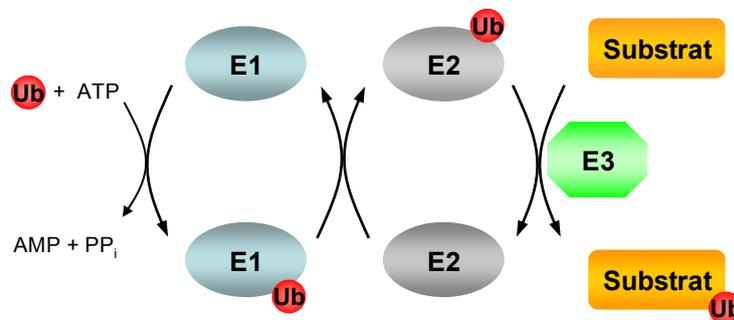


Abb. 3: Mechanismus der Ubiquitylierung

Der Ablauf der Ubiquitylierung ist im Text erklärt. E1, Ubiquitin-aktivierendes Enzym; E2, Ubiquitin-konjugierendes Enzym; E3, Ubiquitin-E3-Ligase; Ub, Ubiquitin; ATP, Adenosintri-phosphat; AMP, Adenosinmonophosphat; PP_i, Pyrophosphat.

Zielproteine können einfach (Monoubiquitylierung) oder mehrfach ubiquityliert werden. Bei einer Mehrfachubiquitylierung werden durch die E3-Ligase weitere Ubiquitine an andere Lysine des Substrats (Multiubiquitylierung) oder auf schon gebundene Ubiquitinreste übertragen (Di-Ubiquitinierung, Polyubiquitylierung). Die jeweilige Verknüpfungsart bestimmt das Schicksal des Substrats. So werden z.B. polyubiquitylierte Proteine über das 26S-Proteasom abgebaut (Pickart & van Demark, 2000), wohingegen die Monoubiquitylierung eine Markierung für den Abbau im Lysosom darstellt (Miranda & Sorkin, 2007).

Die E3-Ligasen spielen eine essentielle Rolle bei der Ubiquitin-Übertragung von E2-Enzymen auf Zielproteine, da sie die Substratspezifität gewährleisten. Es sind bisher drei Unterfamilien der E3-Ligasen bekannt: Enzyme mit HECT-, mit RING- oder mit U-Box-Domänen (Fang & Weissman, 2004). Die größte Gruppe stellen die RING-E3-Ligasen, zu welchen z.B. die den EGF-Rezeptor ubiquitylierenden Cbl- (*Casitas b-lineage lymphoma*)-Proteine gehören. Für die Cbl-Familie konnten bisher drei Säugetierhomologe identifiziert werden, c-Cbl, Cbl-b und Cbl-c, die sich in der Länge ihrer C-Termini und somit in ihrer Funktion als Adaptorproteine unterscheiden. Cbl-c ist die kürzeste Isoform, deren Funktion

bisher wenig verstanden ist. c-Cbl und Cbl-b sind ubiquitär exprimiert und sehr gut untersucht. Bisher konnten mehr als 150 Proteine, u.a. Rezeptoren, zytosolische Kinasen, Ubiquitin-Ligasen und Adaptormoleküle, identifiziert werden, die Cbl-abhängig reguliert werden (Schmidt & Dikic, 2005). C-terminal von der **RING-Domäne** der c-Cbl-Proteine befinden sich die **Prolin-reichen Domäne (ProR)**; Abb. 4) und das **PKPFPR-Motiv**, welche Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Am N-Terminus der Cbl-Proteine ist eine **Tyrosinkinase-Bindedomäne (TKB, tyrosin-kinase-binding)**; Abb. 4) lokalisiert, welche die Bindung von Cbl an Phosphotyrosin-Reste vermittelt. Schließlich ist C-terminal, außer in Cbl-c, die **UBA/LZ- (Ubiquitin-associated/leucine zipper)**-Domäne lokalisiert, welche die Oligomerisierung von Cbl-Proteinen und die Ubiquitin-Bindung vermittelt (Thien & Langdon, 2001).



Abb. 4: Proteindomänen von c-Cbl

Die funktionellen Proteindomänen sind als farbige Zylinder dargestellt. TKB/ , *tyrosine kinase binding*; ProR/ , *proline rich*; PKPFPR-Motiv/ ; UBA/LZ/ , *ubiquitin-associated/leucine zipper*.

3. Die Rho-GTPasen

Rho-GTPasen (*Ras homology*) sind 20 - 40 kDa schwere monomere, GDP/GTP-bindende Proteine, die eine Untergruppe der Superfamilie der kleinen Ras-GTPasen darstellen und zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Reorganisation des Aktinzytoskeletts, Vesikeltransport und Differenzierung, steuern (zusammengefasst in Lundquist, 2006). Die am besten charakterisierten Rho-GTPasen sind RhoA, Rac1 und Cdc42. In der vorliegenden Arbeit wird von „Rac“ gesprochen, wenn in der Literatur nicht eindeutig dokumentiert wurde, um welche Isoform (Rac1, Rac2 oder Rac3) es sich handelt. Diese GTPasen werden als molekulare Schalter bezeichnet, da sie zwischen zwei konformationellen Zuständen wechseln können: einer GTP-gebundenen, aktiven Form und einem GDP-gebundenen, inaktiven Zustand. Der Wechsel zwischen den beiden Formen ist im GTPase-Zyklus, der von drei verschiedenen Klassen von Regulatorproteinen beeinflusst werden kann, zusammengefasst (Abb. 5):

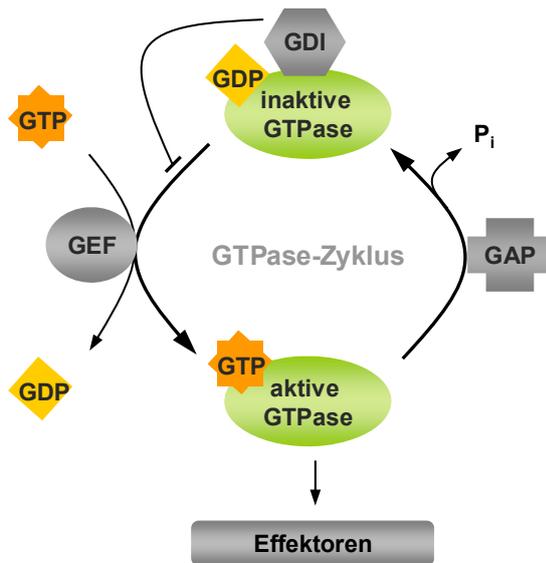


Abb. 5: Der Rho-GTPase-Zyklus

Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) stimulieren den Übergang der inaktiven, GDP-gebundenen GTPase in den aktiven, GTP-gebundenen Zustand. In der aktivierten Form kann die Rho-GTPase mit einer Vielzahl von Effektorproteinen (Effektoren) interagieren, diese aktivieren und so intrazelluläre Signale weiterleiten. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) verstärken die intrinsische Hydrolase-Aktivität der GTPase und stimulieren so die Hydrolyse von GTP zu GDP und P_i (Orthophosphat). Dadurch wird die GTPase in die inaktive Form überführt. GDP-Dissoziationsinhibitoren (GDI) sequestrieren die GTPase im inaktiven Zustand und verhindern somit deren Aktivierung. GDP, Guanosin-5'-diphosphat; GTP, Guanosin-5'-Triphosphat.

Der Austausch des von GTPasen im inaktiven Zustand gebundenen GDPs nach GTP wird durch die **Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren** (*Guanine nucleotide exchange factors*, **GEFs**) katalysiert. Hierdurch kommt es zu einer Konformationsänderung der GTPasen, und die Affinität zu derzeit mehr als 60 bekannten verschiedenen Effektorproteinen wird erhöht. Durch die Interaktion mit GTPasen werden Effektorproteine aktiviert und setzen so lange Signaltransduktionskaskaden fort, bis sie inaktiviert werden (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Die Inaktivierung der GTPasen erfolgt durch Hydrolyse des gebundenen GTPs nach GDP, wobei die intrinsische GTPase-Aktivität (Hydrolase-Aktivität) durch **GTPase-aktivierende Proteine** (*GTPase activating proteins*, **GAPs**) drastisch erhöht wird. Im GDP-gebundenen Zustand können GTPasen an **Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitoren** (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*, **GDIs**) assoziiert sein, wodurch eine spontane bzw. GEF-stimulierte Dissoziation von GDP und somit GTPase-Aktivierung verhindert wird (Symons & Rusk, 2003).

3.1 Die Rho-GTPasen Rac und Cdc42 spielen bei der Regulation von endozytischen Prozessen eine wichtige Rolle

Rho-GTPasen gelten als Schlüsselregulatoren des Aktinzytoskeletts und kontrollieren damit Adhäsion, Motilität und Zellmorphologie (Nobes & Hall, 1995; Hall, 1998). Ein Großteil dieses Wissens wurde mithilfe von GTPase-Proteinvarianten erlangt, die spezifische Aminosäureaustausche aufweisen: Eine **dominant-negative** Mutante, welche mit erhöhter Affinität GEFs bindet, weist einen Aminosäureaustausch von Serin an Position 17 nach Asparagin (S17N) auf. Die ektopische Expression dieser Proteinvariante in eukaryotischen Zellen führt dazu, dass die exprimierte GTPase an zelluläre GEF-Proteine bindet und endogene GTPasen nicht mehr aktiviert werden können. Ein Aminosäureaustausch von Threonin nach

Leucin an der Position 61 (T61L) bringt dagegen eine Proteinvariante hervor, die eine stark verminderte GTPase-Aktivität aufweist, und als **konstitutiv-aktiv** bezeichnet wird (Feig, 1999; Ridley, 2001).

In den letzten Jahren wurden überdies Zusammenhänge zwischen Rho-GTPasen und der Steuerung des vesikulären Transports bei Phagozytose, Macropinozytose sowie bei CME und NCE beschrieben. Bemerkenswerterweise fanden sich verschiedene Mitglieder der Rho-GTPasen an unterschiedlichen endozytotischen Kompartimenten lokalisiert, von welchen aus sie höchstwahrscheinlich distinkte Schritte des Traffickingprozesses beeinflussen: Konstitutiv-aktives Rac blockiert z.B. die Internalisierung von Transferrin- und EGF-Rezeptoren, indem es vermehrt die Phosphatidylinositol-4',5'-bisphosphat [PtdIns(4,5)P₂]-spezifische 5'-Phosphatase Synaptojanin 2 bindet und diese zur Zellmembran rekrutiert (Lamaze *et al.*, 1996; Malecz *et al.*, 2000). Konzentrierungen von PtdIns(4,5)P₂ an der Zellmembran gelten als Stellen, von welchen aus Clathrin und akzessorische Proteine rekrutiert werden, und damit als Ausgangsorte für die CME (Martin, 2001). Cdc42 reguliert im Gegensatz zu Rac1 höchstwahrscheinlich die Aktinpolymerisierung an CCPs und steigert so die Effizienz der CME (Qualmann & Mellor, 2003). Jedoch scheint Cdc42 nicht obligatorisch für die CME zu sein (Kroschewski *et al.*, 1999). NCE, welche von *lipids rafts* an der Plasmamembran ausgeht (Orth *et al.*, 2006), wird zwar nicht durch konstitutiv-aktives Rac1 beeinflusst, jedoch durch dominant-negatives Rac1 inhibiert (Lamaze *et al.*, 2001).

4. Die Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren α PIX und β PIX

Der erste Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor wurde 1985 in Zellen eines diffusen B-Zell-Lymphoms identifiziert und als ***Dbi*** (*diffuse B-cell lymphoma*) bezeichnet (Eva & Aaronson, 1985). Wenig später konnte gezeigt werden, dass *Dbi* den Nukleotidaustausch an der GTPase Cdc42 katalysiert und die ca. 180 Aminosäuren umfassende **DH-** (*Dbi homology*) **Domäne** dessen katalytische Domäne darstellt (Hart *et al.*, 1991). Basierend auf Homologie mit dieser Domäne kennt man mittlerweile mehr als 70 für Rho-GTPasen spezifische GEFs (Garcia-Mata & Burridge, 2007).

Die hoch-homologen Proteine α PIX und β PIX werden von zwei separaten Genen, *ARHGEF6* (*alpha rho guanine nucleotide exchange factor 6*) und *ARHGEF7* (*alpha rho guanine nucleotide exchange factor 7*), kodiert und sind als Mitglieder der Rho-GEF-Familie spezifisch für Cdc42 und Rac1. Zunächst als PAK- (*p21-activated kinase*)-interagierende Austauschfaktoren (*PAK-interacting exchange factors*, PIX) identifiziert, werden sie in der Literatur auch als **Cool-2** (*cloned out of library-2* entspricht α PIX) und **Cool-1** (*cloned out of library-1* entspricht β PIX) bezeichnet (Bagrodia *et al.*, 1998; Manser *et al.*, 1998). Mutationen in *ARHGEF6* führen zu einer unspezifischen Form der X-chromosomal vererbten mentalen

Retardierung (**NS-XLMR**) beim Menschen (Kutsche *et al.*, 2000), wohingegen das *ARHGEF7*-Gen bisher mit keiner Krankheit in Verbindung gebracht wurde.

4.1 Domänenstruktur der PIX-Proteine

Wie fast alle Rho-GEFs besitzen α PIX und β PIX eine zur DH-Domäne direkt C-terminal anschließende **PH-** (*Pleckstrin-homology*; Abb. 6) **Domäne**. Das DH-PH-Tandem bildet das katalytische Modul der PIX-Proteine. Die genaue Funktion der PH-Domäne ist nicht bekannt. Da sie jedoch die Assoziation mit Phospholipiden der Plasmamembran bzw. verschiedenen anderen Proteinen vermittelt, könnte die PH-Domäne über allosterische Wechselwirkungen zur Substratspezifität beitragen und/oder regulatorisch auf die von der DH-Domäne vermittelten GEF-Aktivität wirken (Rebecchi & Scarlata, 1998; Lemmon & Ferguson, 2000). Im C-terminalen Bereich der PH-Domäne von α PIX, nicht jedoch von β PIX, wurde ein Rac1-Interaktionsmotiv (RSID, *Rac-specific interaction domain*) identifiziert (Feng *et al.*, 2004). PIX-Proteine besitzen N-terminal zur DH-Domäne eine **SH3-** (*Src homology 3*; Abb. 6) **Domäne**, welche mit Prolin-reichen Sequenzmotiven (PXXP) anderer Proteine interagiert. Die SH3-Domäne der PIX-Proteine bindet neben PAK (Bagrodia *et al.*, 1998; Manser *et al.*, 1998) auch Proteine der Cbl-Familie (Flanders *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2006). Überdies wurden ein SLAM- (*signalling lymphocyte activation molecule*)-assoziiertes Protein (SAP) und die Ubiquitin-E3-Ligase AIP4 (*atrophin-interactin protein 4*) als Bindepartner der β PIX-SH3-Domäne identifiziert (Gu *et al.*, 2006; Janz *et al.*, 2007). PIX-Proteine weisen eine **GIT1-Bindedomäne (GBD, *GIT1-binding domain***; Abb. 6) auf (Premont *et al.*, 1998). GIT-Proteine, auch CAT- (*cool-associated tyrosine phosphorylated protein 1*) oder auch p95-Moleküle genannt, sind multifunktionelle Proteine, welche verschiedene zelluläre Prozesse, wie die Regulation des Aktinzytoskeletts oder den Vesikeltransport, beeinflussen (Hoefen & Berk, 2006). Am C-terminalen Ende der PIX-Proteine ist die **CC-** (*coiled-coil*) **Domäne** lokalisiert, welche eine Homo- und Heterodimerisierung der PIX-Proteine ermöglicht (Manser *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2001; Koh *et al.*, 2001; Rosenberger *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu β PIX besitzt α PIX am N-Terminus eine singuläre **CH-** (*calponin homology*) **Domäne**. Die genaue Funktion der α PIX-CH-Domäne konnte bisher noch nicht geklärt werden, jedoch vermittelt sie die Interaktion mit β -Parvin, einem Protein, das für Zelladhäsion und -migration wichtig ist (Rosenberger *et al.*, 2003).

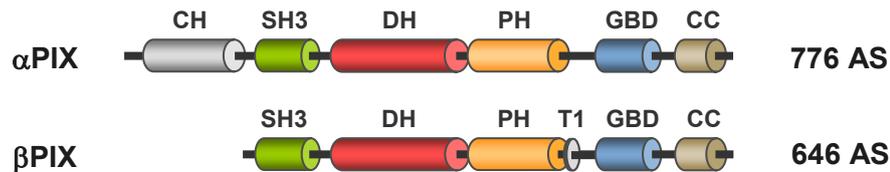


Abb. 6: Proteindomänen von α PIX und β PIX

Die funktionellen Proteindomänen sind als farbige Zylinder dargestellt. CH/ , *calponin homology*; SH3/ , *Src homology 3*; DH/ , *Dbl homology*; T1-Region/ ; PH/ , *pleckstrin homology*; GBD/ , *GIT1-binding domain*; CC/ , *coiled-coil*. Rechts neben den Modellen ist die Anzahl der Aminosäuren (AS) der PIX-Proteine angegeben.

4.2 Die Regulation der PIX-Proteine und die PIX-vermittelte Signalweiterleitung

Weil sie GTPasen aktivieren können, stellen GEF-Proteine höchstwichtige Schnittstellen vieler intrazellulärer Signalwege dar. Lange war unklar, ob die PIX-Proteine echte GEFs darstellen oder ausschließlich als Adaptorproteine fungieren, doch schließlich konnte für α PIX *in vitro* eine GEF-Aktivität nachgewiesen werden (Yoshii *et al.*, 1999). Neuere Studien deckten - erstmalig für ein GEF-Protein - eine allosterische Regulation von α PIX auf: Dimerisiertes α PIX ist in der Lage, Rac1 zu aktivieren, während α PIX-Monomere in Assoziation mit SH3-Bindeproteinen sowohl Rac1 als auch Cdc42 aktivieren können (Feng *et al.*, 2004; Baird *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu α PIX besitzt β PIX unmittelbar C-terminal der PH-Domäne eine negativ wirkende regulatorische **T1-Region**, welche eine konstitutive GEF-Aktivität verhindert (Feng *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2006; Abb. 5). Es wird vermutet, dass die T1-Region eine intramolekulare Faltung des C-terminalen Endes über die DH- und PH-Domänen bewirkt und so die GEF-Aktivität hemmt (Feng *et al.*, 2002). Des Weiteren enthält β PIX, nicht jedoch α PIX, unmittelbar nach der T1-Region ein Tyrosin, das EGF-abhängig phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung bewirkt, dass β PIX spezifisch den Nukleotid-Austausch für Cdc42 stimuliert, wohingegen Rac1 nicht aktiviert wird (Feng *et al.*, 2006).

Die Aktivierung der Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1 führt auch zur Aktivierung der PIX-gebundenen PAK-Kinasen, die eine Vielzahl von Signalwegen stimulieren und so u.a. das Aktinzytoskelett und Genexpression steuern (Yoshii *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2002; Flanders *et al.*, 2003). Interessanterweise wurde eine Interaktion von α PIX mit der PI3-Kinase beschrieben, die für die Aktivierung von PAK essentiell ist (Yoshii *et al.*, 1999).

4.3 Die Interaktion zwischen β PIX und Cbl reguliert die EGF-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion

Wie bereits erwähnt wurde, bindet β PIX über die SH3-Domäne Proteine der Cbl-Familie (Flanders *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2006). Eine Interaktion zwischen α PIX und Cbl-Proteinen wurde aufgrund einer kompetitiven Inhibierung der Aktivierung von PAK durch ektopische Cbl-Expression angenommen, denn schließlich binden beide Proteine, PAK und Cbl, an die SH3-Domäne von β PIX (Flanders *et al.*, 2002). Für die β PIX::c-Cbl-Interaktion sind das konservierte Tryptophan an Aminosäureposition 43 der β PIX-SH3-Domäne sowie das Arginin an Aminosäureposition 829 von c-Cbl bzw. das Arginin an Position 911 von Cbl-b essentiell (Wu *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2006). Diese Arginine befinden sich in einem ungewöhnlichen, konservierten Sequenzmotiv (PKPxPR).

Cbl-Proteine sind wichtige Regulatoren von zellulären Prozessen, wie z.B. des EGF-Rezeptor-Abbaus (Levkowitz *et al.*, 1998; Joazeiro *et al.*, 1999; Waterman *et al.*, 1999). Doch auch Cbl-Proteine werden negativ reguliert, wobei insbesondere die Interaktion mit β PIX von Bedeutung ist (Wu *et al.*, 2003). So bilden β PIX und aktives Cdc42 zusammen mit c-Cbl einen Komplex und sequestrieren c-Cbl so höchstwahrscheinlich vom EGF-Rezeptor. Damit verhindert die β PIX::c-Cbl-Assoziation eine ubiquitylierungsabhängige Degradierung des EGF-Rezeptors und führt so zu anhaltender Signaltransduktion durch die aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinase (Wu *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2006). Überdies inhibiert ektopisch exprimiertes β PIX die Endozytose des EGF-Rezeptors, da eine vermehrte Komplexbildung zwischen β PIX und Cbl die Assoziation von Cbl mit endozytischen Proteinen wie CIN85 (*Cbl-interacting protein of 85 kDa*) verhindert, welche für die Internalisierung des EGF-Rezeptors nötig ist (Schmidt *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2006). Auch β PIX wird negativ reguliert: Zum einen kommt es durch Dephosphorylierung von β PIX zur Auflösung des Cdc42:: β PIX::c-Cbl-Komplexes. Zum anderen monoubiquityliert c-Cbl β PIX und initiiert so dessen Degradierung in Lysosomen, was wiederum zu einer Freisetzung der gebundenen Cbl-Proteine führt (Schmidt *et al.*, 2006). Die freigewordene Ubiquitin-Ligase kann daraufhin wieder EGF-Rezeptoren durch Ubiquitylierung für den Proteinabbau markieren und so die EGF-Rezeptor-abhängige Signaltransduktion abschwächen.

5. Ziel der Arbeit

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war die Erforschung einer möglichen Beteiligung von α PIX an Trafficking-Prozessen des EGF-Rezeptors. Deshalb war es zunächst von Interesse, ob α PIX mit der Ubiquitin-E3-Ligase c-Cbl interagiert, welche maßgeblich das Trafficking und den Proteinumsatz des EGF-Rezeptors beeinflusst. Eine Assoziation sollte sowohl für endogene als auch für ektopisch exprimierte α PIX- und c-Cbl-Proteine mithilfe von Koimmunpräzipitationen analysiert werden, und die für diese Interaktion essentiellen Proteinmotive aufgeklärt werden. Mittels zellbiologischer Methoden sollte die subzelluläre Lokalisation von α PIX nach EGF-Stimulation untersucht werden. Darüber hinaus sollte eine mögliche EGF-Stimulations-abhängige Regulation der α PIX::c-Cbl-Komplexbildung biochemisch und zellbiologisch geklärt werden.

Da das hoch-homologe β PIX-Protein, welches laut veröffentlichten Resultaten mit c-Cbl interagiert, nach EGF-Stimulation durch c-Cbl ubiquityliert und anschließend abgebaut wird, sollte getestet werden, ob auch α PIX nach EGF-Stimulation durch c-Cbl für die Degradierung markiert und anschließend abgebaut wird.

Schließlich sollte die α PIX-Funktion während der EGF-Rezeptor-Degradierung und – Internalisierung biochemisch und zellbiologisch analysiert werden. Dazu sollten Liganden-Internalisierungsassays mit Fluoreszenz-markiertem EGF und Zelloberflächen-Biotinylierungsassays etabliert und sodann an stabil α PIX-exprimierenden Zellen angewendet werden. Mithilfe der Biotinylierungsassays sollte dabei neben der Internalisierung auch die Degradierung und das Recycling des EGF-Rezeptors in Abhängigkeit von α PIX untersucht und quantitativ ausgewertet werden.

III. Material & Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BAA 30%; 37,5:1)	Biorad (München)
Agar (Select)	Invitrogen (Karlsruhe)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Ammoniumacetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)	Merck (Darmstadt)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ampicillin-Natriumsalz ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}\cdot\text{Na}$)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	Biorad (München)
Borsäure (H_3BO_3)	Merck (Darmstadt)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Calciumchlorid (CaCl_2)	Merck (Darmstadt)
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche (Mannheim)
D(+)-Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck (Darmstadt)
Epidermal Growth Factor (EGF), human	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Epidermal Growth Factor (EGF)-Alexa Fluor 488	Invitrogen (Karlsruhe)
Essigsäure (CH_3COOH)	Merck (Darmstadt)
Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	J.T. Baker (Griesheim)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin	Thermo Scientific (Bonn)
EZview™ Red Anti-HA Affinity Gel	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
EZview™ Red Streptavidin Affinity Gel	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)	Roth (Karlsruhe)
Glycin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Oxide (Wesel)
Isopropanol ($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$)	Fluka (Neu-Ulm)
Kaliuacetat (KAc; KCH_3COO)	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kanamycinsulfat ($\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_{11}\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$)	Fluka (Neu-Ulm)
Leupeptin-hemisulfat ($\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_4\cdot\frac{1}{2}\text{H}_2\text{SO}_4$)	Roche (Mannheim)
L-Glutathion, reduziert ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Lipofectamin™2000 Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck (Darmstadt)
Manganchlorid (MnCl_2)	Merck (Darmstadt)
Methanol (CH_3OH)	Merck (Darmstadt)
MG-132 ($\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_5$)	Calbiochem (San Diego, USA)
Natriuacetat (CH_3COONa)	Merck (Darmstadt)
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker (Griesheim)
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt)
Natriumsalz-Deoxycholsäure (DOC, $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$)	Roth (Karlsruhe)
Natriumtetraborat (Borax; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
N-Ethylmaleimide ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_2$)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED; $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Nonidet P40 / Igepal $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{O}_{12}$	ICN (Eschwege)

Normal Goat Serum	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Orange-G	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Paraformaldehyd (CH ₂ O) _n	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Pepstatin A (C ₃₄ H ₆₃ N ₅ O ₉)	Roche (Mannheim)
Phenylmethyl Sulphonyl Fluoride (PMSF; C ₇ H ₇ FO ₂ S)	Roche (Mannheim)
Poly-L-Lysinhydrobromid (C ₆ H ₁₂ N ₂ OHBr) _n +H ₂ O	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Polyoxyethylen Sorbitan Monolaurat (Tween 20; C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Polyvinylalkohol 488 [Mowiol 488; (C ₂ H ₄ O) _x]	Fluka (Neu-Ulm)
Primaquindiphosphat [C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O ₂ (H ₃ PO ₄) ₂]	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Propylgallat (C ₁₀ H ₁₂ O ₅)	Fluka (Neu-Ulm)
Rubidiumchlorid (RbCl)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
SimplyBlue™ SafeStain	Invitrogen (Karlsruhe)
TexasRed®-X Phalloidin	Invitrogen (Karlsruhe)
Trizma® Base (Tris; C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypton	Difco (Kansas, USA)
TurboFect™ <i>in vitro</i> Transfection Reagent	Fementas (St. Leon-Rot)
Wasser für Chromatographie (HPLC)	Merck (Darmstadt)
1,4-Dithioerythritol (DTT; C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)	Merck (Darmstadt)
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; C ₁₆ H ₁₅ N ₅)	Serva (Heidelberg)

1.2 Kits, Enzyme, Nukleotide und Standards

BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific (Bonn)
BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
Immobilon™ Western	Millipore (Schwalbach)
JetQuick PCR Product Purification Spin Kit	Genomed (Löhne)
NucleoBond® Xtra Maxi	Macherey/Nagel (Düren)
pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Restore™ Western-Blot Stripping Puffer	Thermo Scientific (Bonn)

Alkalische Phosphatase	Roche (Mannheim)
Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix	Invitrogen (Karlsruhe)
PfuULTRA™ HF DNA Polymerase	Stratagene (Waldbronn)
Phusion™ DNA Polymerase	NEB (Frankfurt a. Main)
Quick Ligase	NEB (Frankfurt a. Main)
Restriktionsendonukleasen	Promega (Mannheim), NEB (Frankfurt a. Main), Fermentas (St. Leon-Rot)
RNase A	Invitrogen (Karlsruhe)
T4 DNA Ligase	NEB (Frankfurt a. Main)
Taq DNA Polymerase	Qiagen (Hilden)

dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Invitrogen (Karlsruhe)

DNA-Standard Fast-Ruler™	Fermentas (St. Leon-Rot)
PageRuler™ Plus Prestained Protein	Fermentas (St. Leon-Rot)
100 Bp DNA-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
1 Kb DNA-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)

1.3 Medien und Zusätze

1.3.1 Medien und Zusätze für molekularbiologische Arbeiten

Medien und Zusätze für Anzucht und Kultivierung von Bakterien

LB-Medium (Luria Bertani)	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Natriumchlorid
	ad 1000 ml	Aqua dest.
	pH	7,0
Agar für Festmedien		LB-Medium
	+ 15 g/l	Agar
Ampicillin	1 ml pro 1000 ml von Stocklösung (250 mg/ml in Aqua dest.)	
Kanamycin	1 ml pro 1000 ml von Stocklösung (25 mg/ml in Aqua dest.)	
SOC-Medium	20 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	0,5 g	Natriumchlorid
	ad 970 ml	Aqua dest.
	10 ml	steril filtriertes 1M MgSO ₄
	10 ml	steril filtriertes 1M MgCl ₂
	10 ml	steril filtrierte 40% Glucose

Medien und Zusätze für die Herstellung chemisch kompetenter E.coli-Zellen

ψB-Medium	20 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	0,75 g	Kaliumchlorid
	ad 966 ml	Aqua dest.
	pH	7,6
	34 ml	steril filtriertes 1M MgSO ₄
TfBI	1,47 g	Kaliumacetat
	4,95 g	Manganchlorid
	6,05 g	Rubidiumchlorid
	0,74 g	Calciumchlorid
	75 ml	Glycerol
	ad 500 ml	Aqua dest.
	pH	5,8
TfBII	10 ml	100 mM MOPS
	1,1 g	Calciumchlorid
	0,12 g	Rubidiumchlorid
	15 ml	Glycerol
	ad 100 ml	Aqua dest.

1.3.2 Medien und Zusätze für zellbiologische Arbeiten

Medien und Zusätze für die Zellkultivierung

Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (D-MEM) mit L-Glutamin	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
F-12 Nutrient Mixture (Ham)	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Opti-MEM® I serumreduziertes Medium mit GlutaMAX™ I	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)

Fötales Rinderserum (FBS)	PAA Laboratories (Karlsruhe)
Hygromycin (50 mg/ml)	Calbiochem (Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin (100 U/ml / 100 mg/ml)	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
TrypLE™ Express	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)

1.4 Puffer und Lösungen

1.4.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli (Mini-Präparation)

Lösung I	50 mM	Glucose
	25 mM	Tris-HCl, pH 8
	10 mM	EDTA
Lösung II	0,2 N	NaOH
	1%	SDS (w/v)
Lösung III	4 M	KAc, pH 5,5
	2 M	Essigsäure
1x TE-Puffer	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA
	pH	7,5
TE/RNase-Puffer	100 µl/ml	RNase A in 1xTE-Puffer

Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli (Maxi-Präparation)

RES (Zellsuspension)	50 mM	Tris, pH 8
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase
LYS (Zelllyse)	200 mM	NaOH
	1%	SDS (w/v)
NEU (Neutralisation)	3 M	KAc, pH 5,5
EQU (Säulenäquilibrierung)	750 mM	NaCl
	50 mM	MOPS, pH 7
	15%	Isopropanol (v/v)
	0,15%	Triton-X-100 (v/v)
WASH (Waschpuffer)	1 M	NaCl
	50 mM	MOPS, pH 7
	15%	Isopropanol (v/v)
ELU (Elutionspuffer)	1,25 M	NaCl
	50 mM	Tris, pH 8,5
	15%	Isopropanol (v/v)

Elektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren im Agarosegel

10x TBE	890 mM	Borsäure
	20 mM	EDTA
	890 mM	Tris
	pH	8
10x Ladepuffer	25 ml	Glycerin
	25 ml	1x TBE
	20 mg	Orange-G
Ethidiumbromid	0,05%	(w/v, in Aqua dest.)

PCR-Puffer

10x Cloned Pfu DNA Polymerase Reaction Buffer	100 mM	KCl
	20 mM	MgSO ₄
	100 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	200 mM	Tris-HCl, pH 8,8
	1%	Triton® X-100 (v/v)
	1 mg/ml	nukleasefreies BSA

1.4.2 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten**Zelllyse**

RIPA-Lysepuffer	150 mM	NaCl
	50 mM	Tris-HCl, pH 8
	0,5%	DOC (w/v)
	1%	NP-40 (v/v)
	0,1%	SDS (w/v)

SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE)

4x Trenngelpuffer	2 g	SDS
	91 g	Tris
	ad 500 ml	Aqua dest.
	pH	8,8 mit H ₃ PO ₄
4x Sammelgelpuffer	2 g	SDS
	30,3 g	Tris
	ad 500 ml	Aqua dest.
	pH	6,8 mit H ₃ PO ₄
4x Lämmli-puffer (Ladepuffer)	0,01%	Bromphenolblau (v/v)
	33%	Glycerol (v/v)
	6,7%	SDS (w/v)
	0,3 M	DTT
	80 mM	Tris-HCl, pH 6,8
10x SDS-Laufpuffer	288,4 g	Glycin
	40 g	SDS
	60,6 g	Tris
	ad 2000 ml	Aqua bidest.
	pH	8,3

Western-Blot

Transferpuffer	150 mM Glycin 25 mM Tris 10 % Methanol (v/v) pH 8,3
10x PBST	4 g KCl 4,8 g KH ₂ PO ₄ 160 g NaCl 28,8 g Na ₂ HPO ₄ 20 ml Tween 20 ad 2000 ml Aqua dest. pH 7,2
10x TBST	1,5 M NaCl 200 mM Tris-HCl, pH 7,4 1% Tween 20 (v/v)
Antikörperlösung:	für Antikörper von:
1x TBST mit 5% BSA (w/v) (TBST/BSA)	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)
1x TBST mit 0,4% Milchpulver (TBSTM)	Abcam (Cambridge, UK) Roche (Mannheim) Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
1x PBST mit 5% Milchpulver (PBSTM)	Invitrogen (Karlsruhe) Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)

Koimmunpräzipitation

1x TBS	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl, pH 7,4
KoIP-Lysepuffer	1 mM EDTA 50 mM NaCl 150 mM Tris-HCl, pH 8 0,5% NP-40 (v/v) frisch dazu: 1 Tabl. Complete Mini Proteaseinhibitoren / 10 ml

1.4.3 Puffer und Lösungen für zellbiologische Arbeiten**Zellkultur**

10x PBS-/-	2 g KCl 2,4 g KH ₂ PO ₄ 80 g NaCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ ad 1000 ml Aqua dest.
------------	---

Beschichtung von Deckgläschen

0,1 M Boratpuffer	1,55 g Borsäure 2,38 g Natriumtetraborat ad 500 ml Aqua dest. pH 8,5
Poly-L-Lysin-Lösung [1 mg/ml]	in 0,1 M Boratpuffer

Immunfluoreszenz-Analysen

1x PBS+/-	0,9 mM CaCl ₂ 0,52 mM MgCl ₂ 0,16 mM MgSO ₄ in 1x PBS-/-
Hochsalzpuffer	500 mM NaCl in 1x PBS+/-
Fixierlösung	4% Paraformaldehyd (w/v) in 1x PBS+/-
Blockierlösung	2% BSA (w/v) 3% Ziegen-Serum (v/v) 0,5% Igepal (v/v) in 1x PBS+/-
Antikörperlösung	3% Ziegen-Serum (v/v) 0,1% Igepal (v/v) in 1xPBS+/-
Mowiol-Einbettmedium	25% Propylgallatlösung (v/v) (2,5 g in 50 ml 1x PBS+/- und 50 ml 100% Glycerol) 75% Mowiol-488-Lösung (v/v) (20 g in 80 ml 1x PBS+/-)

Biotinylierungsassays

HBSS	1,3 mM CaCl ₂ 5,6 mM Glucose 5,4 mM KCl 0,4 mM KH ₂ PO ₄ 0,5 mM MgCl ₂ 0,6 mM MgSO ₄ 137 mM NaCl 4,2 mM NaHCO ₃ 0,3 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
Wasch-HBSS	5 mM Tris-HCl, pH 7,4 in HBSS
Glutathion-Puffer	1 mM EDTA 50 mM Glutathion 75 mM NaCl frisch dazu: 10% FBS (v/v) frisch dazu: 75 mM NaOH

1.5 Bakterienstämme und Zelllinien

	Name	Eigenschaften/Zelltyp	Herkunft	Referenz
Bakterienstämme	<i>E. coli</i> C600	F ⁻ <i>tonA21 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 glnV44 rfbC1 fhuA1 λ⁻</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)	
	<i>E. coli</i> DH10B	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL (Str^R) nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)	
	<i>E. coli</i> TOP10	F- <i>Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)	
Zelllinien	Flp-In TM -CHO	Adhärente Fibroblasten aus Ovarien des Chinesischen Hamsters	Invitrogen (Karlsruhe)	
	CHO-K1	Adhärente Fibroblasten aus Ovarien des Chinesischen Hamsters	DSMZ (Braunschweig)	Puck <i>et al.</i> , 1958
	COS-7	Adhärente Fibroblasten aus Nieren der Grünen Meerkatze	DSMZ (Braunschweig)	Gluzman <i>et al.</i> , 1981
	HEK-293	Adhärente, embryonale Nierenzelllinie (human)	DSMZ (Braunschweig)	Graham <i>et al.</i> , 1977
	HT22	Adhärente, murine hippocampale Zelllinie		
	H4	Adhärente, Neuroglia-Zelllinie (human)	ATCC (USA)	Arnstein <i>et al.</i> , 1974
	Neuro-2A	Adhärente, murine Neuroblastomzelllinie	DSMZ (Braunschweig)	Olmsted <i>et al.</i> , 1970
	PC12	Schwach adhärente Zellen; Phäochromocytom, Niere, Ratte	CLS (Heidelberg)	Greene <i>et al.</i> , 1976
	SH-SY5Y	Adhärente, humane Neuroblastomzelllinie	DSMZ (Braunschweig)	Biedler <i>et al.</i> , 1973
	Stabile Zelllinien	CAT-Flp-In-CHO	stabil Chloramphenicol-Acetyltransferase-exprimierende CHO-Zellen	AG Kutsche
αPIX ^{WT} -Flp-In-CHO		stabil αPIX ^{WT} -exprimerende CHO-Zellen	AG Kutsche	
αPIX ^{dn} -Flp-In-CHO		stabil αPIX ^{dn} -exprimerende CHO-Zellen	AG Kutsche	
αPIX ^{W197K} -Flp-In-CHO		stabil αPIX ^{W197K} -exprimerende CHO-Zellen	diese Arbeit	

Tab.1: Verwendete Bakterienstämme und Zelllinien

Angegeben ist jeweils der Name, die genetischen Eigenschaften bzw. der Zelltyp, die Herkunft und, falls vorhanden, eine Referenz für die verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien. (DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; ATCC = American Type Culture Collection; CLS = Cell Lines Service)

1.6 Plasmide

1.6.1 Zur Verfügung gestellte Konstrukte

Name des Konstrukts	Name des Inserts (Genbank Eintragsnummer)	kodierte Amino- säuren	Herkunft
pMT2SM-HA-ARHGEF6/ α PIX	Wildtyp- α PIX (NM_004840.2)	2-776	AG Kutsche, UKE, Hamburg
pFLAG-CMV4-ARHGEF6/ α PIX	Wildtyp- α PIX (NM_004840.2)	2-777	AG Kutsche, UKE, Hamburg
pRK5-c-Cbl	Wildtyp-c-Cbl (NM_005188.2)	1-906	M. Schmidt, Frankfurt a. Main
pRK5/HERc	Wildtyp-EGFR (NM_005228.3)	1-1210	A. Ullrich, Martinsried
pcDNA3-EGFR	Wildtyp-EGFR (NM_005228.3)	1-1210	S. Lipkowitz, Bethesda (USA)
pGreenLantern-Rab7	Wildtyp-Rab7 (NM_004637.5)		S. Linder, Hamburg
pEGFP-C3-Rab11WT	Wildtyp-Rab11 (X56388)		R. Jacob, Marburg
pRK5-HA-Ubiquitin-WT	Wildtyp-UbiquitinC (NM_021009)		Addgene (USA)

Tab. 2: Vorliegende Konstrukte für die eukaryotische Expression

Es sind jeweils der Name des Konstrukts, der Name des Inserts mit Genbank Eintragsnummer, der Umfang der vom Insert kodierten Proteinsequenz sowie die Herkunft des Konstrukts angegeben.

1.6.2 Ausgangsvektoren für die Herstellung neuer Konstrukte

Zur Subklonierung verwendete Konstrukte

Name des Konstrukts	Name des Inserts (Genbank Eintragsnummer)	kodierte Amino- säuren	Herkunft
pENTR3C-ARHGEF6/ α PIX	Wildtyp- α PIX (NM_004840.2)	2-776	AG Kutsche, UKE, Hamburg
pENTR/D-TOPO-ARHGEF6/ α PIX	Wildtyp- α PIX (NM_004840.2)	2-776	AG Kutsche, UKE, Hamburg
pRK5-c-Cbl	Wildtyp-c-Cbl (NM_005188.2)	1-906	M. Schmidt, Frankfurt a. Main

Tab. 3: Übersicht über bereits Kostrukte zur Herstellung neuer Konstrukte

Angegeben sind jeweils der Name des Konstrukts, der Name des Inserts mit Genbank Eintragsnummer, der Umfang der vom Insert kodierten Proteinsequenz sowie die Herkunft des Konstrukts.

Zielvektoren für Klonierungen

	Name	Eigenschaften	Herkunft	Referenz
Eukaryotische Expressionsvektoren	pMT2SM-HA	Amp ^r , HA-Epitop	R. M. Ahmadian (Dortmund)	Kaufman <i>et al.</i> , 1987
Gateway™-Vektoren	pENTR/D-TOPO	Km ^r	Invitrogen (Karlsruhe)	
	pEF5/FRT/V5-DEST	Amp ^r , Hyg ^r , ccdB, FRT-Seq., Cm ^r , V5-Epitop	Invitrogen (Karlsruhe)	
	pcDNA3native-DEST	Amp ^r , Neo ^r , ccdB	AG Kutsche, UKE, Hamburg	

Tab. 4: Übersicht über Vektoren zur Herstellung neuer Konstrukte

Es sind jeweils der Name des Vektors, die Eigenschaften, die Herkunft und, wenn verfügbar, eine Referenz angegeben.

1.6.3 Hergestellte Konstrukte**Konstrukt für die eukaryotische Expression**

Name des Konstrukts	Oligonukleotide	Template	kodierte Aminosäuren
pMT2SM-HA-ARHGEF6/αPIXW197K	aPIXf.l.-NotI-pMT2SMHA aPIXW197K-rev aPIXW197K-for aPIX-doppelmut-KpnI	pENTR3C-ARHGEF6/αPIX	2-776

Tab. 5: Konstrukte für die Expression in eukaryotischen Zellen

Die Klonierung dieses Konstruktes erfolgte durch PCR-vermittelte Mutagenese, Restriktion und anschließende Ligation. Angegeben sind der Name, die für die PCR eingesetzten Oligonukleotide, das Template für die PCR und der Umfang der vom Insert kodierten Proteinsequenz.

Mittels Topoisomerase-Reaktion hergestellte Gateway-Eingangskonstrukte

Name des Konstrukts	Herstellung			kodierte Aminosäuren
	Oligonukleotide	Template	Methode	
pENTR/D-TOPO-ARHGEF6/αPIXW197K	aPIX-fN-pET aPIX-rN-pET	pMT2SM-HA-ARHGEF6/αPIXW197K	Topoisomerase-Reaktion	1-776
pENTR/D-TOPO-c-Cbl	c-Cbl/pET/for c-Cbl/pET/rev	pRK5-c-Cbl	Topoisomerase-Reaktion	1-906
pENTR/D-TOPO-c-CblR829A	c-Cbl/pET/for c-CblR829A_rev c-CblR829A_for c-Cbl/pET/rev	pRK5-c-Cbl	PCR-vermittelte Mutagenese + Topoisomerase-Reaktion	1-906
pENTR/D-TOPO-c-CblC381A	c-Cbl/pET/for c-Cbl_C381A_rev c-Cbl_C381A_for c-Cbl/pET/rev	pRK5-c-Cbl	PCR-vermittelte Mutagenese + Topoisomerase-Reaktion	1-906

Tab. 6: Übersicht über die mit Hilfe einer Topoisomerase-Reaktion hergestellten Eingangsvektoren für die Gateway-Technologie

Angegeben sind die Namen der Konstrukte, die für die PCR verwendeten Oligonukleotide und Templates, die Methodik der Herstellung der Konstrukte und der Umfang der vom Insert kodierten Proteinsequenz.

(Tabelle auf vorangegangener Seite)

Mittels Gateway™-Technologie hergestellte Zielkonstrukte für die eukaryotische Expression

Name des Konstrukts	Herstellung	kodierte Aminosäuren
pEF5/FRT/V5-DEST-ARHGEF6/ α PIXW197K	Rekombination aus pENTR/D-TOPO-ARHGEF6/ α PIXW197K	1-776
pcDNA3-DEST-c-Cbl	Rekombination aus pENTR/D-TOPO-c-Cbl	1-906
pcDNA3-DEST -c-CbIR829A	Rekombination aus pENTR/D-TOPO-c-CbIR829A	1-906
pcDNA3-DEST -c-CbIC381A	Rekombination aus pENTR/D-TOPO-c-CbIC381A	1-906

Tab. 7: Übersicht über die mit Hilfe der Gateway™-Technologie hergestellten Konstrukte

Es sind der Name der Konstrukte, die Methodik der Herstellung und der Umfang der vom Insert kodierten Proteinsequenz angegeben.

1.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden manuell designt und von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Vor der Verwendung wurden die entsalzen, lyophilisierten Oligonukleotide mit 1x TE auf eine Stocklösung mit einer Konzentration von 100 pmol/ μ l eingestellt. Die Gebrauchslösungen der verwendeten Oligonukleotide entstanden durch eine 1:10-Verdünnung der Stocklösung mit Aqua bidest.

1.7.1 Oligonukleotide für Klonierungen

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Herkunft
aPIXf.l.-NotI-pMT2SMHA	GAAAAAAGCGGCCGCAAATCCAGAAGAACAAATCG TGACATGG	AG Kutsche, UKE Hamburg
aPIX-Cter-EcoRI-pMT2SMHA	CCGGAATTCCTCATTATGGAAGAATTGAGGTCTTG CTAC	AG Kutsche, UKE, Hamburg
aPIX-fC-pET	CACCAATCCAGAAGAACAAATCGTGACATGG	AG Kutsche, UKE, Hamburg
aPIX-rC-pET	TCATTATGGAAGAATTGAGGTCTTGCTAC	AG Kutsche, UKE, Hamburg
aPIXW197K-for	GTTGAAGAAGGAGGCAAGTGGGAAGGCAC	diese Arbeit
aPIXW197K-rev	GTGCCTTCCCCTTGCCTCCTTCTTCAAC	diese Arbeit
c-Cbl/pET/for	CACCATGGCCGGCAACGTGAAGAAGAGCTC	diese Arbeit
c-Cbl/pET/rev	CTAGGTAGCTACATGGGCAGGAGAAG	diese Arbeit

c-CblR829A_for	CAAACCATTCCCGGCGAGAATCAACTC	diese Arbeit
c-CblR829A_rev	GAGTTGATTCTCGCCGGAATGGTTTTG	diese Arbeit
c-Cbl_C381A_for	CTCCACATTCCAAGTCTAAAATATGTGCTG	diese Arbeit
c-Cbl_C381A_rev	CAGCACATATTTTAGCTAGTTGGAATGTGGAG	diese Arbeit

Tab. 8: Verwendete Oligonukleotide für Klonierungen

1.7.2 Oligonukleotide für Sequenzierungen

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Herkunft
pMT2_seq	CACTCCCAGGTCCAAGTGCATAAG	AG Kutsche, Hamburg
pFLAG-CMV-N	AATGTCGTAATAACCCCGCCCGTTGAC GC	AG Kutsche, Hamburg
M13 uni	GTAAAACGACGGCCAGT	AG Kutsche, Hamburg
cDNAT7	TAATACGACTCACTATAGGG	AG Kutsche, Hamburg
c-KIA 16	TATCAGAAAGACCATGTGGACG	AG Kutsche, Hamburg
KIA 40	AGAGACCTCTCTCCCCAAAAGCC	AG Kutsche, Hamburg
KIA 28frag	GATGAGTTGGAACAATTCATGG	AG Kutsche, Hamburg
KIA 20	CGAACCTATTCAGGCATGGGAAG	AG Kutsche, Hamburg
KIA 13	CAATAGCAGGAACGGTGGGTGAC	AG Kutsche, Hamburg
KIA 9	CAGCAGCACTAGGTTATAAAGAG	AG Kutsche, Hamburg
KIA 6	CATCATTGAAGAAACCAGAAGC	AG Kutsche, Hamburg
EGFR_1F	AGAGGATGTTCAATAACTGTGAGG	diese Arbeit
EGFR_1R	AGGAATTCGCTCCACTGTGTTGAGG	diese Arbeit
EGFR_2F	AGTGTGATCCAAGCTGTCCCAATGG	diese Arbeit
EGFR_3F	ACAGCTATGAGATGGAGGAAGAC	diese Arbeit
EGFR_4F	AGTCGTGAGCCTGAACATAACATCC	diese Arbeit
EGFR_5F	CATGAACATCACCTGCACAGGACG	diese Arbeit
EGFR_6F	AGATCAAAGTGCTGGGCTCCGGTGC	diese Arbeit
EGFR_7F	CACCGCAGCATGTCAAGATCACAG	diese Arbeit
EGFR_8F	GTCCTACAGACTCCAACCTTCTACC	diese Arbeit
EGFR_9F	CGAGTATCTCAAACTGTCCAGC	diese Arbeit
Cbl_1for	CGTACTATCTTGCAAGATATGAGG	AG Kutsche, Hamburg
Cbl_2for	GCTTTCGACAGGCTCTACATGAAG	AG Kutsche, Hamburg
Cbl_2rev	CGTCCTTCATGAGCCCAATCAGG	AG Kutsche, Hamburg
Cbl_3for	GTTACTGCTGATGGGAACATTCTCC	AG Kutsche, Hamburg
Cbl_4for	CAGGGCTGTCCTTTCTGCCGATGTG	AG Kutsche, Hamburg
Cbl_5for	GCTGCTTCTGGCTCCCTTCATAAAG	AG Kutsche, Hamburg
Cbl_6for	ACCAGATGTGCCTAGGCTCGGAGC	AG Kutsche, Hamburg
Cbl_7for	ATCTATCACCGAGAGCAGCACCTTTGG	AG Kutsche, Hamburg
Cbl_8for	GCTGTGAGCAAGGTAGTGGTCTG	AG Kutsche, Hamburg

Tab. 9: Verwendete Oligonukleotide für Sequenzierungen

1.8 Antikörper

1.8.1 Primärantikörper

Antikörper	Antigen	hergestellt in	Verdünnung	Hersteller
anti-Cool2/ α PIX	humanes α PIX	Kaninchen	WB 1:1000 IF 1:400	Cell Signaling – NEB (Frankfurt a. Main)
anti-ARHGEF6	humanes α PIX	Kaninchen	WB 1:400	Atlas (Stockholm, Schweden)
anti-AKT	humanes AKT	Kaninchen	WB 1:1000	Cell Signaling – NEB (Frankfurt a. Main)
anti-phospho-AKT Ser473	humanes p(Ser473)-AKT	Kaninchen	WB 1:500	Cell Signaling – NEB (Frankfurt a. Main)
anti-c-Cbl (C-15)	humanes c-Cbl	Kaninchen	WB 1:1000 IF 1:200	Santa Cruz (Heidelberg)
anti-c-Cbl	humanes c-Cbl	Maus	IF 1:500	BD (Heidelberg)
anti-EEA1	humanes EEA1	Maus	IF 1:500	BD (Heidelberg)
anti-EGFR (1005)	humanes EGFR	Kaninchen	WB 1:300 IF 1:200	Santa Cruz (Heidelberg)
anti-EGFR (R-1)	humanes EGFR	Maus	IF 1:200	Santa Cruz (Heidelberg)
anti-GAPDH	Kaninchen Muskel-GAPDH	Maus	WB 1:10000	Abcam (Cambridge, UK)
anti-HA	Hämagglutinin des humanen Influenza-Virus	Kaninchen	IF 1:200	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
anti-HA	Hämagglutinin des humanen Influenza-Virus	Maus	IF 1:1000	Covance (München)
anti-LAMP-1	humanes Lamp1	Kaninchen	IF 1:400	Abcam (Cambridge, UK)
anti- α -Tubulin (Clone DM 1A)	humanes α -Tubulin	Maus	WB 1:10000	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Tab. 10: Übersicht über in dieser Arbeit verwendete Primärantikörper

Es jeweils der Name des Primärantikörpers, das erkannte Antigen, der Wirtsorganismus für die Herstellung des Antikörpers und dessen Hersteller bzw. Vertriebsfirma angegeben. Außerdem ist die jeweilige Verdünnung des Antikörpers für die Anwendung im Western-Blot (WB) und/oder in der Immunfluoreszenz (IF) angegeben.

1.8.2 Sekundärantikörper

Antikörper/ Toxin	Antigen/Toxin	Konjugat	hergestellt in	Verdünnung	Hersteller
AlexaFluor-488 Ziege-anti- Kaninchen	Kaninchen Immunglobuline	Alexa-Fluor- 488	Ziege	IF 1:1000	Molecular Probes (Karlsruhe)
AlexaFluor-488 Ziege-anti-Maus	Maus Immunglobuline	Alexa-Fluor- 488	Ziege	IF 1:1000	Molecular Probes (Karlsruhe)
AlexaFluor-546 Ziege-anti- Kaninchen	Kaninchen Immunglobuline	Alexa-Fluor- 546	Ziege	IF 1:1000	Molecular Probes (Karlsruhe)
AlexaFluor-546 Ziege-anti-Maus	Maus Immunglobuline	Alexa-Fluor- 546	Ziege	IF 1:1000	Molecular Probes (Karlsruhe)
ECL™ Esel-anti- Kaninchen-HRP	Kaninchen Immunglobulin G	Meerrettich- Peroxidase	Esel	WB 1:7000-25000	GE Healthcare (Freiburg)
ECL™ Schaf- anti-Maus-HRP	Maus Immunglobulin G	Meerrettich- Peroxidase	Schaf	WB 1:7000-10000	GE Healthcare (Freiburg)
anti-FLAGM2- Peroxidase	synthetisches FLAG-Peptid	Meerrettich- Peroxidase	Maus	WB 1:2000	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
anti-HA-HRP, High Affinity (3F10)	humanes Hämagglutinin	Meerrettich- Peroxidase	Ratte	WB 1:4000	Roche (Mannheim)
anti-V5-HRP	P/V-Protein des Paramyxovirus SV5	Meerrettich- Peroxidase	Maus	WB 1:5000 IF 1:1000	Invitrogen (Karlsruhe)

Tab. 11: Übersicht über in dieser Arbeit verwendete Sekundärantikörper

Angegeben sind die Namen der verwendeten Antikörper, die Antigene, die Antikörperkonjugate, die Wirtsorganismen und die Hersteller der Antikörper. Die in dieser Arbeit eingesetzten Verdünnungen für Western-Blot (WB) und Immunfluoreszenzen (IF) sind ebenfalls angegeben.

1.9 Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien

100 mm Polystyrol-Zellkulturschalen	Sarstedt (Nürnbrecht)
6-Loch-, 12-Loch- und 24-Loch-Zellkulturplatten	Sarstedt (Nürnbrecht)
Agarplatten	Greiner (Essen)
Autoklav	Tecnomara (Fernwald)
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
CO ₂ Water-Jacketed Inkubator	Nuaire™ US AUTOFLOW (USA)
Deckgläser	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Digitalkamera	OLYMPUS (Hamburg)
Drucker <i>Digital Graphic Printer</i>	SONY (Japan)
Filmentwickler <i>OPTIMAX X-Ray Film Processor</i>	Protec® (Oberstenfeld-Gronau)
Gelelektrophoresekammer	BioRad (München)
Heizblock <i>Dri-Block</i>	Techne (USA)
Inkubationsschüttler <i>Multitron</i>	Infors (Schweiz)
Kühlzentrifuge <i>5417R</i>	Eppendorf AG (Hamburg)
Kunststoff-Tubes (Falcon)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Laserscanmikroskop <i>DMIRE2</i>	Leica (Wetzlar)
Magnetrührer <i>RET basic</i>	IKA Labortechnik (Staufen i. Br.)
Objektträger	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
PCR-Cycler <i>PTC 200</i>	MJ Research, Inc. (USA)
PCR-Tubes (0,5 ml)	Biozym Diagnostik GmbH (Oldenburg)

Photometer <i>BioPhotometer</i>	Eppendorf AG (Hamburg)
PIPETBOY acu	IBS Integra Biosciences (Fernwald)
Pipetten <i>Finnpipetten</i>	Thermo Labsystems (Mannheim)
Röntgenfilme (<i>Cronex 5</i>)	Agfa (Berlin)
Semi-Dry <i>Fastblot B34</i>	Biometra (Göttingen)
Semi-Dry Elektroblotter <i>PerfectBlue</i>	Peqlab (Erlangen)
Spannungsgeber <i>Power Pac 300</i>	BioRad (München)
Spannungsgeber <i>Electrophoresis power supply ST305</i>	Life Technologies (Karlsruhe)
Spannungsgeber <i>Electrophoresis power supply PS3002</i>	Life Technologies (Karlsruhe)
Spannungsgeber <i>Standard Power Pack P25</i>	Biometra (Göttingen)
Sterilwerkbank <i>HERA safe Typ 12/2, 1995</i>	Heraeus (Hanau)
Sterilwerkbank <i>Lamin Air Instruments</i>	Heraeus (Hanau)
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf AG (Hamburg)
Tischzentrifuge <i>Biofuge Pico</i>	Heraeus (Hanau)
UV-Transilluminator	Bachofer (Reutlingen)
Vortex-Gerät <i>Vortex Genie 2 Heidolph Reex 2000</i>	Scientific Industries, INC. (USA)
Waage <i>Scout Pro</i>	Ohaus (Schweiz)
Wasserbad <i>GFL 1083</i>	GFL (Burgwedel)
Zentrifuge <i>Megafuge 1.0</i>	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge <i>Labofuge GL</i>	Heraeus (Hanau)

2. Molekularbiologische Methoden

2.1 Anzucht von Bakterien

Für die Anzucht von *E.coli* wurden für eine Minipräparation 2 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie, für eine Maxipräparation 200 ml LB-Medium mit der 2 ml-Vorkultur beimpft und über Nacht bei 220 Upm und 37°C im Inkubationsschüttler inkubiert.

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

Kompetente *E.coli*-Zellen (DH10B und K12C600) wurden nach der Calcium-Chlorid-Methode erzeugt. Dazu wurde eine Vorkultur aus 2 ml ψ B-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 200 Upm geschüttelt. Mit einem ml dieser Vorkultur wurden wiederum 100 ml ψ B-Medium beimpft und so lange kultiviert bis eine optische Dichte bei 550 nm (OD_{550}) von 0,3 – 0,4 erreicht war. Von dieser Kultur wurden 5 ml in 100 ml ψ B-Medium verdünnt und erneut bis zu einer OD_{550} von 0,3 – 0,4 kultiviert und anschließend für 5 min in Eiswasser abgekühlt. Die Kultur wurde in vorgekühlte Falcons überführt und bei 5°C für 8 min bei 1000 g zentrifugiert. Die Permeabilität der bakteriellen Zellmembranen für Fremd-DNA wurde durch Resuspension in 15 ml eiskaltem TfBI-Puffer, 30-minütiger Inkubation auf Eiswasser, einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 5°C für 8 min bei 1000 g und abschließender Aufnahme in 2 ml eiskaltem TfBII stark erhöht. Die erhaltenen kompetenten Zellen wurden in 200 μ l-Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

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

Die kompetenten *E.coli* wurden auf Eis aufgetaut und 100 μ l der Suspension mit ca. 100 ng Plasmid-DNA versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde für die optimale Aufnahme der DNA ein

Hitzeschock bei 42°C für 90 s durchgeführt. Nach 5-minütiger Abkühlung auf Eis wurden die Zellen mit 700 µl SOC-Medium versetzt, für 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf selektiven LB-Agarplatten ausgestrichen.

2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

2.4.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Für analytische Zwecke wurde Plasmid-DNA mittels Minipräparation auf Grundlage der alkalischen Lyse isoliert. Dazu wurden die Bakterien aus einer Übernachtskultur für 5 min bei 6800 g pelletiert und in 100 µl der Lösung I resuspendiert. Die basische Lyse der Zellen wurde durch die Zugabe von 200 µl Lösung II initiiert und nach 5-minütiger Inkubation durch Neutralisation mit 300 µl Lösung III gestoppt. Nach sorgfältigem Schütteln wurde die Suspension für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min bei 21000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Zentrifugationsröhrchen überführt und die darin enthaltene DNA mit 350 µl Isopropanol gefällt. Die gefällte DNA wurde bei 21000 g für 5 min abzentrifugiert und anschließend in 100 µl RNase A-haltigem TE-Puffer für 15 min bei 37°C inkubiert, um eventuell mitgefällte RNA abzubauen. Die gewonnene DNA-Lösung wurde durch Zugabe von 125 µl 88% Isopropanol/0,2 M KAc gereinigt. Nach 10-minütiger Inkubation wurde die DNA bei 21000 g für 5 min pelletiert und das getrocknete DNA-Pellet in 30-50 µl Aqua dest. gelöst.

2.4.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA zum Zwecke der Transfektion von eukaryotischen Zellen bedarf einer höheren Menge und einem höheren Reinheitsgrad als sie mithilfe der oben beschriebenen Minipräparation erzielt werden kann. In dieser Arbeit verwendete Plasmid-DNA wurde nach alkalischer Lyse durch Anionenaustausch-Chromatographie mit dem NucleoBond® Xtra Maxi Kit der Firma Macherey/Nagel gewonnen. Die gefällte DNA wurde in Aqua bidest. gelöst und bei -20°C gelagert.

2.5 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Zur Kontrolle der Qualität und der Quantität der isolierten DNA wurden Restriktionsanalysen durchgeführt. Restriktionsendonukleasen des Typs II erkennen spezifische, meist palindromische 4- bis 8-stellige Nukleotidsequenzen und hydrolysieren die Phosphorsäurediester-Bindungen der vorliegenden DNA in unmittelbarer Nähe zu dieser Erkennungssequenz. Es entstehen dabei enzymabhängig doppelsträngige, glatte (*blunt ends*) oder 3'- bzw. 5'-überhängende Enden (*sticky ends*). Die Hydrolyse der DNA wurde nach Angaben der jeweiligen Enzymhersteller Promega, NEB oder Fermentas durchgeführt. Dazu wurden pro Ansatz zu analytischen Zwecken ca. 0,1 – 1 µg und zu präparativen Zwecken 1 – 2 µg Plasmid-DNA und 0,5 – 1 U Enzym in einem Reaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt. Die Analyse der Restriktionsspaltung erfolgte in einer horizontalen Agarosegelelektrophorese.

2.6 Dephosphorylierung von 5'-Phosphat-DNA-Enden

Die Dephosphorylierung der durch Restriktionsenzyme gespaltenen Vektor-DNA verhindert die Rezirkularisierung des Plasmids und erhöht damit die *in-vitro*-Neukombination von DNA-Fragmenten. Es wurden eine alkalische Phosphatase aus Kälberdarm der Firma Roche und der zugehörige Reaktionspuffer nach Herstellerangaben verwendet.

2.7 Ligation von DNA

Für die Ligation von sowohl glatten als auch 3'- bzw. 5'-überhängenden Restriktionsenden wurde entweder die T4-DNA-Ligase oder die Quick Ligase der Firma NEB verwendet. Diese Enzyme knüpfen Phosphodiesterbindungen zwischen den 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen von freien DNA-Enden und ermöglichen so eine kovalente Verbindung von DNA-Fragmenten. Die durch Restriktionsenzyme linearisierte und anschließend aufgereinigte Vektor-DNA wurde zusammen mit einem 3- bis 5-fachen molaren Überschuss eines entsprechend geschnittenen DNA-Fragments vermengt und nach Angaben der Hersteller mit Ligase (1 U) und dem dazugehörigen Puffer inkubiert.

2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und PCR-vermittelte Mutagenese

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR – *polymerase chain reaction*) dient der spezifischen *in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten unter der Verwendung hitzestabiler DNA-Polymerasen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der zyklischen Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts, der von zwei Oligonukleotiden (Primern) flankiert wird. In dieser Arbeit wurde die PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten sowie zur Erzeugung von Punktmutationen in DNA-Konstrukten verwendet. Dabei wurden in der Regel 2-10 ng Template-DNA, je 10 pmol eines 5'- und 3'-Primers sowie 0,2 µl (1 U) Polymerase eingesetzt und diese mit 10x PCR Puffer, Desoxynukleotiden (2,5 mM je Nukleotid) und Aqua bidest. auf ein Reaktionsvolumen von 25 µl gebracht.

Nach der Denaturierung des PCR-Ansatzes (3 min, 95°C) wurden 30 Zyklen aus Denaturierung (30 s, 95°C), Anlagerung der Primer (*annealing*, 30 s, 48-68°C) und Polymerisation (Elongation, 1-4 min, 72°C) durchlaufen. Die Anlagerungstemperatur der Primer richtet sich dabei nach der Schmelztemperatur der vorliegenden Oligonukleotide und die Dauer der Elongation nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Templates, wobei DNA-Polymerasen 500 – 1000 Bp pro Minute polymerisieren können.

Für Klonierungen wurden DNA-Polymerasen mit 3'→5'-Exonuklease-Aktivität und somit Korrektoreigenschaft (*proofreading*) wie z.B. PfuULTRA™ HF- und Phusion™ DNA Polymerase, verwendet. Das gezielte Einführen von Punktmutationen in DNA-Sequenzen wurde durch PCR-vermittelte Mutagenese erreicht (Ito *et al.*, 1991). Dazu wurden zwei überlappende, etwa 35 Bp lange DNA-Fragmente in zwei getrennten PCR-Reaktionen mit spezifischen Oligonukleotiden, die die Basenaustausche aufwiesen, generiert. Die beiden erhaltenen PCR-Produkte enthielten nunmehr die gewünschte Mutation und wurden sodann nach Aufreinigung in einer weiteren PCR als Template eingesetzt (*Megaprime*-PCR). Jeweils 1 µl einer 1:10-Verdünnung der beiden PCR-Produkte sowie Puffer, dNTPs und Polymerase wurden in den Reaktionsansatz gegeben und einem Drei-Zyklus-

Programm unterworfen (Programm 1). Danach folgte die Zugabe der 5'- und 3'-Primer und das Durchlaufen von 19 weiteren Zyklen mit dem Ziel das Gesamtfragment zu amplifizieren (Programm 2). Das Produkt enthielt nun die gewünschte Punktmutation und konnte je nach Art der Klonierung per Restriktionsspaltung und Ligation oder mit Hilfe der TOPO® Cloning-Technologie in den Zielvektor überführt werden. Zur Überprüfung der Integrität der PCR-Produkte wurde die Plasmid-DNA sequenziert.

Megaprime PCR-Ansatz

1 µl PCR Produkt 1 → 1:10-Verdünnung
 1 µl PCR Produkt 2 → 1:10-Verdünnung
 0,5 µl dNTP's (10 pmol/µl)
 2,5 µl 10x PCR-Puffer
 0,2 µl Polymerase
 ad 25 µl Aqua bidest.

Programm 1:

1. 95°C / 3 min
 2. 95°C / 15 s
 3. 40°C / 20 s
 4. 72°C / 3-5 min
 5. *go to 2 / 2 times*
 6. end

Zugabe der Primer

(direkt in PCR Reaktion)
 +1 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
 +1 µl Primer 2 (10 pmol/µl)

Programm 2:

1. 95°C / 3 min
 2. 95°C / 15 s
 3. 55°C / 10 s
 4. 72°C / 4 min
 5. *go to 2 / 19 times*
 6. 72°C / 10 min
 7. end

2.9 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Darstellung von PCR-Produkten und der Auftrennung fragmentierter DNA. Die Laufstrecke eines Fragments im Agarosegel, das je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente einen Agarosegehalt von 0,8 – 1,5% (w/v) aufweist, ist dem Logarithmus seines Molekulargewichts umgekehrt proportional, d.h. kleinere Fragmente wandern schneller durch die Gelporen als größere. Da DNA aufgrund von Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat eine negative Gesamtladung aufweist, wandert DNA in einem angelegten elektrischen Feld von der Kathode zur Anode.

Für die Herstellung eines Agarosegels wurde zunächst die entsprechende Agarosemenge in 1x TBE-Puffer aufgekocht, anschließend auf etwa 50°C abgekühlt, in ein mit Probenkammern bestückten Gelschlitten gegossen und nach dem Auspolymerisieren in eine mit TBE befüllte Gelelektrophoresekammer gegeben und mit einer Mischung aus ¼ Volumen Ladepuffer (Orange G) und ¾ Volumen Probe beladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei ca. 140 V für eine Laufzeit von 60 min. Abschließend wurde das Gel in eine 0,05%-ige Ethidiumbromid-Lösung überführt und dort für mindestens 15 min angefärbt. Der in die große Furche der DNA interkalierende Farbstoff wurde anschließend durch Anregung mit UV-Licht (312 nm) auf einem Transilluminator-Tisch sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mit dem *DIGI CAM Digital Camera Control*-Programm.

2.10 Aufreinigung von PCR- und Restriktionsprodukten

Um in weiteren Arbeitsschritten störende Oligonukleotide, kleinere DNA-Fragmente und Enzymreste aus PCR- und Restriktionsprodukten zu entfernen, wurden die Produkte mithilfe des *Jetquick PCR Product Purification Spin Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.11 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden mit dem ABI Prism Dye Terminator Kit und dem ABI 16-Kapillar-Sequenzierer (ABI Prism[®] 3500 Genetic Analyzer) der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Das Prinzip dieser Reaktion beruht auf der Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977), wobei neben 2'-Desoxyribonukleotiden (dNTPs) auch fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) in die zyklische Sequenzierreaktion eines spezifischen PCR-Produktes eingesetzt werden. Wird während der Amplifizierungsreaktion ein solches ddNTP in den entstehenden DNA-Strang eingebaut, kommt es zum Abbruch der Sequenzierreaktion. Die so entstehenden DNA-Stränge sind aufgrund des zufälligen Einbaus von ddNTPs unterschiedlicher Länge und je nach Didesoxynukleotid mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert, der bei der nachfolgenden Kapillarelektrophorese mittels Laser detektiert wird. Daher kann aus der Größe der PCR-Fragmente und deren Fluoreszenzmarkierung das Sequenzchromatogramm einer Probe abgeleitet werden.

2.12 Klonierung mittels TOPO[®] Cloning-Technologie

Die TOPO[®]-Klonierungs-Technologie ist eine schnelle und effiziente Klonierungsstrategie, die der direkten Insertion eines PCR-Produkts in einen Plasmidvektor dient. Die TOPO-Technologie nutzt dabei die Eigenschaft der Topoisomerase I aus dem *Vaccinia Virus*, welche sowohl DNA spalten als auch ligieren kann. Sie bindet zunächst spezifisch an die doppelsträngige Vektor-DNA und spaltet das Phosphodiester-Rückgrat eines Strangs (Shuman, 1991), wobei ein einzelsträngiger 3'-Überhang entsteht. Dieses einzelsträngige Ende dringt in das doppelsträngige PCR-Produkt ein, ersetzt einen Teil des unteren Strangs und wird an das PCR-Produkt ligiert. Mithilfe dieser Reaktion kann u.a. ein sogenannter Eingangsvektor (*entry vector*) als Ausgangsvektor zur Klonierung eines bestimmten DNA-Fragments (Inserts) in verschiedene Zielvektoren (*destination vector*) des GATEWAY[™]-Systems generiert werden. Die TOPO-Cloning-Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers Invitrogen durchgeführt.

2.13 Klonierung mittels GATEWAY[™]-Technologie

Die GATEWAY[™]-Technologie ersetzt als universelle Klonierungsstrategie herkömmliches Klonieren über Restriktion und Ligation durch lokusspezifische Rekombinationsreaktionen. Grundlage dieser Technologie sind Eigenschaften des Bakteriophagen Lambda, welcher im Rahmen des lysogenen Zykluses in das Genom eines Bakteriums integrieren kann. Das zu klonierende DNA-Fragment wird von zwei spezifischen kurzen DNA-Sequenzen, den so genannten Att-Stellen (*attachment sites*),

flankiert. Das Einfügen des DNA-Fragments (Inserts) zwischen die Att-Stellen kann mittels herkömmlicher Klonierung (Restriktion und Ligation) oder mit Hilfe der TOPO-Technologie erfolgen. Der so entstandene Eingangsklon mit Insert wird in einer enzym-vermittelten LR-Reaktion mit einem Zielvektor mit äquivalenten Att-Stellen eingesetzt. Bei dieser Reaktion erfolgt eine Rekombination zwischen den Att-Stellen des Eingangsklons und des Zielvektors, sodass schließlich das Insert in den Zielvektor gelangt. Um einen gewöhnlichen Plasmidvektor in einen Gateway-kompatiblen Zielvektor zu überführen wird einfach eine Gateway-Leserahmen-Kassette (*Gateway Reading Frame Cassette*) mit Att-Stellen eingebaut. Die GATEWAY™-Reaktionen in dieser Arbeit wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.14 Quantifizierung von DNA mittels photometrischer Analyse

Die Quantifizierung von DNA erfolgte photometrisch im Spektralphotometer *BioPhotometer* der Firma Eppendorf durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm. Eine optische Dichte von 1 bei dieser Wellenlänge entspricht dabei einer DNA-Konzentration von ca. 50 µg/ml. Proteine zeigen im Gegensatz zu DNA ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, so dass der Quotient A der Absorption beider Wellenlängen ($A_{260/280}$) als ein Maß für die Reinheit der DNA angesehen werden kann. Der Quotient sollte für reine DNA zwischen 1,8 – 2,0 liegen.

3. Proteinbiochemische Methoden

3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Rattenhirn

Um die Interaktion zwischen neuronal exprimiertem α PIX- und c-Cbl nachzuweisen, wurden Proteine aus Rattenhirn isoliert. Dazu wurde das Gehirn einer ausgewachsenen Ratte entnommen, in einen vorgekühlten Glashomogenisator überführt und mit 5 ml eiskaltem KolP-Lysepuffer (+ Complete mini Proteaseinhibitoren, + 1 mM PMSF, + 0,7 µg/µl Pepstatin A) versetzt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Hirn mittels Glasstab homogenisiert bis eine breiige Konsistenz der Lösung erreicht war. Das Homogenat wurde in vorgekühlte Zentrifugationsröhrchen überführt und für weitere 20 min auf Eis inkubiert, um eine vollständige Lyse zu erzielen. Größere Gewebetrümmer wurden anschließend mittels Zentrifugation bei 6800 g für 10 min und 4°C entfernt. 500 µl des Überstandes wurden als Rohhirnlysat zurückbehalten und der restliche Überstand zur Gewinnung der zytosolischen Fraktion erneut zentrifugiert (21000 g, 10 min, 4°C). Der Überstand dieser Zentrifugation (zytosolische Fraktion) wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert

3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels der eindimensionalen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Um eine Trennung der Proteine nach ihrer Größe zu erreichen, wird als Trägermedium für das Gel Polyacrylamid, dessen Konzentration den Vernetzungsgrad des Gels bestimmt, verwendet.

Außerdem wird dem Proteingemisch SDS in sättigender Konzentration zugesetzt. SDS bewirkt zum einen eine Zerstörung aller nicht-kovalenten Wechselwirkungen und damit der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur nativer Proteine, zum anderen kommt es zur Ausbildung von SDS-Protein-Komplexen. Da SDS negativ geladen und die Proteine mit diesem gesättigt sind, wird die spezifische Ladung der Proteine vernachlässigbar und das Ladung/Masse-Verhältnis für jedes Protein annähernd gleich. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines speziellen Proteins im SDS-Gel wird damit durch dessen Molekulargewicht und durch die Porengröße des Gels bestimmt. Zur Gelelektrophorese wurde die Trenngel-Polyacrylamid-Lösung nach der unten angegebenen Rezeptur hergestellt, zwischen zwei Glasplatten in eine Minigel-Apparatur (BioRad) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach TEMED- und APS-katalysierter Polymerisation wurde das Isopropanol vollständig entfernt und ausgewaschen. Nachfolgend wurde auf das Trenngel ein Sammelgel gegossen und mit Probenkammern bestückt. Dieses dient der Fokussierung der SDS-Protein-Komplexe vor der eigentlichen Auftrennung im Trenngel. Die Proteinproben wurden mit 4x SDS-Probenpuffer (Lämmli-Puffer) versetzt, für 3 - 5 min bei 95°C aufgeköcht, zentrifugiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese in 1x SDS-Laufpuffer erfolgte bei 100 V durch das Sammelgel und bei 150 V durch das Trenngel. Neben den Proteinproben wurde zur Überprüfung der molekularen Masse der Proteine stets ein Proteinmassenstandard aufgetragen.

	Trenngel		Sammelgel
	12,5%	10%	5,0%
Aqua bidest. [ml]	3,3	4,2	3,9
4x Trenngelpuffer bzw. 4x Sammelgelpuffer [ml]	2,5	2,5	1,7
30% AA/BisAA (37,5:1) [ml]	4,2	3,4	1,2
TEMED [μ l]	6,3	6,3	6,3
10% APS (w/v) [μ l]	125	125	125

Tab. 12: Zusammensetzung von verschiedenen Trenn- und Sammelgelen

3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Test

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des BCATM-Protein Assay Kit der Firma Thermo Scientific. Dieser Test nutzt die Reduktion zweiwertiger Kupferionen zu einwertigen Kupferionen durch die Reaktion mit dem zu vermessenden Proteinlysate. Die Chelatisierung der entstehenden Cu⁺-Ionen mit Bicinchoninsäure- (BCA-) Molekülen führt zur Entstehung eines lila-farbenden Reaktionsprodukts, dessen Absorption sich bei 562 nm weitgehend linear zu der Proteinkonzentration verhält und photometrisch bestimmt werden kann. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Berechnung der Proteinkonzentrationen der gemessenen Proteinlysate diente die Eichkurve des Standardproteins BSA (Bovines Serum Albumin) mit verschiedenen bekannten Konzentrationen (100, 200, 400, 600, 800 und 1000 mg/ml).

3.4 Western-Blot

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Gelen erfolgte auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membran, wobei man sich die negative Ladung der SDS-Proteinkomplexe zunutze macht (Elektro-Blot). Zunächst wurde eine PVDF-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten, für 30 s in 100%-igem Methanol aktiviert, für 1 min in Aqua bidest. gewaschen und für 5 min in Transferpuffer inkubiert. Vier 1 mm dicke Whatman-Filterpapiere wurden ebenfalls auf Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer inkubiert. Die Polyacrylamidgele wurden aus der Gelelektrophoresekammer entnommen und kurz in Transferpuffer äquilibriert, um störende Salze zu entfernen. Das Western-Blot-Sandwich wurde folgendermaßen im Blotter luftblasenfrei aufgebaut (von unten nach oben):

- Anode
- zwei Whatman-Filterpapiere
- PVDF-Membran
- SDS-Gel
- zwei Whatman-Filterpapiere
- Kathode

Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte für ca. 50 min bei konstanter Stromstärke (3,5 mA/cm² Gelfläche). Danach wurden die auf der PVDF-Membran immobilisierten Proteine einer Immundetektion zugeführt.

3.5 Immunologische Detektion auf PVDF-Membranen immobilisierter Proteine

Die spezifische Detektion von auf PVDF-Membranen immobilisierten Proteinen beruht auf der Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes und die Bindung eines sekundären Antikörpers an diesen Komplex. Der zweite Antikörper ist mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert, welche in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) die Oxidation von Luminol katalysiert. Das instabile Intermediärprodukt dieser Reaktion befindet sich in einem angeregtem Zustand und fällt unter mit Röntgenfilmen detektierbarer Lichtemission in seinen Grundzustand zurück (Chemilumineszenz).

Nach dem Proteintransfer wurden zunächst freie Bindungskapazitäten auf der PVDF-Membran abgesättigt. Dies geschah je nach verwendeten Primärantikörper entweder mit 4% (w/v) Milchpulver in 1x TBST (für Antikörper von Cell Signaling Technology, Abcam, Roche und Sigma-Aldrich) oder mit 10% (w/v) Milchpulver in 1x PBST (für Antikörper von Invitrogen und Santa Cruz) für mindestens 30 min bei RT oder bei 4°C ü.N. Die Inkubation mit dem primären protein- oder peptidspezifischen Antikörper erfolgte wiederum je nach Antikörperhersteller in TBST/BSA, TBSTM oder PBSTM (siehe 1.4.2 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten – Western-Blot) über Nacht unter leichtem Schütteln bei 4°C. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Membran mit 1x TBST bzw. 1x PBST für je 10 min entfernt. Die Detektion des primären Antikörpers erfolgte mit einem gegen diesen gerichteten HRP-konjugierten Sekundärantikörper. Nach ca. 1 Stunde Inkubation bei RT wurde die Membran dreimal für je 10 min mit 1x TBST bzw. 1x PBST gewaschen. Abschließend wurde die Membran für ca. 3 min mit einer ECL-Substratlösung (ImmobilonTM Western – *Chemiluminescent HRP-substrate*) inkubiert und die entstehende

Chemilumineszenz durch Exposition der Membran auf Röntgenfilm sichtbar gemacht. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte in einem speziellen Entwicklergerät (X-Ray Film Processor). Falls an den Primärantikörper direkt HRP konjugiert war, konnte bereits nach Inkubation mit diesem und Waschen mit TBST bzw. PBST die Chemilumineszenz-Reaktion durchgeführt werden. Mittels Inkubation mit dem Restore™ Western-Blot Stripping Puffer oder mit 0,2 M NaOH für ca. 20 min konnten die Antikörper falls gewünscht von den auf der Membran immobilisierten Proteinen gelöst und anschließend eine erneute Immundetektion mit einem anderen Antikörper durchgeführt werden.

3.6 Koimmunpräzipitation

Eine Methode zum Nachweis und zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen stellt die Koimmunpräzipitation (KoIP) dar. In dieser Arbeit wurden KoIPs zum Nachweis der Interaktionen von endogenem α PIX mit endogenem c-Cbl genutzt, sowie zur Feststellung der für die Assoziation dieser Proteine verantwortlichen Aminosäuren. Desweiteren wurde diese Methode genutzt, um eine mögliche Ubiquitylierung von α PIX-Proteinen zu untersuchen.

Für die Koimmunpräzipitation wird zu einem angefertigten Zelllysat ein Antikörper gegeben, der spezifisch gegen ein Epitop eines der beiden zu untersuchenden Proteine (Protein X) gerichtet ist, also über seine F_{ab} -Region an dieses bindet. Dieser Antikörper (anti-Protein X) bindet gleichzeitig mittels seiner F_c -Region an speziell beschichtete Agarosekügelchen, welche ebenfalls zum Lysat zugefügt werden. Nach einer Inkubation erfolgt mittels Zentrifugation eine Sedimentation der Agarosekügelchen und damit des zu untersuchenden Proteins X. Interagiert ein Protein (Protein Y) mit Protein X, so wird dieses durch die Zentrifugation kosedimentiert und kann im Präzipitat durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde für den Nachweis der Interaktion ektopisch exprimierter Proteine das Ezview™ Rot-ANTI-HA-Affinitäts-Gel bzw. das Ezview™ Rot-ANTI-FLAG®M2-Affinitäts-Gel verwendet. Für Koimmunpräzipitationen endogener Proteine wurden Protein A-Agarosekügelchen und ein spezifischer Antikörper verwendet.

KoIP ektopisch exprimierter Proteine

Vorbehandlung der Agarosekügelchen

Pro Ansatz wurden 50 μ l der bereits mit anti-FLAG- bzw. anti-HA-Antikörper gekoppelten Agarosekügelchen in ein vorgekühltes Zentrifugationsröhrchen überführt und nach Zugabe von 500 μ l TBS und vorsichtigem Invertieren bei 8000 g und 4°C für 30 s sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und dieser Waschschrift zweimal wiederholt.

Zelllyse

Zellen ($1,2-2,5 \times 10^6$) wurden in 100 mm-Zellkulturschalen kultiviert und bei etwa 75%-iger Konfluenz mithilfe von Lipofectamin™ 2000 oder TurboFect™ *in vitro* Transfection Reagent transfiziert. 20-24 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf Eis einmal mit 10 ml eiskaltem 1x PBS+/+ gewaschen, in 1 ml Lysepuffer von der Zellkulturschale abgeschabt, durch Pipettieren homogenisiert und in ein vorgekühltes Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach ca. 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellhomogenate zur Abtrennung der Zelltrümmer und Zellkerne für ca. 10 min bei 4°C und 21000 g

abzentrifugiert. 75 µl des Überstandes wurden als Rohlysat zurückbehalten, mit 4x Lämmli-Puffer versetzt und bei -20°C weggefroren. Der restliche Überstand wurde für die Koimmunpräzipitation eingesetzt.

Koimmunpräzipitation

Der Überstand wurde zu den vorbehandelten Agarosekügelchen gegeben und für mind. 2 h oder ü.N. bei 4°C auf einem Überkoprotator (15-20 Upm) inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 1 min bei 8000 g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. 500 µl kaltes TBS wurden zum Sediment gegeben, dieses durch Invertieren vermischt, bei 8000 g für 30 s erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, wobei beim letzten Waschschrift der Überstand bis auf 20 µl abgezogen wurde. Das Präzipitat wurde mit 25 µl 4x Lämmli-Puffer versetzt und bei -20°C weggefroren. Abschließend wurde das Präzipitat zusammen mit dem Rohlysat mittels Western-Blot analysiert.

KoIP endogen exprimierter Proteine

Für diese Experimente wurde entweder die adhärente, Neuroglia-Zelllinie H4 oder Rattenhirnlysat verwendet.

Zellyse und Vorklärung des Lysats

H4-Zellen wurden pro Versuch jeweils in zwei 100 mm-Zellkulturschalen bis ca. 90 – 100% Konfluenz kultiviert und anschließend mit insgesamt 1,5 ml KoIP-Lysepuffer lysiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Lysate bei 21000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde vom Überstand 75 µl als Rohlysat abgenommen, mit Lämmli-Puffer versetzt und bei -20°C weggefroren. Um unspezifisch an die Agarosekügelchen bindene Proteine aus dem Lysat zu eliminieren, wurde zu dem restlichen Lysat 50 µl Protein A-Agarose gegeben. Nach ca. 60 min Inkubation bei 4°C auf einem Überkoprotator wurde der Ansatz bei 8000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues, vorgekühltes Zentrifugationsröhrchen gegeben.

Koimmunpräzipitation

Zum vorgeklärten Überstand wurde der spezifische Antikörper des zu präzipitierenden Proteins gegeben und der Ansatz für 60 min bei 4°C im Überkoprotator inkubiert. Um den entstehenden Antigen-Antikörper-Komplex zu präzipitieren, wurden sodann 50 µl Protein A-Agarose zum Ansatz gegeben und die Bindung der Antikörper-Protein-Komplexe an die Agarosekügelchen in einer dreistündigen Inkubation im Überkoprotator bei 4°C ermöglicht. Anschließend wurde der Ansatz bei 7400 g und 4°C für 60 s zentrifugiert und das Sediment wie oben beschrieben dreimalig mit 500 µl Lysepuffer gewaschen. Abschließend wurde das Präzipitat mit 4x Lämmli-Puffer versetzt und bei -20°C bis zur Analyse mittels Western-Blot weggefroren.

4. Zellbiologische Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die verwendeten Zelllinien wurden in Begasungsbrutschränken bei konstanten 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert und unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Werkbank bearbeitet. Für Experimente wurden alle Zelllinien als Adhäsionskulturen auf 100 mm-Zellkulturschalen bzw. für Immunfluoreszenzstudien auf Glasdeckgläschen in 12-Loch-Kulturplatten kultiviert.

Zelllinie	Medium	Zusätze
Flp-In TM -CHO	F12 (Ham)	10% FBS (v/v) 1% PenStrep (v/v) 100 µg/ml Zeocin (v/v)
stabil transfizierte Flp-In TM -CHO	F12 (Ham)	10% FBS (v/v) 1% PenStrep (v/v) 200 µg/ml Hygromycin (v/v)
COS-7	D-MEM	10% FBS (v/v) 1% PenStrep (v/v)
HEK-293	D-MEM	10% FBS (v/v) 1% PenStrep (v/v)
H4	D-MEM	10% FBS (v/v) 1% PenStrep (v/v)

Tab. 13: Für zellbiologische Experimente verwendete Zelllinien und dazugehörige Kulturmedien

Angegeben sind die Zelllinien, die zur Kultivierung verwendeten Medien und die jeweiligen Zusätze. Diese Zusammensetzungen werden im folgenden Vollmedium genannt. PenStrep, Penicillin/Streptomycin-Lösung.

4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden bei -150°C gelagert und bei Bedarf aufgetaut. Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst mittels TrypLETM Express von der Kulturschale gelöst und in Suspension gebracht. Die Trypsinreaktion wurde nach Ablösen der Zellen durch Zugabe von Vollmedium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für ca. 3 min bei 800 g und RT pelletiert und das Pellet zur Vermeidung von Eiskristallen in 4 ml eiskaltem Einfriermedium (Vollmedium + 10% DMSO [v/v]) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in 1,8 ml Kryoröhrchen (Nunc) aliquotiert, in einem Isopropanol-befüllten Einfrierbehälter ü.N. bei -80°C gelagert und anschließend bei -150°C weggefroren. Beim Auftauen wurden die gefrorenen Zellsuspensionen soweit aufgetaut, dass noch Eiskristalle sichtbar waren. Die Zellaliquots wurden sofort mit 10 ml vorgewärmtem Vollmedium vermischt, die Suspensionen bei 800 g und RT für 3 min zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 10 ml frischem Vollmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurden in eine Zellkulturschale gegeben und diese in einen Begasungsbrutschrank überführt.

4.1.3 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden zweimal wöchentlich bei einer Konfluenz von ca. 90% auf neue Kulturschalen überführt. Dazu wurde das Vollmedium abgesaugt, die Zellen zur Entfernung von im Medium

befindlichen Proteinen mit 5 ml 1x PBS gewaschen und durch Zugabe von 1 ml TrypLE™ Express von der Kulturschale gelöst. Nach Ablösen der Zellen wurden 9 ml frisches Vollmedium zugesetzt, um die Trypsinreaktion abzustoppen, und die Zellen sorgfältig durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen wurden diese in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:15 verdünnt und davon 10 ml in ein neues Kulturgefäß überführt.

4.1.4 Poly-L-Lysin-Beschichtung von Glasdeckgläschen

Für Immunfluoreszenz-Experimente wurden COS-7-Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Glasdeckgläschen (18 mm) in 12-Loch-Kultur-Platten kultiviert. Zur Beschichtung wurden die durch Abflammen sterilisierten Glasdeckgläschen in 12-Loch-Platten gelegt und mit je 1 ml einer Poly-L-Lysin-Lösung (100 µg/ml) überschichtet. Es folgte eine Inkubation für 1-3 h bei RT. Anschließend wurde die Lösung abgezogen und die beschichteten Deckgläschen zweimal mit sterilem Aqua bidest. gewaschen. Zur Lagerung bei 4°C wurde erneut steriles Aqua bidest. auf die Deckgläschen gegeben, um deren Austrocknung zu verhindern. Direkt vor Kultivierung der Zellen wurde das Aqua bidest. abgezogen und die COS-7-Zellen auf den beschichteten Glasdeckgläschen ausgesät.

4.1.5 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Die verwendeten Transfektionsmethoden mittels Lipofectamin™2000 (COS-7) oder TurboFect™ (HEK-293 und Flp-In™-CHO) beruhen auf dem Prinzip der Lipofektion. Bei diesen Transfektionsreagenzien handelt es sich um kationische Lipide, welche aufgrund der negativen Ladungseigenschaften von DNA durch ionische Wechselwirkung Lipid-DNA-Komplexe bilden. Da diese Komplexe von Zellen durch Endozytose aufgenommen werden, kann so eine gewünschte Plasmid-DNA in Zellen eingebracht werden. Das optimale Verhältnis von DNA zu Transfektionsreagenz wurde durch Tests auf ein Verhältnis von 1:2 (µg:µl) bestimmt.

Transfektion mit Lipofectamin™2000

COS-7-Zellen wurden am Vortag der Transfektion mittels Neubauerzählkammer gezählt und in einer Konzentration von $1,2 \times 10^6$ Zellen/100 mm-Zellkulturschale (bzw. 9×10^4 Zellen/12-Loch für IF) ausgesät. Am nächsten Tag wurden Transfektionslösung I (100-400 µl Optimem + 1-6 µg Plasmid-DNA) und Transfektionslösung II (100-400 µl Optimem + 2-12 µl Lipofectamin™2000) hergestellt, 5 min bei RT inkubiert, vermischt und für weitere 20-30 min bei RT inkubiert. Zwischenzeitlich wurden die zu transfizierenden Zellen mit 5 ml (bzw. 1 ml für IF) 1x PBS gewaschen und mit 3,2 ml (bzw. 0,8 ml für IF) vorgewärmtem Optimem überschichtet. Der Transfektionsansatz wurde sodann tröpfchenweise auf die Zellen gegeben, die Kulturschalen zur Verteilung der Lösung vorsichtig geschwenkt und bei 37°C und 5% CO₂ für ca. sechs Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium von der Kulturschale abgesaugt und je nach Experiment 10 ml (bzw. 1 ml für IF) Vollmedium oder 10 ml (bzw. 1 ml für IF) Hungermedium (D-MEM + 1% PenStrep + 0,1% FBS) zu den Zellen gegeben und für weitere 16-20 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Transfektion mit TurboFect™

Die HEK-293-Zellen und die stabilen Flp-In-CHO-Zelllinien wurden am Tag vor der Transfektion in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/100 mm-Kulturschale (bzw. $1,3 \times 10^5$ Zellen/12-Loch für IF) ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden zu 1 ml (bzw. 200 μ l für IF) Optimem 0,5-10 μ g Plasmid-DNA und 2-15 μ l TurboFect™ gegeben und dieser Ansatz für 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die zu transfizierenden Zellen mit 5 ml (bzw. 1 ml für IF) 1x PBS gewaschen und mit 9 ml (bzw. 0,8 ml für IF) vorgewärmtem Optimem überschichtet. Anschließend wurde tröpfchenweise der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 16-24 h Inkubationszeit im Begasungsbrutschrank wurden die transfizierten Zellen für die jeweiligen Experimente eingesetzt.

4.1.6 Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen mit dem Flp-In™ System

Für die Herstellung stabil transfizierter Zellen wurden Flp-In™-CHO-Zellen aus dem Flp-In™ System der Firma Invitrogen genutzt. Diese Zellen verfügen über einen definierten Lokus im Genom, wo eine cDNA-Sequenz eingebaut und stabil exprimiert wird. Die cDNA-Sequenz wird dazu in einen Eingangsvektor kloniert, in dem sie von zwei kurzen Erkennungssequenzen flankiert wird. Diese dienen beim Einbau in das zelluläre Genom als Erkennungsstellen für eine Rekombination zwischen dem Vektor und dem definierten Lokus. Vermittelt wird die Rekombination durch die Flp-Rekombinase, welche zusätzlich zum cDNA-tragenden Vektor mithilfe eines Expressionsvektors in die Zellen transfiziert wird. Die Selektion auf transfizierte Klone erfolgte mittels einer miteingefügten Hygromycinresistenz. Der proteinbiochemische Nachweis der stabilen Expression der gewünschten cDNA-Sequenz ist über ein C-terminal gekoppeltes V5-Epitop möglich.

Die Flp-In™-CHO-Zellen wurden am Vortag der Transfektion in einer Konzentration von $1,2 \times 10^6$ Zellen/100 mm-Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wurden Transfektionslösung I (400 μ l Optimem + 1,2 μ g des gewünschten DNA-Plasmids + 9 μ g des Flp-Rekombinase-Vektors) und Transfektionslösung II (400 μ l Optimem + 20 μ l Lipofectamin™2000) hergestellt und eine Transfektion, wie oben für Lipofectamin™2000 beschrieben, durchgeführt. Nach sechsständiger Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsansatz wurde dieser abgesaugt und durch 10 ml F12-Vollmedium (ohne Zeocin und Hygromycin) ersetzt. Nach weiteren 24h Inkubation im Begasungsbrutschrank wurde das Vollmedium durch Selektionsmedium ersetzt (F12-Vollmedium + 100 μ g/ml Hygromycin). Um positive Klone besser selektieren zu können, wurden die Zellen am nächsten Tag trypsiniert und in 6-Loch-Kulturplatten umgesetzt. Nach zweiwöchiger Selektion mit steigender Hygromycinkonzentration (bis 200 μ g/ml) im Selektionsmedium wurden die verschiedenen Klonlinien mittels Immunblotting und anti-V5-Antikörper auf die stabile Expression der jeweils eingebrachten cDNA getestet. Als Kontrollzelllinie für weitere Versuche mit den stabil exprimierenden Zelllinien diente eine Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) stabil exprimierende Flp-In-CHO-Linie.

4.2 Immunfluoreszenz-Analysen

Mittels Immunfluoreszenz-Analysen (IF) wurden subzelluläre Lokalisation von Proteinen und die Kolo-kalisation zweier Proteine sowie die Aufnahme und das Trafficking von Fluoreszenz-markierten Liganden untersucht. Am Vortag der Transfektion bzw. bei Kolo-kalisationsstudien an endogen exprimierten Proteinen am Vortag der IF wurden H4- und Flp-InTM-CHO- Zellen auf sterilisierte Glasdeckgläschen und COS-7-Zellen auf sterile, beschichtete Deckgläschen ausgesät. Für die Aufnahme von Fluoreszenz-markierten Liganden wurden die Zellen mit 25 ng/ml EGF-Alexa Fluor 488 oder EGF-Alexa Fluor 555 für definierte Zeitspannen stimuliert. Für eine andere Fragestellung wurden die Zellen vor der IF-Analyse mit 25 ng/ml unmarkierten EGF stimuliert.

Das Zellmedium wurde abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit eiskaltem 1x PBS^{+/+} gewaschen. Dann wurden pro 12-Loch 500 µl Paraformaldehyd-Lösung zur Fixierung der Zellen dazugegeben und die Kulturplatten bei leichtem Schwenken für 10 min bei RT inkubiert. Die Fixierlösung wurde anschließend wieder entfernt und die Zellen dreimal für je 10 min mit 1x PBS^{+/+} unter Schwenken gewaschen. Für die Detektion endogen exprimierter Proteine in H4-Zellen wurde an dieser Stelle eine zusätzliche Permeabilisierung der Zellen mit eiskaltem Methanol eingebaut, diese erfolgte für 10 min bei -20°C durchgeführt. Anschließend wurden die H4-Zellen einmal für 5 min mit 1X PBS gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen nach der Fixierung für 30-60 min in Blockierlösung unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper verdünnt in der Antikörperlösung erfolgte in einer dunklen, feuchten Kammer für 2-3 h oder ü.N. Anschließend wurden die Zellen zunächst zweimal für 10 min mit einem Hochsalzpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Darauf folgte ein zweimaliges Waschen mit 1x PBS^{+/+} unter leichtem Schwenken für je 10 min. Die Zellen wurden für 1 h mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten sekundären Antikörpern in Antikörperlösung in der feuchten Dunkelkammer inkubiert. Dieser Antikörperlösung wurde außerdem DAPI zugesetzt; dieser Farbstoff bindet an AT-reiche Regionen der DNA und dient somit der Anfärbung des Zellkerns. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit 1x PBS^{+/+} für je 10 min und abschließend das Einbetten der Deckgläschen mit Mowiol-Einbettmedium auf einem Objektträger. Die Auswertung der Präparate erfolgte am konfokalen Laserscanmikroskop Leica *DMIRE2*, welches die Darstellung definierter Zellebenen ermöglicht, und der entsprechenden Leica TCS-Software (*TCS confocal software*).

Name	Absorptionmaximum	Emissionsmaximum
Alexa-Fluor [®] 488	495 nm	519 nm
Alexa-Fluor [®] 546	556 nm	573 nm
Alexa-Fluor [®] 555	555 nm	565 nm
DAPI	358 nm	461 nm
Texas [®] Rot	591 nm	608 nm

Tab. 14: Übersicht über verwendete Fluoreszenzfarbstoffe, deren Absorptions- und Emissionsmaxima

Angegeben ist die jeweilige Wellenlänge des Lichts in nm.

4.3 Biotinylierungsassays

Als Biotinylierung bezeichnet man eine biochemische Methode mittels der Biotin - ein kleines, wasserlösliches Vitamin - an eine Vielzahl von Makromolekülen wie z.B. Proteinen gebunden werden kann. Die geringe Größe des Biotins ermöglicht zum einen, dass ein Molekül bei Vorhandensein von entsprechenden Bindestellen mehrfach biotinyliert werden kann, zum anderen bleiben durch die Biotinbindung die biologischen und chemischen Eigenschaften des Moleküls praktisch unverändert. Für die Experimente in dieser Arbeit wurde das thiol-spaltbare und amin-reaktive Biotinylierungsreagenz Sulfo-NHS-SS-Biotin verwendet, welches aufgrund der Ladung des gebundenen Succinimidyl-Rings die Zellmembran nicht durchdringen kann. Somit reagiert die Estergruppe dieses Reagenzes, solange die Zellmembran intakt ist, nur mit den primären Aminogruppen von Proteinen an der Zelloberfläche, d.h. mit der α -Aminogruppe der ersten Aminosäure des Proteins sowie der ϵ -Aminogruppe von Lysinen in dem Protein. Um eine mit dieser Interaktion verbundene, sterische Hinderung des gebundenen Proteins zu reduzieren, werden in der Regel, wie auch in dieser Arbeit, Biotinmoleküle mit verlängerten Verbindungsarmen (*spacer arm*) verwendet (Biotin-crosslinker). Das biotinylierte Protein kann nach der Zellyse durch Präzipitation mit Streptavidin-konjugierten Agarosekügelchen (in dieser Arbeit: EZview™ Red Streptavidin Affinitätsgel) isoliert werden. Streptavidin ist ein aus *Streptomyces avidinii* gewonnenes 66 kDa schweres Homotetramer, welches mit einer Affinität von mehr als 10^{15} M^{-1} von Biotin gebunden wird und somit eine der stärksten natürlichen Bindungen darstellt.

Die Methode der Zelloberflächen-Biotinylierung wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung der Rolle von α PIX bei der Endozytose, beim Recycling und beim lysosomalen Abbau des EGF-Rezeptors (EGFR) genutzt. Aufgrund der geringen endogenen Expression des EGF-Rezeptors in den verwendeten Flp-In™-CHO-Zellen wurden am Vortag der Versuche die Zellen transient mit einem *Wildtyp-EGFR*-Konstrukt transfiziert.

4.3.1 Biotinylierung und Detektion von zelloberflächenständigen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGF-Rezeptor)

Vorbehandlung der Streptavidin-Agarosekügelchen

Pro Ansatz wurden 40 μl der mit Streptavidin-gekoppelten Agarosekügelchen mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein vorgekühltes Zentrifugationsröhrchen überführt und nach Zugabe von 1000 μl RIPA-Lysepuffer (+ Complete mini Proteaseinhibitor-Tabletten) und vorsichtigem Invertieren bei 8000 g und 4°C für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und dieser Waschschrift ein weiteres Mal wiederholt.

Biotinylierung

Zur Darstellung der an der Zelloberfläche lokalisierten EGF-Rezeptoren vor und nach der Stimulation mit EGF wurden die stabil α PIX^{WT}- bzw. zur Kontrolle CAT-exprimierenden CHO-Zellen (α PIX^{WT}-CHO; CAT-CHO) 48 h vor der Biotinylierung in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/100 mm-Zellkulturschale ausgesät. Nach ca. 24 h wurden die Zellen mit dem *EGFR*^{WT}-Konstrukt transfiziert

und ü.N. unter Serumentzug kultiviert. Weitere 18 h später wurden die Zellen zunächst einmal mit 1x PBS-/- gewaschen, anschließend mit vorgewärmten, 25 ng/ml EGF-haltigem Hungermedium versetzt und für verschiedene Zeitperioden bei 37°C in einem Begasungsbrutschrank inkubiert. Pro Zelllinie wurde außerdem je eine Zellkulturschale zurückbehalten und mit Hungermedium ohne EGF versetzt (= 0 min-Wert). Nach der Stimulationsphase wurden die Zellkulturschalen zum Abstoppen der EGF-Rezeptor-Endozytose auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal mit eiskaltem 1x HBSS gewaschen, um störende Proteine aus dem Medium zu eliminieren. Anschließend wurden die Zellen mit einer eiskalten, 0,5 mg/ml-haltigen Biotin-Lösung (in HBSS) überschichtet und die Schalen für 15 min unter leichtem Schwenken im Kühlraum bei 4°C inkubiert. Nach der Biotinbindung wurden die Zellen zweimalig mit 5 ml eiskaltem Wasch-HBSS auf Eis gewaschen, um ungebundenes Biotin zu entfernen.

Zellyse

Es folgte ein Waschschrift mit 5 ml eiskaltem 1x PBS+/, die Lyse der Zellen in 1 ml RIPA-Puffer (+ Complete mini Proteaseinhibitor-Tabletten) pro Schale durch Abschaben und das Überführen des Lysats in ein vorgekühltes Zentrifugationsröhrchen. Nach 10-minütiger Inkubation des Lysats auf Eis wurden Zelltrümmer bei 21000 g und 4°C für 10 min abzentrifugiert.

Präzipitation mit Streptavidin

Vom Zentrifugationsüberstand wurden 75 µl als Rohlysat zurückbehalten, mit Lämmli-Puffer versetzt und bei -20°C weggefroren. Der Rest des Überstandes wurde auf die vorbehandelten Streptavidin-Agarosekügelchen gegeben und für mind. 2 h oder ü.N. bei 4°C auf einem Überkoprotator (15-20 Upm) inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 1 min bei 7600 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, zu dem Sediment 500 µl RIPA-Puffer gegeben und der Ansatz durch Invertieren vermischt. Nun wurde dieser bei 7600 g und 4°C für 30 s zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Nach einer Wiederholung des Waschschrifts mit 500 µl RIPA-Puffer und der Zentrifugation wurde der Überstand wiederum vollständig abgenommen und frische 20 µl RIPA-Puffer und 30 µl Lämmli-Puffer zu dem Sediment gegeben. Der Mix wurde durch Vortexen vermischt und das Präzipitat bis zur Analyse mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immundetektion bei -20°C gelagert.

4.3.2 Biotinylierung von zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren und Quantifizierung der EGF-Rezeptor-Endozytose

Die Bestimmung der EGF-Rezeptor-Endozytoserate erfolgte mittels Quantifizierung der internalisierten, biotinylierten Rezeptoren nach EGF-Stimulation. Für diese Versuche wurden die Kontrollzelllinie CAT-CHO und die stabil $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -, $\alpha\text{PIX}^{\text{W197K}}$ - sowie $\alpha\text{PIX}^{\text{GEF}}$ -exprimierenden CHO-Zelllinien verwendet.

Vorbehandlung der Streptavidin-Agarosekügelchen

Siehe Material & Methoden, 4.3.1 *Biotinylierung und Detektion von zelloberflächenständigen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGF-Rezeptor)*

Biotinylierung

Die am Vortag mit $EGFR^{WT}$ -Konstrukten transfizierten Zellen wurden auf Eis gestellt und dreimal mit 5 ml eiskaltem HBSS gewaschen, um störende, auf den Zellen verbliebene Proteine aus dem Medium zu entfernen. Die Biotinylierung der an der Zelloberfläche befindlichen EGF-Rezeptoren erfolgte mit einer 0,5 mg/ml-haltigen Biotin-Lösung (in HBSS) für 15 min unter leichtem Schwenken im Kühlraum. Anschließend wurden die Zellkulturschalen wieder auf Eis gestellt, um die Endozytose des biotinylierten Rezeptors zu vermeiden. Die Zellen wurden dreimal zur Entfernung von ungebundenem Biotin mit 5 ml eiskaltem Wasch-HBSS gewaschen.

Endozytose

Um die Endozytose von membrangebundenen, biotinylierten EGF-Rezeptoren zu induzieren, wurden die Zellen mit 37°C-warmem 25 ng/ml EGF-haltigen F12-Hungermedium versetzt, für definierte Zeitperioden in einem Begasungsbrutschrank inkubiert und nach der jeweiligen Stimulationsperiode direkt auf Eis gestellt, um eine weitere Endozytose zu stoppen. Die Zellen wurden anschließend einem zweimaligen 25-minütigen Waschschrift mit 5 ml Glutathion-Puffer bei 4°C und Schwenken auf einem Horizontalschüttler unterzogen, um das an der Zelloberfläche verbliebene Biotin zu entfernen. Um die Effektivität der Glutathion-Waschschriffe zu überprüfen, blieb pro Zelllinie je eine Schale unstimuliert und wurde direkt nach der Biotinylierung und dem HBSS-Waschschrift mit dem Glutathion-Puffer behandelt.

Zellyse + Präzipitation mit Streptavidin

Siehe Material & Methoden, 4.3.1 Biotinylierung und Quantifizierung von zelloberflächenständigen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGF-Rezeptor)

Nach Zellyse, Streptavidin-Präzipitation, Western-Blotting und Immundetektion konnte sodann eine Aussage über Quantität der endozytierten EGF-Rezeptoren in der jeweiligen Zelllinie nach definiertem Stimulationszeitraum getätigt werden.

4.3.3 Biotinylierung von zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren und Quantifizierung des EGF-Rezeptors-Recyclings

Die Recyclingrate des EGF-Rezeptors wurde mittels Bestimmung der Menge an biotinylierten Rezeptoren nach Endozytose und anschließender Wiedererwärmung innerhalb der Zelle untersucht. Außerdem wurden die Degradierung sowie das Recycling des Rezeptors durch spezifische Reagenzien inhibiert, um eine Aussage über den Einfluss von α PIX auf verschiedene Etappen des EGF-Rezeptor-Trafficking treffen zu können. Für diese Experimente wurden die Kontrollzelllinie CAT-CHO und die stabil α PIX^{WT}-exprimierende CHO-Zelllinie verwendet.

Vorbehandlung der Streptavidin-Agarosekügelchen

Siehe Material & Methoden, 4.3.1 Biotinylierung und Detektion von zelloberflächenständigen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGF-Rezeptor)

Biotinylierung

Siehe Material & Methoden, 4.3.2 *Biotinylierung von zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren und Quantifizierung der EGF-Rezeptor-Endozytose*

Endozytose

Zur Induktion der EGF-Rezeptor-Internalisierung wurden die Zellen mit vorgewärmten, 25 ng/ml EGF-haltigem Hungermedium versetzt und für 30 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zum Stoppen der Endozytose direkt auf Eis gestellt. Das Biotin von den an der Zelloberfläche verbliebenen Rezeptoren wurde durch zweimaliges Waschen (je 25 min) mit je 5 ml eiskaltem Glutathion-Puffer im Kühlraum entfernt.

Recycling/Degradierung

Durch die Zugabe von vorgewärmten HBSS und die Inkubation der Zellen für definierte Zeitperioden bei 37°C wurden das Recycling und die Degradierung des EGF-Rezeptors ermöglicht. Anschließend wurden die in Gang gesetzten Prozesse durch den Transfer der Zellschalen auf Eis wieder gestoppt. Darauf folgend wurden die an die Zelloberfläche recycelten EGF-Rezeptoren durch Waschen mit Glutathion-Puffer (s.o.) debiotinyliert. Zusätzlich zu den wiedererwärmten Zellen wurde pro Zelllinie je eine Zellkulturschale sofort nach der Endozytose und der De-Biotinylierung lysiert. Die Menge der in dieser Fraktion detektierten, biotinylierten EGF-Rezeptoren wurde für die spätere quantitative Auswertung des Versuchs gleich 100% der recycelbaren, biotinylierten Rezeptoren gesetzt. Um den Einfluss von α PIX auf einzelne Schritte des EGF-Rezeptor-Traffickings genauer untersuchen zu können, wurde der o.g. Versuch unter Inhibition des Recyclings mithilfe von 0,3 mM Primaquin, welches zu allen erwärmten Lösungen gegeben wurde, wiederholt. Primaquin ist eine schwache Base, welche in Endosomen akkumuliert, deren pH neutralisiert und das Recycling von endocytierten Membranproteinen inhibiert (van Weert *et al.*, 1995).

Zellyse + Präzipitation mit Streptavidin

Siehe Material & Methoden, 4.3.1 *Biotinylierung und Detektion von zelloberflächenständigen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGF-Rezeptor)*

Nach der Zellyse und der Streptavidin-Präzipitation konnte mittels Immundetektion eine quantitative Aussage über die nach dem Wiedererwärmen in der Zelle vorliegenden biotinylierten EGF-Rezeptoren gemacht werden.

4.3.4 Biotinylierung der zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren von degradierungs-inhibierten Zellen und Quantifizierung der EGF-Rezeptor-Recyclings

Die Recyclingrate des EGF-Rezeptors wurde über die Abnahme der Menge an internalisierten EGF-Rezeptoren im Zellinneren nach dem periodischen Erwärmen der Zellen in Zwei-Minuten-Schritten ermittelt. Die verwendeten Zellen wurden zur Inhibition der EGF-Rezeptor-Degradierung 18 h nach der Transfektion mit dem *EGFR*^{WT}-Konstrukt für 24 h mit je 100 μ M der lysosomalen Inhibitoren

Leupeptin und Pepstatin A inkubiert. Diese Inhibition ermöglichte eine selektive Betrachtung des EGF-Rezeptor-Recyclings ohne die Einflüsse des Rezeptorabbaus. Verwendet wurden für die Experimente die Kontrollzelllinie CAT-CHO und die stabil α PIX^{WT}-exprimierende CHO-Zelllinie.

Vorbehandlung der Streptavidin-Agarosekügelchen

Siehe Material & Methoden, 4.3.1 *Biotinylierung und Detektion von zelloberflächenständigen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGF-Rezeptor)*

Biotinylierung

Siehe Material & Methoden, 4.3.2 *Biotinylierung von zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren und Quantifizierung der EGF-Rezeptor-Endozytose*

Endozytose

Siehe Material & Methoden, 4.3.3 *Biotinylierung von zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren und Quantifizierung des EGF-Rezeptor-Recyclings*

Recycling

Durch die Zugabe von vorgewärmten HBSS und die anschließende Inkubation der Zellen für genau zwei Minuten bei 37°C wurde das Recycling der EGF-Rezeptoren induziert. Diese kurze, zweiminütige Erwärmungsphase wurde gewählt, da in diesem Zeitraum lediglich das Recycling, nicht jedoch die Re-Internalisierung des Rezeptors möglich ist. Durch den Transfer der Zellschalen auf ein Eisbad wurde dieser Prozess gestoppt. Daran anschließend wurde das Biotin durch zwei 25-minütige Waschschriffe mit 5 ml eiskaltem Glutathion-Puffer (4°C, Horizontalschüttler) von den an die Zelloberfläche recycelten Rezeptoren entfernt und diese Zellen lysiert. Parallelkulturen wurden für bis zu vier weitere Zyklen bestehend aus Erwärmen und Waschen eingesetzt. Pro Zelllinie wurde je eine Schale direkt nach der Endozytose und den folgenden Waschschriffen lysiert und diente jeweils als 100%-Wert für die intrazelluläre Fraktion an biotinylierten, recycelbaren Rezeptoren.

Zellyse + Präzipitation mit Streptavidin

Siehe Material & Methoden, 4.3.1 *Biotinylierung und Detektion von zelloberflächenständigen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGF-Rezeptor)*

Nach der Zellyse und der Streptavidin-Präzipitation konnte mittels Immundetektion eine quantitative Aussage über die nach dem Recycling in der Zelle verbliebenen, biotinylierten EGF-Rezeptoren getätigt werden.

IV. Ergebnisse

1. Untersuchung der α PIX-Expression in verschiedenen Zelllinien mittels Western-Blot-Analyse

Humanes α PIX bzw. murines α PIX wird ubiquitär exprimiert, wobei die Expressionsstärke in den verschiedenen Gewebetypen sehr unterschiedlich ist (Manser *et al.* 1998; Kutsche *et al.*, 2000). Unlängst wurden in Maus-Gewebelysaten zwei verschiedene Isoformen des Proteins identifiziert: eine ca. 87 kDa schwere Isoform, die das *full-length* α PIX-Protein darstellt und am stärksten in Thymus und Milz exprimiert ist, und eine ca. 72 kDa-Isoform, deren Struktur noch unbekannt ist und welche hauptsächlich im Gehirn exprimiert wird (Kuchenbecker, 2006). Da in dieser Arbeit endogen α PIX-exprimierende Zelllinien verwendet werden sollten, wurden die humanen neuronalen Zelllinien SH-SY5Y und H4, die murinen neuronalen Zelllinien HT22 und Neuro-2A, die Fibroblasten-Zelllinien CHO-K1 und COS-7, sowie PC12-Zellen mittels Western-Blot und Immundetektion analysiert (Abb. 7). Die 72 kDa-Isoform von α PIX konnte in allen neuronalen Zelllinien (SH-SY5Y, H4, HT22 und Neuro-2A) detektiert werden. In H4-Zellen war überdies die 87 kDa α PIX-Isoform nachweisbar, wie auch in CHO-K1-Zellen. COS-7- und PC12-Zellen wiesen dagegen kein α PIX-Protein auf. Demnach ist die humane Neuroglia-Zelllinie H4 die einzige untersuchte Zelllinie, die sowohl die neurospezifische Isoform als auch die 87 kDa-Isoform von α PIX in detektierbarem Maße exprimiert. Weitere Versuche mit endogenem α PIX wurden aus diesem Grund mit der H4-Zelllinie durchgeführt.

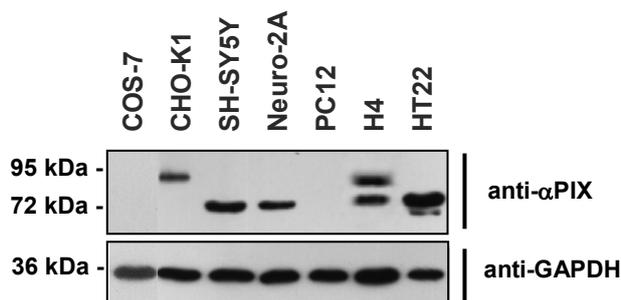


Abb. 7: Nachweis der α PIX-Proteinmenge in verschiedenen Zelllinien

COS-7-, CHO-K1-, SH-SY5Y-, Neuro-2A-, PC12-, H4- und HT22-Zellen wurden lysiert, und die Proteinkonzentration wurde auf 700 ng/ml eingestellt. Die endogene Expression beider α PIX-Isoformen (\sim 87 kDa und \sim 72 kDa) wurde mittels Western-Blot und Immundetektion mit einem anti- α PIX-Antikörper analysiert (oberer Blot). Als Ladekontrolle wurde die Proteinmenge des Haushaltsproteins Glycerinaldehyd-3'-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in den Zelllysaten mithilfe spezifischer Antikörper überprüft (unterer Blot). Neben den Blots sind die verwendeten Antikörper (rechts) und die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards (links) angegeben.

2. Identifizierung von c-Cbl als Interaktionspartner von α PIX und Bestimmung der dafür essentiellen Proteinmotive und Aminosäuren

Es wurde berichtet, dass β PIX und auch α PIX Protein-Protein-Bindepartner von Mitgliedern der Cbl (*Casitas b-lineage lymphoma*)-Proteinfamilie sind. Dabei wurde eine direkte Assoziation von c-Cbl bzw. Cbl-b mit β PIX nachgewiesen; hingegen konnte eine Interaktion von α PIX mit Cbl-b nur aufgrund der kompetitiven Hemmung der bekannten PIX-PAK-Interaktion durch Cbl-b-Expression konstatiert werden (Flanders *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003). Da die Ubiquitin-E3-Ligase c-Cbl das Trafficking von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) wie dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-Rezeptor) reguliert und in dieser Arbeit der Einfluss von α PIX auf das RTK-Trafficking analysiert werden sollte, wurde zunächst eine Assoziation zwischen c-Cbl und α PIX mithilfe verschiedener biochemischer und zellbiologischer Techniken untersucht.

2.1 Koimmunpräzipitation von endogenem α PIX mit endogenem c-Cbl aus der humanen Neuroglia-Zelllinie H4

Der Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion lässt sich mithilfe der Koimmunpräzipitation (KoIP) erbringen. Mithilfe der spezifischen Bindung eines Antikörpers an sein Antigen einerseits und der Bindung der F_C -Region dieses Antikörpers an speziell behandelte Agarosekügelchen andererseits wird das Antigen (Protein) aus einem Zellysate präzipitiert. Unter günstigen Pufferbedingungen lässt sich ein mit dem präzipitierten Protein interagierendes Protein ko-präzipitieren und anschließend mithilfe spezifischer Antikörper im Präzipitat nachweisen. Als Voraussetzung dafür gilt, dass für die beiden zu untersuchenden Proteine spezifische Antikörper existieren und beide Proteine in einer Zelllinie oder einem Gewebe in detektierbarer Menge exprimiert werden.

Da die H4-Zellen sowohl α PIX (siehe Kapitel 1) als auch c-Cbl endogen exprimieren (Daten nicht gezeigt), wurden diese Zellen für die KoIPs verwendet. Nach der Zellyse der zu 90% konfluenten Zellrasen erfolgte die Präzipitation von c-Cbl mit einem spezifischen Antikörper, generiert in Kaninchen, und Protein A-Agarosekügelchen. Um unspezifische Bindungen des c-Cbl-Antikörpers, z.B. durch seine F_C -Region, abschätzen zu können, wurden Immunglobuline (IgG) aus dem Serum eines unbehandelten Kaninchens als Negativkontrolle eingesetzt. Nach der Präzipitation mit dem spezifischen c-Cbl-Antikörper bzw. den Kontroll-IgGs wurde jeweils ein Teil des Überstandes zurückbehalten und dieser zusätzlich zu den Rohlysaten und Präzipitaten mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mithilfe von Western-Blots analysiert (Abb. 8). Die Immundetektion mittels c-Cbl-Antikörper zeigte: a) c-Cbl ist in den

Rohlysaten exprimiert (Abb. 8 unten, Spuren 1 und 4), b) die Präzipitation von c-Cbl war erfolgreich (Abb. 8 unten, Spur 6) und c) die Präzipitation mittels c-Cbl-Antikörper ist spezifisch, da einerseits c-Cbl im Kaninchen IgG-Präzipitat nicht angereichert ist (Abb. 8 unten, Spur 3) und andererseits eine deutlich geringere c-Cbl-Proteinmenge im Überstand des c-Cbl-Präzipitats im Vergleich zum Überstand des Kontroll-Präzipitats vorhanden ist (Abb. 8 unten, Spuren 2 und 5). Durch Immundetektion mit α PIX-spezifischen Antikörpern konnte die 87 kDa-Isoform von α PIX in den Rohlysaten und Überständen der Präzipitationen nachgewiesen werden (Abb. 8 oben, Spuren 1, 2, 4 und 5). Darüber hinaus war die 87 kDa α PIX-Isoform im c-Cbl- jedoch nicht im Kontroll-Präzipitat detektierbar (Abb. 8 oben, Spuren 3 und 6; Abb. 8, Zusatz-Western-Blot rechts). Demzufolge konnte die größere α PIX-Isoform mit c-Cbl ko-präzipitiert werden, was auf eine Interaktion beider Proteine hindeutet. Aufgrund einer markanten, unspezifischen Bande im Bereich des Molekulargewichts der kleineren Isoform von α PIX konnte jedoch nicht die 72 kDa-Isoform von α PIX detektiert werden (Abb. 8 oben, Spuren 1 - 6).

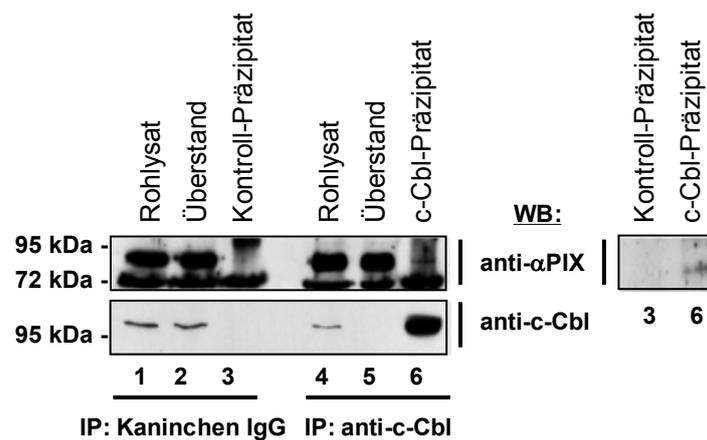


Abb. 8: Darstellung der Interaktion von α PIX mit c-Cbl durch Koimmunpräzipitation und Western-Blot

H4-Zellen wurden lysiert und eine Koimmunpräzipitation mit einem c-Cbl-spezifischen Antikörper wurde durchgeführt. Als Kontrolle dienten aufgereinigte IgGs von unbehandelten Kaninchen. Rohlysate (Spuren 1 und 4), Überstände (Spuren 2 und 5) sowie Präzipitate (Spuren 3 und 6) sowohl der c-Cbl-spezifischen als auch der Kontrollpräzipitation wurden nach Western-Blot mittels Immundetektion mit anti-c-Cbl- (unten) und anti- α PIX-Antikörpern (oben) analysiert. Der rechte Western-Blot zeigt die Detektion von α PIX in den nebeneinander aufgetragenen Kontroll- und c-Cbl-Präzipitaten. Links sind die Molekulargewichte des Proteinstandards angegeben. IgG, Immunglobulin G; IP, Immunpräzipitation; WB, Western-Blot.

2.2 Koimmunpräzipitation von endogenem α PIX und endogenem c-Cbl aus Rattenhirnlysaten

Zur Untersuchung einer möglichen Interaktion von c-Cbl mit der 72 kDa-Isoform von α PIX, welche hauptsächlich im neuronalen Gewebe exprimiert wird, wurde für weitere Koimmunpräzipitationsversuche ein Rattenhirnlysate (Proteinkonzentration $\sim 500 \mu\text{g/ml}$) hergestellt.

Zunächst wurde in diesen Lysaten die Expression von c-Cbl und der 72 kDa α PIX-Isoform mittels Western-Blot nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Präzipitation von c-Cbl erfolgte mit einem in der Maus generierten spezifischen c-Cbl-Antikörper, als Kontrolle dienten aufgereinigte Immunglobuline einer unbehandelten Maus. In einem parallelen Ansatz wurden zur Immunpräzipitation α PIX-spezifische, im Kaninchen hergestellte Antikörper eingesetzt; zur Kontrolle dieser Präzipitation wurden die Immunglobuline eines unbehandelten Kaninchens verwendet. Nach Inkubation der Lysate mit dem jeweiligen Antikörper und Agarosekügelchen und darauf folgender Präzipitation wurden Aliquots der Präzipitat-überstände zurückbehalten und diese zusammen mit dem Hirnröhlysat und den Präzipitaten mittels Western-Blot analysiert (Abb. 9). Durch Immundetektion mit spezifischen α PIX-Antikörpern konnte die Expression der 72 kDa α PIX-Isoform im Hirnlysat und die erfolgreiche Immunpräzipitation des Proteins nachgewiesen werden (Abb. 9 oben, Spuren 1 und 7). Im gleichen Präzipitat konnte auch c-Cbl detektiert werden (Abb. 9 unten, Spur 7), was auf eine Protein-Protein-Interaktion zwischen α PIX und c-Cbl hindeutet. Dieses Ergebnis ist spezifisch, da im Kontrollansatz, der Präzipitation mit Kaninchen-Immunglobulinen, kein c-Cbl nachgewiesen werden konnte (Abb. 9 unten, Spur 6). Die Immundetektion mit c-Cbl-spezifischem Antikörper zeigt die Expression von c-Cbl und dessen Präzipitation im c-Cbl-Präzipitat (Abb. 9 unten, Spuren 1 und 5). Die kleine α PIX-Isoform konnte ebenfalls in diesem Präzipitat, nicht aber im Kontrollpräzipitat mit Maus-Immunglobulinen nachgewiesen werden (Abb. 9 oben, Spuren 4 und 5). Die Überstände der jeweiligen Präzipitationen zeigen, dass die KoIPs mit den spezifischen Antikörpern (anti- α PIX bzw. anti-c-Cbl) gegenüber den Präzipitationen mit den Immunglobulinen zu einer Reduktion der Protein-Gesamtmenge der zu präzipitierenden Proteine führten, was einen Hinweis auf die Spezifität der IPs darstellt. Demnach konnten sowohl mit dem α PIX-Antikörper als auch mit dem c-Cbl-Antikörper spezifisch c-Cbl bzw. α PIX aus Rattenhirnlysaten kopräzipitiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass neben der 87 kDa α PIX-Isoform auch die 72 kDa-Isoform von α PIX mit c-Cbl interagiert. Zusammengefasst konnte sowohl *in vitro* (Zellkultur) als auch *in vivo* (Rattenhirn) eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen gezeigt werden.

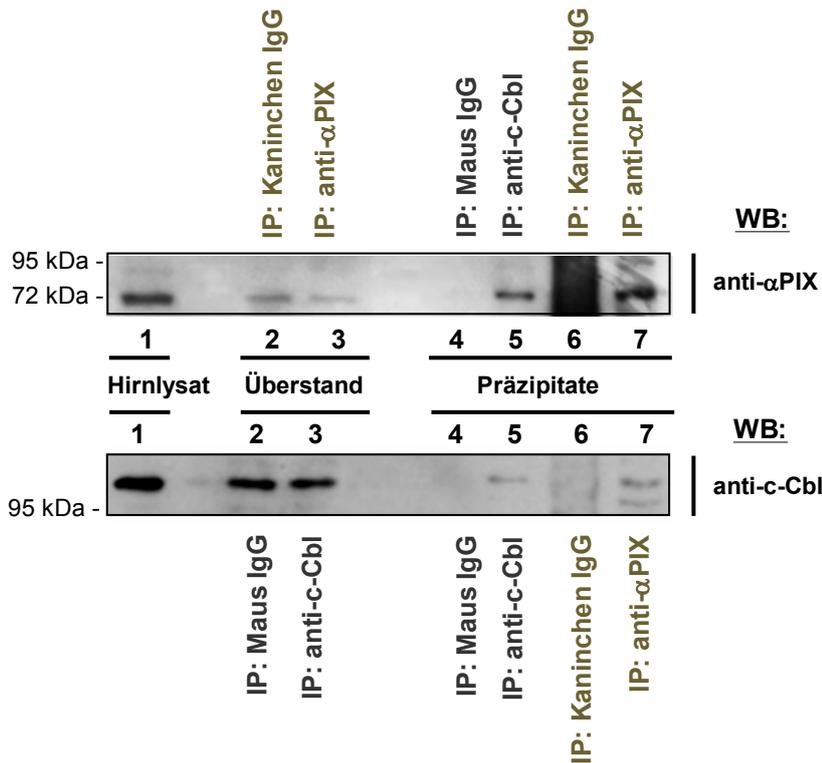


Abb. 9: Western-Blot-Analyse der Koimmunpräzipitationen von endogenem α PIX und endogenem c-Cbl aus Rattenhirnlysat

Von einem Rattenhirnlysat wurde jeweils 500 μ g Gesamtprotein pro KoIP eingesetzt. Die Präzipitationen erfolgten mit einem α PIX-Antikörper, Kaninchen Immunglobulinen zur Kontrolle, einem Antikörper gegen c-Cbl und Maus-Immunglobulinen wiederum zur Kontrolle. Hirnrohlysat (Spur 1), Überstände (Spuren 2 und 3) und Präzipitate (Spuren 4 – 7) wurden nach Western-Blot mittels Immunodetektion mit Antikörpern gegen α PIX (oben) bzw. c-Cbl (unten) analysiert. Die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards sind links neben den Blots angegeben. IP, Immunpräzipitation; WB, Western-Blot.

2.3 Identifizierung der α PIX-Bindedomäne für c-Cbl mithilfe von Koimmunpräzipitationen

α PIX und β PIX besitzen eine nahezu identische Domänenstruktur mit bis zu 63% identischer Aminosäuresequenz und sind damit hoch-homologe Proteine. Es war bereits bekannt, dass β PIX mittels der *src homology 3* (SH3)-Domäne sowohl mit c-Cbl als auch mit dessen homologen Protein Cbl-b interagiert (Flanders *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2006). Die hohe Aminosäuresequenzhomologie der SH3-Domänen von α PIX und β PIX legt nahe, dass auch α PIX über diese Domäne mit c-Cbl interagiert. Um die α PIX::c-Cbl-Interaktion näher zu charakterisieren, wurden noch vor Beginn dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Kerstin Kutsche verschiedene α PIX-Expressionskonstrukte, u.a. ein Wildtyp- α PIX-Konstrukt (α PIX^{WT}), ein α PIX-Konstrukt mit deletierter SH3- (α PIX ^{Δ SH3}) und ein α PIX-Konstrukt mit deletierter *coiled-coil* (CC-) Domäne (α PIX ^{Δ CC}) generiert (Abb. 10). Die CC-Domäne dient neben der Homodimerisierung von α PIX-Proteinen, welche vor allem für die Rac1-spezifische GEF-Aktivität von α PIX von Bedeutung ist (Feng *et al.*, 2004; Baird *et al.*, 2005), auch der Heterodimerisierung von α PIX- und β PIX-Proteinen (Koh *et al.*, 2001). Als Grundlage für die Klonierung der verschiedenen α PIX-Konstrukte diente die cDNA für die 87 kDa-Isoform von α PIX. In Abbildung 10 ist die Proteindomänenstruktur der hier verwendeten α PIX-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp- α PIX dargestellt.

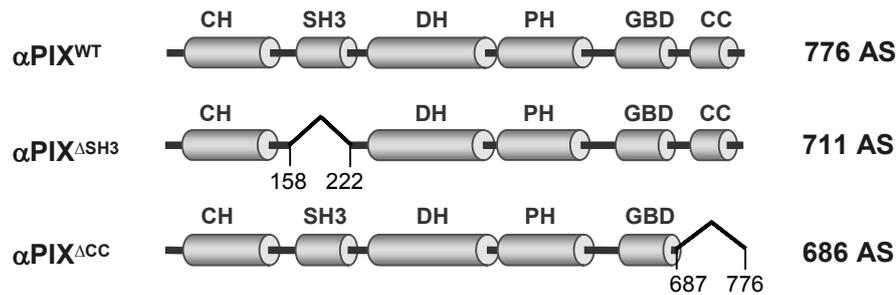


Abb. 10: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$, $\alpha\text{PIX}^{\Delta\text{SH3}}$ und $\alpha\text{PIX}^{\Delta\text{CC}}$

Die Domänen sind als graue Zylinder dargestellt. Bei den Deletionsmutanten ist der deletierte Bereich durch ein offenes Dreieck dargestellt, darunter ist der Bereich der deletierten Aminosäuren angegeben. Rechts neben der jeweiligen Domänenstruktur ist die Gesamtlänge des Proteins in Aminosäuren (AS) angegeben. CH: *calponin homology*, SH3: *Src homology 3*, DH: *Dbl homology*, PH: *pleckstrin homology*, GBD: *GIT1-binding domain*, CC: *coiled-coil*.

Ob αPIX direkt mittels SH3-Domäne mit c-Cbl interagiert oder diese Interaktion möglicherweise über eine $\alpha\text{PIX}::\beta\text{PIX}$ -Heterodimerisierung und damit indirekt über βPIX vermittelt wird, wurde mit Hilfe von Koimmunpräzipitationen überprüft. Dazu wurden in COS-7-Zellen c-Cbl^{WT} und je eine in Abbildung 10 dargestellte, mit HA-Epitop versehene αPIX -Variante ko-exprimiert und nach der Zellyse eine KoIP mittels anti-HA-Antikörper-konjugierter Agarosekügelchen durchgeführt. Als negative Kontrolle dienten COS-7-Zellen, welche mit dem HA-Leervektor (HA-Vektor) und einem c-Cbl^{WT}-Konstrukt kotransfiziert wurden. Die erhaltenen Rohlysate und Präzipitate wurden nach SDS-PAGE mittels Western-Blot und Immundetektion analysiert. Alle HA-getaggten αPIX -Proteinvarianten konnten in den Rohlysaten und den Präzipitaten nachgewiesen werden (Abb. 11, erster und dritter Blot von oben, Spuren 2 – 4). Ektopisch exprimiertes c-Cbl wurde in allen Rohlysaten detektiert (Abb. 11, zweiter Blot von unten, Spuren 1 – 4). In den Präzipitaten konnte c-Cbl jedoch nur bei Koexpression von $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ bzw. $\alpha\text{PIX}^{\Delta\text{CC}}$ (Abb. 11, zweiter Blot von oben, Spuren 2 und 3), nicht aber bei $\alpha\text{PIX}^{\Delta\text{SH3}}$ -Koexpression und im Kontrollansatz (HA-Vektor) nachgewiesen werden (Abb. 11, zweiter Blot von oben, Spuren 1 und 4). Diese Ergebnisse bestätigen zum einen die Resultate aus den Koimmunpräzipitationen von endogenen αPIX - und Cbl-Proteinen, zum anderen scheint die CC-Domäne für die $\alpha\text{PIX}::\text{c-Cbl}$ -Assoziation unbedeutend zu sein. Daraus kann man schließen, dass diese Interaktion nicht durch eine CC-Domänen-abhängige $\alpha\text{PIX}::\beta\text{PIX}$ -Heterodimerisierung oder $\alpha\text{PIX}::\alpha\text{PIX}$ -Homodimerisierung vermittelt wird. Da c-Cbl jedoch nicht mit $\alpha\text{PIX}^{\Delta\text{SH3}}$ ko-präzipitiert werden konnte, lässt dies vermuten, dass αPIX über die SH3-Domäne mit c-Cbl interagiert.

Um diese Annahme experimentell zu bestätigen, wurde durch PCR-vermittelte Mutagenese eine Punktmutation an der entsprechenden Position der α PIX-cDNA eingefügt und die mutierte Kodierregion mittels Restriktion und Ligation in den pMT2SM-HA-Vektor kloniert (HA- α PIX^{W197K}) (Abb. 13). Die eingeführte Mutation führt auf Proteinebene zum Austausch des unpolaren Tryptophans durch die basische Aminosäure Lysin. Zur genauen Charakterisierung der α PIX::c-Cbl-Assoziation wurden außerdem, mithilfe der PCR-vermittelten Mutagenese, zwei c-Cbl-Expressionskonstrukte (im Vektor pcDNA3-DEST) mit Mutationen erzeugt. Die erste Mutation führt zum Austausch des Arginins an Aminosäureposition 829 im PKPFPR-Motiv gegen ein Alanin. Das entsprechende mutante Protein c-Cbl^{R829A} kann nicht mehr mit β PIX interagieren (Schmidt *et al.*, 2006), sodass es wahrscheinlich erscheint, dass auch die Interaktion mit der SH3-Domäne von α PIX beeinträchtigt ist. Um zu testen, ob die Aktivität von c-Cbl als Ubiquitin-Ligase Einfluss auf die Interaktion von α PIX und c-Cbl hat, wurde ein c-Cbl-Expressionskonstrukt (pcDNA3-DEST-c-Cbl^{C381A}) hergestellt, das auf Proteinebene zum Austausch eines für die Ligase-Funktion essentielles Cysteins in der Ringdomäne durch ein Alanin führt (Waterman *et al.*, 1999). Die Abbildung 13 zeigt grafisch die Position der in α PIX und c-Cbl veränderten Aminosäuren.

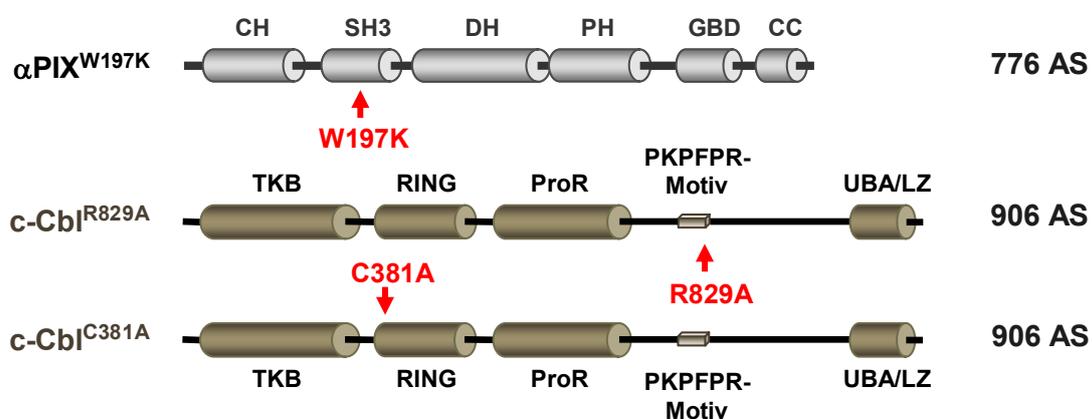


Abb. 13: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von α PIX^{W197K}, c-Cbl^{R829A} und c-Cbl^{C381A}

Die Domänen von α PIX sind als graue, die von c-Cbl als braune Zylinder dargestellt. Die Bezeichnung der Domänen ist über bzw. unter den Zylindern angegeben. Eine konservierte Peptidsequenz, das PKPFPR-Motiv, ist als brauner Block gekennzeichnet. Die Positionen der veränderten Aminosäuren sind durch rote Pfeile markiert, der jeweilige Aminosäureaustausch ist darunter bzw. darüber angegeben. Bei α PIX wurde das Tryptophan (W) an Position 197 in der SH3-Domäne durch ein Lysin (K) ersetzt (W197K). Bei c-Cbl wurde das Cystein (C) an Aminosäureposition 381 in der Ringdomäne durch Alanin (A) (C381A) bzw. das Arginin (R) an Position 829 im PKPFPR-Motiv durch Alanin (A) ersetzt (R829A). Links neben der Domänenstruktur ist der Name der Mutante, rechts daneben die Gesamtanzahl der Aminosäuren angegeben. CH: *calponin homology*, SH3: *Src homology 3*, DH: *Dbl homology*, PH: *pleckstrin homology*, GBD: *GIT1-binding domain*, CC: *coiled-coil*, TKB: *tyrosine kinase binding*, ProR: *proline rich*, UBA/LZ: *ubiquitin-associated/leucine zipper*.

Die Interaktion zwischen α PIX und c-Cbl wurde mittels Koimmunpräzipitation näher charakterisiert (Abb. 14). Dazu wurden HA-fusionierte α PIX-Varianten präzipitiert und die

Präzipitate auf Vorhandensein von c-Cbl untersucht. Wie in Spur 2 der Abbildung 14 ersichtlich, konnte im HA- α PIX^{W197K}-Präzipitat kein c-Cbl nachgewiesen werden (Abb. 14, zweiter Blot von oben). Mit dem α PIX-Wildtyp-Protein (α PIX^{WT}) konnte c-Cbl^{C381A}, nicht jedoch c-Cbl^{R829A} kopräzipitiert werden (Abb. 14, Präzipitate, Spuren 3 und 4). Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass das Tryptophan W197 in der SH3-Domäne von α PIX sowie der Argininrest an Aminosäureposition 829 von c-Cbl essentiell für die α PIX::c-Cbl-Interaktion sind. Darüber hinaus scheint die Aktivität von c-Cbl als Ubiquitin-verknüpfende Ligase für die α PIX::c-Cbl-Assoziation unbedeutend zu sein.

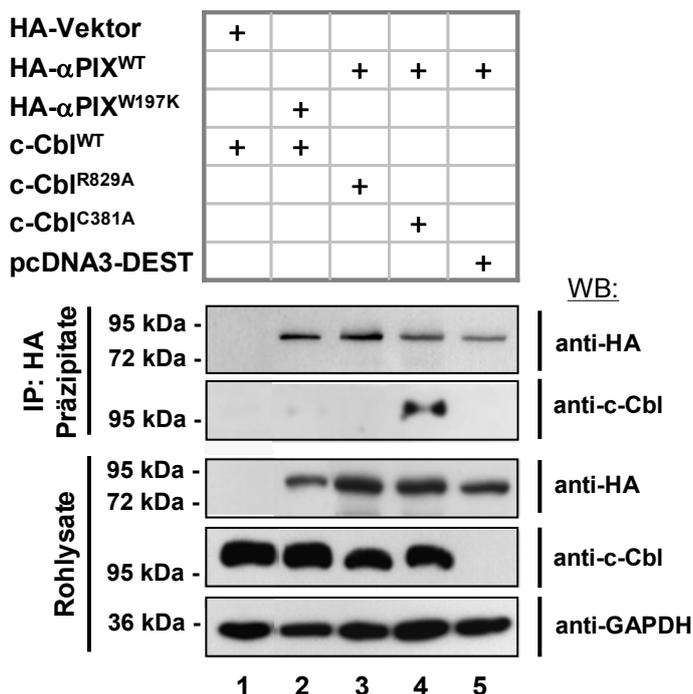


Abb. 14: Darstellung der Interaktion zwischen verschiedenen ektopisch exprimierten c-Cbl- und α PIX-Proteinvarianten mittels KoIP und Western-Blot

COS-7-Zellen wurden mit verschiedenen c-Cbl und α PIX-Expressionskonstrukten wie in der Abbildung links angegeben ko-transfiziert. Als Negativkontrollen dienten Kotretransfektionen mit einem c-Cbl^{WT}-Konstrukt und dem HA-Vektor (Spur 1) sowie mit dem HA- α PIX^{WT}-Konstrukt und dem pcDNA3-DEST-Vektor (Spur 5). Zelllysate wurden einer Präzipitation mit anti-HA-Antikörper konjugierten Agarosekügelchen unterzogen. Nach Western-Blot wurden die Rohlysate und Präzipitate mittels Immundetektion mit anti-HA-Antikörpern (erster und dritter Blot von oben) bzw. mit c-Cbl-Antikörpern (zweiter und vierter Blot von oben) analysiert. Als Ladekontrolle wurde in den Rohlysaten die Proteinmenge des Haushaltsproteins GAPDH mit Hilfe spezifischer Antikörper ermittelt (unterster Blot). Links neben den Blots sind die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards angegeben. IP, Immunpräzipitation; WB, Western-Blot.

2.5 Zellbiologische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von α PIX und c-Cbl

Eine weitere Methode zur Charakterisierung einer Protein-Protein-Interaktion stellt die Immunzytochemie dar. Dazu werden ektopisch oder endogen exprimierte Proteine mit einem spezifischen Primärantikörper und einem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörper mikroskopisch sichtbar gemacht. Befinden sich zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Proteine in räumlicher Nähe zueinander, besteht also eine Kolo-kalisation, wird diese durch die Überlagerung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sichtbar. So ergibt beispielsweise die Überlagerung eines grünen und roten Farbstoffs eine gelbe Pseudofärbung, was als Hinweis auf eine gleiche subzelluläre Verteilung und somit auf

eine mögliche Interaktion der analysierten Proteine gewertet wird. In dieser Arbeit sollte die subzelluläre Lokalisation von HA- α PIX^{WT} und c-Cbl^{WT} sowie der Proteinvarianten HA- α PIX^{W197K}, c-Cbl^{R829A} und c-Cbl^{C381A} in COS-7-Zellen untersucht werden.

2.5.1 Analyse der subzellulären Lokalisation von HA- α PIX^{WT} und c-Cbl^{WT} sowie von HA- α PIX^{W197K}, c-Cbl^{R829A} und c-Cbl^{C381A} in COS-7-Zellen

Für überexprimiertes HA- α PIX wurde unter basalen Wachstumsbedingungen eine zytoplasmatische Lokalisation sowie eine Anreicherung an Membranstülpungen und Lamellipodien an der Zellperipherie beschrieben (Rosenberger *et al.*, 2003). Auch für c-Cbl wurde eine zytoplasmatische Verteilung mit Proteinkonzentrierung an der Zellmembran, welche durch die Tyrosinkinase-Bindedomäne und die prolinreiche Domäne vermittelt werden, gezeigt (Blake *et al.*, 1993; Swaminathan *et al.*, 2007). Um die subzelluläre Lokalisation von HA- α PIX^{WT} und Cbl-bindungsdefizientem HA- α PIX^{W197K} sowie von c-Cbl^{WT}, α PIX-bindungsdefizientem c-Cbl^{R829A} und Ubiquitin-Ligase-defizientem c-Cbl^{C381A} zu klären, wurden diese Proteinvarianten in COS-7-Zellen unter basalen Wachstumsbedingungen transient überexprimiert und mittels spezifischer Erstantikörper und Fluoreszenz-konjugierter Zweitantikörper visualisiert (Abb. 15).

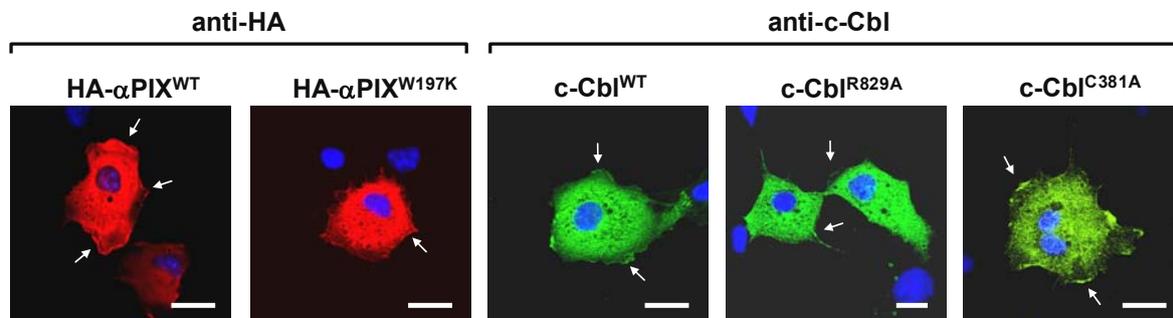


Abb. 15: Subzelluläre Lokalisation verschiedener α PIX- und c-Cbl-Proteinvarianten in COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden mit verschiedenen pMT2SM-HA- α PIX- bzw. verschiedenen pcDNA3-DEST-c-Cbl-Konstrukten transfiziert und unter basalen Wachstumsbedingungen kultiviert. Nach 24 h wurde α PIX mit anti-HA-Antikörpern und einem Alexa Fluor 546-konjugierten Sekundärantikörper (rot, HA- α PIX^{WT} und HA- α PIX^{W197K}) und die c-Cbl-Proteine mit c-Cbl-Antikörpern gefolgt von einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörper (grün; c-Cbl^{WT}, c-Cbl^{R829A} und c-Cbl^{C381A}) detektiert. Die weißen Pfeile markieren die Anreicherung des jeweiligen Proteins an der Zellmembran. Mittels DAPI-Färbung der DNA wurde jeweils der Zellkern dargestellt (blau). Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laserscanmikroskop. Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 25 μ m.

HA- α PIX^{WT} weist in COS-7-Zellen die typische zytoplasmatische Verteilung mit Anreicherungen in der Zellperipherie auf (Abb. 15, HA- α PIX^{WT}; weiße Pfeile). Im Gegensatz dazu ist HA- α PIX^{W197K} hauptsächlich im Zytoplasma und nur selten an der Zellmembran lokalisiert (Abb. 15, HA- α PIX^{W197K}; weißer Pfeil). Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass HA-

α PIX^{W197K} nicht wie α PIX^{WT} an die Zellmembran gelangt. Alle drei analysierten c-Cbl-Proteinvarianten (c-Cbl^{WT}, c-Cbl^{R829A} und c-Cbl^{C381A}) sind hauptsächlich zytoplasmatisch und verstärkt auch an der Zellperipherie in Zellfortsätzen lokalisiert (Abb. 15, c-Cbl^{WT}, c-Cbl^{R829A} und c-Cbl^{C381A}; weiße Pfeile). Demnach sind sowohl α PIX-bindungsdefizientes c-Cbl^{R829A} als auch Ubiquitin-Ligase-defizientes c-Cbl^{C381A} unter Standardwachstumsbedingungen in der Zelle nicht fehllokalisiert. Aufgrund der nach ektopischer Expression starken Anreicherung der HA- α PIX- und c-Cbl-Proteine im Zytoplasma der COS-7-Zellen konnten keine verlässlichen Aussagen zu möglichen Kollokationen gemacht werden. Daher wurde auf H4-Zellen zurückgegriffen, die endogenes α PIX und c-Cbl exprimieren.

2.5.1 Analyse der subzellulären Lokalisation von endogenem α PIX und endogenem c-Cbl und deren Kollokalisation

Endogenes α PIX ist in Makrophagen zytoplasmatisch, mit Anreicherung an der ventralen Zellseite, lokalisiert (Gringel *et al.*, 2006). Da endogenes c-Cbl ebenfalls eine zytosolische Verteilung aufweist (Blake *et al.*, 1993), ist eine Kollokalisation beider Proteine prinzipiell möglich. Um mögliche Einflüsse von Wachstumsbedingungen auf die subzelluläre Lokalisation von α PIX und c-Cbl zu testen, wurden H4-Zellen unter basalen Wachstumsbedingungen, unter Serumentzug sowie unter Serumentzug mit anschließender Stimulation mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen zunächst fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen α PIX und c-Cbl und mit Fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpern inkubiert. Die Auswertung der Immunfluoreszenzexperimente erfolgte mithilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie, welche die Darstellung definierter Zellebenen ermöglicht (Abb. 16). Unter basalen Wachstumsbedingungen lokalisiert α PIX im Zytoplasma und an der Zellmembran (Abb. 16 B, α PIX; roter Pfeil), wenn jedoch den Zellen das Serum entzogen wurde, befindet sich α PIX nur mehr im Zytosol (Abb. 16 A, α PIX). c-Cbl lokalisiert sowohl unter Standard-Wachstumsbedingungen als auch nach Serumentzug an der Zellmembran (Abb. 16 A und B, c-Cbl; grüne Pfeile). Die Überlagerung der jeweiligen Aufnahmen der α PIX- und c-Cbl-Lokalisation ergibt bei Kollokalisation eine gelbe Pseudofärbung. Dies war unter basalen Wachstumsbedingungen und unter Serumentzug nur partiell, vorwiegend im perinukleären Bereich, der Fall (Abb. 16 A und B, Überlagerung und Vergrößerung, pseudogelbe Färbung). Nach Serumentzug und anschließender EGF-Stimulation kam es zu einer deutlichen Anreicherung von sowohl α PIX als auch c-Cbl an der Zellperipherie, insbesondere an Membranauffaltungen (Abb. 16 C, α PIX und c-Cbl; roter und grüner Pfeil). Dementsprechend zeigte sich eine verstärkte Kollokalisation dieser Proteine besonders an der Zellmembran, jedoch auch leicht im Zytoplasma (Abb. 16 C, Überlagerung

und Vergrößerung). Zusammengefasst unterstützen die partielle Kolo­kalisierung von α PIX und c-Cbl im Zytoplasma und deren starke Kolo­kalisierung nach der EGF-Stimulation im Bereich der Zellmembran von H4-Zellen das Vorhandensein einer direkten Interaktion zwischen α PIX und c-Cbl. Darüber hinaus lässt die EGF-induzierte Rekrutierung von α PIX und c-Cbl an die Zellmembran eine wichtige Rolle der EGF-Rezeptor-vermittelten Signalweiterleitung für die Komplexbildung von α PIX und c-Cbl vermuten.

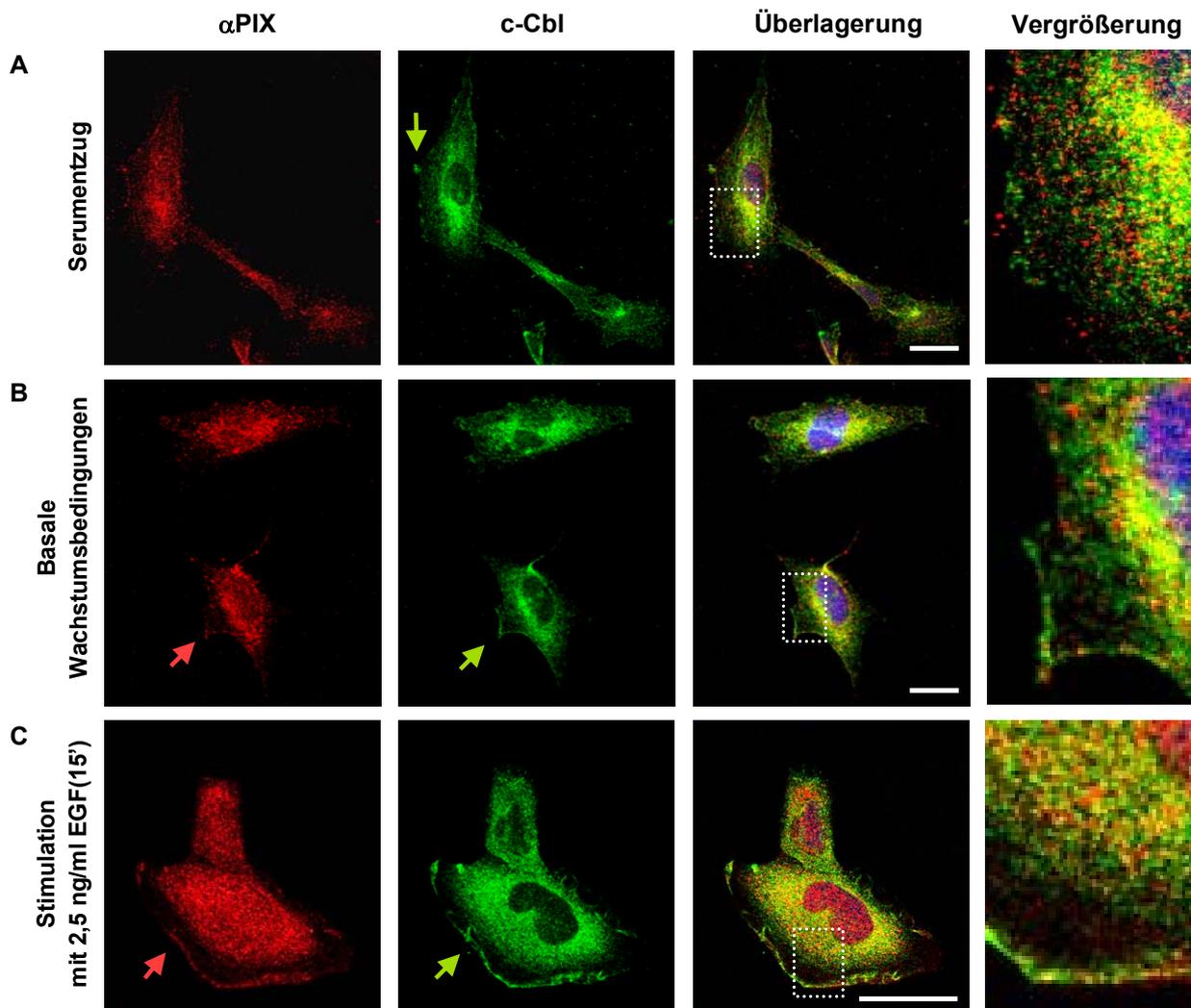


Abb. 16: Subzelluläre Lokalisation von endogenem α PIX und endogenem c-Cbl und partielle Kolo­kalisierung beider Proteine nach unterschiedlichen Kulturbedingungen in H4-Zellen

H4-Zellen wurden unter Serumentzug (A), unter basalen Wachstumsbedingungen (B) und unter Serumentzug mit nachfolgender Stimulation mit 2,5 ng/ml EGF für 15 min (C) kultiviert und anschließend mit PFA fixiert. α PIX wurde mithilfe eines spezifischen Primärantikörpers und eines Alexa Fluor 546-konjugierten Sekundärantikörpers (α PIX, rot), c-Cbl mit einem spezifischen Erstantikörper und einem Alexa Fluor 488-konjugierten Zweitantikörper sichtbar gemacht (c-Cbl, grün). Rote Pfeile zeigen die Membranlokalisation von α PIX, grüne Pfeile die Membranlokalisation von c-Cbl an. Die Überlagerung der aufgenommenen Bilder am Computer zeigt die partielle Kolo­kalisierung beider Proteine (Überlagerung und Vergrößerung, gelbe Pseudofärbung). Mittels DAPI-Färbung der DNA wurden jeweils die Zellkerne sichtbar gemacht (Überlagerung, blau). Der vergrößerte Ausschnitt ist in den Überlagerungsbildern mit einem gestrichelten Rahmen markiert. Die weißen Balken in den Überlagerungsbildern entsprechen einer Länge von 20 μ m.

2.6 Biochemische Untersuchungen der Komplexbildung zwischen α PIX und c-Cbl und dessen Abhängigkeit vom epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)

Die immunzytochemisch detektierte Zunahme der Kolo-kalisation von α PIX und c-Cbl nach EGF-Stimulation sollte mithilfe einer biochemischen Methode verifiziert werden. Dazu wurden Koimmunpräzipitationen von ektopisch exprimierten c-Cbl und HA- α PIX aus COS-7-Zelllysaten durchgeführt.

2.6.1 Analyse der α PIX::c-Cbl-Assoziation in Abhängigkeit von der Dauer der EGF-Stimulation

HA- α PIX- und c-Cbl-koexprimierende COS-7-Zellen wurden nach Serumentzug für definierte Zeiträume (5, 10, 30 und 60 min) mit EGF stimuliert. Nach Zelllyse wurde HA- α PIX mit anti-HA-Agarose präzipitiert und die Präzipitate auf das Vorhandensein von c-Cbl untersucht (Abb. 17). Als Kontrollen dienten HA- α PIX und c-Cbl überexprimierende Zellen, welche mit serumhaltigen (Abb. 17, +S) bzw. mit serumfreien Medium (Abb. 17, 0 min) weiterkultiviert wurden. Wie in den Spuren 7 – 12 der Abbildung 17 ersichtlich ist, wurde in allen Präzipitaten etwa gleich viel HA- α PIX^{WT} detektiert (oberer Blot), so dass die c-Cbl-Proteinmengen in den Präzipitaten verglichen und eine quantitative Aussage über die Komplexbildung gemacht werden kann. In allen Präzipitaten wurde c-Cbl nachgewiesen, jedoch schwankten die Mengen des kopräzipitierten c-Cbl erheblich (Abb. 17, zweiter Blot von oben, Spuren 7 - 12). Das stärkste Signal für c-Cbl in den Präzipitaten wurde unter basalen Wachstumsbedingungen (+S) detektiert, wobei die c-Cbl-Menge in den Rohlysaten unter dieser Bedingung am größten war (Abb. 17, jeweils zweiter Blot von oben, Spuren 1 und 7). Die geringste Konzentration von c-Cbl in den Präzipitaten wurde dagegen unter Serumentzug nachgewiesen (Abb. 17, zweiter Blot von oben, Spur 8). Die Menge der α PIX::c-Cbl-Komplexe nahm mit der Dauer der EGF-Stimulation zu, erreichte nach 30-minütiger Stimulation ihren Maximalwert (Abb. 17, Präzipitate, zweiter Blot von oben, Spuren 9 – 11) und nahm nach weiteren 30 min EGF-Stimulation letztlich wieder leicht ab (Abb. 17, Präzipitate, zweiter Blot von oben, Spur 12). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Komplexbildung zwischen α PIX und c-Cbl von der Stimulation mit EGF und deren Dauer abhängig ist, und weisen auf eine Funktion dieser Komplexbildung im Rahmen der EGF-Rezeptor-vermittelten Signalweiterleitung hin. Auffällig ist außerdem, dass im Laufe der EGF-Stimulation sowohl die α PIX- als auch die c-Cbl-Proteinmenge in den Rohlysaten stetig abnimmt (Abb. 17, Rohlysate, oberer und mittlerer Blot, Spuren 1 – 6), obwohl die

Gesamtproteinkonzentration in den Zelllysaten, wie auf dem GAPDH-Blot der Abbildung 17 zu erkennen ist, etwa gleich bleibt (Abb. 11, Rohlysate, unterer Blot, Spuren 1 – 6). Da c-Cbl eine Ubiquitin-E3-Ligase ist, welche Proteine für den Proteinabbau markiert, könnte ein Zusammenhang zwischen dieser Funktion, der c-Cbl:: α PIX-Assoziation und der EGF-induzierten Abnahme der α PIX-Menge bestehen. Auf einen möglichen, durch c-Cbl-vermittelten Abbau von α PIX wird in einem späteren Kapitel eingegangen (Kapitel 3).

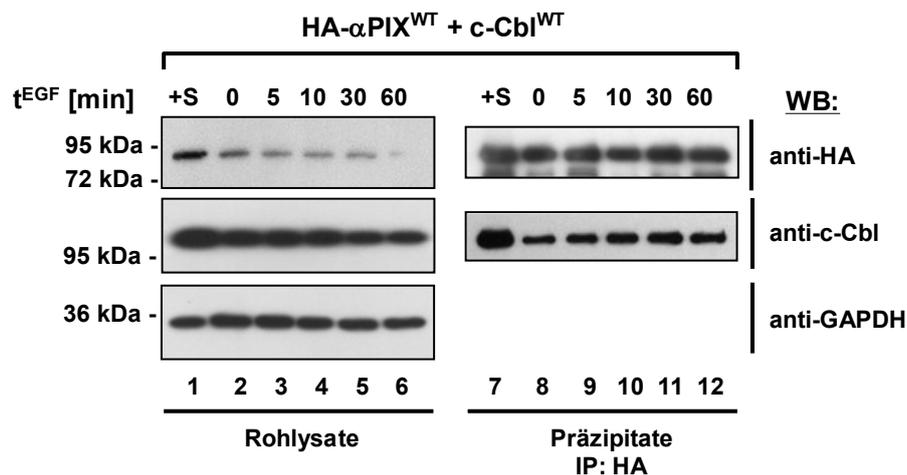


Abb. 17: Darstellung der α PIX::c-Cbl-Interaktion nach EGF-Stimulation mittels KoIP und Western-Blot

Serumentzogene COS-7-Zellen wurden mit $HA-\alpha PIX^{WT}$ - und $c-Cbl^{WT}$ -Konstrukten ko-transfiziert und am nächsten Tag für 5, 10, 30 oder 60 min mit 2,5 ng/ml EGF stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die unstimuliert blieben (0) bzw. unter basalen Wachstumsbedingungen kultiviert wurden (+S). Die Zellen wurden lysiert und die Lysate einer Präzipitation mit anti-HA-konjugierter Agarose zugeführt. Rohlysate (Spuren 1 – 6) und Präzipitate (Spuren 7 – 12) wurden schließlich nach Western-Blot mittels Immundetektion mit anti-HA- (obere Blots) bzw. anti-c-Cbl-Antikörpern (jeweils zweiter Blot von oben) untersucht. Als Ladekontrolle der SDS-Gele wurde in den Rohlysaten die Menge des Haushaltsproteins GAPDH mithilfe spezifischer Antikörper gezeigt (unterer Blot). Links neben den Blots sind die Molekulargewichte des Proteinstandards und rechts die verwendeten Antikörper angegeben. IP, Immunpräzipitation; WB, Western-Blot.

2.6.2 Analyse der α PIX::c-Cbl-Assoziation in Abhängigkeit von der EGF-Konzentration

Da in der Literatur die Höhe der experimentell sinnvollen EGF-Konzentrationen kontrovers diskutiert wird (Sigismund *et al.*, 2005; 2008), wurde die α PIX::c-Cbl-Komplexbildung in Abhängigkeit von der EGF-Dosis untersucht. Die gehungerten $HA-\alpha PIX^{WT}$ - und $c-Cbl^{WT}$ -exprimierenden COS-7-Zellen wurden für 15 min mit unterschiedlichen EGF-Konzentrationen (2,5, 5, 25 bzw. 100 ng/ml) stimuliert und anschließend einer Präzipitation mittels anti-HA-Agarose unterzogen. Als Kontrolle blieb ein Ansatz unstimuliert (0). Die Präzipitate wurden daraufhin mittels Western-Blot und Immundetektion auf das Vorhandensein von c-Cbl untersucht (Abb. 18). Wie im vorigen Experiment wurde bei Serumentzug die geringste Menge an c-Cbl und nach EGF-Stimulation eine Zunahme der c-Cbl-Menge in den

Präzipitaten detektiert (Abb. 18, Präzipitate, unterer Blot, Spuren 6 – 10). Es wurde jedoch nach Stimulation mit unterschiedlichen EGF-Konzentrationen kein Mengenunterschied von c-Cbl in den Präzipitaten nachgewiesen (Abb. 18, Präzipitate, unterer Blot, Spuren 7 – 10). Eine EGF-Dosisabhängigkeit für die α PIX::c-Cbl-Assoziation scheint damit zumindest nach 15-minütiger Stimulation nicht gegeben zu sein.

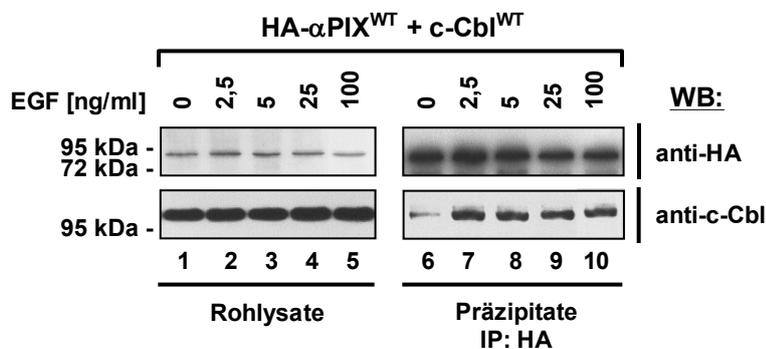


Abb. 18: Darstellung der Abhängigkeit der α PIX::c-Cbl-Assoziation von der EGF-Konzentration mittels KoIP und Western-Blot
Serumentzogene COS-7-Zellen wurden mit HA- α PIX^{WT}- und c-Cbl^{WT}-Expressionskonstrukten transfiziert und am nächsten Tag für 15 min mit 2,5, 5, 25 oder 100 ng/ml EGF stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit EGF stimuliert wurden (0). Nach der Zellyse erfolgte

die Präzipitation mit anti-HA-Agarose. Schließlich wurden die Rohlysate (Spuren 1 – 5) und Präzipitate (Spuren 6 – 10) nach Western-Blot mittels Immundetektion mit anti-HA- (obere Blots) bzw. anti-c-Cbl-Antikörpern (untere Blots) untersucht. Links neben den Blots sind die Molekulargewichte des Proteinstandards und rechts die verwendeten Antikörper angegeben. IP, Immunpräzipitation; WB, Western-Blot.

3. Untersuchungen zur Funktion des α PIX::c-Cbl-Komplexes für den zellulären Proteinumsatz

Die Menge der α PIX::c-Cbl-Komplexe scheint von der Dauer der EGF-Stimulation abhängig zu sein (Kapitel 2.6.1). Bei diesen Versuchen wurde auch beobachtet, dass die α PIX- sowie die c-Cbl-Proteinmenge nach EGF-Stimulation in der Zelle stetig abnahm. Diese Verminderung sowie ein möglicher Einfluss der Ubiquitin-Ligase c-Cbl auf die Abnahme der α PIX-Menge sollte näher untersucht werden.

3.1 Untersuchungen zum Proteinabbau von endogenem α PIX und endogenem c-Cbl nach EGF-Stimulation

Zur Verifizierung des in Kapitel 2.6.1 detektierten Proteinabbaus wurden zu 90% konfluente H4-Zellrasen ü.N. gehungert und anschließend für definierte Zeiträume (5, 15, 30 bzw. 60 min) mit EGF stimuliert. Zur Bestimmung der Standardproteinkonzentrationen von α PIX und c-Cbl in den H4-Zellen blieb ein Ansatz unstimuliert (0 min). Nach der Zellyse wurden die Lysate mittels Western-Blot und Immundetektion qualitativ analysiert (Abb. 19). Da bekannt ist, dass der EGF-Rezeptor nach EGF-Stimulation degradiert wird (Stoscheck & Carpenter, 1984), wurde als Positivkontrolle für Proteinabbau der EGF-Rezeptor in den Zellysaten nachgewiesen (Abb. 19, oberster Blot, Spuren 1 – 5). Wie auf dem zweiten Blot von oben in

Abbildung 19 ersichtlich ist, nahm mit zunehmender Dauer der EGF-Stimulation auch die c-Cbl-Proteinmenge in den Lysaten leicht ab (Spuren 1 – 5). Für α PIX wurde hingegen eine stärkere Abnahme der Proteinmenge in den Zelllysaten festgestellt; so konnte nach 60-minütiger EGF-Stimulation eine starke Abnahme der zellulären α PIX-Konzentration nachgewiesen werden (Abb. 19, dritter Blot von oben, Spuren 1 – 5). Dieser Versuch zeigt, dass, wie der EGF-Rezeptor, anscheinend auch α PIX und c-Cbl EGF-abhängig degradiert werden.

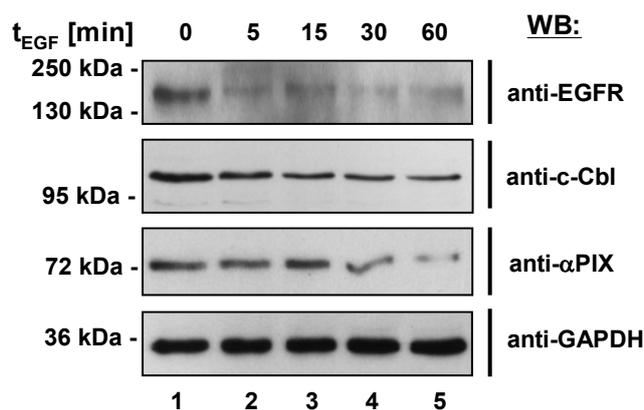


Abb. 19: Darstellung der Abnahme der Proteinmenge von endogenem EGF-Rezeptor, α PIX und c-Cbl nach EGF-Stimulation mittels Western-Blot

Serumentzogene H4-Zellen wurden für 5, 15, 30 oder 60 min mit 25 ng/ml EGF stimuliert; zur Kontrolle der Stimulation blieb ein Ansatz unstimuliert (0). Nach der Zellyse erfolgte die Analyse der Zelllysate mittels Western-Blot und Immundetektion mit Antikörpern gegen EGF-Rezeptor (EGFR, oberer Blot), c-Cbl (zweiter Blot von oben) bzw. α PIX (dritter Blot von oben). Die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards sind links neben den Blots angegeben. Als Ladekontrolle wurde die Proteinmenge des Haushaltsproteins GAPDH mit spezifischen Antikörpern detektiert. WB: Western-Blot.

3.1.1 Untersuchung eines von c-Cbl abhängigen Abbaus von α PIX

Um den Einfluss von c-Cbl auf den Abbau von α PIX zu testen, wurde nach definierten Zeitpunkten (10, 30, 60 bzw. 90 min) der EGF-Stimulation die Proteinmenge von α PIX und c-Cbl in HA- α PIX^{WT}- und c-Cbl^{WT}-koexprimierenden COS-7-Zellen im Vergleich zu HA- α PIX^{WT}-exprimierenden Zellen untersucht. Dazu wurden die Zelllysate mittels Western-Blot und Immundetektion analysiert (Abb. 20). Die Immundetektion mittels c-Cbl-Antikörper zeigte wieder eine leichte Abnahme der c-Cbl-Proteinmenge in den Lysaten der c-Cbl-überexprimierenden Zellen nach EGF-Stimulation (Abb. 20, mittlerer Blot, Spuren 6 – 10). Darüber hinaus wurde sowohl in den Lysaten nach α PIX-Überexpression (Abb. 20, HA- α PIX^{WT}) als auch in den Lysaten nach α PIX- und c-Cbl-Koexpression (Abb. 20, HA- α PIX^{WT} + c-Cbl^{WT}) eine starke Abnahme der α PIX-Proteinkonzentration nach EGF-Stimulation detektiert (Abb. 20, oberer Blot, Spuren 1 – 10). Interessant ist, dass die Gesamtproteinkonzentration von α PIX bei der Koexpression von c-Cbl deutlich niedriger war als bei der alleinigen HA- α PIX^{WT}-Überexpression (Abb. 20, oberer Blot, Vgl. Spuren 1 – 5 und 6 – 10), obwohl für die Transfektionen die gleiche DNA-Menge verwendet wurde. Dies könnte bedeuten, dass die Ubiquitin-Ligase c-Cbl die α PIX-Proteinmenge in der Zelle konstant niedrig hält. Die

postulierte c-Cbl-abhängige α PIX-Degradierung konnte mit diesem Experiment jedoch nicht bewiesen werden.

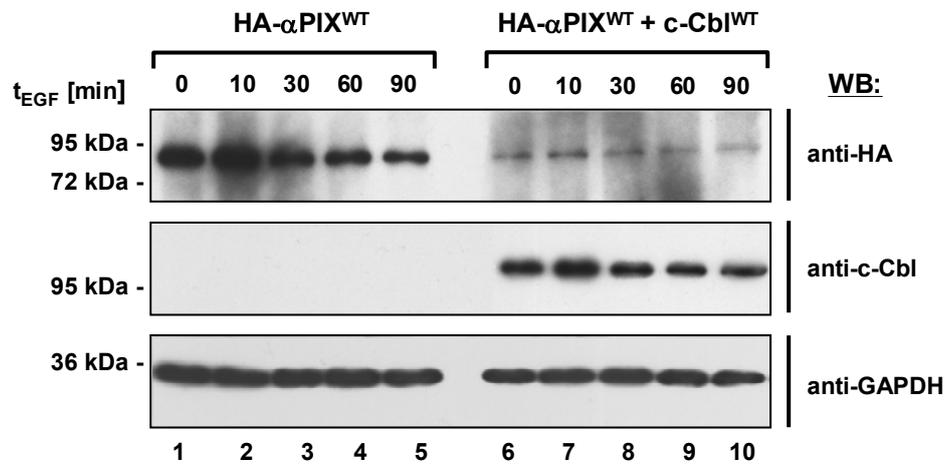


Abb. 20: Western-Blot-Analyse zum Einfluss der c-Cbl-Expression auf den Abbau von α PIX nach EGF-Stimulation

Serumentzogene COS-7-Zellen wurden entweder mit dem HA- α PIX^{WT}-Konstrukt allein oder zusammen mit dem c-Cbl^{WT}-Konstrukt transfiziert und anschließend mit 5 ng/ml EGF für 10, 30, 60 oder 90 min stimuliert. Ein Ansatz blieb unstimuliert (0). Die Zellen wurden lysiert und die Zellysate nach Western-Blot mittels Immundetektion mit anti-HA- (oberer Blot) bzw. anti-c-Cbl-Antikörpern (mittlerer Blot) analysiert. Als Ladekontrolle wurde die Menge des Haushaltsproteins GAPDH mit Hilfe spezifischer Antikörper ermittelt (unterer Blot). Links neben den Blots sind die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards, rechts die verwendeten Antikörper angegeben. WB, Western-Blot.

3.1.2 Untersuchung zum Proteinabbau von α PIX und c-Cbl in Abhängigkeit von der α PIX::c-Cbl-Assoziation

Die Vermutung liegt nahe, dass die α PIX::c-Cbl-Assoziation eine Voraussetzung für die EGF-induzierte Verminderung der α PIX-Proteinmenge darstellt. Um dieser These nachzugehen, wurde c-Cbl-bindungsdefizientes HA- α PIX^{W197K}-Protein mit Wildtyp-c-Cbl bzw. α PIX-bindungsdefizientes c-Cbl^{R829A} mit Wildtyp- α PIX in COS-7-Zellen überexprimiert und die Zellen für definierte Zeiträume mit EGF stimuliert oder in serumfreien (0 min) bzw. serumhaltigen Medium (+S) weiterkultiviert. Als Kontrolle dienten Zellen, welche mit den Wildtyp-Konstrukten von α PIX und c-Cbl transfiziert wurden. Zusätzlich wurde in weiteren Zellen die Ubiquitin-Ligase-defiziente Proteinvariante c-Cbl^{C381A} zusammen mit HA- α PIX^{WT} überexprimiert, um zu testen, ob der α PIX-Abbau möglicherweise durch Ubiquitylierung seitens c-Cbl induziert wird. Abbildung 21 zeigt die Analyse der Zellysate mittels Western-Blot und Immundetektion. Der Abbau von HA- α PIX sowie von c-Cbl nach Stimulation mit EGF konnte nur in den Lysaten detektiert werden, in denen die Wildtyp-Varianten der beiden Proteine koexprimiert wurden (Abb. 21, oberer und mittlerer Blot, Spuren 1 – 4). Bei Koexpression von α PIX^{W197K} und c-Cbl^{WT} bzw. von α PIX^{WT} und c-Cbl^{R829A} blieben die Proteinmengen von α PIX und c-Cbl nach EGF-Stimulation konstant (Abb. 21, obere und

mittlere Blots, Spuren 5 – 8 bzw. 9 - 12). Die Interaktion zwischen α PIX und c-Cbl scheint damit wichtig für die Degradierung von α PIX zu sein. Interessanterweise scheint dies ebenfalls für den Abbau von c-Cbl nach EGF-Stimulation zu gelten. Die EGF-Stimulation der c-Cbl^{C381A}- und HA- α PIX^{WT}-koexprimierenden Zellen führte ebenfalls zu keinem detektierbaren Proteinabbau (Abb. 21, oberer und mittlerer Blot, Spuren 13 – 16). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Degradierung von α PIX durch c-Cbl-vermittelte Ubiquitylierung induziert wird. Unklar ist, warum c-Cbl^{C381A} nach EGF-Stimulation nicht abgebaut wird, obwohl die α PIX::c-Cbl-Assoziation durch den Aminosäureaustausch p.C381A in der Ringdomäne von c-Cbl nicht beeinträchtigt wird. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür könnte eine α PIX-vermittelte Autoubiquitylierung von c-Cbl sein.

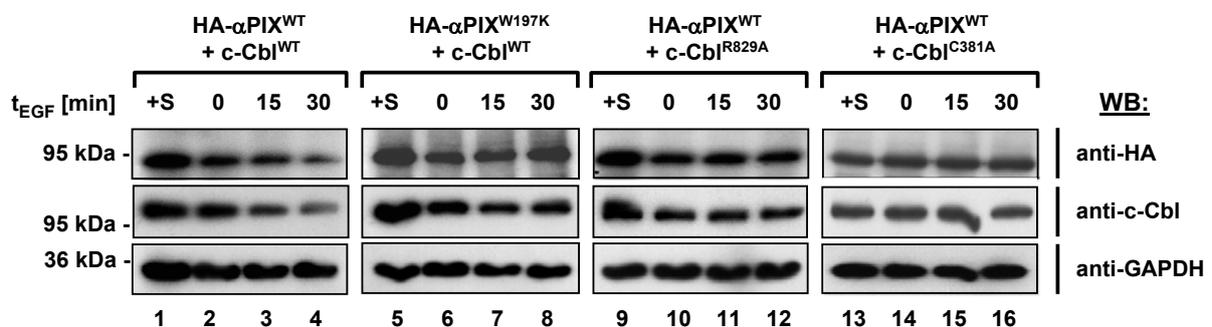


Abb. 21: Darstellung der Proteindegredierung ektoisch exprimierter c-Cbl- und α PIX-Proteinvarianten nach EGF-Stimulation mittels Western-Blot

Serumentzogene COS-7-Zellen wurden mit Konstrukten für die ektoische Expression von HA- α PIX^{WT} und c-Cbl^{WT}, HA- α PIX^{W197K} und c-Cbl^{WT}, HA- α PIX^{WT} und c-Cbl^{R829A} bzw. HA- α PIX^{WT} und c-Cbl^{C381A} ko-transfiziert und nach für 15 oder 30 min mit 5 ng/ml EGF stimuliert. Als Kontrolle wurden die Zellen ü.N. in serumfreiem (0) oder serumhaltigem (+S) Medium kultiviert. Die Zelllysate wurden einer Analyse mittels Western-Blot und Immundetektion mit Antikörpern gegen das HA-Epitop von HA- α PIX (obere Blots) oder c-Cbl (mittlere Blots) unterzogen. Der Nachweis des Haushaltsproteins GAPDH erfolgte als Ladekontrolle (untere Blots). Links neben den Blots stehen die Molekulargewichte des Proteinstandards, rechts die verwendeten Antikörper. WB, Western-Blot.

3.2 Untersuchungen zur Ubiquitylierung von α PIX durch die Ubiquitin-E3-Ligase c-Cbl

Nach EGF-Stimulation verknüpft die Ubiquitin-E3-Ligase c-Cbl kovalent Ubiquitin-Reste an seine Substrate und markiert diese damit für den Proteinabbau (Levkovitz *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 2003). Die bisherigen Ergebnisse in dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die Interaktion von α PIX und c-Cbl eine Voraussetzung für die EGF-induzierte Degradierung von α PIX ist. Daher kann vermutet werden, dass c-Cbl α PIX ubiquityliert und damit für den Proteinabbau markiert. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde die Ubiquitylierung von α PIX^{WT} mittels Ubiquitylierungsassays überprüft. Bei diesen Experimenten macht man sich zunutze, dass Ubiquitin kovalent an seine Zielproteine verknüpft wird. Durch jedes konjugierte Ubiquitin-Molekül erhöht sich das Molekulargewicht des Zielproteins um ca. 8,5 kDa, so dass dieses

nach Auftrennung in der SDS-PAGE deutlich vom nicht-modifizierten Zielprotein zu unterscheiden ist. Da für solche Assays in der Regel die humane, embryonale Nierenzelllinie HEK-293 verwendet wird, wurde diese auch für die Ubiquitylierungsexperimente in dieser Arbeit benutzt.

3.2.1 Untersuchung der α PIX-Ubiquitylierung mittels Immunpräzipitationen und Western-Blot-Analyse

In serumentzogenen HEK-293-Zellen wurden die Fusionsproteine HA-Ubiquitin und FLAG- α PIX^{WT} transient überexprimiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, welche mit FLAG- α PIX^{WT} und dem HA-Leervektor (HA-pRK5) transfiziert wurden. Zur zellulären Anreicherung ubiquitylierter Proteine wurde anschließend der gesamte zelluläre Proteinabbau durch Inkubation mit Ammoniumchlorid, Chloroquin und MG-132 inhibiert. Zur Induktion der Ubiquitylierung von α PIX wurden die Zellen mit EGF stimuliert oder blieben zur Kontrolle unbehandelt. Nach der Zelllyse wurde das FLAG-getaggte α PIX^{WT}-Protein präzipitiert und die Präzipitate auf das Vorhandensein unterschiedlich schwerer α PIX-Proteine untersucht (Abb. 22).

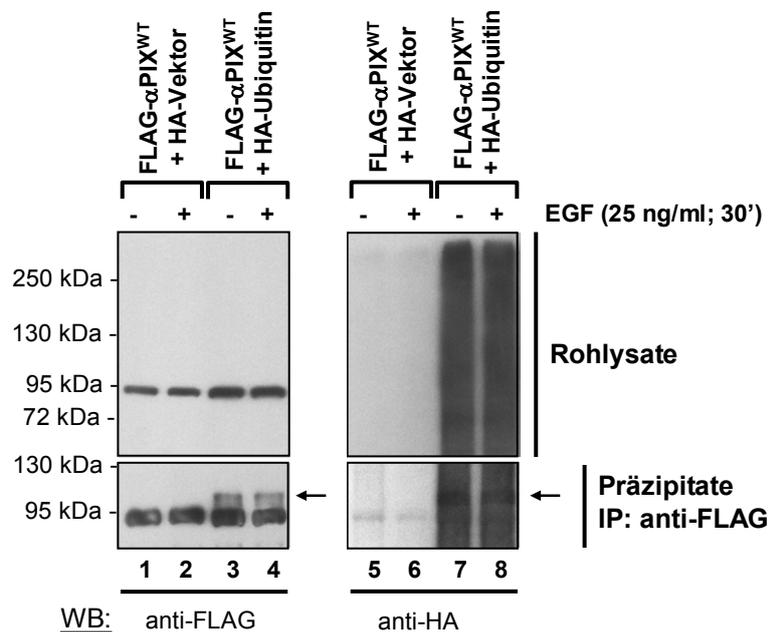


Abb. 22: Darstellung der Ubiquitylierung von α PIX durch Immunpräzipitation und Western-Blot
 Serumentzogene HEK-293-Zellen wurden mit *FLAG- α PIX^{WT}*- und *HA-Ubiquitin*-Konstrukten transfiziert. Zur Kontrolle wurden Zellen mit dem HA-Leervektor und einem *FLAG- α PIX^{WT}*-Konstrukt transfiziert. Die Inhibition des lyso-somalen Proteinabbaus erfolgte am nächsten Tag durch Inkubation mit 10 mM NH₄Cl und 50 μ M Chloroquin, die Inhibition der proteasomalen Proteindegradierung erfolgte durch Inkubation mit 20 μ M MG-132 für sechs Stunden. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit 25 ng/ml EGF stimuliert (+; Spuren 2, 4, 6 und 8) oder blieben unbehandelt (-; Spuren 1, 3, 5 und 7). Die Rohlysate (oben) und Präzipitate (unten) wurden nach Western-Blot mittels Immundetektion mit einem anti-FLAG- (Spuren 1 – 4) bzw. anti-HA-Antikörper (Spuren 5 – 8) analysiert. Die modifizierten α PIX-Proteinvarianten sind mit Pfeilen markiert. Die Molekulargewichte

des verwendeten Proteinstandards sind links von den Blots, die verwendeten Antikörper unterhalb der Blots angegeben. IP, Immunpräzipitation; WB, Western-Blot.

Die Immundetektion mit anti-FLAG-Antikörpern zeigt, dass bei Koexpression von FLAG- α PIX^{WT} und HA-Ubiquitin neben den unmodifizierten FLAG- α PIX-Proteinen auch eine FLAG- α PIX-Proteinvariante mit höherem Molekulargewicht detektiert wurde (Abb. 22, Präzipitate, Spuren 3 und 4; Pfeil). Da diese Proteinvariante nicht bei alleiniger FLAG- α PIX-Expression nachgewiesen wurde (Abb. 22, Präzipitate, Spuren 1 und 2), kann dabei von einem Ubiquitin-modifizierten α PIX-Protein ausgegangen werden. Das Molekulargewicht dieser α PIX-Proteine war dabei gegenüber dem unmodifizierten Protein um ca. 8 kDa erhöht, was einer Monoubiquitylierung entsprechen würde. Auch mithilfe von anti-HA-Antikörpern wurde in den Präzipitaten aus dem Ansatz nach HA-Ubiquitin- und FLAG- α PIX^{WT}-Koexpression eine Bande entsprechend der Größe von einfach-ubiquityliertem α PIX detektiert (Abb. 22, Präzipitate, Spuren 7 und 8, Pfeil). Bemerkenswerterweise konnte jedoch zwischen EGF-stimulierten und unstimulierten Zellen kein Unterschied in der Menge der ubiquitylierten α PIX-Proteine detektiert werden (Abb. 22, Präzipitate, vgl. Spuren 3 und 4 bzw. Spuren 7 und 8). Diese Versuche deuten darauf hin, dass α PIX in der Zelle ubiquityliert wird.

3.2.2 Verifizierung der α PIX-Ubiquitylierung mittels Immunpräzipitation und Western-Blot-Analyse

Um die zuvor erzielten Ergebnisse zu verifizieren und zu überprüfen, ob c-Cbl die Ubiquitylierung von α PIX vermittelt, wurden weitere Ubiquitylierungsassays durchgeführt. Serumentzogene HEK-293-Zellen wurden mit *HA-Ubiquitin*- und *FLAG- α PIX^{WT}*- oder zusätzlich mit *c-Cbl^{WT}*-Expressionkonstrukten kotransfiziert und am nächsten Tag mit EGF stimuliert oder in serumfreiem Medium weiterkultiviert (- Serum). Die Zelllysate wurden einer Immunpräzipitation mit anti-HA-Agarose zugeführt, sodass nur die ubiquitylierten, nicht jedoch die unmodifizierten Proteine aus dem Proteinlysat angereichert wurden. Wie aus Abbildung 23 A hervorgeht, konnte bei FLAG- α PIX- und HA-Ubiquitin-Koexpression (oberer Blot, Spur 5) sowie bei FLAG- α PIX-, HA-Ubiquitin- und c-Cbl-Koexpression (oberer Blot, Spur 7) bei Serumentzug ubiquityliertes FLAG- α PIX aus den Lysaten präzipitiert werden. Dieses wies dabei hauptsächlich ein um ca. 8 kDa erhöhtes Molekulargewicht auf, was auf eine Monoubiquitylierung hindeutet. Es wurden jedoch auch schwächere Banden mit noch höherem Molekulargewicht detektiert, die auf eine Mehrfach-Ubiquitylierung hinweisen (Abb. 23 A, oberer Blot, Spuren 5 und 7). Interessanterweise wurde bei der Koexpression von c-Cbl^{WT} weniger ubiquityliertes α PIX präzipitiert (Abb. 23 A, oberer Blot, vgl. Spuren 5 und 7). Wie aus Abbildung 23 B hervorgeht, wurde nach EGF-Stimulation verglichen mit den

unstimulierten Zellen insgesamt weniger α PIX präzipitiert (Präzipitate, oberer Blot, Spuren 13 und 15). Dies kann daran liegen, dass bei diesem Versuch keine Inhibierung des Proteinabbaus erfolgte und somit der Großteil der ubiquitylierten α PIX-Proteine degradiert wurde. Bei Koexpression von c-Cbl wurde eine höhere Konzentration an ubiquityliertem α PIX im Präzipitat nachgewiesen (Abb. 23 B, Präzipitate, oberer Blot, vgl. Spuren 13 und 15), was auf eine c-Cbl-vermittelte Ubiquitylierung von α PIX nach EGF-Stimulation hindeutet. Auch für c-Cbl wurden in den Präzipitaten modifizierte Proteinvarianten detektiert (Abb. 23 A und B, unterer Blot, Spuren 6 und 7 bzw. 14 und 15). Diese weisen ein um mehr als 8 kDa erhöhtes Molekulargewicht für c-Cbl auf und bestätigen bereits publizierte Ergebnisse zur c-Cbl-Ubiquitylierung (Ettenberg *et al.*, 2001; Bao *et al.*, 2003).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass α PIX ubiquityliert wird, geben jedoch keine Antwort darauf, ob c-Cbl diese Proteinmodifizierung bewirkt.

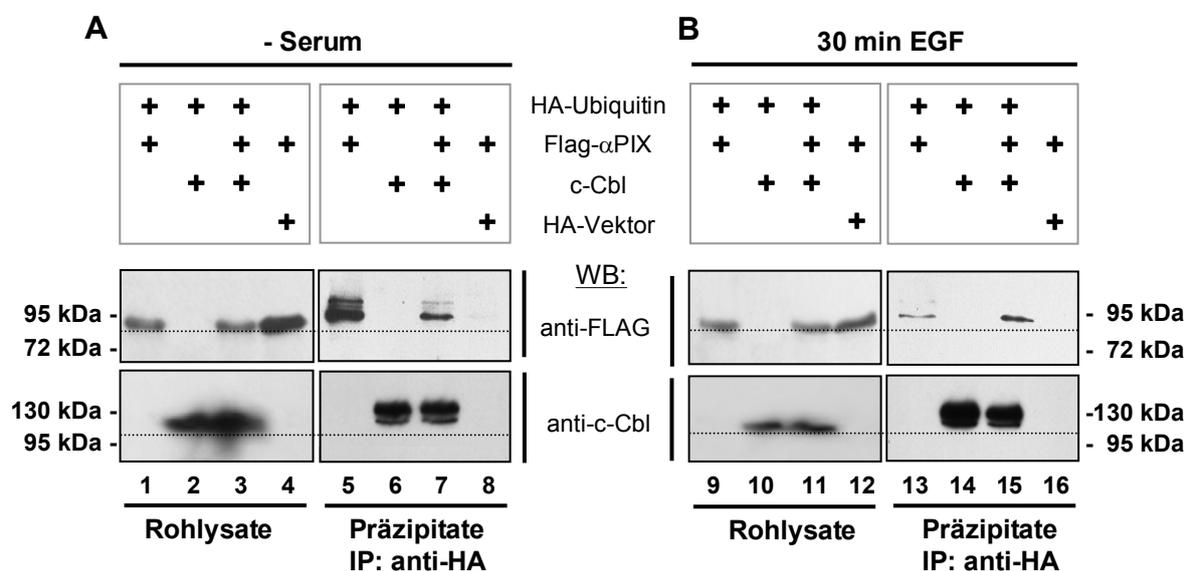


Abb. 23: Darstellung der Ubiquitylierung von ektopisch exprimierten α PIX und c-Cbl mittels Immunpräzipitation von HA-Ubiquitin in unstimulierten und EGF-stimulierten HEK-293-Zellen

In serumtrogenen HEK-293-Zellen wurden die in den Kästchen angegebenen Proteine exprimiert. Vor der Zellyse wurden die Zellen in serumfreiem Medium kultiviert (-Serum) (A) oder nach Serumentzug für 30 min mit 25 ng/ml EGF stimuliert (B). HA-Ubiquitin wurde mittels anti-HA-Antikörper-konjugierten Agarosekügelchen präzipitiert. Rohlysate (Spuren 1 – 4 und 9 – 12) und Präzipitate (Spuren 5 – 8 und 13 – 16) wurden mittels Western-Blot und Immundetektion mit anti-FLAG- (obere Blots) bzw. anti-c-Cbl-Antikörpern (untere Blots) analysiert. Das Molekulargewicht des jeweiligen unmodifizierten Proteins ist im Blot durch eine gestrichelte Linie markiert. Links von A und rechts von B sind die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards angegeben. IP, Immunpräzipitation; WB, Western-Blot.

4. Die Rolle von α PIX bei der Regulation des EGF-Rezeptor-Traffickings

Die Ubiquitin-E3-Ligase c-Cbl hat eine wichtige Funktion bei der EGF-Rezeptor-Internalisierung und der anschließenden Degradierung des Rezeptors in Lysosomen

(Levkowitz *et al.*, 1998; Duan *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2006). Die Aktivität von c-Cbl selbst wird z.B. negativ durch die Aktivierung der GTPase Cdc42 reguliert (Wu *et al.*, 2003). Da α PIX ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für Cdc42 ist und somit die Aktivität der GTPase beeinflusst und α PIX zudem direkt mit c-Cbl interagiert, sollte in dieser Arbeit die Funktion von α PIX bei der Regulation des EGF-Rezeptor-Traffickings untersucht werden.

4.1 Immunzytochemische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von endogenem EGF-Rezeptor und endogenem α PIX

Nach Stimulation mit dem EGF wird α PIX an die Zellmembran rekrutiert (siehe Ergebnisse, Kapitel 2.5). Nun sollte geklärt werden, ob α PIX an der Plasmamembran mit dem EGF-Rezeptor kolokalisiert. Dazu wurden serumentzogene H4-Zellen für 15 min mit EGF stimuliert bzw. blieben unbehandelt. EGF-Rezeptoren sowie α PIX wurden mit spezifischen Antikörpern immunzytochemisch nachgewiesen (Abb. 24).

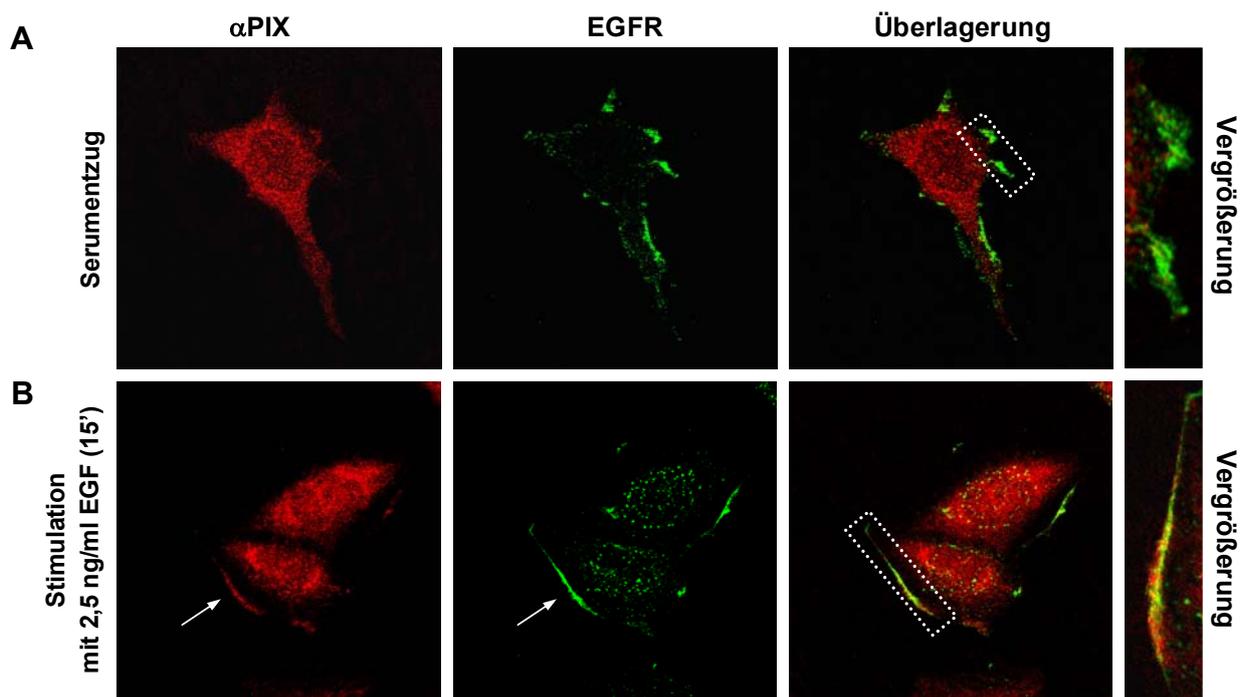


Abb. 24: Subzelluläre Lokalisation von endogenem EGF-Rezeptor und Kolokalisation von α PIX und EGF-Rezeptoren in H4-Zellen

H4-Zellen wurden nach Serumentzug **(A)** sowie nach Serumentzug mit nachfolgender EGF-Stimulation (2,5 ng/ml EGF für 15 min) **(B)** fixiert. α PIX wurde mithilfe eines anti- α PIX-Antikörpers und eines Alexa Fluor 546-konjugierten Sekundärantikörpers (α PIX, rot) und die EGF-Rezeptoren mit einem anti-EGFR-Antikörper und einem Alexa Fluor 488-konjugierten Antikörper dargestellt (EGFR, grün). In den Überlagerungsbildern zeigen pseudogelbe Färbungen Bereiche der Kolokalisation von α PIX und EGF-Rezeptoren an (Überlagerung). Die vergrößerten Ausschnitte der Überlagerungsbilder sind mit einem gestrichelten Rahmen markiert. Weiße Pfeile in **B** geben die Membranlokalisation des jeweiligen Proteins an.

Die Auswertung mittels konfokaler Laserscanmikroskopie ergab, dass die EGF-Rezeptoren in unstimulierten Zellen hauptsächlich an der Zellmembran und im submembranen Bereich der Zelle lokalisieren (Abb. 24 A, mittleres Bild und Vergrößerung, grün). α PIX zeigt dagegen unter diesen Kulturbedingungen eine rein zytoplasmatische Verteilung (Abb. 24 A, linkes Bild, rot). Auf dem Überlagerungs- und Vergrößerungsbild von Abbildung 24 A lässt sich erkennen, dass α PIX und der EGF-Rezeptor in unstimulierten H4-Zellen nicht kolokalisieren.

Nach EGF-Stimulation kommt es zu einer punktförmigen Verteilung des EGF-Rezeptors im Zytoplasma der H4-Zellen, was auf die Internalisierung der EGF-Rezeptoren hinweist (Abb. 24 B, mittleres Bild, grün). Außerdem waren nach der Stimulation die EGF-Rezeptoren kaum noch im submembranen Bereich, sondern konzentriert an der Zellmembran, erkennbar durch eine schärfere Zellmembranlinie, zu beobachten (Abb. 24 B, mittleres Bild, Pfeil). Die EGF-Stimulation führte außerdem, wie schon in Kapitel 2.5.2 beschrieben, zu einer Rekrutierung von α PIX an die Zellmembran (Abb. 24 A, linkes Bild, Pfeil), wo es mit dem EGF-Rezeptor partiell kolokalisierte. An diesen Zellmembranbereichen konnte daraufhin die Kolokalisation von α PIX und dem EGF-Rezeptor detektiert werden (Abb. 24 B, Überlagerung und Vergrößerung, gelbe Pseudofärbung). Die Immunfluoreszenzexperimente geben damit erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von α PIX an der Regulation des EGF-Rezeptor-Traffickings.

4.2 Einfluss der α PIX-Überexpression auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose von Fluoreszenz-markiertem epidermalem Wachstumsfaktor

Das α PIX-Homolog β PIX reguliert die EGF-Rezeptor-Internalisierung (Wu *et al.*, 2003). Die Ergebnisse aus dem vorigen Kapitel dieser Arbeit geben Hinweise darauf, dass auch α PIX an der Regulation des EGF-Rezeptor-Traffickings beteiligt sein könnte. Um die Auswirkungen der α PIX-Überexpression auf das EGF-Rezeptor-Trafficking zu studieren, wurden serumentzogene COS-7-Zellen mit *HA- α PIX^{WT}*-Konstrukten transfiziert und diese am nächsten Tag mit Alexa Fluor 488-konjugiertes EGF (EGF488) stimuliert. Die publizierten EGF-Konzentrationen variieren erheblich (10 ng/ml bis 5 μ g/ml). Daher wurde für die ersten Internalisierungsversuche eine mittlere Konzentration von 200 ng/ml Fluoreszenz-markiertem EGF verwendet. Die Zellen wurden bei 4°C mit EGF488 vorinkubiert, um eine Absättigung der membranständigen EGF-Rezeptoren zu erreichen. Daraufhin wurde die EGF-Rezeptor-Endozytose durch Erwärmung auf 37°C initialisiert und die nicht internalisierten EGF-Moleküle von der Zelloberfläche entfernt. Nach immunzytochemischer Färbung erfolgte eine Auswertung mittels konfokaler Laserscanmikroskopie. In Abbildung 25 ist exemplarisch die Aufnahme von Fluoreszenz-markiertem EGF in HA- α PIX-überexprimierenden und untransfizierten COS-7-Zellen gezeigt.

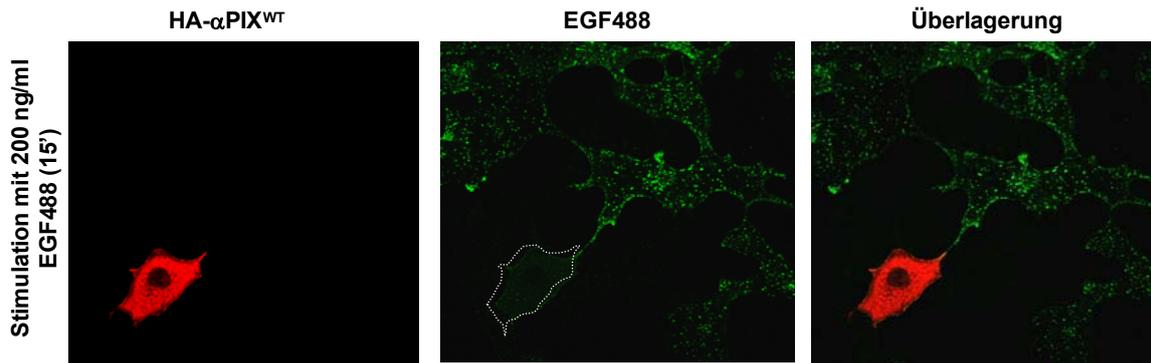


Abb. 25: Endozytose von Fluoreszenz-markiertem EGF in HA- α PIX^{WT}-überexprimierenden COS-7-Zellen (nach Vorinkubation mit EGF488)

In serumentzogenen COS-7-Zellen wurde HA- α PIX^{WT} transient überexprimiert und die Zellen am darauffolgenden Tag mit 200 ng/ml EGF488-haltigem Hungermedium für 60 min bei 4°C vorinkubiert. Anschließend wurde die Endozytose von EGF durch eine 15-minütige Erwärmung der Zellen auf 37°C ermöglicht. Nicht-endozytiertes EGF wurde mit einem sauren Waschlösung eiskalt abgewaschen. Die Detektion von HA- α PIX^{WT} erfolgte mit einem anti-HA-Antikörper gefolgt von einem Alexa Fluor 546-gekoppelten Sekundärantikörper (HA- α PIX^{WT}, rot). Die Verteilung von Fluoreszenz-markiertem EGF ist in der Mitte dargestellt (EGF488, grün). Das rechte Bild zeigt die Überlagerung der HA- α PIX^{WT}-überexprimierenden Zelle und der EGF488-Aufnahme (Überlagerung). Die Immunfluoreszenzen wurden mit einem konfokalen Laserscannmikroskop ausgewertet. Die HA- α PIX^{WT}-überexprimierende Zelle ist im EGF488-Bild durch eine gestrichelte Linie hervorgehoben.

Das endozytierte EGF488 ist anhand des feinen Punktmusters im Zytoplasma der untransfizierten COS-7-Zellen zu erkennen (Abb. 25; EGF488, grün). Im Vergleich dazu wiesen die HA- α PIX^{WT}-überexprimierenden Zellen beinahe kein Fluoreszenz-markiertes EGF innerhalb der Zelle auf (Abb. 25, EGF488, gestrichelte Umrandung). α PIX scheint damit durchaus Einfluss auf die EGF-Verteilung in der Zelle zu nehmen. Aufgrund der sehr hohen in diesem Experiment eingesetzten EGF-Konzentration und der unphysiologischen EGF-Vorinkubation kann man nicht ohne weiteres davon ausgehen, dass α PIX auch unter natürlichen Wachstumsbedingungen die Aufnahme von EGF verhindert. Daher wurde das Versuchsprotokoll geändert und die EGF-Konzentration auf ein physiologisches Niveau erniedrigt. Serumentzogene, HA- α PIX^{WT}-exprimierende COS-7-Zellen wurden ohne Vorinkubation mit EGF488 für definierte Zeiträume (15, 30 und 60 min) mit 25 ng/ml EGF488 versetzt und bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde nicht-endozytiertes EGF488 abgewaschen. Abbildung 26 zeigt transfizierte und untransfizierte COS-7-Zellen nach 15 bzw. 60 min EGF488-Stimulation.

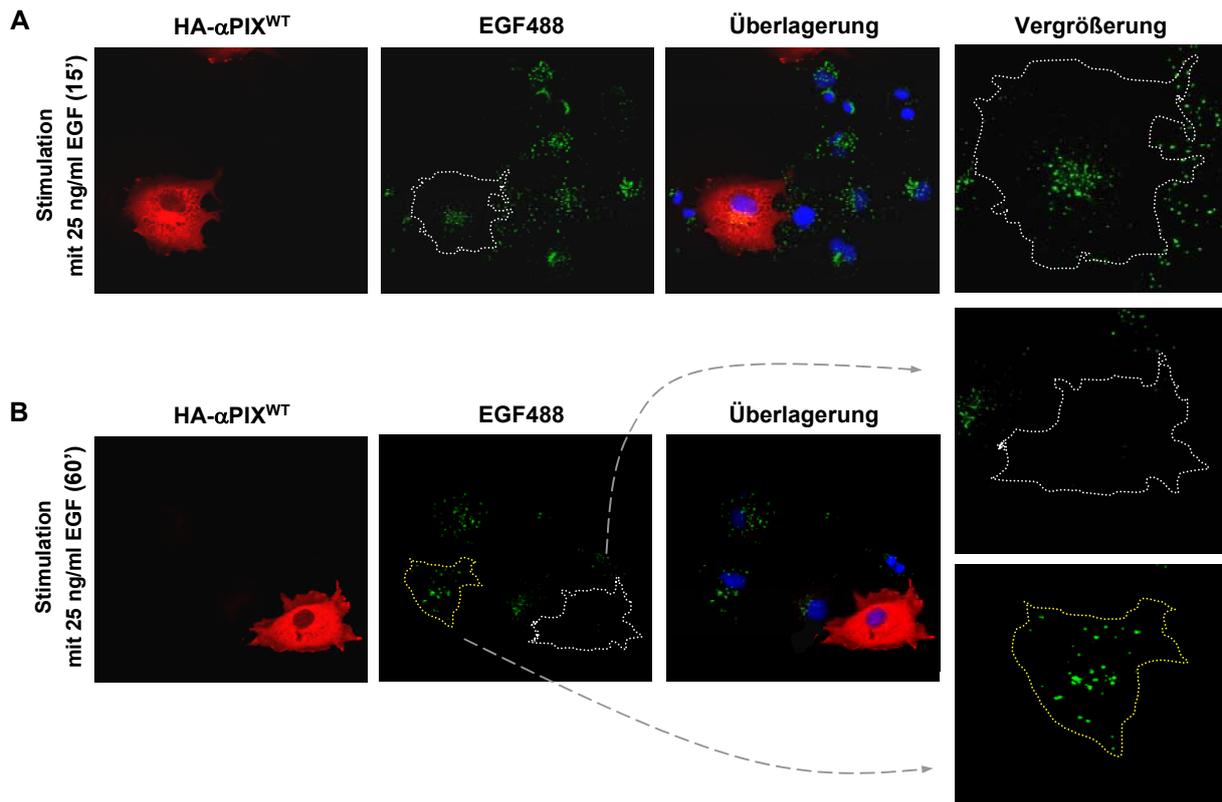


Abb. 26: Endozytose von Fluoreszenz-markiertem EGF in mit HA- α PIX^{WT}-transfizierten COS-7-Zellen (ohne Vorinkubation mit EGF488)

Serumentzogene COS-7-Zellen wurden mit einem HA- α PIX^{WT}-Konstrukt transfiziert und für 15 min (**A**) oder 60 min (**B**) mit 25 ng/ml Alexa Fluor 488-konjugiertem EGF (EGF488, grün) stimuliert. Der Nachweis von HA- α PIX^{WT} erfolgte mit einem anti-HA-Antikörper und einem Alexa Fluor 546-gekoppelten Sekundäntikörper (HA- α PIX^{WT}, rot). In der zweiten Spalte ist die Verteilung von Fluoreszenz-markiertem EGF dargestellt (EGF488, grün). Die DNA wurde mithilfe von DAPI angefärbt (Überlagerung, blau). Die Auswertung der Immunfluoreszenzexperimente erfolgte mit einem konfokalen Laserscanmikroskop. HA- α PIX^{WT}-exprimierende Zellen sind in den EGF488-Bildern mit einer weißen Umrandung hervorgehoben und rechts vergrößert dargestellt (Vergrößerung, weiß). In **B** ist zusätzlich eine untransfizierte COS-7-Zelle hervorgehoben (gelb umrandet) und rechts vergrößert dargestellt (Vergrößerung, gelb).

Nach 15-minütiger EGF488-Stimulation wurde sowohl bei untransfizierten, als auch bei α PIX-überexprimierenden Zellen die charakteristische punktförmige Verteilung des endozytierten EGF488 detektiert, wobei die Menge an zytoplasmatisch lokalisiertem EGF in allen Zellen vergleichbar war (Abb. 26 A, EGF488, grün). Auch nach 30-minütiger EGF488-Stimulation konnten keine Unterschiede in der intrazellulären EGF488-Menge zwischen transfizierten und untransfizierten COS-7-Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Nach 60-minütiger Inkubation mit EGF488 konnte in den HA- α PIX^{WT}-überexprimierenden im Unterschied zu untransfizierten Zellen beinahe kein Fluoreszenz-markiertes EGF mehr detektiert werden (Abb. 26 B, EGF488 und Vergrößerungen). In diesen Experimenten wurde also deutlich, dass die α PIX-Überexpression erst nach 60-minütiger EGF-Stimulation Auswirkungen auf die zelluläre Verteilung von Fluoreszenz-markiertem EGF zeigte. Die in Abb. 25 gezeigte starke Reduktion von intrazellulärem EGF nach bereits 15-minütiger

Stimulation in α PIX-überexprimierenden Zellen kann als ein durch Vorinkubation in EGF-haltigem Medium beschleunigter Effekt bewertet werden.

4.3 Untersuchung der EGF-Rezeptor-Internalisierung in stabil α PIX^{WT}-exprimierenden CHO-K1-Zellen mittels Rezeptor-Biotinylierungsassays

Wie oben dargestellt, ist bei α PIX-Überexpression in COS-7-Zellen die Menge an intrazellulärem EGF nach 60 min EGF-Stimulation stark reduziert. Um diese Ergebnisse zu verifizieren und quantitativ auszuwerten, wurden Rezeptor-Biotinylierungsassays in CHO-K1-Zellen durchgeführt. CHO-K1-Zellen haben sich als Modellsystem für die Untersuchung der Endozytose, des Recyclings und der Degradierung von ektopisch exprimierten EGF-Rezeptor bewährt, da sie nur sehr wenig endogenen EGF-Rezeptor, aber alle dazu nötigen Trafficking-Proteine aufweisen (Lin *et al.*, 2006). Noch vor Beginn dieser Arbeit wurde die stabil α PIX^{WT}-exprimierende CHO-K1-Zelllinie (α PIX^{WT}-CHO) hergestellt, welche zusammen mit der stabil Chloramphenicol-Acetyltransferase-exprimierenden Kontrollzelllinie (CAT-CHO) für die Biotinylierungsassays genutzt wurde. Die α PIX- bzw. CAT-Expression in diesen Zelllinien konnte mithilfe eines C-terminalen V5-Tags nachgewiesen werden (Abb. 27 A).

Zur Untersuchung der EGF-Rezeptor-Internalisierung wurden serumentzogene, transient mit *EGFR*^{WT}-transfizierte CAT- bzw. α PIX^{WT}-CHO-Zellen mit einem nicht-membrangängigen Biotin-*crosslinker* versetzt und alle Zelloberflächenproteine bei 4°C für 15 min durch Biotinylierung markiert. Nach der Entfernung ungebundenen Biotins wurden die Zelllinien für definierte Zeiträume (15, 30 und 60 min) mit EGF stimuliert, um die Internalisierung der EGF-Rezeptoren zu stimulieren. Zur Kontrolle blieb je ein Ansatz unstimuliert. Das Biotin von nicht-endozytierten Rezeptoren wurde daraufhin durch Waschen mit einem reduzierenden Glutathion-Puffer entfernt, sodass letztendlich nur noch die internalisierten Rezeptoren biotinyliert waren. Nach Zellyse wurden diese mit Streptavidin-Agarose präzipitiert und die Rohlysate und Präzipitate mittels Western-Blot und Immundetektion analysiert. Die Menge an internalisiertem EGF-Rezeptor ist demnach in den Präzipitaten, die Gesamtmenge der EGF-Rezeptor (= internalisierte und Zellmembranständige EGF-Rezeptor) in den Rohlysaten ersichtlich. Abbildung 27 B zeigt, dass ohne EGF-Stimulation nahezu kein EGF-Rezeptor internalisiert wurde (Abb. 27 B, Präzipitate, Spuren 1 und 5). Mit der EGF-Stimulation kam es in den CAT-CHO-Zellen zu einer stetigen Zunahme der internalisierten EGF-Rezeptor-Menge (Abb. 27 B, Präzipitate, Spuren 2 – 4). Im Gegensatz dazu nahm die intrazelluläre EGF-Rezeptor-Menge in den α PIX^{WT}-CHO-Zellen nur bis zum 30 min-Zeitpunkt zu, nach 60-minütiger Stimulation jedoch wieder ab (Abb. 27 B, Präzipitate, Spuren und 6 - 8). Die Blots aus vier voneinander unabhängig durchgeführten Assays wurden semi-quantitativ mittels densitometrischer Messungen der Schwärzungen auf den Autoradio-

grammen ausgewertet. Die EGF-Rezeptor-Mengen in den Präzipitaten (Abb. 27 B, Präzipitate, Spuren 1 – 8) wurden ins Verhältnis zu den Gesamt-EGF-Rezeptor-Mengen in den Rohlysaten zum jeweiligen Stimulationszeitraum gesetzt und der 60-Minutenwert der Kontrollzellen gleich eins gesetzt. Die Mittelwerte der relativen intrazellulären EGF-Rezeptor-Menge wurden als Liniendiagramm dargestellt (Abb. 27 C). Nach 60-minütiger EGF-Stimulation liegen in stabil $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -exprimierenden CHO-Zellen ca. 60% weniger internalisierte EGF-Rezeptoren vor als in den Kontrollzellen. Diese Reduktion der intrazellulären EGF-Rezeptor-Menge war in den $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -CHO-Zellen statistisch hoch signifikant.

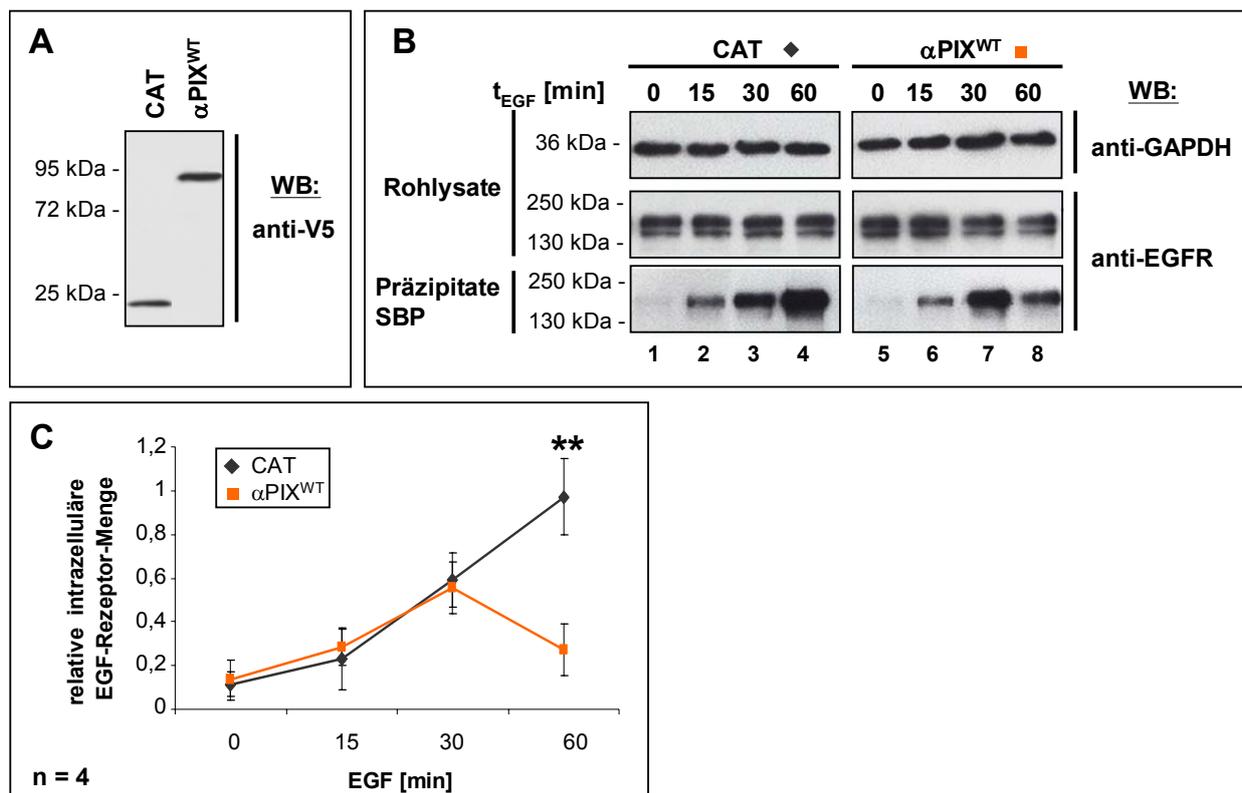


Abb. 27: Internalisierung des EGF-Rezeptors in CAT- und $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -CHO-Zellen

(A) Nachweis der Proteinmenge der V5-Fusionsproteine CAT-V5 sowie $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -V5 in den jeweiligen stabilen Zelllinien. Nach der Zellyse erfolgte die Analyse der Zelllysate mittels Western-Blot und Immundetektion mit anti-V5-Antikörpern. Links des Blots sind einige Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards angegeben. WB, Western-Blot. **(B)** Internalisierung der EGF-Rezeptoren in CAT- und $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -CHO-Zellen. Serumentzogene CAT- und $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -CHO-Zellen wurden mit einem *Wildtyp*-EGFR-Konstrukt transfiziert. Nach der 15-minütigen Oberflächenprotein-Biotinylierung bei 4°C und der Entfernung von ungebundenem Biotin durch saures Waschen wurden die Zellen für 15, 30 oder 60 min mit 25 ng/ml EGF bei 37°C stimuliert (Spuren 2 – 4, 6 – 8) bzw. blieben unbehandelt (Spuren 1 und 5). Anschließend wurden die Zellen auf Eis gekühlt, die an der Zelloberfläche verbliebenen Rezeptoren mittels reduzierendem Glutathionpuffer de-biotinyliert und die Zellen lysiert. Die Lysate wurden einer Präzipitation unter Verwendung von Streptavidin-Agarose zugeführt. Rohlysate (mittlere Blots) und Präzipitate (untere Blots) wurden schließlich nach Western-Blot mittels Immundetektion mit anti-EGFR-Antikörpern analysiert. Als Ladekontrolle wurde in den Rohlysaten die Menge des Haushaltsproteins GAPDH mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die gezeigten Blots stellen repräsentative Ergebnisse aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Biotinylierungsassays dar. Links neben den Blots sind die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards angegeben. SBP, Streptavidin-Biotin-Präzipitation; WB, Western-Blot. **(C)** Quantitative Auswertung der EGF-Rezeptor-Internalisierung. Das Diagramm zeigt die relative intrazelluläre EGF-Rezeptor-Menge nach EGF-Stimulation in CAT- und $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -CHO-Zellen als

Mittelwert aus vier voneinander unabhängigen Assays (n=4) mit errechneter Standardabweichung an. Die maximale EGF-Rezeptor-Menge nach 60 min EGF-Stimulation der CAT-CHO-Zellen wurde gleich 1 gesetzt. Der Unterschied der relativen intrazellulären EGF-Rezeptor-Menge war nach 60-minütiger EGF-Stimulation in stabil $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -exprimierenden Zellen gegenüber der Kontrollzelllinie hoch signifikant verringert ($** p < 0,01$; studentischer t-TEST). Graue Linie: CAT-CHO, orange Linie: $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -CHO.

4.3.1 Auswirkungen der stabilen Expression verschiedener αPIX -Proteinvarianten auf die EGF-Rezeptor-Internalisierung

Um zu überprüfen, ob das veränderte EGF-Rezeptor-Trafficking in $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -CHO-Zellen auf die $\alpha\text{PIX}::\text{c-Cbl}$ -Assoziation zurückzuführen ist, wurde eine CHO-Zelllinie generiert, welche stabil c-Cbl-bindungsdefizientes $\alpha\text{PIX}^{\text{W197K}}$ exprimiert. Dazu wurde die $\alpha\text{PIX}^{\text{W197K}}$ -cDNA in den Expressionsvektor pEF5/FRT/V5-DEST kloniert. Anschließend wurden Flp-In-CHO-Zellen mit diesem Konstrukt transfiziert und stabile Klone aufgrund ihrer Hygromycin-Resistenz selektiert. Nach dem Nachweis der stabilen Expression von $\alpha\text{PIX}^{\text{W197K}}$ mittels Western-Blot (Daten nicht gezeigt) wurden diese Zellen für Biotinylierungsexperimente verwendet. Darüber hinaus wurde für diese Experimente eine stabil GEF-defizientes αPIX exprimierende CHO-Zelllinie verwendet, die zu Beginn dieser Arbeit bereits vorgelegen hat. Diese αPIX -Proteinvariante $\alpha\text{PIX}^{\text{GEF-}}$ weist Austausch von zwei aufeinanderfolgenden Leucinen durch Arginin bzw. Serin in der *Dbl homology*-Domäne auf (L386R/L387S), wodurch ein αPIX -Protein entsteht, welches keine Guanin-Nukleotid-Austauschaktivität (GEF-) mehr besitzt (Yoshii *et al.*, 1999).

Analog dem zuvor beschriebenen Internalisierungsexperiment wurden die $\alpha\text{PIX}^{\text{W197K}}$ - und $\alpha\text{PIX}^{\text{GEF-}}$ -CHO-Zellen mit einem EGFR^{WT} -Konstrukt transfiziert, biotinyliert und anschließend mit EGF stimuliert. Nach der Lyse und der Präzipitation mit Streptavidin-Agarose erfolgte die Analyse der Rohlysate und Präzipitate mittels Western-Blot und Immundetektion. Die Abbildung 28 zeigt beispielhaft einen von vier unabhängig voneinander durchgeführten Biotinylierungsassays zur Untersuchung der EGF-Rezeptor-Internalisierung in $\alpha\text{PIX}^{\text{W197K}}$ - und $\alpha\text{PIX}^{\text{GEF-}}$ -CHO-Zellen.

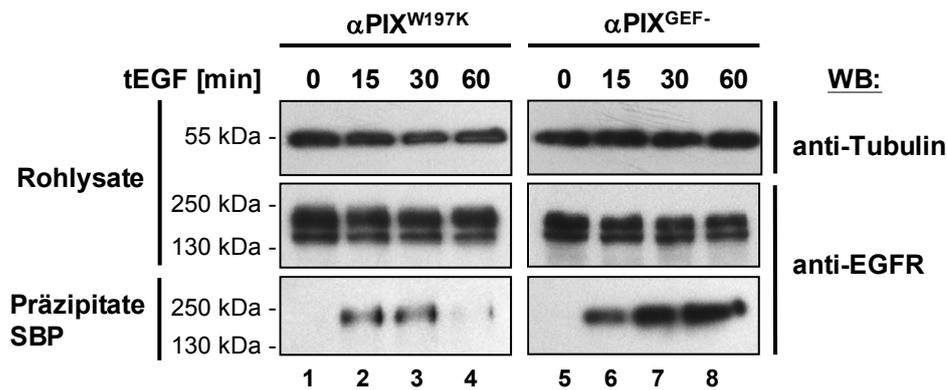


Abb. 28: Internalisierung des EGF-Rezeptors in $\alpha\text{PIX}^{\text{W197K}}$ - und $\alpha\text{PIX}^{\text{GEF-}}$ -CHO-Zellen

Serumentzogene $\alpha\text{PIX}^{\text{W197K}}$ - und $\alpha\text{PIX}^{\text{GEF-}}$ -Zellen wurden mit einem EGFR^{WT} -Konstrukt trans-fiziert. Nach Biotinylierung der Oberflächenrezeptoren bei 4°C für 15 min und saurem Waschen zur Entfernung ungebundener Biotinmoleküle wurde die Internalisierung von EGF-Rezeptoren mittels EGF-Stimulation induziert. Die Zellen wurden für 15, 30 oder 60 min mit 25 ng/ml EGF stimuliert (Spuren 2 – 4 und 6 – 8) oder blieben unbehandelt (Spuren 1 und 5). Nach Abkühlung der Zellen wurden bei 4°C die Biotinmoleküle von an der Zelloberfläche verbliebenen Rezeptoren abgewaschen und die Zellen lysiert. Die Lysate wurden zur Präzipitation mit Streptavidin-gekoppelter Agarose eingesetzt und die Rohlysate (mittlere Blots) und Präzipitate (untere Blots) schließlich nach Western-Blot mittels Immundetektion mit anti-EGFR-Antikörpern analysiert. Als Ladekontrolle wurde in den Rohlysaten die Proteinmenge von Tubulin mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die gezeigten Blots stellen repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängig durchgeführten Biotinylierungsassays dar. Links neben den Blots sind die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards angegeben. SBP, Streptavidin-Biotin-Präzipitation; WB, Western-Blot.

Für die $\alpha\text{PIX}^{\text{W197K}}$ -CHO-Zellen wurde ähnlich der $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -CHO-Zellen nach 60-minütiger EGF-Stimulation eine Abnahme der intrazellulären EGF-Rezeptor-Menge detektiert (vgl. Abb. 27 B, Spuren 5 – 8 mit Abb. 28, Spuren 1 – 4). Im Gegensatz dazu zeigten die $\alpha\text{PIX}^{\text{GEF-}}$ -CHO-Zellen an den entsprechenden Stimulationspunkten mit EGF eine mit der CAT-Kontrollzelllinie vergleichbare, intrazelluläre EGF-Rezeptor-Menge (vgl. Abb. 27 B, Spuren 1 – 4 und Abb. 28, Spuren 5 – 8). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Veränderung im EGF-Rezeptor-Trafficking in $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -CHO-Zellen auf der Funktion von αPIX als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor, nicht jedoch auf der $\alpha\text{PIX}::\text{c-Cbl}$ -Assoziation basiert.

4.4 Bestimmung der Menge an EGF-Rezeptoren an der Zelloberfläche von stabil $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -exprimierenden CHO-K1-Zellen

Der in Kapitel 4.3 nachgewiesene EGF-Rezeptor-Traffickingdefekt in $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -CHO-Zellen kann auf eine veränderte Internalisierung, auf verstärktes Recycling oder auf eine verstärkte Degradierung von EGF-Rezeptoren zurückzuführen sein. Zur Untersuchung der Internalisierung und des Recyclings von EGF-Rezeptoren in $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -überexprimierenden Zellen, wurde die jeweils vor und nach der EGF-Stimulation an der Zelloberfläche befindliche EGF-Rezeptor-Menge mittels Biotinylierung bestimmt. Dazu wurden EGFR^{WT} -transfizierte, serumentzogene CAT- und $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -CHO-Zellen für definierte Zeiträume (15, 30 und 60 min)

mit EGF stimuliert oder blieben unbehandelt (0 min). Anschließend wurden Zelloberflächenproteine bei 4°C biotinyliert, die Zellen lysiert, die biotinylierten Proteine mittels Streptavidin-konjugierten Agarosekügelchen präzipitiert und die Präzipitate auf die Menge der EGF-Rezeptoren untersucht. Die Auswertung der Experimente ergab, dass in unstimulierten Kontroll- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen nur wenig EGF-Rezeptor an der Zelloberfläche vorhanden war (Abb. 29 A, untere Blots, Spuren 1 und 5). Jedoch war die Menge an membranständigen EGF-Rezeptoren in α PIX^{WT}-CHO-Zellen zu diesem Zeitpunkt gegenüber den Kontrollzellen leicht erhöht (Abb. 29 A, Präzipitate, vgl. Spuren 1 und 5). Nach 15-minütiger EGF-Stimulation wurde in beiden Zelllinien eine relative hohe Konzentration an membranständigen EGF-Rezeptoren detektiert (Abb. 29 A, Präzipitate, Spuren 2 und 6). Der in Kapitel 4.3 zuvor beschriebene Biotinylierungsassay zur EGF-Rezeptor-Internalisierung in CAT-CHO-Zellen zeigte, dass nach 15 min EGF-Stimulation, bezogen auf den maximalen Wert nach 60 min, ca. 25% des Rezeptors internalisiert sind (siehe Abb. 27 C). Daher wurde zur Quantifizierung der Oberflächenrezeptoren die relative, an der Zelloberfläche detektierte EGF-Rezeptor-Menge nach 15 min EGF-Stimulation gleich 75% ($EGFR^{\text{GESAMT}} - EGFR^{\text{INTERNALISIERT}} = EGFR^{\text{OBERFLÄCHE}}$) gesetzt (Abb. 29 B). Davon ausgehend ergab sich, dass nach 30 min EGF-Stimulation in beiden Zelllinien nun mehr etwa 23% der ursprünglich membranständigen EGF-Rezeptoren an der Zellmembran lokalisiert waren (Abb. 29 B). Nach 60-minütiger EGF-Stimulation war an der Zelloberfläche der Kontrollzellen nur noch ca. 11% der EGF-Rezeptoren vorhanden (Abb. 29 B). Im Gegensatz dazu nahm die EGF-Rezeptor-Menge an der Zelloberfläche von α PIX^{WT}-CHO-Zellen statistisch signifikant auf ca. 64% zu, was auf ein verstärktes Recycling der EGF-Rezeptoren in dieser Zelllinie hinweist (vgl. Abb. 29 A, Präzipitate, Spuren 4 und 8; Abb. 29 B).

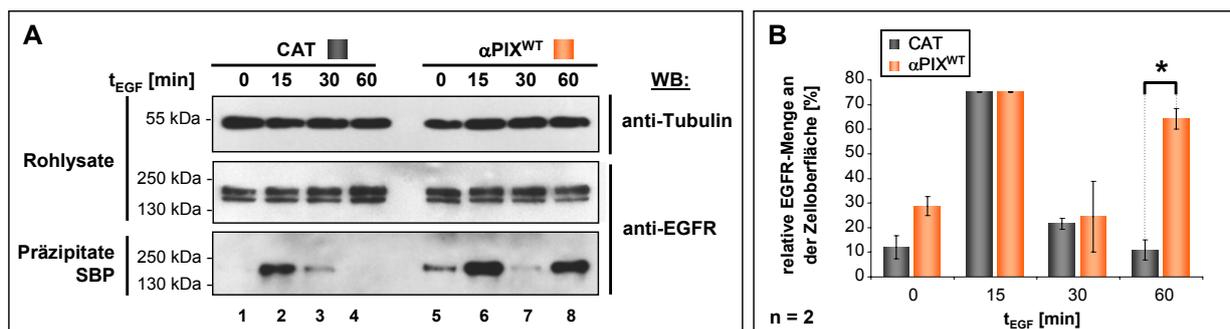


Abb. 29: Bestimmung der Zelloberflächen-ständigen EGF-Rezeptoren in CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen

(A) $EGFR^{\text{WT}}$ -transfizierte CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen wurden für 15, 30 oder 60 min mit 25 ng/ml EGF stimuliert (Spuren 2 – 4 und 6 – 8) oder blieben unbehandelt (Spuren 1 und 5). Nach Abkühlung der Zellen auf Eis erfolgten die Oberflächen-Biotinylierung, ein saurer Waschschriff zur Entfernung von ungebundenem Biotin, die Lyse der Zellen und die Präzipitation der biotinylierten Oberflächenproteine mit Streptavidin-Agarose. Rohlysate (mittlerer Blot) und Präzipitate (unterer Blot) wurden nach Western-Blot mittels Immundetektion mit einem anti-EGFR-Antikörper untersucht. Als Ladekontrolle wurde in den Rohlysaten Tubulin mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Links der Blots sind die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards angegeben. Der gezeigte Blot stellt ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Biotinylierungsassays dar. SBP, Streptavidin-Biotin-Präzipitation; WB, Western-Blot. **(B)** Quantitative

Auswertung von zwei unabhängigen Oberflächen-Biotinylierungsassays (n=2). Das Balkendiagramm zeigt die relative EGF-Rezeptor-Menge an der Zelloberfläche nach EGF-Stimulation an. Die jeweils mittlere EGF-Rezeptor-Menge an der Zelloberfläche wurde dazu zur jeweiligen Gesamt-EGF-Rezeptor-Menge normalisiert und ist prozentual mit errechneter Standardabweichung angegeben. Die maximale EGF-Rezeptor-Menge an der Zelloberfläche nach 15-minütiger EGF-Stimulation wurde gleich 75% der Oberflächen-ständigen EGF-Rezeptoren gesetzt (siehe auch Abb. 27 C). Die relative EGF-Rezeptor-Menge an der Zelloberfläche war nach 60-minütiger EGF-Stimulation in α PIX^{WT}-CHO-Zellen gegenüber der Kontrollzelllinie signifikant erhöht (*p<0,1; studentischer t-TEST). Graue Balken: CAT-CHO-Zellen, orange Balken: α PIX^{WT}-CHO-Zellen.

4.5 Verifizierung des veränderten EGF-Rezeptor-Recyclings in α PIX^{WT}-CHO-Zellen mithilfe von Recycling-Biotinylierungsassays

Zur Überprüfung der These, dass die α PIX-Überexpression das Recycling des EGF-Rezeptors beeinflusst, wurden weitere Biotinylierungsassays durchgeführt. Serummentzogene, EGFR^{WT}-überexprimierende CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen wurden biotinyliert, für 30 min mit EGF stimuliert, da bis zu diesem Zeitpunkt die Internalisierung in CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen vergleichbar war, und anschließend zum Stoppen des EGF-Rezeptor-Traffickings auf Eis abgekühlt. Das Biotin von nicht-internalisierten EGF-Rezeptoren wurde bei 4°C entfernt und die Zellen anschließend für definierte Zeiträume (5, 15 oder 30 min) auf 37°C wiedererwärmt, um das Recycling der EGF-Rezeptoren zu ermöglichen. Die Zellen wurden nach Wiedererwärmung abgekühlt und die an die Zelloberfläche recycelten EGF-Rezeptoren erneut de-biotinyliert. Somit war die Gesamtmenge der biotinylierten EGF-Rezeptoren um den recycelten Anteil reduziert. Als Kontrolle für die nach 30 min EGF-Stimulation in der Zelle vorhandenen, internalisierten Biotin-EGF-Rezeptor-Komplexe wurde jeweils eine Zellpopulation der verwendeten Zelllinie ohne Wiedererwärmung direkt lysiert. Nach Zelllyse wurden die biotinylierten Rezeptoren mit Streptavidin-konjugierten Agarosekügelchen präzipitiert und die EGF-Rezeptor-Menge in den Präzipitaten bestimmt. Es wurden vier voneinander unabhängige Experimente durchgeführt; in Abb. 30 A ist einer dieser Versuche exemplarisch dargestellt. Nach 30-minütiger EGF-Stimulation (= 0 min Wiedererwärmung) wurde in CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen etwa gleich viel intrazellulärer EGF-Rezeptor detektiert (Abb. 30 A, Präzipitate, Spuren 1 und 5). Diese Werte entsprechen in der quantitativen Auswertung der Blots der maximalen Menge an recycelbaren EGF-Rezeptoren (100%). Davon ausgehend wurde die relative EGF-Rezeptor-Menge bestimmt, welche nach 5, 15 oder 30 min Wiedererwärmung innerhalb der Zelle detektiert werden konnte (Abb. 30 B). Es zeigte sich, dass die intrazelluläre EGF-Rezeptor-Menge in CAT-CHO-Zellen nach 5 min Wiedererwärmung bei 61% liegt und minimal ansteigt (15 min) und nach 30 min auf etwa 43% abfällt (Abb. 30 A und B). α PIX^{WT}-CHO-Zellen zeigen nach der Reduktion auf ca. 53% der Ausgangsmenge nach 5 min Wiedererwärmung einen kontinuierlichen Anstieg der intrazellulären EGF-Rezeptor-Menge über 72% nach 15 min bis zu über 85% nach 30 min

(Abb. 30 A und B). Diese Ergebnisse zeigen, dass der EGF-Rezeptor in beiden Zelllinien recycelt und auch re-internalisiert wird, da es zwischen 5 und 15 min Wiedererwärmung zu einer Zunahme der intrazellulären EGF-Rezeptor-Menge kam. Bemerkenswert ist der hoch signifikante Unterschied in der intrazellulären EGF-Rezeptor-Menge zwischen α PIX^{WT}- und CAT-CHO-Zellen nach 30 min Wiedererwärmung ($p < 0,01$). Diese Resultate deuten darauf hin, dass Recycling und Re-Internalisierung der EGF-Rezeptoren in den α PIX^{WT}-CHO-Zellen verändert ist. Es lässt sich jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht mit Sicherheit sagen, ob der EGF-Rezeptor in den α PIX-überexprimierenden Zellen verstärkt recycelt/re-internalisiert wird oder ob der Abbau der EGF-Rezeptor inhibiert ist.

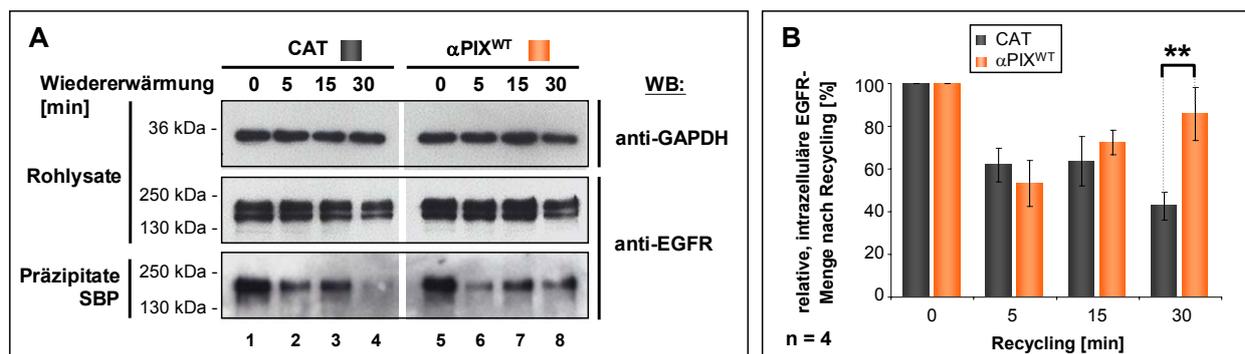


Abb. 30: Bestimmung der intrazellulären EGF-Rezeptor-Menge nach Wiedererwärmung von CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen

(A) Serumentzogene CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen wurden mit einem *EGFR*^{WT}-Konstrukt transfiziert. Nach der Oberflächen-Biotinylierung bei 4°C für 15 min und der Entfernung freien Biotins mit HBSS-Tris-HCl wurden die Zellen für 30 min bei 37°C mit 25 ng/ml EGF stimuliert. Der anschließenden Abkühlung auf Eis und De-Biotinylierung mit einem reduzierenden Glutathion-Puffer folgte eine Wiedererwärmung der Zellen für 5, 15 oder 30 min auf 37°C (Spuren 2 – 4 und 6 – 8) oder die direkte Zellyse (Spuren 1 und 5). Daraufhin wurde das Biotin von zur Zelloberfläche recycelten EGF-Rezeptoren durch Waschen mit dem Glutathion-Puffer entfernt und die Zellen lysiert. Die Lysate wurden einer Präzipitation unter Verwendung von Streptavidin-Agarose zugeführt. Die Rohlysate (mittlere Blots) und Präzipitate (untere Blots) wurden mittels Western-Blot und Immundetektion mit einem anti-EGFR-Antikörper analysiert. Als Ladekontrolle wurde die Menge des Haushaltsproteins GAPDH in den Rohlysaten mit anti-GAPDH-Antikörpern detektiert. Die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards sind links der Blots angegeben. Der gezeigte Blot stellt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Biotinylierungsassays dar. SBP, Streptavidin-Biotin-Präzipitation; WB, Western-Blot. (B) Quantitative Auswertung von drei unabhängigen Recyclingassays ($n=3$). Die jeweils mittlere intrazelluläre EGF-Rezeptor-Menge wurde ins Verhältnis zur Gesamt-EGF-Rezeptor-Menge gesetzt und die relative intrazelluläre EGF-Rezeptor-Menge mit errechneter Standardabweichung als Balkendiagramm dargestellt. Die Menge der intrazellulären EGF-Rezeptoren der nicht-wiedererwärmten Zellen (= 0 min) wurde gleich 100% gesetzt. ** $p < 0,01$, Ergebnis ist statistisch hoch signifikant. Graue Balken: CAT-CHO-Zellen, orange Balken: α PIX^{WT}-CHO-Zellen.

4.5.1 Untersuchung zum EGF-Rezeptor-Abbau in CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen bei gleichzeitiger Inhibierung des EGF-Rezeptor-Recyclings

Im vorigen Versuch wurde gezeigt, dass in α PIX^{WT}-exprimierenden CHO-Zellen nach 30-minütiger Wiedererwärmung mehr EGF-Rezeptoren in der Zelle vorhanden waren als in den Kontrollzellen. Um herauszufinden, ob dieses Ergebnis durch ein stärkeres EGF-Rezeptor-Recycling/Re-Internalisierung oder einen verminderten EGF-Rezeptor-Abbau in den α PIX^{WT}-

CHO-Zellen zu erklären ist, wurde der oben beschriebene Recyclingassay unter selektiver Inhibition des EGF-Rezeptor-Recyclings wiederholt. Dazu wurde dem Stimulations- und dem Wiedererwärmungsmedium jeweils 0,3 mM Primaquin zugesetzt. Primaquin ist eine schwache Base, die in Endosomen akkumuliert, deren pH erhöht und letztlich das Recycling von endozytierten Membranproteinen blockiert (van Weert *et al.*, 1995). In Abbildung 31 A ist eines von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten exemplarisch dargestellt.

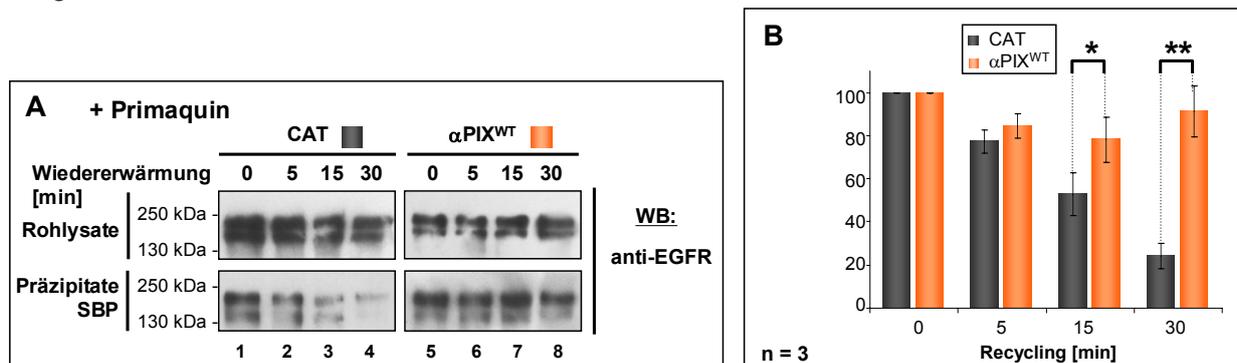


Abb. 31: Bestimmung der intrazellulären EGF-Rezeptormenge nach Wiedererwärmung Recycling-inhibierter CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen

(A) Gehungerte, mit einem $EGFR^{WT}$ -Konstrukt transfizierte CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen wurden bei 4°C für 15 min Oberflächen-biotinyliert. Nach Abwaschen von ungebundenem Biotin erfolgte eine EGF-Stimulation (25 ng/ml, 30 min), anschließende Abkühlung auf Eis und De-Biotinylierung mit reduzierendem Glutathion-Puffer bei 4°C. Die Zellen wurden daraufhin für 5, 15 oder 30 min wiedererwärmt (Spuren 2 – 4 und 6 – 8), auf Eis abgekühlt und abschließend zur Entfernung von Biotin an recycelten EGF-Rezeptoren bei 4°C mit Glutathion-Puffer behandelt. Nach Zellyse erfolgte die Präzipitation von intrazellulären, biotinylierten EGF-Rezeptoren mit Streptavidin-Agarose. Die Präzipitate (untere Blots) und Rohlysate (oberen Blots) wurden nach Western-Blot mittels Immundetektion mit anti-EGFR-Antikörpern analysiert. Die gezeigten Blots stellen repräsentative Ergebnisse von drei unabhängig voneinander durchgeführten Biotinylierungsassays dar. SBP, Streptavidin-Biotin-Präzipitation; WB, Western-Blot. (B) Quantitative Auswertung von drei unabhängigen Versuchen (n=3). Das Balkendiagramm zeigt die mittlere, relative intrazelluläre EGF-Rezeptor-Menge nach Wiedererwärmen in Prozent an. Die relative EGF-Rezeptor-Menge der nicht-wiedererwärmten Zellen (= 0 min) wurde gleich 100% gesetzt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an. * p<0,1, Ergebnis signifikant; ** p<0,01, Ergebnis hoch signifikant. Graue Balken: CAT-CHO-Zellen; orange Balken: α PIX^{WT}-CHO-Zellen.

Für die Quantifizierung der Proteinbanden wurde die intrazelluläre EGF-Rezeptor-Menge nach der 30-minütigen Internalisierung ohne Wiedererwärmung als die maximale Menge (100%) an recycelbaren EGF-Rezeptoren festgelegt (Abb. 31 B). Davon ausgehend ließ sich die relative, intrazelluläre EGF-Rezeptor-Menge nach 5-, 15- oder 30-minütiger Wiedererwärmung der Zellen berechnen. In den Kontrollzellen nahm nach den Wiedererwärmungsphasen die intrazelluläre EGF-Rezeptor-Menge stetig ab und lag nach 30 min bei ca. 20% (Abb. 31 A und B). Da das Recycling während dieser Versuche mithilfe von Primaquin inhibiert war, kann die Abnahme der intrazellulären EGF-Rezeptor-Menge auf die Degradierung der EGF-Rezeptoren in Lysosomen zurückgeführt werden. In den α PIX^{WT}-CHO-Zellen wurde nach 5-minütiger Wiedererwärmung zunächst eine Verringerung des intra-

zellulären EGF-Rezeptor-Pools um 20% detektiert und diese Menge blieb auch nach 15 und 30 min relativ konstant, mit 80 bzw. 90% (Abb. 31 A und B). Diese Ergebnisse deuten an, dass EGF-Rezeptoren in den Recycling-inhibierten α PIX^{WT}-CHO-Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen nicht degradiert werden, sondern im Intrazellularraum akkumulieren.

4.6 Untersuchungen zum EGF-Rezeptor-Recycling in CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen bei gleichzeitiger Inhibierung des lysosomalen Proteinabbaues

Die Ergebnisse des in Kapitel 4.5.1 beschriebenen Versuchs zeigen, dass α PIX-Expression in CHO-Zellen die Degradierung der EGF-Rezeptoren hemmt, können jedoch nicht vollständig die in Kapitel 4.5 beschriebenen Werte für die intrazelluläre EGF-Rezeptor-Menge nach EGF-Rezeptor-Recycling erklären. Zur selektiven Untersuchung des EGF-Rezeptor-Recyclings wurden EGFR^{WT}-überexprimierende CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen zunächst mit den Proteaseinhibitoren Leupeptin und Pepstatin A behandelt, um den lysosomalen Abbau der EGF-Rezeptoren zu verhindern. Im Anschluss daran erfolgten eine Oberflächenbiotinylierung bei 4°C, eine 30-minütige Stimulation mit EGF bei 37°C und die De-Biotinylierung der nicht-internalisierten EGF-Rezeptoren bei 4°C. Zur Kontrolle wurde nach diesen Schritten je eine Zellpopulation der CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen lysiert (= 0 min Recycling) und die in diesen Zellen detektierte, intrazelluläre EGF-Rezeptor-Menge gleich 100% gesetzt (Abb. 32 A und B). Die verbliebenen Zellen wurden für 2 min auf 37°C wiedererwärmt. In diesem Zeitraum ist das Recycling des EGF-Rezeptors, jedoch nicht dessen Re-Internalisierung möglich. Nach diesem Schritt wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und das Biotin bei 4°C von den an die Zelloberfläche recycelten EGF-Rezeptoren entfernt, so dass nur die innerhalb der Zelle verbliebenen Rezeptoren biotinyliert vorlagen. In Parallelansätzen wurden bis zu vier weitere Zyklen bestehend aus jeweils 2 min Wiedererwärmung und De-Biotinylierung der recycelten Rezeptoren durchgeführt und die Zellen anschließend lysiert. Biotinylierte EGF-Rezeptoren wurden mit Streptavidin-Agarose präzipitiert und die Präzipitate auf die Menge an EGF-Rezeptoren untersucht (Abb. 32 A). Die Auswertung von vier voneinander unabhängigen Versuchen ergab, dass die EGF-Rezeptor-Menge in den Kontrollzellen innerhalb von fünf Zyklen, bestehend aus Wiedererwärmung und De-Biotinylierung, nur leicht, um ca. 14%, abnahm (Abb. 32 A, B und C). Im Gegensatz dazu wurde nach fünf Zyklen in den stabil α PIX^{WT}-exprimierenden Zellen eine Abnahme der intrazellulären EGF-Rezeptor-Menge um ca. 67% nachgewiesen (Abb. 32 A, B und C). Da der lysosomale Abbau der EGF-Rezeptoren inhibiert worden war, entspricht die Abnahme der intrazellulären EGF-Rezeptor-Menge der recycelten EGF-Rezeptor-Fraktion.

Die α PIX-Überexpression scheint somit das Recycling der EGF-Rezeptoren stark zu erhöhen, nämlich nach 10 min Recycling um etwa das Vierfache (Abb. 32 C, 10 min).

Darüber hinaus zeigten α PIX^{WT}-CHO-Zellen einen sehr frühen Beginn des Recyclings, schon nach 2 min, wohingegen die Kontrollzellen erst nach 8 min effektiv die EGF-Rezeptoren an die Membran zurücktransportierten (Abb. 32 B und C).

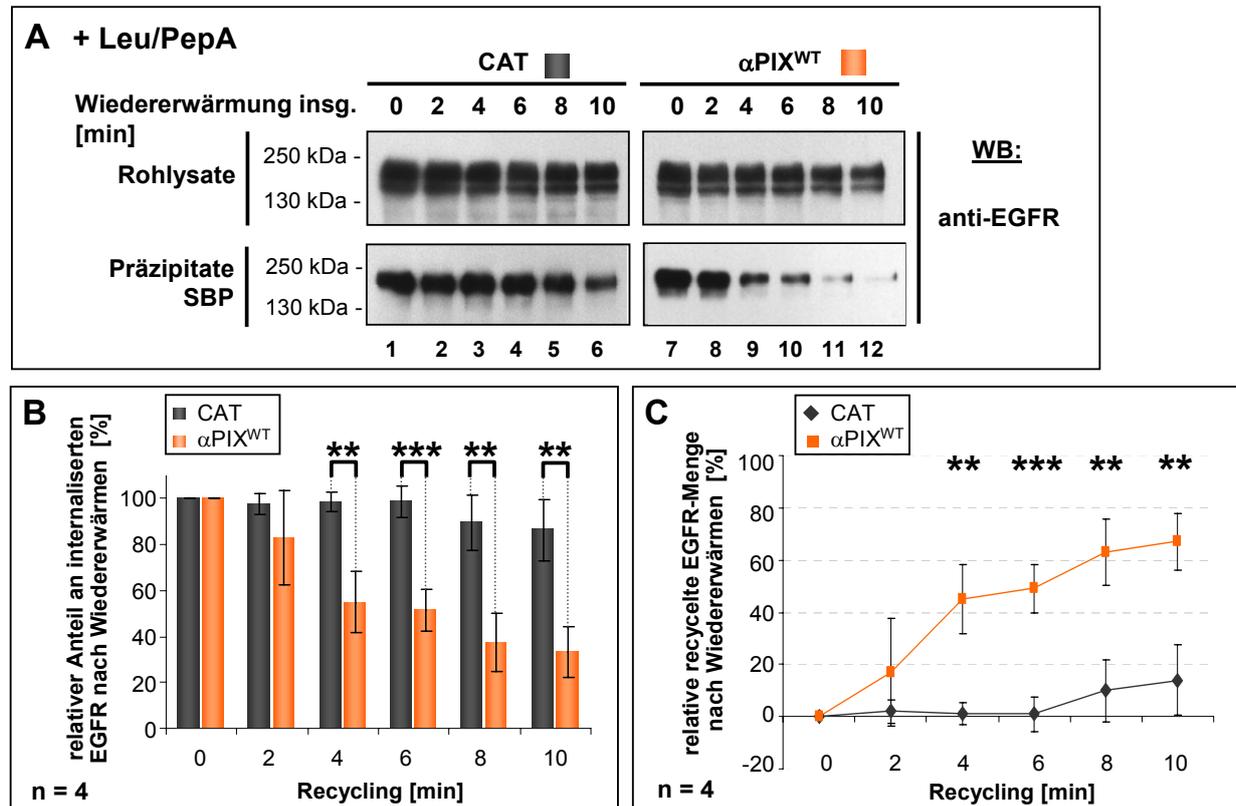


Abb. 32: Untersuchung des EGF-Rezeptor-Recyclings in CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen unter Inhibition des lysosomalen Proteinabbaus

(A) CAT- oder α PIX^{WT}-exprimierende, serumentzogene CHO-Zellen wurden mit $EGFR^{WT}$ -Konstrukten transient transfiziert. Nach 18 h wurden die Zellen für 24 h mit Inhibitoren des lysosomalen Proteinabbaus [100 μ M Leupeptin (Leu) und 100 μ M Pepstatin A (PepA)] inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Biotinylierung der Oberflächenrezeptoren bei 4°C, die Stimulation der Zellen mit 25 ng/ml EGF für 30 min bei 37°C, das Herunterkühlen auf Eis und die anschließende De-Biotinylierung der nicht internalisierten, biotinylierten Oberflächenrezeptoren. Zur Bestimmung der internalisierten EGF-Rezeptor-Ausgangsmenge wurde jeweils eine Zellpopulation lysiert (Spuren 1 und 7). Weitere Parallelansätze wurden einer 2-minütigen Wiedererwärmung auf 37°C unterzogen, auf Eis heruntergekühlt, zur De-Biotinylierung der recycelten Rezeptoren mit eiskaltem Glutathion-Puffer behandelt und anschließend lysiert (Spuren 2 – 8). Parallelkulturen wurden bis zu vier weiteren Zyklen aus Wiedererwärmung und De-Biotinylierung unterzogen (Spuren 3 – 6 und 9 – 12). Die Präzipitation der biotinylierten EGF-Rezeptoren erfolgte mit Streptavidin-Agarose. Rohlysate (obere Blots) und Präzipitate (untere Blots) wurden nach Western-Blot mithilfe der Immundetektion mit anti-EGFR-Antikörpern analysiert. Links der Blots sind die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards dargestellt. Der gezeigte Blot stellt ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängig durchgeführten Biotinylierungsassays dar. SBP, Streptavidin-Biotin-Präzipitation; WB: Western-Blot. **(B)** Quantitative Auswertung von vier unabhängigen Versuchen (n=4). Das Diagramm zeigt den mittleren, relativen Anteil von internalisierten EGF-Rezeptoren innerhalb der Zelle nach Wiedererwärmung, normalisiert zur EGF-Rezeptor-Gesamtmenge an. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an. Die relative EGF-Rezeptor-Menge in den nicht-wiedererwärmten Zellen (= 0 min) wurde gleich 100% gesetzt. ** p<0,01, Ergebnis hoch signifikant; *** p<0,001, Ergebnis höchst signifikant. Graue Balken: CAT-CHO-Zellen, orange Balken: α PIX^{WT}-CHO-Zellen. **(C)** Das Liniendiagramm stellt

die in (B) gezeigten Werte reziprok als mittlere, relative recycelte EGF-Rezeptor-Menge dar. Graue Linie: CAT-CHO-Zellen, orange Linie: α PIX^{WT}-CHO-Zellen.

5. Immunzytochemische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von endozytiertem EGF in CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen

Zur detaillierten Untersuchung des Transports des epidermalen Wachstumsfaktors EGF in CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen wurde den Zellen für definierte Zeiträume Fluoreszenzmarkiertes EGF (EGF488) zur Endozytose angeboten und die Kollokalisierung von internalisiertem EGF mit Markerproteinen unterschiedlicher subzellulärer Kompartimente analysiert.

5.1 Untersuchung der Lokalisation von EGF in frühen Endosomen von CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen

Serumentzogene CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen wurden mit einem *EGFR*^{WT}-Konstrukt transfiziert und für 30 oder 60 min mit Alexa Fluor 488-konjugiertem EGF (EGF488) stimuliert. Das endozytierte EGF488 war anhand eines Punktmusters im Zytoplasma der CHO-Zellen zu erkennen (Abb. 33, erste Spalte, grün). Als Markerprotein wurde das endogene *early endosome antigen 1*-Protein mit einem anti-EEA1-Antikörper und einem Alexa Fluor 546-konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen (Abb. 33, zweite Spalte, rot). EEA1 ist ein für frühe Endosomen spezifisches, membrangebundenes Protein, welches für die Fusion von endozytierten Vesikeln essentiell ist (Mills *et al.*, 1998). Die Auswertung der Versuche ergab, dass nach 30-minütiger Stimulation mit EGF488 CAT- sowie α PIX^{WT}-CHO-Zellen etwa gleich viel EGF endozytiert hatten (Abb. 33 A, erste Spalte). Das internalisierte EGF488 lokalisierte dabei in CAT-CHO-Zellen stärker perinukleär (Abb. 33 A, EGF488, oberes Bild, grün) als in den α PIX^{WT}-CHO-Zellen, wo es diffus im Zytoplasma verteilt war (Abb. 33 A, EGF488, unteres Bild, grün). Frühe Endosomen waren ebenfalls punktförmig im Zellplasma zu erkennen und lokalisierten wiederum in CAT-CHO-Zellen, welche EGF488 internalisiert hatten, verstärkt perinukleär und in α PIX^{WT}-CHO-Zellen dispers verteilt im Zytoplasma (Abb. 33 A + B, EEA1, rot). Wie anhand der pseudogelben Färbung in den Vergrößerungsausschnitten von Abbildung 33 A erkennbar ist, kollokalisierte in beiden Zelllinien das endozytierte EGF488 zu diesem Stimulationszeitpunkt partiell mit dem EEA1-Protein. Nach 60-minütiger EGF488-Inkubation konnte in den α PIX^{WT}-CHO-Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen nur noch wenig EGF488 detektiert werden (Abb. 33 B, EGF488, grün). Zu diesem Stimulationszeitpunkt kollokalisieren EGF488 und EEA1 in beiden Zelllinien nur mehr in geringem Maße, wobei in α PIX^{WT}-CHO-Zellen auch nur wenig EGF488 vorlag (Abbildung 33 B, Überlagerung und Vergrößerung, pseudogelbe Färbung). Diese Ergebnisse deuten

daraufhin, dass der vesikel-vermittelte Transport von EGF in stabil α PIX-exprimierenden CHO-Zellen verändert ist: EGF-haltige frühe Endosomen zeigen eine veränderte zelluläre Lokalisation und EGF verschwindet vorzeitig aus dem Zytoplasma.

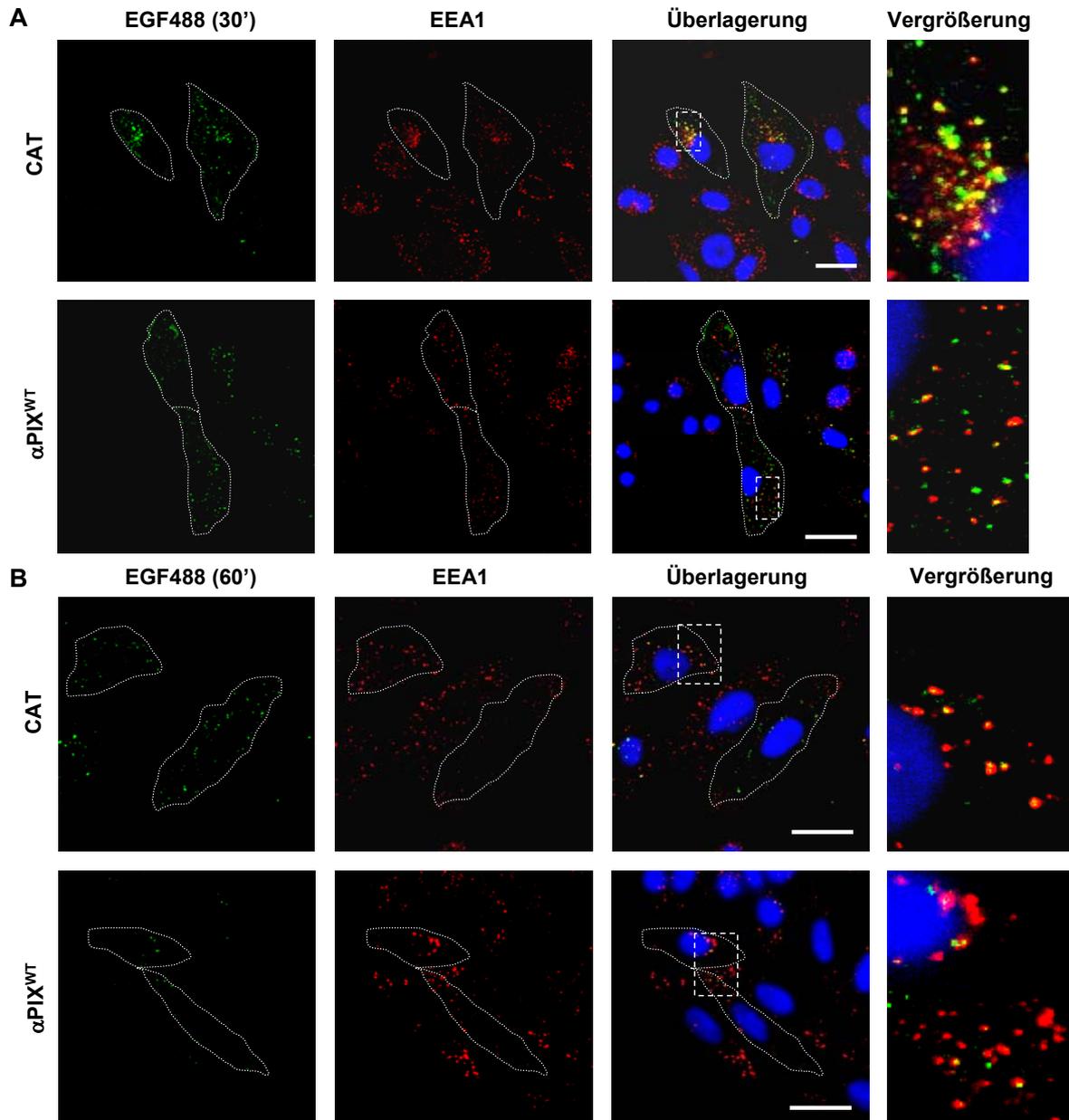


Abb. 33: Subzelluläre Lokalisation von endozytiertem, Fluoreszenz-markiertem EGF488 und Kofärbung von endogenem EEA1 als Markerprotein für frühe Endosomen in CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen

Serumentzogene, mit $EGFR^{WT}$ -Konstrukten transfiizierte CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen wurden mit 25 ng/ml Alexa Fluor 488-konjugiertem EGF (EGF488) für 30 (**A**) oder 60 min (**B**) stimuliert. Die Verteilung von EGF ist an der grünen Pseudofarbe zu erkennen (A und B, EGF488). EEA1 wurde unter Verwendung eines anti-EEA1-Primärantikörpers und eines Alexa Fluor 546-konjugierten Sekundärantikörpers detektiert (A und B, EEA1, rot). In den Überlagerungs- und Vergrößerungsbildern weisen pseudogelbe Färbungen auf eine Kolo-kalisation von EGF488 und EEA1 hin. Die weißen, gestrichelten Rechtecke markieren den in der Vergrößerung gezeigten Ausschnitt (A und B, Überlagerung und Vergrößerung) und die gepunkteten Linien den Umriss von zwei Zellen mit internalisiertem EGF488 (A und B, Spalten 1 - 3). Mittels DAPI-Färbung der DNA wurden die Zellkerne

dargestellt. Die Auswertung der Experimente erfolgte mittels konfokaler Laserscannmikroskopie. Die weißen Balken in den Überlagerungsbildern entsprechen einer Länge von 20 μm .

5.2 Untersuchung der Lokalisation von EGF in Rab7-positiven Zellkompartimenten von CAT- und $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -CHO-Zellen

Für die Lokalisationsstudien von Fluoreszenz-markiertem EGF in späten Endosomen wurden die serumentzogenen Zellen am Vortag der Immunfluoreszenzversuche mit einem EGFR^{WT} - und einem GFP-Rab7 -Konstrukt transfiziert. Rab7 gehört zur Rab-Familie der Ras-ähnlichen GTPasen, vermittelt die Fusion später endozytotischer Strukturen zu Lysosomen und ist hauptsächlich in den späten Endosomen lokalisiert (Bucci *et al.*, 2000). Vor der Fixierung der Zellen erfolgte die Stimulation mit Alexa Fluor 555-konjugiertem EGF (EGF555) für 30 min oder 60 min. Zur Untersuchung des EGF-Traffickings nach Stimulation mit darauf folgendem EGF-Entzug wurden Zellen in einem Parallelansatz für 30 min mit Fluoreszenz-markiertem EGF stimuliert und anschließend zweimal mit saurem Waschpuffer gewaschen, um gebundenes EGF von den an der Zelloberfläche verbliebenen EGF-Rezeptoren zu entfernen. Danach wurden die Zellen für weitere 30 min mit warmem Hungermedium auf 37°C wiedererwärmt. Die Auswertung der Immunfluoreszenzpräparate zeigte, dass GFP-Rab7 und somit die späten Endosomen im perinukleären Bereich der Zelle lokalisieren (Abb. 34 A bis C, GFP-Rab7). Da GFP zu einem gewissen Maß in den Zellkern transloziert (Seibel *et al.*, 2007), konnte GFP-Rab7 auch in den Zellkernen nachgewiesen werden (Abb. 34 A bis C, GFP-Rab7). Nach 30-minütiger EGF555-Inkubation wurde sowohl in den Kontrollzellen als auch in den stabil $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -exprimierenden Zellen nur wenig EGF555 detektiert (Abb. 34 A, EGF555), welches mit Rab7 kolokalisierte (Abb. 34 A, Überlagerung und Vergrößerung). Nach 60-minütiger Stimulation mit EGF555 wurde in den $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -CHO-Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen nur sehr wenig Fluoreszenz-markiertes EGF nachgewiesen (Abb. 34 B, EGF555, grün). Wie anhand der pseudogelben Bereiche in den Vergrößerungsbildern von Abbildung 34 B zu erkennen ist, kolokolisieren EGF555 und GFP-Rab7 in den Kontrollzellen partiell; in den stabil $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -exprimierenden Zellen konnte jedoch beinahe keine Kolokalisation festgestellt werden (Abb. 34 B, Überlagerung und Vergrößerung). Im Gegensatz dazu konnte in den wiedererwärmten $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$ -CHO-Zellen eine deutlich erhöhte Menge an Fluoreszenz-markiertem EGF detektiert werden (Abb. 34 C, $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$, EGF555), welches partiell mit GFP-Rab7 kolokalisierte und demzufolge in den späten Endosomen lokalisiert war (Abb. 34 C, $\alpha\text{PIX}^{\text{WT}}$). Wie Abbildung 34 C auch zeigt, konnte dies nicht in den Kontrollzellen festgestellt werden - diese wiesen nur eine sehr geringe EGF-Menge im Zytoplasma der Zellen auf, welche zudem so gut wie gar nicht mit GFP-Rab7 kolokalisiert (Überlagerung und Vergrößerung, CAT).

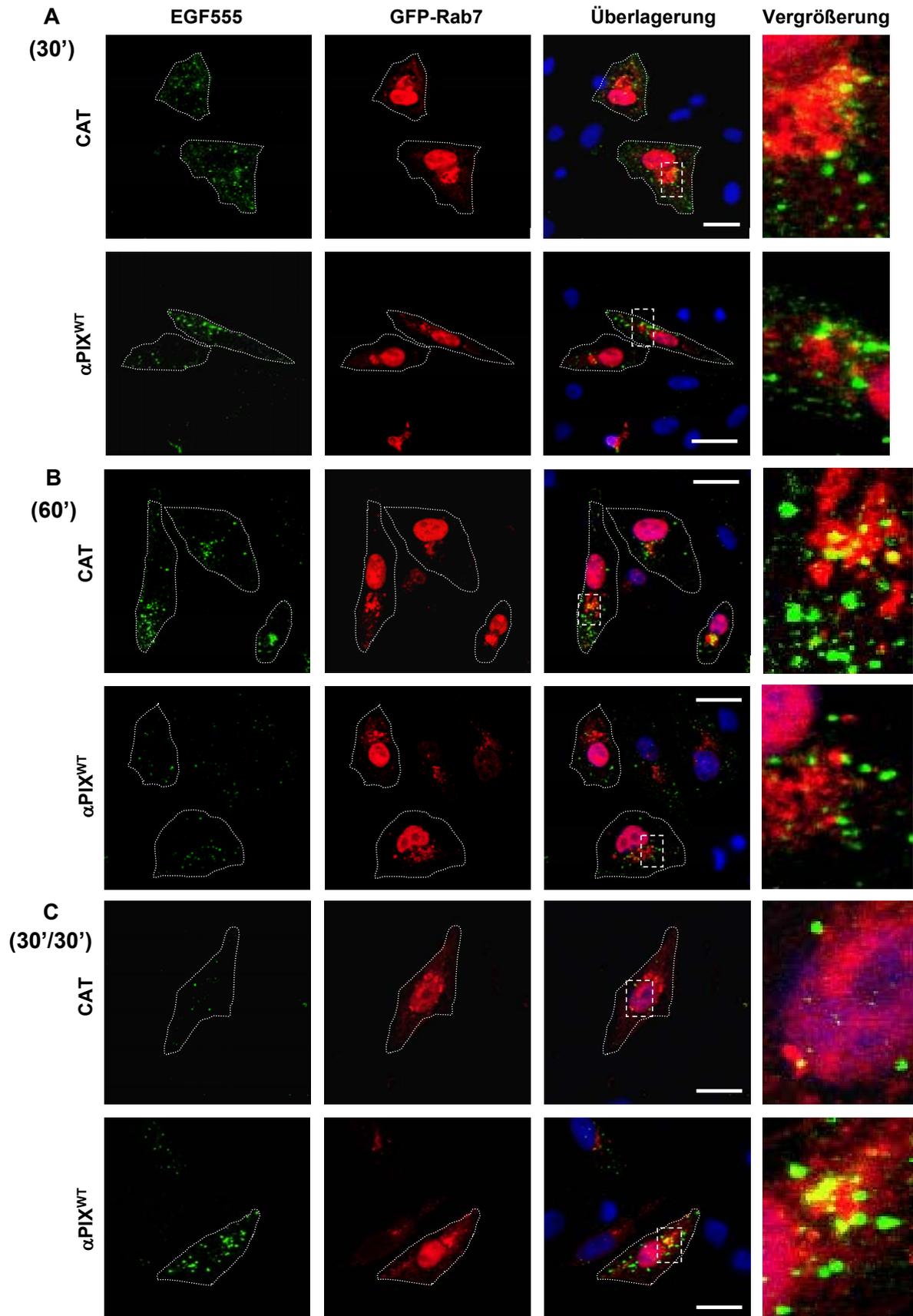


Abb. 34: Subzelluläre Lokalisation von endozytiertem EGF555 und Kolokalisation mit GFP-Rab7 als Markerprotein für späte Endosomen in CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen

Serumentzogene CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen wurden mit *EGFR^{WT}*- und *GFP-Rab7^{WT}*-Konstrukten kotransfiziert und am nächsten Tag mit 25 ng/ml Alexa Fluor 555-konjugiertem EGF für 30 min (A), 60 min (B) oder 30 min mit anschließendem sauren Waschen und 30-minütiger Wiedererwärmung (C) stimuliert. Die Lokalisation von GFP-Rab7 ist rot (A bis C, GFP-Rab7), internalisiertes EGF555 ist grün dargestellt (A bis C, EGF555). In den Überlagerungs- und Vergrößerungsbildern weisen pseudogelbe Bereiche auf Kolokalisation von EGF555 und GFP-Rab7 hin. Weiße, gestrichelte Rechtecke (A - C, Überlagerung) markieren die in den Vergrößerungen gezeigten Ausschnitte (A bis C, Vergrößerung). Die gepunkteten Linien zeigen den Umriss von Zellen mit internalisiertem EGF488 (A bis C, erste bis dritte Spalte). Die Zellkerne wurden durch DNA-Färbung mittels DAPI dargestellt. Die Auswertung der Immunfluoreszenzexperimente erfolgte mit einem konfokalen Laserscannmikroskop. Die weißen Balken in den Überlagerungsbildern entsprechen einer Länge von 20 μ m. (Abbildung auf der vorangegangenen Seite)

5.3 Untersuchung der Lokalisation von EGF in Rab11-positiven Zellkompartimenten von CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen

Um die Lokalisation von EGF in Recycling-Endosomen von CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen zu analysieren, wurden serumentzogene Zellen mit einem *EGFR^{WT}*- und einem *GFP-Rab11^{WT}*-Konstrukt kotransfiziert. Rab11 gehört zur Familie der Rab-GTPasen und reguliert das Trafficking von Proteinen in Recycling-Endosomen (Ullrich *et al.*, 1996). Da Rab11 hauptsächlich in Recycling-Endosomen lokalisiert ist, wurde es als Markerprotein für dieses Zellorganell verwendet. Die Zellen wurden wie in Kapitel 5.2 beschrieben behandelt und analysiert (Abb. 35 A bis C). Die Auswertung der Immunfluoreszenzpräparate ergab, dass GFP-Rab11 sowohl in CAT- als auch α PIX^{WT}-CHO-Zellen in kleinen punktförmigen Vesikeln zu finden ist, welche sowohl im Zytoplasma als auch im perinukleären Bereich vorliegen (Abb. 35 A bis C, GFP-Rab11, rot). GFP-Rab11 wurde aufgrund seines GFP-Tags je nach Expressionsniveau auch in den Zellkernen detektiert. Wie in Abbildung 35 A anhand der pseudogelben Färbung in den Überlagerungsbildern ersichtlich, wurde nach 30-minütiger Inkubation mit Fluoreszenz-markiertem EGF eine hohe Kolokalisationsrate von EGF555 und Rab11 in den α PIX^{WT}-CHO-Zellen, nicht jedoch in den Kontrollzellen, nachgewiesen. Nach 60 min Stimulation mit EGF555 konnte sowohl in den α PIX^{WT}-CHO- als auch in den CAT-CHO-Zellen keine Kolokalisation von intrazellulärem EGF555 und GFP-Rab11 detektiert werden (Abb. 35 B, CAT und α PIX^{WT}, Überlagerung und Vergrößerung). Wurden die Zellen für 30 min mit EGF555 inkubiert, anschließend gewaschen und für weitere 30 min durch Wiedererwärmung das EGF-Recycling ermöglicht, zeigte sich, dass zu diesem Zeitpunkt mehr internalisiertes EGF555 in den Rab11-positiven Vesikeln der α PIX^{WT}-CHO-Zellen lokalisiert war. In den Kontrollzellen konnte dagegen auch nach Wiedererwärmung nahezu keine Kolokalisation von EGF555 und GFP-Rab11 beobachtet werden (Abb. 35 C, Überlagerung und Vergrößerung). Zusammengenommen verifizieren diese Ergebnisse die in

Kapitel 4.6 beschriebenen biochemischen Resultate bezogen auf das verstärkte Recycling der EGF-Rezeptoren in α PIX^{WT}-CHO-Zellen.

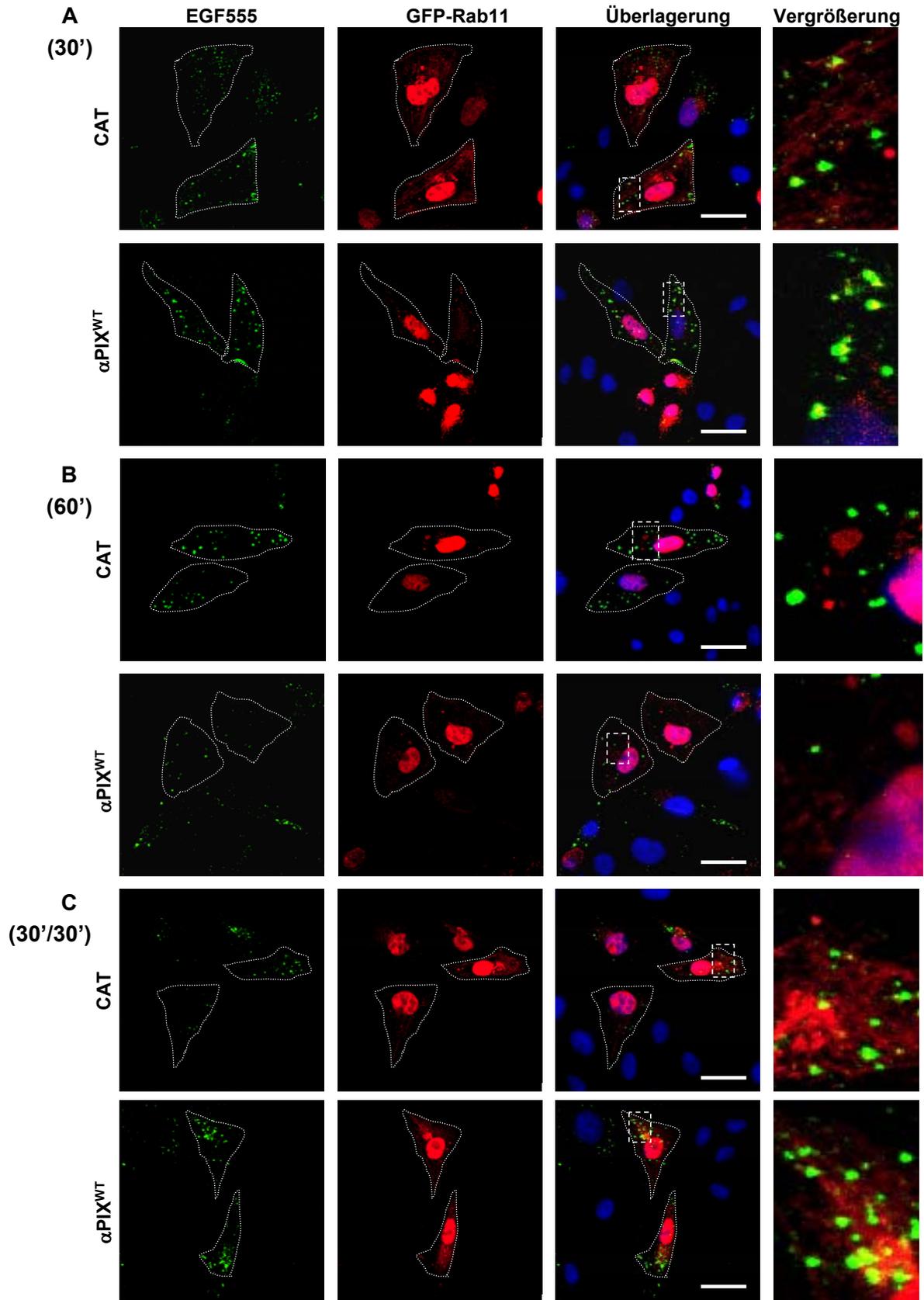


Abb. 35: Subzelluläre Lokalisation von endozytiertem EGF555 und Kolo­kalisierung mit GFP-Rab11 als Markerprotein für Recycling-Endosomen in CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen

Serumentzogene, mit *EGFR*^{WT}- und *GFP-Rab11*^{WT}-kotransfizierte CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen wurden mit 25 ng/ml Alexa Fluor 555-konjugiertem EGF (EGF555) für 30 (A) oder 60 min (B) stimuliert. Parallelansätze wurden mit 25 ng/ml EGF555 stimuliert, sauer gewaschen und für 30 min bei 37°C wiedererwärmt. (C). Das internalisierte EGF555 ist grün (A bis C, EGF555) und das Markerprotein für Recyclingendosomen GFP-Rab11 ist rot dargestellt (A bis C, GFP-Rab11). Pseudogelbe Bereiche in den Überlagerungs- und Vergrößerungsbildern weisen auf eine Kolo­kalisierung von EGF555 und GFP-Rab11 hin. Die weißen, gestrichelten Rechtecke markieren die in den Vergrößerungen gezeigten Ausschnitte (A bis C, Überlagerung) und die gepunkteten Linien markieren Zellen mit internalisiertem EGF555 (A bis C, erste bis dritte Spalte). Mittels DAPI-Färbung wurde die DNA der Zellkerne ange­färbt. Die Auswertung der Immunfluoreszenzexperimente erfolgte mittels konfokaler Laser-scannmikroskopie. Die weißen Balken in den Überlagerungsbildern entsprechen einer Länge von 20 μ m.

(Abbildung auf der vorangegangenen Seite)

6. Aktivierung der AKT-Kinase nach EGF-Stimulation in CAT-, α PIX^{WT}-, α PIX^{W197K}- und α PIX^{GEF}-CHO-Zellen

In den vorhergehenden Kapiteln wurde gezeigt, dass die stabile Expression von α PIX^{WT} stark in das Trafficking des EGF-Rezeptors und somit höchstwahrscheinlich in die EGF-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion eingreift. Daher sollte die Aktivierung der AKT-Kinase in CHO-Zelllinien mit stabiler Expression von α PIX^{WT}, α PIX^{W197K} oder α PIX^{GEF} sowie in den Kontrollzellen CAT-CHO untersucht werden. Dazu wurden die serumentzogenen, mit *EGFR*^{WT}-transfizierten Zelllinien für definierte Zeiträume (CAT- und α PIX^{WT}-CHO für 15, 30, 60, 90 oder 120 min; α PIX^{W197K}- und α PIX^{dn}-CHO für 15, 30 oder 60 min) mit EGF stimuliert. Zur Kontrolle der Signalantwort blieb je eine Zellpopulation der Zelllinien unstimuliert. Nach Zelllyse erfolgte die Analyse der Rohlysate mittels Western-Blot und Immundetektion mit Antikörpern gegen AKT sowie gegen phospho-AKT (p-AKT) (Abb. 36 A). Zur Bestimmung der AKT-Aktivierung wurde die Menge an phosphorylierter AKT-Kinase nach einem bestimmten Stimulationszeitraum zur Gesamtmenge der AKT-Kinase (phosphoryliertes und nicht-phosphoryliertes AKT) normalisiert. Aufgrund der in den Kontrollansätzen für alle Zelllinien etwa gleich schwachen Grundaktivierung wurde die Hintergrundschwärzung gleich 0 gesetzt (Abb. 36 B). Die Auswertung dieser Versuche ergab, dass die Aktivierung von AKT in den Kontrollzellen bis zu einer EGF-Stimulation von 60 min stetig anstieg und danach innerhalb von weiteren 60 min auf 60% der Maximalaktivierung absank (Abb. 36 B, graue Säulen). Der maximale Wert bei 60 min Stimulation von CAT-CHO-Zellen wurde somit als 100%-Marke gesetzt und die relative Aktivierung von AKT in den α PIX-Zelllinien innerhalb der nun vorhandenen Prozentskala eruiert. α PIX^{WT}-CHO-Zellen zeigten nach 60-minütiger EGF-Stimulation eine maximale AKT-Aktivierung von nur 60% bezogen auf die Kontrollzellen (Abb. 36 B, orange Säulen). Nach länger andauernder EGF-Stimulation nahm auch hier die AKT-Aktivierung wieder ab und blieb statistisch signifikant niedriger als in den Kontrollzellen (Abb. 36 B, * p<0,1). Die stabile α PIX^{W197K}-Expression führte dagegen zu einer mit den

Kontrollzellen vergleichbaren AKT-Aktivierung (Abb. 36 B, grüne Säulen). Wie an den blauen Säulen in Abbildung 36 B zu erkennen ist, wurde für die dominant-negative α PIX-exprimierende Zelllinie schon nach 15-minütiger EGF-Stimulation eine maximale Aktivierung von AKT erreicht, welche ca. 65% der Maximalaktivierung in den Kontrollzellen entsprach. Mit fortschreitender EGF-Stimulation nahm die Menge an phosphoryliertem AKT in den α PIX^{GEF}-CHO-Zellen ab und betrug nach 60-minütiger Stimulation ca. 25% der AKT-Maximalaktivierung in den Kontrollzellen (Abb. 36 B, blaue Säulen).

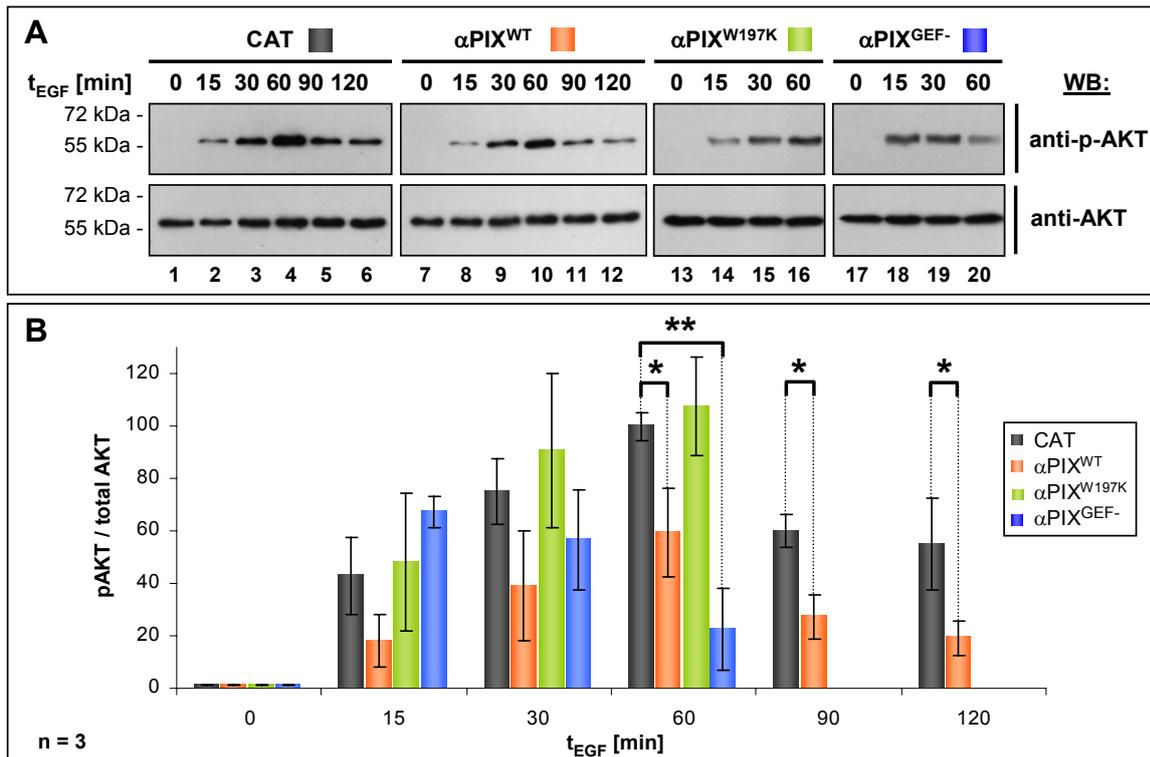


Abb. 36: Aktivierung der AKT-Kinase nach EGF-Stimulation in CAT-, α PIX^{WT}-, α PIX^{W197K}- und α PIX^{GEF}-CHO-Zellen

(A) Serumentzogene CAT-, α PIX^{WT}-, α PIX^{W197K}- und α PIX^{GEF}-CHO-Zellen wurden mit einem EGFR^{WT}-Konstrukt transfiziert und für 0, 15, 30 oder 60 min mit 25 ng/ml EGF stimuliert. CAT- und α PIX^{WT}-CHO-Zellen wurden außerdem für 90 oder 120 min mit EGF stimuliert. Die Zellysate wurden nach Western-Blot mittels Immundetektion mit anti-AKT (untere Blots) und anti-p-AKT-Antikörpern (obere Blots) untersucht. Links der Blots stehen die Molekulargewichte des Proteinstandards, rechts die verwendeten Antikörper. Die gezeigten Blots stellen repräsentative Ergebnisse von drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen dar. WB, Western-Blot. (B) Quantitative Auswertung der AKT-Aktivierung von drei voneinander unabhängigen Versuchen (n=3). Das Säulendiagramm gibt das mittlere Verhältnis der phosphorylierten AKT-Kinase zur Gesamtmenge an AKT zu verschiedenen Stimulationszeitpunkten an. Das p-AKT/AKT-Verhältnis in den Zellen ohne EGF-Stimulation wurde gleich 0%, das p-AKT/AKT-Verhältnis in den CAT-CHO-Zellen nach 60 min Stimulation gleich 100% gesetzt. ** p<0,01, statistisch hoch signifikante Ergebnisse; * p<0,1, statistisch signifikante Ergebnisse; graue Säulen: CAT-CHO-, orange Säulen: α PIX^{WT}-CHO-, grüne Säulen: α PIX^{W197K}-CHO-, blaue Säulen: α PIX^{GEF}-CHO-Zellen.

V. Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors α PIX einerseits zu einer Hemmung der EGF-Rezeptor-Degradierung, andererseits zu einer Verstärkung des EGF-Rezeptor-Recyclings führt. Darüber hinaus wurde die Interaktion zwischen α PIX und der Ubiquitin-E3-Ligase c-Cbl nachgewiesen und charakterisiert. Diese Assoziation wird über EGF-Rezeptor-vermittelte Signalweiterleitung kontrolliert und ist essentiell für die EGF-abhängige Degradierung beider Proteine.

Im ersten Teil der Diskussion soll auf die zelluläre Funktion und die Regulation der α PIX::c-Cbl-Interaktion eingegangen werden, wohingegen sich der zweite Teil der Diskussion mit der durch α PIX verursachten erhöhten EGF-Rezeptor-Recyclingrate beschäftigt.

1. Die EGF-stimulierte Interaktion von α PIX und c-Cbl beeinflusst wichtige zelluläre Prozesse wie EGF-Rezeptor-Degradierung und PI3-Kinase-vermittelte Signaltransduktion

Die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionspartnern ist ein wichtiges Hilfsmittel zur Aufklärung der biologischen Funktion der beteiligten Proteine. Die zelluläre Funktion von β PIX, einem zu α PIX hoch-homologen Protein, ist in der Literatur sehr viel umfassender beschrieben, als die von α PIX, was u.a. an der Vielzahl der bekannten Interaktionspartner für β PIX liegt. Insbesondere hat die Interaktion zwischen β PIX und Proteinen der Cbl-Familie der Ubiquitin-E3-Ligasen wesentlich zur Aufklärung der Funktion von β PIX beigetragen (Flanders *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2006). Eine direkte Interaktion von α PIX und den Cbl-Proteinen, welche aufgrund der hohen Homologie von α PIX und β PIX naheliegend ist, konnte bisher nicht gezeigt werden. Allerdings wurde beschrieben, dass die Bindung der Serin/Threonin-Kinase PAK3 an α PIX und damit deren Aktivierung kompetitiv durch Cbl-b-Koexpression gehemmt werden kann (Flanders *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurde mithilfe von Koimmunpräzipitationen (KoIPs) die Ubiquitin-E3-Ligase c-Cbl als neuer Interaktionspartner beider α PIX-Isoformen identifiziert. Da α PIX und β PIX eine äußerst ähnliche Domänenstruktur und hohe Homologie im Bereich der SH3-Domäne aufweisen, lag die Vermutung nahe, dass α PIX wie β PIX (Flanders *et al.*, 2003) über die SH3-Domäne mit c-Cbl interagiert. Ein weiterer Hinweis darauf war, dass PAK, welches durch Cbl-b-Expression in seiner Aktivität gehemmt wird, an die SH3-Domäne von α PIX bindet (Bagrodia *et al.*, 1998; Manser *et al.*, 1998). Mithilfe von KoIPs konnte schließlich gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen α PIX und c-Cbl über die SH3-Domäne von α PIX vermittelt wird und ein hoch-konserviertes Tryptophan (W197) in dieser Domäne essentiell für die Assoziation

ist. Tryptophan 197 ist interessanterweise auch wichtig für die α PIX::PAK-Interaktion (Feng *et al.*, 2004), so dass PAK und c-Cbl höchstwahrscheinlich um dieselbe Bindestelle von α PIX konkurrieren. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die α PIX::c-Cbl-Interaktion, wie die bereits charakterisierte β PIX::c-Cbl-Assoziation (Schmidt *et al.*, 2006), über einen Argininrest an Position 829 im PKPFPR-Bindemotif von c-Cbl vermittelt wird. Bemerkenswerterweise gleicht dieses atypische Bindemotif in seiner Konsensus-Sequenz (PxxxPR) wiederum dem PIX-Bindemotif von PAK (PPVIAPR), welches ungewöhnlich spezifische und hoch-affine Bindungen ermöglicht (Manser *et al.*, 1998; Hoelz *et al.*, 2006). Immunzytochemische Experimente mit endogen exprimierten α PIX und c-Cbl zeigten aber auch, dass die beiden Proteine im Zytoplasma nur partiell kolokalisieren. Eine deutliche Kollokalisierung zwischen α PIX und c-Cbl ergab sich erst nach EGF-Stimulation an der Plasmamembran von H4-Zellen. Daher wurde die α PIX::c-Cbl-Komplexbildung in Abhängigkeit von der Stimulation mit EGF untersucht. Es zeigte sich, dass diese Komplexbildung mit der EGF-abhängigen Signalweiterleitung korreliert, wobei die wenigsten Komplexe in unstimulierten Zellen detektiert wurden. Die Menge der α PIX::c-Cbl-Komplexe nahm bis zu einem Maximum nach 30 min EGF-Stimulation zu und danach wieder leicht ab. Diese Regulation der α PIX::c-Cbl-Komplexbildung deutet auf eine zeitlich genau definierte Funktion hin. So könnte c-Cbl etwa nach EGF-Stimulation zeitlich kontrolliert kompetitiv zur α PIX::PAK-Bindung wirken und so die Aktivierung der PAK-Kinase hemmen. Zusammengenommen ergibt sich daraus ein hochwirksames System zur kompetitiven Bindung von α PIX an PAK und c-Cbl und damit die Möglichkeit zur präzisen Regulation von opponierenden zellulären Prozessen: Während die Funktion der PAK-Kinasen hauptsächlich darin besteht, proliferative Signale von Wachstumsfaktorrezeptoren weiterzuleiten und das Aktinzytoskelett zu organisieren (Hofmann *et al.*, 2004), ist die Ubiquitin-Ligase c-Cbl an der negativen Regulation von Wachstumsfaktorrezeptoren beteiligt (Thien & Langdon, 2005). Daraus folgt, dass α PIX an der Schaltstelle zwischen fortwährender Signalweiterleitung und Signalabschwächung sitzt.

Für β PIX konnte bereits eine EGF-abhängige Interaktion mit c-Cbl gezeigt werden, wobei die maximale Komplexbildung schon nach 5-minütiger EGF-Stimulation erreicht wurde (Schmidt *et al.*, 2006). Die Komplexbildung zwischen β PIX und c-Cbl könnte demzufolge kurzzeitiger sein oder vor der Interaktion zwischen α PIX und c-Cbl stattfinden. Da jedoch in der Arbeit von Schmidt und Mitarbeitern (2006) ein anderer Zelltyp und eine 10-fach höhere EGF-Konzentration verwendet wurden, können auch die Versuchsbedingungen für diese abweichende Beobachtung verantwortlich sein.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, geht die EGF-Rezeptor-vermittelte α PIX::c-Cbl-Assoziation mit einer EGF-abhängigen, c-Cbl-vermittelten Reduktion der zellulären Menge an α PIX-Proteinen einher. Für diese Degradierung ist zum einen die Interaktion zwischen

α PIX und c-Cbl essentiell, zum anderen scheint die Reduktion der α PIX-Proteinmenge höchstwahrscheinlich auf der c-Cbl-vermittelten Ubiquitylierung als Proteinabbau-Markierung zu basieren. In der Tat konnte mithilfe zweier unterschiedlicher Ubiquitylierungsassays nachgewiesen werden, dass α PIX monoubiquityliert wird. Interessanterweise konnte im ersten Ubiquitylierungsexperiment, trotz Inhibition der Proteindegradierung, keine Zunahme von ubiquitylierten α PIX-Molekülen nach EGF-Stimulation beobachtet werden. Dieses Ergebnis könnte jedoch auch an der α PIX-Überexpression liegen, die zur konstitutiven Komplexierung aller vorhandenen endogenen Cbl-Moleküle führt, sodass nach EGF-Stimulation keine neuen, für die α PIX-Degradierung essentiellen Komplexe mehr entstehen und daher keine weiteren α PIX-Proteine ubiquityliert werden. Für β PIX wurde bereits indirekt gezeigt, dass es durch c-Cbl monoubiquityliert wird, wobei unter den Bedingungen des ersten Ubiquitylierungsassays auch keine Zunahme der β PIX-Ubiquitylierung detektiert wurde (Schmidt *et al.*, 2006). Nach Koexpression von c-Cbl konnte jedoch eine Erhöhung der Menge an ubiquityliertem β PIX detektiert werden, was auf eine c-Cbl-vermittelte Ubiquitylierung von β PIX hindeutet (Schmidt *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu wies α PIX bei Koexpression von c-Cbl in serumentzogenen Zellen eine verringerte Ubiquitylierung auf. Da jedoch bei diesem Experiment der Proteinabbau nicht inhibiert wurde, könnte schon ein Teil der ubiquitylierten α PIX-Proteine abgebaut und somit nicht mehr detektierbar gewesen sein. Nach 30 min EGF-Stimulation konnte jedoch bei c-Cbl-Koexpression mehr ubiquityliertes α PIX detektiert werden als in den Zellen, die ausschließlich α PIX und Ubiquitin exprimierten, was darauf hindeutet, dass α PIX durch c-Cbl ubiquityliert wird. Dass nach 30-minütiger EGF-Stimulationsdauer die meisten α PIX:c-Cbl-Komplexe vorliegen, ist ein weiterer Hinweis auf eine c-Cbl-vermittelte α PIX-Ubiquitylierung. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse an, dass α PIX vermutlich durch c-Cbl-vermittelte Ubiquitylierung für die Degradierung markiert wird und die EGF-Stimulation den Proteinabbau initiiert.

Bemerkenswerterweise scheint nicht nur α PIX durch c-Cbl reguliert zu werden, sondern im Gegenzug auch c-Cbl durch α PIX. Der erste wichtige Anhaltspunkt hierfür ist, dass die Interaktion zwischen α PIX und c-Cbl auch für eine EGF-stimulierte Degradierung von c-Cbl notwendig zu sein scheint, wie Stimulationsversuche mit bindungsdefizienten Mutanten von α PIX und c-Cbl zeigten. Erste Hinweise darauf, dass Cbl-Proteine begleitend zu dessen Substraten ubiquityliert und nach EGF-Stimulation degradiert werden, ergaben Studien mit Cbl-b und seinem Substrat, dem EGF-Rezeptor (Ettenberg *et al.*, 2001). Cbl-Proteine werden dabei autokatalytisch polyubiquityliert und anschließend im Proteasom abgebaut (Ettenberg *et al.*, 2001; Bao *et al.*, 2003), wie auch die Ergebnisse für c-Cbl in dieser Arbeit zeigen (Daten teilweise nicht gezeigt). Dass es sich in der vorliegenden Arbeit höchstwahrscheinlich auch um eine Autoubiquitylierung von c-Cbl handelt, zeigen die

Stimulationsversuche an α PIX^{WT} und Ubiquitin-ligasedefizientes c-Cbl^{C381A} koexprimierenden Zellen, in welchen nach EGF-Stimulation kein Abbau von c-Cbl detektiert wurde.

Darüber hinaus unterbindet die Interaktion zwischen α PIX und c-Cbl anscheinend auch wichtige zelluläre Funktionen von c-Cbl. Wie bereits erwähnt wurde, sind Cbl-Proteine Ubiquitin-Ligasen für den EGF-Rezeptor, dessen Degradierung für die Beendigung oder Abschwächung von Signaltransduktionswegen essentiell ist. Um den Einfluss von α PIX auf die EGF-Rezeptor-Degradierung zu testen, wurden Degradierungsassays bei gleichzeitiger Inhibition des EGF-Rezeptor-Recyclings durchgeführt. Diese Versuche ergaben, dass α PIX den Abbau von EGF-Rezeptoren nahezu vollständig inhibiert, so dass sich nach 30 min Wiedererwärmung der intrazelluläre Pool der zuvor internalisierten EGF-Rezeptoren nur um ca. 10 – 20% verkleinerte. Hingegen nahm in Kontrollzellen im gleichen Zeitraum die intrazelluläre Rezeptormenge um ca. 75% ab. Da bei diesem Versuch das Recycling inhibiert war, konnte die Abnahme der intrazellulären EGF-Rezeptor-Menge nur durch Degradierung verursacht worden sein. α PIX hemmt demzufolge die Degradierung des EGF-Rezeptors, und aufgrund der Inhibition des Recyclings führte dies zu einer Akkumulation des Rezeptors innerhalb der Zelle. Ähnliche Ergebnisse wurden für β PIX beschrieben: EGF-Stimulation führt zur Aktivierung von Cdc42, welches sodann über β PIX an den β PIX::c-Cbl-Komplex bindet (Schmidt *et al.*, 2006). Die gleichzeitige Interaktion von β PIX mit aktivem Cdc42 und c-Cbl führt höchstwahrscheinlich zu einer sterischen Hinderung der c-Cbl-Bindung an den EGF-Rezeptor und damit zu keiner Ubiquitylierung und Degradierung des Rezeptors. Dieser Effekt wurde durch die Überexpression von c-Cbl-bindungsdefizienten β PIX-Mutanten wieder aufgehoben (Wu *et al.*, 2003). Diese Hypothese könnte auch auf α PIX und c-Cbl zutreffen und die erhöhte EGF-Rezeptor-Menge durch Hemmung der EGF-Rezeptor-Degradierung erklären. Dementsprechend zeigten Immunfluoreszenz-Experimente, dass EGF in stabil α PIX^{WT}-exprimierenden CHO-Zellen nach 30-minütiger Wiedererwärmung in Rab7-positiven Kompartimenten, welche hauptsächlich multivesikuläre Körperchen (MVBs) darstellen, akkumuliert, wohingegen in Kontrollzellen nach diesem Zeitraum kaum noch internalisiertes EGF detektiert werden konnte. MVBs reifen durch Fusion mit primären lysosomalen Vesikeln zu Lysosomen, in welchen die intraluminal lokalisierten, nicht jedoch die in der äußeren Membran der MVBs verbliebenen EGF-Rezeptoren degradiert werden (Stoschek & Carpenter, 1984; Staub & Rotin, 2006). Eine EGF-Rezeptor-Ubiquitylierung ist für die ESCRT- (*endosomal sorting complex required for transport*)-abhängige Sortierung der Rezeptoren in intraluminale Vesikel der MVBs essentiell (Hurley, 2008). Zusammengefasst könnte die c-Cbl-Sequestrierung durch α PIX zu einem Ausbleiben der EGF-Rezeptor-Ubiquitylierung und damit zu einer ineffizienten Sortierung der EGF-Rezeptoren in intraluminale Vesikel der MVBs geführt haben, was in einer Hemmung der Degradierung resultieren würde.

Interessanterweise scheint α PIX durch die Interaktion mit c-Cbl nicht nur in den EGF-Rezeptor-Proteinumsatz, sondern auch in die EGF-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion einzugreifen. Wie bereits erwähnt wurde, geht die Degradierung des EGF-Rezeptors mit der Beendigung von Signaltransduktionen einher - eine verminderte Degradierung könnte demnach in anhaltender Signalweiterleitung resultieren. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Aktivierung der AKT-Kinase, welche über den Phosphatidylinositol-3'- (PI3-) Kinase-Signalweg erfolgt (Yarden & Sliwkowski, 2001), untersucht. Diese Versuche ergaben, dass nach EGF-Stimulation von stabil α PIX^{WT}-exprimierenden Zellen die AKT-Kinase vermindert aktiviert wird, wohingegen die Expression der c-Cbl-interaktionsdefizienten Mutante α PIX^{W197K} zu einer normalen AKT-Aktivierung führte. c-Cbl bindet Wachstumsfaktor- und Cytokin-stimuliert an die PI3-Kinase (PI3K) (Hunter *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1997; Kassenbrock *et al.*, 2002) und gilt als wichtiger Aktivator des PI3K-AKT-Signalweges (Kassenbrock *et al.*, 2002; Thien *et al.*, 2010). Es wurde gezeigt, dass die Interaktion zwischen der PI3K und dem phosphorylierten Tyrosin an Position 731 (Y731) von c-Cbl essentiell für die Aktivierung der AKT ist (Kassenbrock *et al.*, 2002; Thien *et al.*, 2010). Da die Überexpression der c-Cbl-bindungsdefizienten α PIX-Proteinvariante in einer normalen AKT-Aktivierung resultierte, könnte es bei α PIX^{WT}-Expression zu einer c-Cbl-Sequestrierung durch α PIX kommen. Dadurch könnte einerseits die Interaktion mit Kinasen, welche die Phosphorylierung des Tyrosins 731 von c-Cbl katalysieren, verhindert und somit die PI3K::c-Cbl-Interaktion gehemmt werden. Andererseits könnte die Assoziation zwischen phosphoryliertem c-Cbl und der PI3K direkt unterbunden werden. Beide Szenarien würden zu einer verringerten AKT-Aktivierung führen.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Überexpression von α PIX, vermutlich durch c-Cbl-Sequestrierung, zum einen zu einer Inhibition des EGF-Rezeptor-Abbaus und zum anderen zu einer ineffizienten Aktivierung des PI3K-Signalweges führt, was in einer Hypoaktivierung der AKT-Kinase resultiert.

Studien mit ektopisch exprimiertem β PIX zeigten überdies, dass nicht nur die EGF-Rezeptor-Degradierung sondern auch die Endozytose des EGF-Rezeptors durch β PIX verhindert wird. Es wurde vermutet, dass eine vermehrte Komplexbildung zwischen β PIX und Cbl die Assoziation von Cbl mit endozytischen Adaptorproteinen wie CIN85 (*Cbl-interacting protein of 85 kDa*) unterbindet (Schmidt *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2006), welche für die Internalisierung des EGF-Rezeptors notwendig sind (Kowanetz *et al.*, 2003; Schmidt & Dikic, 2005). Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rezeptor-vermittelte Endozytose von EGF unter dem Einfluss der α PIX-Überexpression untersucht. Nach 15-minütiger Stimulation mit 200 ng/ml EGF war in α PIX-überexprimierenden COS-7-Zellen deutlich weniger EGF intrazellulär lokalisiert als in untransfizierten Zellen. Die β PIX-Studie erzielte unter vergleichbaren Stimulationsbedingungen den gleichen Effekt (Feng *et al.*,

2006), den die Autoren als Blockade der Endozytose interpretierten. Da es sich jedoch bei der hier verwendeten EGF-Konzentration um eine unphysiologische Konzentration handelt, bei der die Internalisierung, das Recycling sowie die Degradierung des EGF-Rezeptors verändert sind (Wiley, 1988; Sorkin & Goh, 2008), ist unsicher, ob die mit α PIX und β PIX erhaltenen Daten als Endozytosedefekt interpretiert werden können. Aus diesem Grund wurde für weitere Experimente mit 25 ng/ml EGF eine physiologische EGF-Konzentration, welche von 0,2 ng/ml im humanen Serum bis 130 ng/ml in der murinen Milch reicht, verwendet (Beardmore & Richards, 1983; Hayashi & Sakamoto, 1988). Weitere immunzytochemische Experimente zur Rezeptor-vermittelten Endozytose von Fluoreszenz-markiertem EGF ergaben, dass erst nach 60-minütiger Stimulation mit 25 ng/ml EGF in α PIX-überexprimierenden COS-7-Zellen deutlich weniger intrazelluläres EGF als in untransfizierten Zellen vorhanden war. Die Kinetik der EGF-Endozytose schien dabei nicht verändert zu sein, da alle Zellen zu früheren Stimulationszeitpunkten etwa gleichviel EGF internalisiert hatten. Darüber hinaus war die Kollokalisierung von EGF und EEA1, dem Markerprotein für frühe Endosomen, in Kontrollzellen und stabil α PIX-exprimierenden Zellen zu allen Stimulationszeitpunkten jeweils vergleichbar, was ebenfalls auf eine unveränderte Internalisierung hindeutet. Demnach beruht die veränderte EGF-Rezeptor-Konzentration in α PIX-überexprimierenden Zellen weder auf einer Inhibierung der Rezeptor-Degradierung noch auf einer veränderten Endozytose.

Zusammengefasst wird folgendes Modell zur EGF-abhängigen Regulation von α PIX vorgeschlagen: Erstens, die Interaktion zwischen α PIX und c-Cbl wird durch Wachstumsfaktor-Stimulation kontrolliert, wobei über den α PIX::c-Cbl-Komplex die Degradierung des EGF-Rezeptors und die EGF-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion beeinflusst werden. Zweitens, nach EGF-Stimulation werden α PIX und c-Cbl in einem Feedbackmechanismus durch c-Cbl-vermittelte Ubiquitylierung bzw. Autoubiquitylierung und anschließender Degradierung negativ reguliert (Abb. 37).

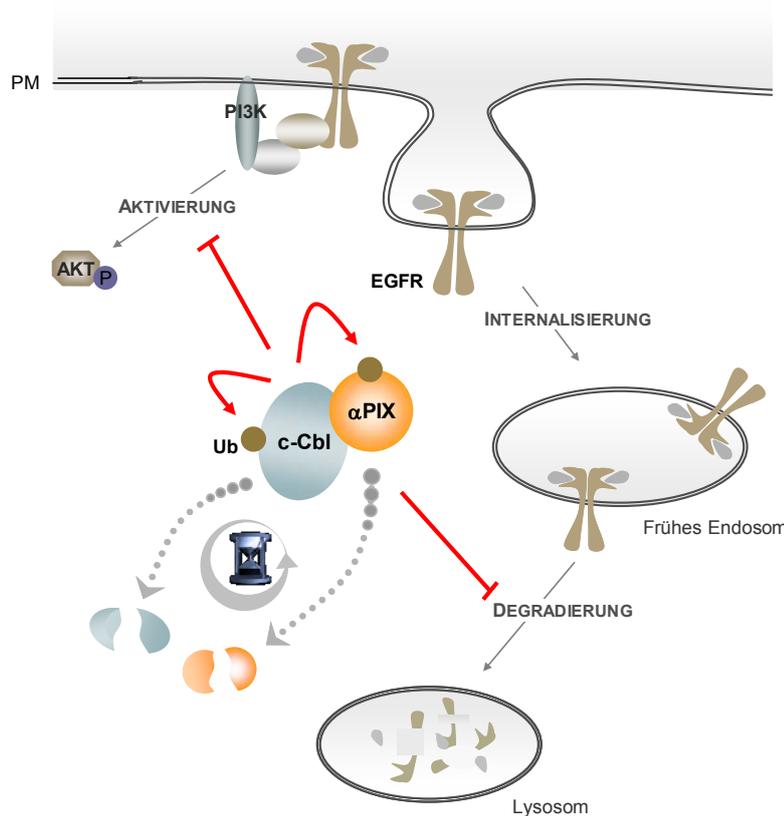


Abb. 37: Modell für die Funktion von α PIX im Komplex mit c-Cbl

Die Assoziation zwischen α PIX und c-Cbl hat zwei wichtige Funktionen: (1) Nach EGF-Stimulation interagiert α PIX mit der Ubiquitin-Ligase c-Cbl, wodurch diese daran gehindert wird, den EGF-Rezeptor (EGFR) zu ubiquitylieren. Aufgrund der fehlenden Ubiquitylierung wird der EGF-Rezeptor nach der Internalisierung nicht im Lysosom degradiert. (2) Nach EGF-Stimulation sequestriert α PIX c-Cbl und verhindert somit eine c-Cbl::PI3-Interaktion, welche für eine Aktivierung (Phosphorylierung; P) von AKT notwendig ist. α PIX selbst wird durch c-Cbl negativ reguliert indem c-Cbl α PIX ubiquityliert und so für Proteinabbau markiert. Die α PIX::c-Cbl-Interaktion initiiert darüber hinaus die Autoubiquitylierung und damit die Degradierung von c-Cbl. PM, Plasmamembran; Ub, Ubiquitin.

2. α PIX stimuliert, vermutlich in Abhängigkeit von der GEF-Aktivität, das EGF-Rezeptor-Recycling

Im vorigen Kapitel wurde bereits beschrieben, dass α PIX-Überexpression neben einer Inhibierung der EGF-Rezeptor-Degradierung wahrscheinlich zu einem veränderten vesikelvermittelten Transport von EGF-Rezeptoren führt. Mittels Biotinylierungsassays an stabil konnte dies verifiziert werden, denn nach 60-minütiger EGF-Stimulation wiesen α PIX-exprimierenden CHO-Zellen eine statistisch signifikant geringere intrazelluläre EGF-Rezeptor-Menge als Kontrollzellen auf. Da diese Abnahme sich durch eine erhöhte Recyclingrate des EGF-Rezeptors erklären ließe, wurde das EGF-Rezeptor-Recycling mittels verschiedener Biotinylierungsassays analysiert.

Erste Hinweise auf ein verstärktes Recycling in stabil α PIX-exprimierenden Zellen gab ein Experiment zur Bestimmung der Menge an zelloberflächenständigen Rezeptoren: Nach 60-minütiger EGF-Stimulation konnten in α PIX^{WT}-, nicht jedoch in den Kontrollzellen, zuvor internalisierte EGF-Rezeptoren an der Zelloberfläche detektiert werden. Mithilfe von Immunfluoreszenz-Experimenten konnte zudem in stabilen α PIX^{WT}-Zellen nach 30 min EGF-Stimulation, also vor dem Wiedererscheinen des EGF-Rezeptor an der Zelloberfläche, eine erhöhte Kolo-kalisation von EGF und der GTPase Rab11, einem Markerprotein für Recycling-Endosomen, detektiert werden.

Um den Einfluss von α PIX auf das Recycling des EGF-Rezeptors direkt zu untersuchen, wurde ein Recyclingassay nach dem *pulse-chase*-Verfahren durchgeführt. Nach 5-minütiger Wiedererwärmung (*chase*) hatte in beiden Zelllinien (α PIX^{WT} und CAT) die intrazelluläre EGF-Rezeptor-Menge um ca. 40 – 50% abgenommen. Aufgrund der α PIX-vermittelten Hemmung der EGF-Rezeptor-Degradierung kann vermutet werden, dass ein Großteil der EGF-Rezeptoren in den α PIX^{WT}-Zellen recycelt wurde, wohingegen in den Kontrollzellen der überwiegende Anteil der Rezeptoren wahrscheinlich der Degradierung zugeführt wurde. Dies bestätigt sich beim Blick auf die intrazellulären EGF-Rezeptor-Mengen nach längerer Wiedererwärmung: Während in den Kontrollzellen dieser Pool aufgrund des Rezeptorabbaus weiter abnahm, stieg die Menge der intrazellulären EGF-Rezeptoren in den α PIX^{WT}-Zellen stark an, was aufgrund der Detektion von ausschließlich biotinylierten Rezeptoren nur durch Re-Internalisierung, nicht aber durch Neusynthese der Rezeptoren zu erklären ist. Um jedoch die spezifische EGF-Rezeptor-Recyclingrate ohne den Einfluss der Rezeptor-Degradierung in den α PIX^{WT}- und den Kontrollzellen bestimmen zu können, wurde ein Recyclingassay bei gleichzeitiger Inhibition der lysosomalen Rezeptor-Degradierung durchgeführt. Für diese Experimente wurden die Wiedererwärmungsphasen auf je 2 min verkürzt, um ausschließlich das Recycling des EGF-Rezeptors zur Plasmamembran, aber nicht dessen Re-Internalisierung betrachten zu können. Diese Versuche ergaben, dass stabil α PIX-exprimierende Zellen eine um mehr als das Vierfache erhöhte Recyclingrate aufwiesen. α PIX scheint damit ein sehr potenter Recyclingaktivator zu sein. Darüber hinaus fiel bei diesem Versuch das gegenüber den Kontrollzellen früher einsetzende Recycling in den stabilen α PIX^{WT}-Zellen auf, was möglicherweise auf einen durch α PIX induzierten schnellen Recyclingweg hindeutet. Tatsächlich existieren schnelle Recyclingrouten, welche durch Abschnürungen Rab4-positiver Vesikel von frühen Endosomen gekennzeichnet sind, und langsamere Recyclingwege, welche Rab11-positive Recyclingkompartimente aufweisen (van der Sluijs *et al.*, 1992; Maxfield & McGraw, 2004; Grant & Donaldson, 2009). Zellen, die c-Cbl-bindungsdefizientes α PIX^{W197K} überexprimierten, zeigten in Biotinylierungsassays nach 60-minütiger EGF-Stimulation wie die α PIX^{WT}-CHO-Zellen eine Abnahme der intrazellulären EGF-Rezeptor-Menge. Damit ist das verstärkte Recycling in α PIX^{WT}-CHO-Zellen unabhängig von der α PIX::c-Cbl-Komplexbildung. Die stabile Expression der GEF-defizienten α PIX-Variante führte dagegen zu einem mit den Kontrollzellen vergleichbaren Ergebnis, d.h. das verstärkte EGF-Rezeptor-Recycling in den α PIX^{WT}-CHO-Zellen kann durch eine Inaktivierung der für die GEF-Aktivität wichtigen DH-Domäne wieder aufgehoben werden. Zusammengefasst ist also das stark erhöhte Recycling in α PIX^{WT}-exprimierenden Zellen mutmaßlich auf die GEF-Aktivität von α PIX zurückzuführen, welche zur Aktivierung von Rho-GTPasen notwendig ist.

Es ist bekannt, dass bestimmte Rho-GTPasen das vesikuläre Trafficking beeinflussen (Lamaze *et al.*, 1996). Als zugrunde liegende Mechanismen zur Regulation der Clathrin-vermittelten Endozytose durch Rho-GTPasen wird neben der Reorganisation des Aktinzytoskeletts auch die Modulation des Phosphatidylinositol-Lipidhaushaltes diskutiert (Ren & Schwartz, 1998; Malecz *et al.*, 2000; Symons & Rusk, 2003). α PIX könnte aufgrund der GEF-Aktivität für Rac1 in das EGF-Rezeptor-Recycling eingreifen, denn es kann sowohl als Dimer als auch als Monomer inaktives Rac1 binden und aktivieren (Feng *et al.*, 2004). Es wurde gezeigt, dass aktiviertes Rac1 die Translokation von Recyclingvesikeln zur Membran, möglicherweise durch die Reorganisation des Aktinzytoskeletts, stimuliert (Matafora *et al.*, 2001). So könnte es durch die α PIX-Überexpression zu einer verstärkten Aktivierung von Rac1 und somit zu einer vermehrten Rekrutierung von Recyclingvesikeln zur Zelloberfläche kommen. Es ist jedoch auch möglich, dass die Aminosäureaustausche (L386R, L387S) in der DH-Domäne von α PIX, die in GEF-Defizienz resultieren (Yoshii *et al.*, 2001), auch zum Verlust von Protein-Protein-Interaktionen, die für das EGF-Rezeptor-Recycling essentiell sind, führen. So interagieren PIX-Proteine u.a. mit Proteinen der GIT-Familie [*G-Protein-coupled receptor (GPCR)-kinase-interacting proteins*] (Di Cesare *et al.*, 2000; Hoefen & Berk, 2006), jedoch ist die Funktion dieser Proteinkomplexe noch nicht völlig aufgeklärt. p95-APP1/GIT1 (p95/GIT) ist ein Mitglied der GIT-Familie, Gerüstproteine, die wichtige Funktionen bei der Reorganisation des Aktinzytoskeletts und dem Membran-Trafficking einnehmen und u.a. das fokale Adhäsionsprotein Paxillin binden (Premont *et al.*, 1998; Turner *et al.*, 1999). p95/GIT-Proteine haben eine N-terminale ARF-GAP-Domäne, welche die Hydrolyse von an ARF-GTPasen (*ADP-Ribosylierungsfaktor-GTPasen*) gebundenem GTP nach GDP katalysiert und für die Bildung von Recyclingvesikeln notwendig ist (Matafora *et al.*, 2001). Interessanterweise ist dabei β PIX für die Entstehung der Recyclingvesikel wichtig, denn β PIX rekrutiert die Proteine p95/GIT und PAK an die Membran von Endosomen (Matafora *et al.*, 2001). Da auch α PIX GIT-Proteine bindet (Bagrodia *et al.*, 1999), könnte α PIX eine ähnliche Rolle wie β PIX einnehmen und eine Überexpression von α PIX zu einer gesteigerten Rekrutierung von p95/GIT und damit zu einer vermehrten Bildung von Recyclingvesikeln führen.

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass die stabile α PIX-Expression zu einer deutlichen Verstärkung des EGF-Rezeptor-Recyclings führt, was einerseits durch eine gesteigerte Rekrutierung von GIT1::PIX::PAK-Komplexen und möglicherweise anderen Proteinen an Endosomen und einer damit einhergehenden, vermehrten Bildung von Recyclingvesikeln erklärt werden kann. Andererseits könnte α PIX die Aktivität von Rac1 (oder anderer Rho-GTPasen) regulieren und so über die Reorganisation des Aktinzytoskeletts die Translokation von Recyclingvesikeln (mit EGF-Rezeptoren) an die Plasmamembran stark erhöhen.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor α PIX ein potenter direkter Regulator mit dualer Funktion für das EGF-Rezeptor-Trafficking ist: Ektopische Expression von α PIX führt einerseits zur Hemmung der Rezeptor-Degradierung, andererseits zu einer deutlichen Verstärkung des EGF-Rezeptor-Recyclings. Dabei ist die Integrität der katalytischen DH-Domäne für den α PIX-Effekt auf das EGF-Rezeptor-Recycling essentiell; die Inhibierung der Rezeptor-Degradierung wird höchstwahrscheinlich durch die Interaktion von α PIX mit der Ubiquitin-E3-Ligase c-Cbl vermittelt. Die α PIX::c-Cbl-Assoziation wurde in dieser Arbeit ausführlich charakterisiert, und es wurde gezeigt, dass diese über die EGF-Rezeptor-vermittelte Signalweiterleitung kontrolliert wird und über eine Autoregulation durch Ubiquitin-vermittelten Proteinumsatzes von α PIX und c-Cbl verfügt. Da beide Proteine, α PIX und c-Cbl, in das EGF-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion eingreifen, konnte demnach ein neuer Feedbackmechanismus zur Feinabstimmung der EGF-induzierten Signalweiterleitung aufgedeckt werden. In Abbildung 38 sind die Ergebnisse dieser Arbeit in einem Modell zusammengefasst.

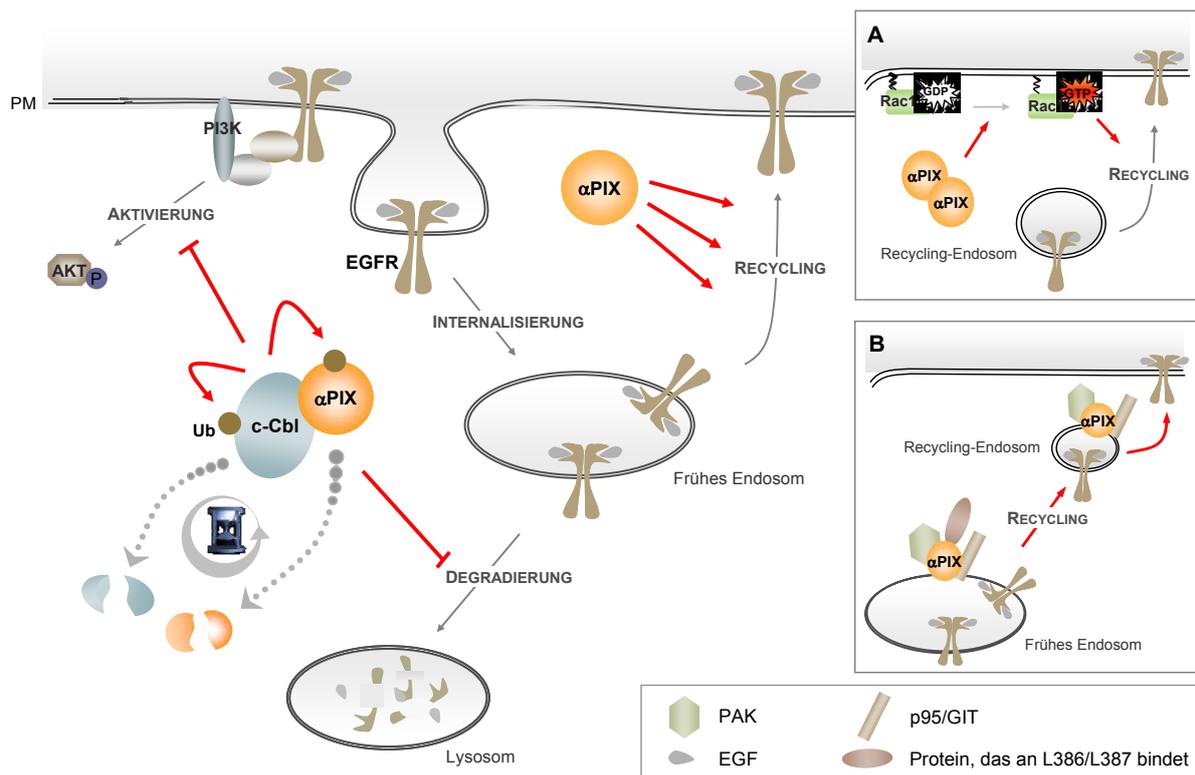


Abb. 38: Modell der möglichen Funktionen von α PIX während des EGF-Rezeptor-Traffickings

α PIX übernimmt in der Zelle eine duale Funktion: 1) α PIX hemmt die Degradierung des EGF-Rezeptors und die Aktivierung von AKT über den PI3K-Signalweg. Nach EGF-Stimulation interagiert α PIX mit der Ubiquitin-Ligase c-Cbl, wodurch diese daran gehindert wird, den EGF-Rezeptor zu ubiquitylieren. Aufgrund der fehlenden Ubiquitylierung wird der EGF-Rezeptor nach der Internalisierung nicht im Lysosomen degradiert. Darüber hinaus führt die α PIX::c-Cbl-Komplexbildung zu einer Hypoaktivierung der AKT-Kinase. 2) α PIX verstärkt das EGF-Rezeptor-Recycling. Dafür sind zwei verschiedene Mechanismen denkbar: (A) α PIX aktiviert als Dimer oder Monomer die Rho-GTPase Rac1. Die Aktivität von Rac1 induziert die Translokation von Recyclingvesikeln zur Zelloberfläche und ermöglicht somit das Recycling des EGF-Rezeptors. (B) α PIX interagiert mit

Proteinen der GIT-Familie (p95/GIT), mit PAK und/oder mit weiteren Proteinen an Endosomen. Dort rekrutiert α PIX zusätzliche für das Recycling essentielle Proteine möglicherweise über dessen katalytische Domäne. Diese Komplexbildung ist für die Abschnürung von kleinen Transportvesikeln (Recycling-Endosomen) wichtig, die zusammen mit dem GIT::PIX::PAK-Komplex an die Zellmembran rekrutiert werden.

Die Funktion von α PIX wird durch c-Cbl negativ reguliert. c-Cbl ubiquityliert α PIX, welches daraufhin dem Abbau zugeführt wird. Die Interaktion mit α PIX initiiert darüber hinaus die Autoubiquitylierung und damit die Degradierung von c-Cbl. Ub, Ubiquitin.

VI. Literaturverzeichnis

- Anderson SM, Burton EA, Koch BL** (1997) Phosphorylation of Cbl following stimulation with interleukin-3 and its association with Grb2, Fyn, and phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* **272**: 739-745
- Arnstein P, Taylor DO, Nelson-Rees WA, Huebner RJ, Lennette EH** (1974) Propagation of human tumors in antithymocyte serum-treated mice. *J Natl Cancer Inst* **52**: 71-84
- Bagrodia S, Bailey D, Lenard Z, Hart M, Guan JL, Premont RT, Taylor SJ, Cerione RA** (1999) A tyrosine-phosphorylated protein that binds to an important regulatory region on the cool family of p21-activated kinase-binding proteins. *The Journal of biological chemistry* **274**: 22393-22400
- Bagrodia S, Taylor SJ, Jordon KA, Van Aelst L, Cerione RA** (1998) A novel regulator of p21-activated kinases. *The Journal of biological chemistry* **273**: 23633-23636
- Baird D, Feng Q, Cerione RA** (2005) The Cool-2/alpha-Pix protein mediates a Cdc42-Rac signaling cascade. *Curr Biol* **15**: 1-10
- Bao J, Gur G, Yarden Y** (2003) Src promotes destruction of c-Cbl: implications for oncogenic synergy between Src and growth factor receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 2438-2443
- Beardmore JM, Richards RC** (1983) Concentrations of epidermal growth factor in mouse milk throughout lactation. *J Endocrinol* **96**: 287-292
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA** (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research* **33**: 2643-2652
- Blake TJ, Heath KG, Langdon WY** (1993) The truncation that generated the v-cbl oncogene reveals an ability for nuclear transport, DNA binding and acute transformation. *The EMBO journal* **12**: 2017-2026
- Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B** (2000) Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* **11**: 467-480
- Carpenter G, Cohen S** (1978) Human epidermal growth factor: binding of the polypeptide to human fibroblasts and stimulation of cell proliferation. *National Cancer Institute monograph*: 149-156
- Conner SD, Schmid SL** (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**: 37-44
- Di Cesare A, Paris S, Albertinazzi C, Dariozzi S, Andersen J, Mann M, Longhi R, de Curtis I** (2000) p95-APP1 links membrane transport to Rac-mediated reorganization of actin. *Nature cell biology* **2**: 521-530
- Dovas A, Couchman JR** (2005) RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *The Biochemical journal* **390**: 1-9
- Duan L, Miura Y, Dimri M, Majumder B, Dodge IL, Reddi AL, Ghosh A, Fernandes N, Zhou P, Mullane-Robinson K, Rao N, Donoghue S, Rogers RA, Bowtell D, Naramura M, Gu H, Band V, Band H** (2003) Cbl-mediated ubiquitinylation is required for lysosomal sorting of epidermal growth factor receptor but is dispensable for endocytosis. *The Journal of biological chemistry* **278**: 28950-28960
- Etienne-Manneville S, Hall A** (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**: 629-635
- Ettenberg SA, Magnifico A, Cuello M, Nau MM, Rubinstein YR, Yarden Y, Weissman AM, Lipkowitz S** (2001) Cbl-b-dependent coordinated degradation of the epidermal growth factor receptor signaling complex. *The Journal of biological chemistry* **276**: 27677-27684
- Eva A, Aaronson SA** (1985) Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature* **316**: 273-275

- Fang S, Weissman AM** (2004) A field guide to ubiquitylation. *Cell Mol Life Sci* **61**: 1546-1561
- Feig LA** (1999) Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nature cell biology* **1**: E25-27
- Feng Q, Albeck JG, Cerione RA, Yang W** (2002) Regulation of the Cool/Pix proteins: key binding partners of the Cdc42/Rac targets, the p21-activated kinases. *The Journal of biological chemistry* **277**: 5644-5650
- Feng Q, Baird D, Cerione RA** (2004) Novel regulatory mechanisms for the Dbl family guanine nucleotide exchange factor Cool-2/alpha-Pix. *The EMBO journal* **23**: 3492-3504
- Flanders JA, Feng Q, Bagrodia S, Laux MT, Singavarapu A, Cerione RA** (2003) The Cbl proteins are binding partners for the Cool/Pix family of p21-activated kinase-binding proteins. *FEBS letters* **550**: 119-123
- Futter CE, Pearse A, Hewlett LJ, Hopkins CR** (1996) Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *The Journal of cell biology* **132**: 1011-1023
- Garcia-Mata R, Burridge K** (2007) Catching a GEF by its tail. *Trends in cell biology* **17**: 36-43
- Gluzman Y** (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**: 175-182
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R** (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**: 59-74
- Grant BD, Donaldson JG** (2009) Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature reviews* **10**: 597-608
- Greene LA, Tischler AS** (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**: 2424-2428
- Gringel A, Walz D, Rosenberger G, Minden A, Kutsche K, Kopp P, Linder S** (2006) PAK4 and alphaPIX determine podosome size and number in macrophages through localized actin regulation. *Journal of cellular physiology* **209**: 568-579
- Gu C, Tangye SG, Sun X, Luo Y, Lin Z, Wu J** (2006) The X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP associates with PAK-interacting exchange factor and participates in T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 14447-14452
- Hall AB, Jura N, DaSilva J, Jang YJ, Gong D, Bar-Sagi D** (2003) hSpry2 is targeted to the ubiquitin-dependent proteasome pathway by c-Cbl. *Curr Biol* **13**: 308-314
- Hart MJ, Eva A, Evans T, Aaronson SA, Cerione RA** (1991) Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature* **354**: 311-314
- Hayashi T, Sakamoto S** (1988) Radioimmunoassay of human epidermal growth factor--hEGF levels in human body fluids. *J Pharmacobiodyn* **11**: 146-151
- Henson ES, Gibson SB** (2006) Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cellular signalling* **18**: 2089-2097
- Hoefen RJ, Berk BC** (2006) The multifunctional GIT family of proteins. *Journal of cell science* **119**: 1469-1475
- Hoelz A, Janz JM, Lawrie SD, Corwin B, Lee A, Sakmar TP** (2006) Crystal structure of the SH3 domain of betaPIX in complex with a high affinity peptide from PAK2. *J Mol Biol* **358**: 509-522
- Hofmann C, Shepelev M, Chernoff J** (2004) The genetics of Pak. *Journal of cell science* **117**: 4343-4354

- Huang F, Kirkpatrick D, Jiang X, Gygi S, Sorkin A** (2006) Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Molecular cell* **21**: 737-748
- Huang Y, Kim SO, Jiang J, Frank SJ** (2003) Growth hormone-induced phosphorylation of epidermal growth factor (EGF) receptor in 3T3-F442A cells. Modulation of EGF-induced trafficking and signaling. *The Journal of biological chemistry* **278**: 18902-18913
- Hunter S, Koch BL, Anderson SM** (1997) Phosphorylation of cbl after stimulation of Nb2 cells with prolactin and its association with phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Endocrinol* **11**: 1213-1222
- Hunter T** (1998) The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **353**: 583-605
- Hurley JH (2008) ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Current opinion in cell biology* **20**: 4-11
- Ito W, Ishiguro H, Kurosawa Y** (1991) A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. *Gene* **102**: 67-70
- Janz JM, Sakmar TP, Min KC** (2007) A novel interaction between atrophin-interacting protein 4 and beta-p21-activated kinase-interactive exchange factor is mediated by an SH3 domain. *The Journal of biological chemistry* **282**: 28893-28903
- Jiang X, Sorkin A** (2003) Epidermal growth factor receptor internalization through clathrin-coated pits requires Cbl RING finger and proline-rich domains but not receptor polyubiquitylation. *Traffic* **4**: 529-543
- Joazeiro CA, Wing SS, Huang H, Levenson JD, Hunter T, Liu YC** (1999) The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science (New York, NY)* **286**: 309-312
- Kaksonen M, Toret CP, Drubin DG** (2006) Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews* **7**: 404-414
- Kassenbrock CK, Hunter S, Garl P, Johnson GL, Anderson SM** (2002) Inhibition of Src family kinases blocks epidermal growth factor (EGF)-induced activation of Akt, phosphorylation of c-Cbl, and ubiquitination of the EGF receptor. *The Journal of biological chemistry* **277**: 24967-24975
- Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD** (2002) Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nature reviews* **3**: 893-905
- Kaufman RJ, Murtha P, Davies MV** (1987) Translational efficiency of polycistronic mRNAs and their utilization to express heterologous genes in mammalian cells. *The EMBO journal* **6**: 187-193
- Kim S, Lee SH, Park D** (2001) Leucine zipper-mediated homodimerization of the p21-activated kinase-interacting factor, beta Pix. Implication for a role in cytoskeletal reorganization. *The Journal of biological chemistry* **276**: 10581-10584
- Koh CG, Manser E, Zhao ZS, Ng CP, Lim L** (2001) Beta1PIX, the PAK-interacting exchange factor, requires localization via a coiled-coil region to promote microvillus-like structures and membrane ruffles. *Journal of cell science* **114**: 4239-4251
- Kowanetz K, Szymkiewicz I, Haglund K, Kowanetz M, Husnjak K, Taylor JD, Soubeyran P, Engstrom U, Ladbury JE, Dikic I** (2003) Identification of a novel proline-arginine motif involved in CIN85-dependent clustering of Cbl and down-regulation of epidermal growth factor receptors. *The Journal of biological chemistry* **278**: 39735-39746
- Kroschewski R, Hall A, Mellman I** (1999) Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane of MDCK cells. *Nature cell biology* **1**: 8-13
- Kuchenbecker K** (2006) Expressionsanalyse des murinen α PIX/Arhgef6-Proteins und die funktionelle Charakterisierung der α PIX/Arhgef6-Knockout-Maus. Dissertation

- Kutsche K, Yntema H, Brandt A, Jantke I, Nothwang HG, Orth U, Boavida MG, David D, Chelly J, Fryns JP, Moraine C, Ropers HH, Hamel BC, van Bokhoven H, Gal A** (2000) Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nature genetics* **26**: 247-250
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lamaze C, Chuang TH, Terlecky LJ, Bokoch GM, Schmid SL** (1996) Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature* **382**: 177-179
- Lamaze C, Dujeancourt A, Baba T, Lo CG, Benmerah A, Dautry-Varsat A** (2001) Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Molecular cell* **7**: 661-671
- Lemmon MA, Ferguson KM** (2000) Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *The Biochemical journal* **350 Pt 1**: 1-18
- Lemmon MA, Schlessinger J** (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**: 1117-1134
- Levkowitz G, Waterman H, Zamir E, Kam Z, Oved S, Langdon WY, Beguinot L, Geiger B, Yarden Y** (1998) c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* **12**: 3663-3674
- Lin Q, Yang W, Cerione RA** (2006) Measurement of epidermal growth factor receptor turnover and effects of Cdc42. *Methods Enzymol* **406**: 614-625
- Lundquist EA** (2006) Small GTPases. *WormBook*: 1-18
- Malecz N, McCabe PC, Spaargaren C, Qiu R, Chuang Y, Symons M** (2000) Synaptojanin 2, a novel Rac1 effector that regulates clathrin-mediated endocytosis. *Curr Biol* **10**: 1383-1386
- Manser E, Loo TH, Koh CG, Zhao ZS, Chen XQ, Tan L, Tan I, Leung T, Lim L** (1998) PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Molecular cell* **1**: 183-192
- Martin TF** (2001) PI(4,5)P(2) regulation of surface membrane traffic. *Current opinion in cell biology* **13**: 493-499
- Matafora V, Paris S, Dariozzi S, de Curtis I** (2001) Molecular mechanisms regulating the subcellular localization of p95-APP1 between the endosomal recycling compartment and sites of actin organization at the cell surface. *Journal of cell science* **114**: 4509-4520
- Maxfield FR, McGraw TE** (2004) Endocytic recycling. *Nature reviews* **5**: 121-132
- Merrifield CJ, Moss SE, Ballestrem C, Imhof BA, Giese G, Wunderlich I, Almers W** (1999) Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. *Nature cell biology* **1**: 72-74
- Mezgueldi M, Mendre C, Calas B, Kassab R, Fattoum A** (1995) Characterization of the regulatory domain of gizzard calponin. Interactions of the 145-163 region with F-actin, calcium-binding proteins, and tropomyosin. *The Journal of biological chemistry* **270**: 8867-8876
- Michaelis M, Bliss J, Arnold SC, Hinsch N, Rothweiler F, Deubzer HE, Witt O, Langer K, Doerr HW, Wels WS, Cinatl J, Jr.** (2008) Cisplatin-resistant neuroblastoma cells express enhanced levels of epidermal growth factor receptor (EGFR) and are sensitive to treatment with EGFR-specific toxins. *Clin Cancer Res* **14**: 6531-6537
- Miller K, Beardmore J, Kanety H, Schlessinger J, Hopkins CR** (1986) Localization of the epidermal growth factor (EGF) receptor within the endosome of EGF-stimulated epidermoid carcinoma (A431) cells. *The Journal of cell biology* **102**: 500-509
- Mills IG, Jones AT, Clague MJ** (1998) Involvement of the endosomal autoantigen EEA1 in homotypic fusion of early endosomes. *Curr Biol* **8**: 881-884

- Miranda M, Sorkin A** (2007) Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms. *Molecular interventions* **7**: 157-167
- Nobes CD, Hall A** (1995) Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochemical Society transactions* **23**: 456-459
- Olmsted JB, Carlson K, Klebe R, Ruddle F, Rosenbaum J** (1970) Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **65**: 129-136
- Paez J, Sellers WR** (2003) PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling. *Cancer treatment and research* **115**: 145-167
- Pelloni S, Berthet P, Blum AL, Doelle W, Goebell H, Kortum K, Peter P, Poulsen H, Strohmeyer G, Tygstrup N** (1977) [The treatment of acute viral hepatitis with (+)-cyanidanol-3]. *Schweiz Med Wochenschr* **107**: 1859-1861
- Pickart CM, VanDemark AP** (2000) Opening doors into the proteasome. *Nature structural biology* **7**: 999-1001
- Premont RT, Claing A, Vitale N, Freeman JL, Pitcher JA, Patton WA, Moss J, Vaughan M, Lefkowitz RJ** (1998) beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 14082-14087
- Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A** (2001) The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine-related cancer* **8**: 11-31
- Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A** (1958) Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* **108**: 945-956
- Qualmann B, Mellor H** (2003) Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases. *The Biochemical journal* **371**: 233-241
- Rebecchi MJ, Scarlata S** (1998) Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **27**: 503-528
- Ren XD, Schwartz MA** (1998) Regulation of inositol lipid kinases by Rho and Rac. *Curr Opin Genet Dev* **8**: 63-67
- Ridley AJ** (2001) Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic* **2**: 303-310
- Rosenberger G, Jantke I, Gal A, Kutsche K** (2003) Interaction of alphaPIX (ARHGEF6) with beta-parvin (PARVB) suggests an involvement of alphaPIX in integrin-mediated signaling. *Human molecular genetics* **12**: 155-167
- Rothman JE, Schmid SL** (1986) Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. *Cell* **46**: 5-9
- Rozelle AL, Machesky LM, Yamamoto M, Driessens MH, Insall RH, Roth MG, Luby-Phelps K, Marriott G, Hall A, Yin HL** (2000) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol* **10**: 311-320
- Sabharanjak S, Sharma P, Parton RG, Mayor S** (2002) GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Developmental cell* **2**: 411-423
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5463-5467
- Schlessinger J** (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**: 211-225
- Schmidt MH, Dikic I** (2005) The Cbl interactome and its functions. *Nature reviews* **6**: 907-918
- Schmidt MH, Husnjak K, Szymkiewicz I, Haglund K, Dikic I** (2006) Cbl escapes Cdc42-mediated inhibition by downregulation of the adaptor molecule betaPix. *Oncogene* **25**: 3071-3078

- Seibel NM, Eljouni J, Nalaskowski MM, Hampe W** (2007) Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers. *Anal Biochem* **368**: 95-99
- Shuman S** (1991) Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 10104-10108
- Sigismund S, Argenzio E, Tosoni D, Cavallaro E, Polo S, Di Fiore PP** (2008) Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Developmental cell* **15**: 209-219
- Sigismund S, Woelk T, Puri C, Maspero E, Tacchetti C, Transidico P, Di Fiore PP, Polo S** (2005) Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 2760-2765
- Slagsvold T, Pattni K, Malerod L, Stenmark H** (2006) Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. *Trends in cell biology* **16**: 317-326
- Smythe E, Ayscough KR** (2006) Actin regulation in endocytosis. *Journal of cell science* **119**: 4589-4598
- Sorkin A, Goh LK** (2008) Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Experimental cell research* **314**: 3093-3106
- Sorkin A, Krolenko S, Kudrjavitceva N, Lazebnik J, Teslenko L, Soderquist AM, Nikolsky N** (1991) Recycling of epidermal growth factor-receptor complexes in A431 cells: identification of dual pathways. *The Journal of cell biology* **112**: 55-63
- Staub O, Rotin D** (2006) Role of ubiquitylation in cellular membrane transport. *Physiol Rev* **86**: 669-707
- Stoscheck CM, Carpenter G** (1984) Down regulation of epidermal growth factor receptors: direct demonstration of receptor degradation in human fibroblasts. *The Journal of cell biology* **98**: 1048-1053
- Swaminathan G, Feshchenko EA, Tsygankov AY** (2007) c-Cbl-facilitated cytoskeletal effects in v-Abl-transformed fibroblasts are regulated by membrane association of c-Cbl. *Oncogene* **26**: 4095-4105
- Symons M, Rusk N** (2003) Control of vesicular trafficking by Rho GTPases. *Curr Biol* **13**: R409-418
- Thien CB, Dagger SA, Steer JH, Koentgen F, Jansen ES, Scott CL, Langdon WY** (2010) c-Cbl promotes T cell receptor-induced thymocyte apoptosis by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *The Journal of biological chemistry* **285**: 10969-10981
- Thien CB, Langdon WY** (2001) Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nature reviews* **2**: 294-307
- Thien CB, Langdon WY** (2005) c-Cbl and Cbl-b ubiquitin ligases: substrate diversity and the negative regulation of signalling responses. *The Biochemical journal* **391**: 153-166
- Turner CE, Brown MC, Perrotta JA, Riedy MC, Nikolopoulos SN, McDonald AR, Bagrodia S, Thomas S, Leventhal PS** (1999) Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *The Journal of cell biology* **145**: 851-863
- Ullrich O, Reinsch S, Urbe S, Zerial M, Parton RG** (1996) Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *The Journal of cell biology* **135**: 913-924
- van der Sluijs P, Hull M, Webster P, Male P, Goud B, Mellman I** (1992) The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* **70**: 729-740
- van Weert AW, Geuze HJ, Groothuis B, Stoorvogel W** (2000) Primaquine interferes with membrane recycling from endosomes to the plasma membrane through a direct interaction with endosomes which does not involve neutralisation of endosomal pH nor osmotic swelling of endosomes. *European journal of cell biology* **79**: 394-399

- Wallasch C, Weiss FU, Niederfellner G, Jallal B, Issing W, Ullrich A** (1995) Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *The EMBO journal* **14**: 4267-4275
- Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Yarden Y** (1999) The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry* **274**: 22151-22154
- Waterman H, Yarden Y** (2001) Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases. *FEBS letters* **490**: 142-152
- Wiley HS** (1988) Anomalous binding of epidermal growth factor to A431 cells is due to the effect of high receptor densities and a saturable endocytic system. *The Journal of cell biology* **107**: 801-810
- Woodman P** (2009) ESCRT proteins, endosome organization and mitogenic receptor down-regulation. *Biochemical Society transactions* **37**: 146-150
- Wu WJ, Tu S, Cerione RA** (2003) Activated Cdc42 sequesters c-Cbl and prevents EGF receptor degradation. *Cell* **114**: 715-725
- Yarden Y, Sliwkowski MX** (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews* **2**: 127-137
- Yoshii S, Tanaka M, Otsuki Y, Fujiyama T, Kataoka H, Arai H, Hanai H, Sugimura H** (2001) Involvement of alpha-PAK-interacting exchange factor in the PAK1-c-Jun NH(2)-terminal kinase 1 activation and apoptosis induced by benzo[a]pyrene. *Molecular and cellular biology* **21**: 6796-6807
- Yoshii S, Tanaka M, Otsuki Y, Wang DY, Guo RJ, Zhu Y, Takeda R, Hanai H, Kaneko E, Sugimura H** (1999) alphaPIX nucleotide exchange factor is activated by interaction with phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene* **18**: 5680-5690