
Zusammenfassung

Kleine monomere GTPasen der Rho-Familie spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen zellulären Prozessen, wie Zellteilung, -polarität, Membrantransport, Transkription und insbesondere bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts. In den letzten Jahren konnte für Rho-GTPasen gezeigt werden, dass sie für die neuronale Morphogenese sehr wichtig sind, indem sie Axonwachstum und -wegfindung, die Ausbildung von dendritischen Dornen sowie die Synapsenentstehung steuern. Für eine kontrollierte Aktivierung der Rho-GTPasen sind Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren, Rho-GEF-Proteine notwendig, welche die Rho-GTPasen von der inaktiven, GDP-gebundenen Form in die aktive, GTP-gebundene Form überführen. Bemerkenswerterweise führen Mutationen in drei Genen, deren Genprodukte an unterschiedlichen Stellen in den Rho-GTPase Zyklus involviert sind, zur X-chromosomal erblichen geistigen Behinderung (MRX). Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass Mutationen im *ARHGEF6/αPIX*-Gen, das für einen Rac1/Cdc42-spezifischen GEF kodiert, ebenfalls zu MRX führen.

In dieser Arbeit sollten zum einen neue Erkenntnisse über die biologische Funktion des *ARHGEF6/αPIX*-Proteins gewonnen werden und zum anderen sollte untersucht werden, welche Auswirkungen Mutationen auf die subzelluläre Verteilung, auf die GEF-Aktivität und auf die Interaktion von *ARHGEF6/αPIX* mit anderen Proteinen haben. Es konnte gezeigt werden, dass die subzelluläre Lokalisation der beiden mutierten *ARHGEF6/αPIX*-Proteine, *ARHGEF6/αPIX-ΔAS56-83* und *ARHGEF6/αPIX-ΔAS396-776*, verändert ist und diese nicht mehr in Lamellipodien und Filopodien an der Zellmembran lokalisiert sind. Mit Hilfe der durchgeführten Rac-Pull-Down-Experimente konnte weder für das *ARHGEF6/αPIX*-Wildtyp-Protein noch für die beiden mutierten Proteine eine GEF-Aktivität nachgewiesen werden. Die Funktionalität dieses Testsystems wurde mit dem GEF-Protein Tiam-1 überprüft. Erst nach Koexpression von *ARHGEF6/αPIX* und der p21-aktivierten Kinase PAK1 bzw. PAK3 konnte eine schwache GEF-Aktivität für *ARHGEF6/αPIX* nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass die GEF-Aktivität dieses Proteins im Vergleich zu anderen GEFs sehr gering ist.

Um neue Einsichten in die biologische Funktion von *ARHGEF6/αPIX* zu bekommen, wurde mit Hilfe des CytoTrap Hefe-Zwei-Hybrid-Systems („Sos recruitment system“) nach neuen Protein-Protein-Interaktionspartnern für *ARHGEF6/αPIX* gesucht. Es wurden insgesamt acht putative, mit *ARHGEF6/αPIX*-assoziierte Proteine gefunden: PARVB (β -Parvin oder

Affixin), CAPNS1 (kleine Untereinheit der Protease Calpain), APBB1 („amyloid beta precursor protein-binding, family B, member 1“)/Fe65, ARHGEF7/ β PIX, RAP1B, PFDN5 (Prefoldin 5), DNLC2A („dynein light chain 2A“) und PNMA1 („paraneoplastic antigen MA1“). Während für die ersten fünf Proteine bereits eine funktionelle Verbindung zum Aktin-Zytoskelett gefunden wurde, ist für die letzten drei Interaktionspartner noch keine bekannt. Eine Interaktion mit ARHGEF6/ α PIX wurde für die Proteine PARVB, CAPNS1, ARHGEF7/ β PIX und RAP1B durch biochemische Experimente bestätigt.

Für die beiden Proteine PARVB und Calpain wurde bereits gezeigt, dass sie während der frühen Phase der Integrin-abhängigen Zelladhäsion und -ausbreitung die Aktivität von Rho-GTPasen regulieren können. Dies führt zur Bildung von fokalen Adhäsionen und zur Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts. Aufgrund dieser Daten wurde die These aufgestellt, dass ARHGEF6/ α PIX ein weiteres Molekül innerhalb dieser Signalkette sein könnte. Zunächst wurde gezeigt, dass ARHGEF6/ α PIX in vollständig ausgebreiteten Zellen zusammen mit PARVB bzw. der kleinen Untereinheit von Calpain in fokalen Adhäsionen zu finden ist. Nach der Etablierung eines Zellsystems, in dem die durch Fibronectin-induzierte, Integrin-abhängige Zellausbreitung untersucht werden konnte, konnte darüberhinaus gezeigt werden, dass diese Proteine auch in sehr früh sich bildenden Kontaktstellen zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix, in sogenannten fokalen Adhäsionen oder genauer in Integrin-haltigen Clustern, zu finden sind. Neben ARHGEF6/ α PIX, PARVB und den beiden Calpain-Proteasen m-Calpain und μ -Calpain wurde auch das ILK- („integrin-linked kinase“) Protein und β 1-Integrin in diesen Clustern gefunden, wohingegen Paxillin und Vinculin nicht detektiert werden konnten.

Eine Inhibierung der Protease m-Calpain führte zu einer deutlichen Hemmung der Zellausbreitung von CHO-K1-Zellen. Durch die Überexpression des normalen ARHGEF6/ α PIX- und einer dominant-negativen Proteinvariante wurde dieser Effekt zum größten Teil aufgehoben. Im Gegensatz dazu ist die ARHGEF6/ α PIX- Δ DH-Variante nicht mehr in der Lage, die Zellausbreitung unter diesen Bedingungen zu stimulieren. Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Daten wurde ein neues Modell entwickelt, nach dem es zu einer Integrin-induzierten Zellausbreitung kommt, die von m-Calpain abhängig ist. Stromabwärts von Calpain vermittelt ARHGEF6/ α PIX durch zwei parallele Signalwege, einen GEF-abhängigen und einen GEF-unabhängigen Weg, die Rho-GTPase induzierte Ausbreitung der Zellen. An dieser Stelle kann nur spekuliert werden, dass diese Signaltransduktionskette unter Umständen auch in das Neuritenwachstum und/oder die Ausbildung dendritischer Dornen in neuronalen Zellen involviert ist.