

Aus der Abteilung  
Zelluläre Signaltransduktion  
des Instituts für  
medizinische Biochemie und Molekularbiologie  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. G. W. Mayr

Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin

Funktion des humanen  
Membranadapterproteins Centaurin  $\alpha 2$  bei  
der EGF-induzierten Zytoskelett- und  
Zellform-Remodellierung

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg  
vorgelegt von

Thurid Kerstin Rathke  
aus Hamburg

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 06.03.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Mayr

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. F. Haag

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. E. Mohr

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	INOSITOLPHOSPHATE UND PHOSPHOINOSITIDE ALS MODULATOREN VON SIGNALKASKADEN.....	1
1.2	PHOSPHOLIPIDBINDUNGSDOMÄNEN VERMITTELN DIE INTERAKTION VON PROTEINEN MIT PHOSPHATIDYLINOSITOLPHOSPHATEN .....	7
1.3	DIE ROLLE DER ADP-RIBOSYLATION FACTOR (ARF) – GTPASE PROTEINE (GAPs) IM INTRAZELLULÄREN MEMBRANTRANSPORT UND DEM CYTOSKELETT - ARRANGEMENT. 13	
1.3.1	<i>Arf-GTPasen als multifunktionale Modulatoren des Aktin-Cytoskeletts</i> 14	
1.3.2	<i>Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren der kleinen G-Proteine</i> .....	16
1.3.3	<i>G-Protein – assoziierte GTPase-aktivierende Proteine (GAPs)</i> .....	17
1.4	PROTEINE DER CENTAURIN - FAMILIE .....	19
1.4.1	<i>Centaurin <math>\alpha</math></i> .....	20
1.4.2	<i>Centaurin <math>\alpha</math>1</i> .....	22
1.4.3	<i>p42<sup>J<sup>P</sup>4</sup></i> .....	25
1.4.4	<i>Phosphatidylinositolphosphat (3,4,5)Phosphat<sub>3</sub> Binding–Protein</i> .....	26
1.4.5	<i>Centaurin <math>\alpha</math>2</i> .....	27
1.4.6	<i>Centaurin <math>\beta</math>2</i> .....	29
1.4.7	<i>Centaurin <math>\beta</math>3/PAP</i> .....	30
1.4.8	<i>Centaurin <math>\beta</math>4/ASAP1</i> .....	30
1.5	ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	32
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN.....</b>	<b>36</b>
2.1	MATERIALIEN.....	36
2.1.1	<i>Expressionsvektoren pEYFP – C1 und pEGFP – N1</i> .....	36
2.1.2	<i>Herstellung eines Centaurin <math>\alpha</math>2 – Wildtyp – EYFP – Fusionsgens</i> .....	37
2.1.3	<i>Verwendete Primer zur Erzeugung der Centaurin <math>\alpha</math>2 – Punktmutanten mittels QuikChange – Mutagenese</i> .....	38
2.1.4	<i>Enzyme</i> .....	40
2.1.5	<i>Eingesetzte Kits und Fertiglösungen</i> .....	41

2.1.6	<i>Größenstandards für doppelsträngige DNA</i> .....	41
2.1.7	<i>Lösungen</i> .....	42
2.1.8	<i>Zelllinien</i> .....	44
2.1.8.1	PC12 – Zellen .....	44
2.1.8.2	Normal – Rat – Kidney (NRK) – Zellen .....	44
2.2	METHODEN .....	45
2.2.1	<i>Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden</i> .....	45
2.2.1.1	Primerdesign.....	45
2.2.1.2	QuikChange Site – Directed Mutagenese und Modifizierte QuickChange – Mutagenese .....	48
2.2.1.3	Agarosegelelektrophorese .....	51
2.2.1.4	Herstellung von Medium und Agarplatten für die Bakterienkultur	52
2.2.1.5	Transformation von E. coli Zellen.....	53
2.2.1.6	Picken von Bakterienkolonien .....	54
2.2.1.7	Mini – und Midipräparation von rekombinanter Plasmid – DNA ...	54
2.2.1.8	Photometrische Konzentrations – und Reinheitsbstimmung von Plasmid – DNA .....	54
2.2.1.9	DNA – Sequenzierung .....	55
2.2.1.10	Computerbasierte Methoden.....	57
2.2.2	<i>Zellbiologische Methoden</i> .....	58
2.2.2.1	Medienherstellung für die Kultur der Zelllinien PC12 und NRK.....	58
2.2.2.2	Kultur der Zelllinien PC12 und NRK.....	58
2.2.2.3	Konservierung der Zelllinien durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff 59	
2.2.2.4	Auftauen von konservierten Zellen.....	59
2.2.2.5	Transfektion eukaryontischer Zellen .....	60
2.2.2.6	Stimulation von transfizierten Zellen mit Epidermal Growth Factor (EGF) und Fixierung mit Paraformaldehyd .....	62
2.2.2.7	Epifluoreszenzmikroskopie von PC12 – und NRK – Zellen.....	63
2.2.2.8	Quasikonfokale Mikroskopie von PC12 – und NRK – Zellen: .....	64
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>67</b>
3.1	DAS HUMANE CENTAURIN A2 .....	67
3.1.1	<i>EYFP-Expressionsvektor von Centaurin <math>\alpha</math>2</i> .....	68

3.2	MUTANTEN DES HUMANEN WILD-TYP-CENTAURIN $\alpha 2$ .....	68
3.3	IN VIVO LOKALISATIONS- UND TRANSLOKATIONSEXPERIMENTE MITTELS EPIFLOURESZENZMIKROSKOPIE .....	71
3.3.1	<i>PC12 – Zellen</i> .....	72
3.3.1.1	pEGFP-N1-Leervektor und Centaurin $\alpha 2$ – Wildtyp .....	72
3.3.1.2	Mutanten R152C, R276C und R152C/R276C.....	74
3.3.1.3	Mutanten R152Q und K153Q.....	78
3.3.1.4	Mutanten K141Q und Y165Q.....	81
3.3.1.5	Mutanten K264Q und K268Q.....	84
3.3.1.6	Mutanten K274Q und Y289Q.....	87
3.3.2	<i>NRK – Zellen</i> .....	94
3.3.2.1	pEGFP-N1-Leervektor und Centaurin $\alpha 2$ -Wildtyp .....	94
3.3.2.2	Mutanten R152C, R276C und R152C/R276C.....	97
3.3.2.3	Mutanten R152Q und K153Q.....	100
3.3.2.4	Mutanten K141Q und Y165Q.....	103
3.3.2.5	Mutanten K264Q und K268Q.....	105
3.3.2.6	Mutanten K274Q und Y289Q.....	107
3.4	BERECHNUNG VON FLOURESZENZPROFILIEN AUS NICHT-KONFOKALEN, EPIFLOURESZENZMIKROSKOPISCHEN DATENSÄTZEN.....	112
3.5	IN VIVO LOKALISATIONS- UND TRANSLOKATIONSEXPRIMENTE MITTELS QUASIKONFOKALER MIKROSKOPIE .....	126
3.5.1	<i>PC12 – Zellen</i> .....	126
3.5.1.1	pEGFP – N1 – Leervektor.....	127
3.5.1.2	Centaurin $\alpha 2$ – Wildtyp.....	128
3.5.1.3	Mutante R152C.....	129
3.5.1.4	Mutante R276C.....	130
3.5.1.5	Doppelmutante R152C/R276C .....	131
3.5.2	<i>NRK-Zellen</i> .....	132
3.5.2.1	pEGFP – N1 – Leervektor.....	133
3.5.2.2	Centaurin $\alpha 2$ – Wildtyp.....	134
3.5.2.3	Mutante R152C.....	135
3.5.2.4	Mutante R276C.....	136
3.5.2.5	Doppelmutante R152C/R276C .....	137

3.6	GENERIERUNG VON ZELLFORMPROFILIEN (CELL-SHAPE PROFILES) FÜR PC12- UND NRK-ZELLEN AUS KONFOKALEN DATENSÄTZEN .....	138
3.6.1	<i>PC12-Zellen</i> .....	138
3.6.2	<i>NRK-Zellen</i> .....	141
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>144</b>
4.1	STRUKTUR DES EXPERIMENTELLEN VORGEHENS .....	144
4.1.1	<i>Mögliche Einflussnahme des GFP auf die Versuchsergebnisse</i> .....	144
4.1.2	<i>Überexpression eines Proteins und die mögliche Einflussnahme auf den Stoffwechsel der Zelle</i> .....	145
4.1.3	<i>Gesichtspunkte zur Verwendung der nichtkonfokalen neben der konfokalen Mikroskopie</i> .....	146
4.2	SUBZELLULÄRES LOKALISATIONSVERHALTEN DER CENTAURIN $\alpha 2$ – MUTANTEN IM VERGLEICH ZUM CENTAURIN $\alpha 2$ – WILDTYP IN PC12 – ZELLEN .....	147
4.2.1	<i>Relative Kernanfärbung in PC12-Zellen</i> .....	150
4.3	SUBZELLULÄRES LOKALISATIONSVERHALTEN DER CENTAURIN $\alpha 2$ – MUTANTEN IM VERGLEICH ZUM CENTAURIN $\alpha 2$ – WILDTYP IN NRK – ZELLEN.....	151
4.3.1	<i>Kernausschluss als möglicher Hinweis auf Vermittlung eines nukleolären Lokalisationssignals durch Centaurin <math>\alpha 2</math></i> .....	154
4.4	LOKALISATIONSUNTERSCHIEDE VON CENTAURIN $\alpha 2$ UND SEINEN MUTANTEN IM ZELLINIENVERGLEICH .....	156
4.5	VERGLEICH DER IN VIVO ERGEBNISSE DER CENTAURIN $\alpha 2$ - MUTANTEN R152C, R276C UND R152C/R276C MIT IN VITRO ERMITTELTEN DATEN IN BEZUG AUF EINE MÖGLICHE PHOSPHATIDYLINOSITOL-SELEKTIVITÄT .....	160
4.6	EINFLUSS DES CENTAURIN $\alpha 2$ AUF DIE AUSBILDUNG SPEZIFISCHER ZELLULÄRER STRUKTURELEMENTE.....	165
4.6.1	<i>Assoziation des Centaurin <math>\alpha 2</math> mit Cytoskelettarealen</i> .....	165
4.6.2	<i>Veränderung der räumlichen Ausrichtung von PC12- und NRK-Zellen unter Centaurin <math>\alpha 2</math> –Überexpression</i> .....	168
4.7	WEITERFÜHRENDE ARBEITSHYPOTHESEN .....	170
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>173</b>
<b>6</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>175</b>

<b>7</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>182</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>184</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>187</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>198</b>
<b>11</b>	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....</b>	<b>199</b>

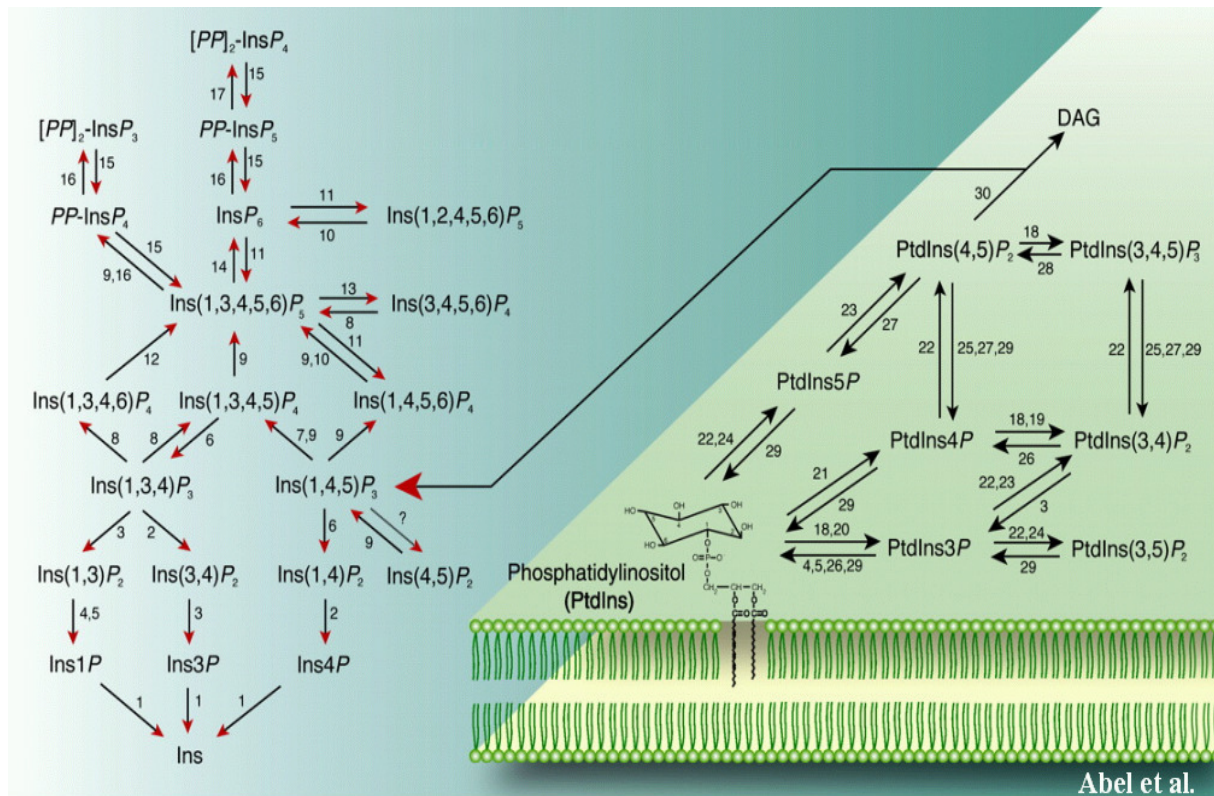
# 1 Einleitung

## ***1.1 Inositolphosphate und Phosphoinositide als Modulatoren von Signalkaskaden***

Die in der Zelle aufgrund ihres hydrophilen Charakters löslich vorkommenden Inositolphosphate und die über ihre Acylketten in den Lipidlayern der Membranen verankerten Phosphoinositide sind als Second Messenger [Mitchell, 1992] an der Regulation unterschiedlichster zellulärer Prozesse beteiligt. Abhängig von ihrem Löslichkeitsgrad und damit ihrer intrazellulären Lokalisation, sowie dem jeweiligen Phosphorylierungscharakter können diese Moleküle als sekundäre Botenstoffe, als modulatorische, niedermolekulare Verbindungsglieder oder aber als Effektoren von Protein-Interaktionspartnern auf unterschiedlichste Signalkaskaden Einfluss nehmen.

Aus dem zweifach phosphorylierten Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat generiert das Enzym Phospholipase C bei Aktivierung das im Cytosol lösliche Inositol 1,4,5-trisphosphat (InsP<sub>3</sub>) [Berridge, 1993] und das in der Membran verbleibende Diacylglycerol (DAG) [Streyer, S. 1021 – 1023]. InsP<sub>3</sub> diffundiert im Cytosol zu einem in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums gelegenen tetrameren InsP<sub>3</sub>-Rezeptor, der mit Bindung des Moleküls als Calcium-freisetzender Kanal fungiert [Furuichi et al, 1995; Patel et al, 1999]. Zur Generierung der höher phosphorylierten Inositolphosphate durch Inositolphosphatkinasen stellt InsP<sub>3</sub> das Ausgangsmolekül dar.





**Abbildung 1: Interkonversionskaskaden und intrazellulärer Verteilungsmodus der Phosphatidylinositole und Inositolphosphate ( Abel et al, 2001)**

Für die höherphosphorylierten Inositolphosphate, die in der Literatur als hochphosphorylierte Inositole (HPIs) beschrieben werden [Llinas et al, 1994], zählen Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphat ( $\text{InsP}_4$ ), Inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphat ( $\text{InsP}_5$ ) und Inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphat ( $\text{InsP}_6$ ).

Die Funktion von  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  hat vermutlich hinsichtlich der intrazellulären Botenstofffunktion einen synergistischen Effekt mit  $\text{InsP}_3$  [Cullen et al, 1990]. Des weiteren sind im Calcium-Stoffwechsel noch  $\text{InsP}_4$ -spezifische Mechanismen bekannt:  $\text{InsP}_4$  reguliert den Influx von extrazellulärem Calcium nach Leerung der intrazellulären Speicher durch  $\text{InsP}_3$  [Putney, 1986], erhöht in Fibroblasten den intrazellulären Calcium-Spiegel, wenn extrazellulär Calcium vorhanden ist [Hashii et al, 1996], ist in Pyramidalzellen des Hippocampus in die intrazelluläre Erhöhung der Calciumkonzentration und den neuronalen Zelltod involviert [Tsubokawa et al, 1996] und aufgrund des Nachweises von  $\text{InsP}_4$ -sensitiven Calciumkanälen in endothelialen Zellen, wird auch hier eine Einflussnahme durch  $\text{InsP}_4$  vermutet [Lückhoff et al, 1992].

Neben der Modulationsfunktion im Calciumstoffwechsel sind für  $\text{InsP}_4$  zusammen mit  $\text{InsP}_5$  und  $\text{InsP}_6$  weitere intrazelluläre Regulationsmechanismen beschrieben.

*In vitro* – Daten verweisen auf eine zum Teil antagonistische nukleäre Wirkung der einzelnen HPIs. Für  $\text{InsP}_6$  und Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphat konnte gezeigt werden, dass sie durch Inhibition der ATPase – Aktivität von Nukleosomen einen negativen Effekt auf Chromatin-Remodellingkomplexe haben, während die Nukleosomen – Mobilisation durch  $\text{InsP}_4$  und  $\text{InsP}_5$  stimuliert werden [Shen et al, 2003]. Des Weiteren wird unter anderem auch  $\text{InsP}_6$  eine Rolle im effizienten mRNA – Kernexport zugeschrieben [York et al, 1999]. Das non homologous end joining (NHEJ), ein in Säugerzellen für die Reparatur von DNA – Doppelstrangbrüchen verantwortlicher Mechanismus, wird von spezifisch an DNA-Protein-Kinase gebundenem  $\text{InsP}_6$  stimuliert [Hanakahi, 2000; Byrum et al, 2004; Macbeth et al, 2005]. Schließlich wurde kürzlich  $\text{InsP}_6$  als essentieller strukturbildender Ligand zweier Familien von RNA editierenden Adenosindesaminasen beschrieben: Für die ADAR`s (Adenosin desaminases, that act on RNA), welche bestimmte regulatorisch bedeutsame mRNA`s editieren, sowie den t-RNA editierenden ADAT`s [Macbeth et al, 2005].

Durch eine Hemmung vermutlich der Vesikelfusion mit der präsynaptischen Plasmamembran von Nervenzellen des Ganglion Stellatum konnte ein Eingreifen der HPIs auf die Neurotransmitterausschüttung nachgewiesen werden [Linas et al, 1994]. Dieser Block ist durch eine nach Bindung von  $\text{InsP}_6$  ausgelöste Konformationsänderung der C2A und C2B – Domäne des Transmembranproteins Synaptotagmin bedingt, welches in synaptischen Vesikeln von Neuronen [Littleton, 1995] und endokrinen Zellen integriert ist und eine Schlüsselrolle in der schnellen Calcium-abhängigen Transmitterausschüttung spielt. Die auf diese Weise veränderte Proteinstruktur inhibiert die Vesikel – Plasmamembraninteraktion, da eine Bindung an die membranständigen Phosphatidylinositole  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  und  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  nicht mehr möglich ist [Schiavo et al, 1996] und schwächt somit in erheblichem Maße die synaptische Vesikelentleerung [Lu et al, 2002].

Inositol 1,4,5-trisphosphat:

- Ausgangsmolekül für höherphosphorylierte Inositolphosphate
- Intrazelluläre Calcium-Freisetzung

Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphat:

- Auffüllen intrazellulärer Calciumspeicher, nach Entleerung durch  $\text{InsP}_3$
- Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels in Fibroblasten
- Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels in neuronalen Zellen auch im Rahmen des neuronalen Zelltodes
- Inhibition der Ausbildung von Chromatin-Remodellingkomplexen (mit  $\text{InsP}_6$ )
- Nukleosomen-Mobilisation (mit  $\text{InsP}_5$ )

Inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphat:

- Nukleosomen-Mobilisation (mit  $\text{InsP}_4$ )

Inositol-hexakisphosphat:

- Positiver Einfluss auf mRNA – Kernexport
- Positiver Einfluss auf DNA-Reparaturmechanismus durch NHEJ
- Inhibition der Ausbildung von Chromatin-Remodellingkomplexe (mit  $\text{InsP}_4$ )
- Strukturbildende Aktivierung von ADARs und ADATs
- Blockade der Transmitterausschüttung in neuronalen Zellen

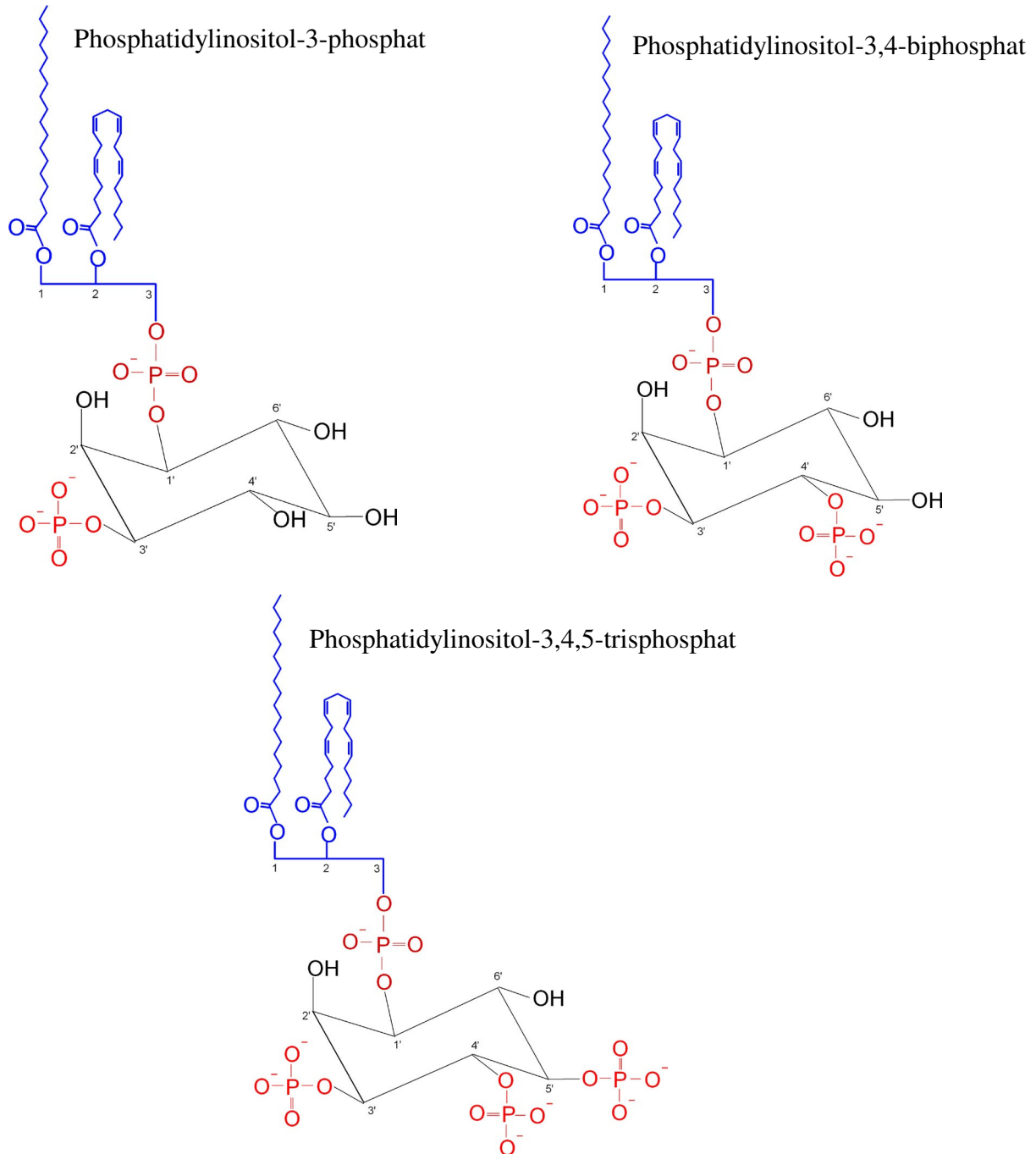
**Tabelle 1: Bekannte Funktionen der einzelnen Inositolphosphat – Isomere (Poly-Phosphoinositide)**

Die unter ATP-Verbrauch durch Kinasen phosphorylierten Phosphatidylinositole sind in den Membranen von Zellen ubiquitär vorhanden und vor allem in der Funktion als Membrananker für frei in der Zelle gelöste Proteine in eine Vielzahl zellulärer Prozesse involviert.

Das Ausgangsprodukt der Phosphatidyl – Biosynthese stellt das aus Glycolyse – Produkten gebildete Phosphatidat dar, welches durch Übertragung von CMP zu GDP – Diacylglycerol reagiert und vermittelt durch die 1-Phosphatidylinositol-4-Kinase mit Inositol zu Phosphatidylinositol 4-phosphat ( $\text{PtdIns4P}$ ) umgewandelt wird [Streyer, S. 1021 – 1023], dessen Funktion als Intermediat in der Synthese von  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  gesehen wird [Dowler et al, 2000]. Ein weiterer Phosphorylierungsschritt führt zum Produkt Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat, welches zusammen mit  $\text{PtdIns4-P}$  unabhängig vom zellulären Aktivierungsgrad grundsätzlich in Zellen vorkommt.

Die Lipidprodukte der Phosphatidylinositol-3-Kinase Phosphatidylinositol 3-Phosphat ( $\text{PtdIns3P}$ ) [Vanhaesebroeck et al, 2001], Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphat

(PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>) und Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) hingegen, treten nur im Falle der Zellstimulation in Erscheinung [Carpenter et al, 1996].



**Abbildung 2: Darstellung der im Wesentlichen in der Plasmamembran vorkommenden Phosphatidylinositole mit farblicher Markierung der Inositolgruppe (blau) und der Phosphatgruppen (rot)**

Als verantwortlich für die Bindung von Proteinen an die Phosphatidylinositolphosphate werden eher die Inositolpolyphosphat – Kopfgruppen,

als die ganzen Phosphoinositide erachtet [Dowler et al, 2000], da für die Phosphatidylinositolphosphate entsprechend der Anordnung ihrer Phosphatgruppen am Inositolring unterschiedliche sterische Interaktionen mit Bindungsdomänen von Bindeproteinen nachgewiesen wurden.

So konnte für die an D-5 Position des Inositolrings phosphorylierten Inositide eine maßgebliche Beteiligung am durch Calcium – aktivierten Signalweg der Sekretion gezeigt werden [Hay et al, 1995].

In genetischen Studien konnte für PtdIns3P konnte gezeigt werden, dass es eine wichtige Rolle in der Regulation des Membrantransfers Golgi – Vakuole oder Golgi – Lysosom und – Endosom spielt [Wurmser et al, 1999].

Das via Phosphorylierung der D-5 Position von PtdIns3P durch die Fab1 Kinase [Odorizzi et al, 1998; Cooke et al, 1998] bei osmotischem Streß in Hefezellen generierte PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> [Dove et al, 1997], legt die Vermutung einer Mediatorfunktion für dieses Lipid in chemisch aktivierten Zellen nahe.

Für PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> konnte eine Beteiligung am Calcium – stimulierten Sekretionsmechanismus in chromaffinen Zellen und PC12 Zellen nachgewiesen werden [Eberhard et al, 1990] und es wurde diesem Second Messenger eine bedeutende Rolle in der Adhäsion des Cytoskeletts an der Plasmamembran [Raucher et al, 2000] und dem Cytoskelett – Remodelling [Randazzo et al, 2000] zugeschrieben.

Die 3-phosphorylierten Lipide werden mittels Phosphorylierung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> durch Phosphatidylinositol-3-Kinase gebildet, welche initial PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> generiert und eine unmittelbare Umwandlung durch eine 5-Phosphatase in PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> erfährt [Stephen et al, 1993; Martin, 1998].

Die in vielen Geweben exprimierten und, da sie keine katalytische Domäne aufweisen, vermutlich als reine Adaptermoleküle agierenden Proteine TAPP-1 und TAPP-2 binden hoch spezifisch an PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> und könnten somit Schlüsselmodulatoren zellulärer Antworten sein [Dowler et al, 2000].

Eine rezeptorvermittelte Aktivierung der Phospholipase C überführt PtdIns-(4,5)-P<sub>2</sub> in das lösliche Inositol 1,4,5-trisphosphat und das in der Membran verbleibende Diacylglycerol, welches als Aktivator der Proteinkinase C fungiert [Lee et al, 1995] und schnell zu Monoacylglycerol und einigen Phospholipiden metabolisiert wird [Menniti et al, 1993]. Etliche der Isoformen der Proteinkinase C wiederum werden durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase – Produkte PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> reguliert [Toker, 1998] und auch andere Serin/Threonin Kinasen wie zum Beispiel Proteinkinase B und Proteinkinase D können durch 3-phosphorylierte Phosphoinositide aktiviert werden [Tanaka et al, 1998].

Für die Phospholipase C $\gamma$  – Isoenzyme ist eine positive Rückkopplung unter anderem durch PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> bekannt [Wang, 1999]. PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> zählt zu den potentiellen Second Messengern in Rezeptor-stimulierten Zellen, da die Aktivierung von Phosphatidylinositol-3-Kinase durch Insulin, Epidermal Growth Factor, Platelet derived Growth Factor, Nerve Growth Factor, fMLP, Platelet-activating Factor, Interleukin-2, Interleukin-3 und Interleukin-4 getriggert wird [Hamonds-Odie et al, 1996; Stephens et al, 1993]. Die Mitogenese, der Glucose- und Vesikel-Transport, das Membran Ruffling, die Aktin-Cytoskelett Anordnung, das Neuritenwachstum und die Zellapoptose sind zelluläre Ereignisse, die durch PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> nachweislich induziert werden [Venkateswarlu et al, 1999; Toker et al, 1997; Rameh et al, 1999].

### ***1.2 Phospholipidbindungsdomänen vermitteln die Interaktion von Proteinen mit Phosphatidylinositolphosphaten***

Viele Proteine, die in Signaltransduktionsprozesse involviert sind (Kinasen, Phospholipasen, GTP-Austauscher-Proteine, Adapterproteine), tragen regulatorische Module, zu denen beispielsweise PH-Domänen, Src-homologe2-Domänen und Phosphotyrosin-Bindungs-Domänen (PTB-Domänen) zählen [Cohen et al, 1995; Pawson, 1995].

Das 1993 erstmals für das Protein Pleckstrin, dem Hauptsubstrat der Proteinkinase C in Thrombozyten beschriebene intern repetitive Sequenzmotiv wurde als Pleckstrin – Homology – Domain (PH-Domäne) bezeichnet [Tyers et al, 1988] und konnte noch in weiteren 251 unterschiedlichen humanen Proteinen nachgewiesen werden

[Goffeau et al, 1996]. Mit einer ungefähren Länge von 110 Aminosäuren und einer in allen 13 bisher nachgewiesenen PH-Domänen-Strukturen [Yoon et al, 1994] hochkonservierten Sekundärstruktur aus einem 7-Strang- $\beta$ -Sandwich, dessen C-terminales Ende von einer langen  $\alpha$ -Helix versiegelt ist, vermittelt diese Domäne sowohl Protein-Protein-Interaktionen, als auch die Bindung an Phosphoinositide. Das offene Ende des  $\beta$ -Sandwiches ist positiv geladen und wird als Bindungspartner für anionische Liganden betrachtet [Wang et al, 1999] (s. Kapitel 3.2: Strukturmodell der PH-Domänen).

Den Hauptbindungspartner aller PtdIns – bindenden PH-Domänen stellt das PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> dar [Harlan et al, 1994]. Die Bindung mit den sauren Phospholipiden erfolgt über das stark positive elektrostatische Potential im Bereich des  $\beta$ 1/ $\beta$ 2 – Loops [Macias et al, 1994], wobei die Bindungsaffinität direkt mit der Anzahl der Lipid – Phosphatgruppen korreliert ist [Takeuchi et al, 1997].

Zu den über Datenbanksuche identifizierten PH-Domänen tragenden Proteinen, die in der intrazellulären Signaltransduktion eine entscheidende Rolle spielen, zählen  $\beta$ -adrenerge Rezeptor-Kinase ( $\beta$ ARK), Phospholipasen wie Phospholipase C (PLC), das ARF GTPase aktivierende Protein Centaurin alpha und Proteine, die als Austauschfaktoren oder GTPase-aktivierende Proteine für kleine G-Proteine fungieren ( Ras-GRF, Dbp, SOS, Ras-GAP und Tiam-1) [Rameh et al, 1997; Musaccio et al, 1993].

Die Sequenzhomologien der einzelnen PH-Domänen ist gering, es finden sich nur 10-30% Aminosäureidentitäten [Lemmon et al, 2002]. Die Homologie betrifft aber sehr ausgeprägt die oben genannte Sekundär- und Tertiärstruktur.

Die für die Reifung von lymphoiden B – Zellen essentielle Bruton`s Tyrosin Kinase (BTK) bindet über ihre PH-Domäne mit hoher Affinität und Spezifität an das Lipid-Monomer PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Es könnte so die Funktion der Kinase durch Modulation der intrazellulären Lokalisation beziehungsweise der Aktivität in stimulierten Zellen beeinflusst werden [Rameh et al, 1997].

Mit  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  und seinem Zerfallsprodukt  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$  interagieren neben BTK ebenfalls spezifisch die  $3'$ -Phosphoinosid-abhängige Protein Kinase 1 (PKC-1), der duale Adapter für Phosphotyrosin und  $3'$ -Phosphoinositide, das Adapterprotein Gab-1 [Dowler et al, 2000] sowie die Proteinkinase B, dessen Bindung an  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  eine funktionelle Inhibition des Proteins zur Folge hat [Rameh et al, 1997].

Für die Familie der eukaryotischen, intrazellulären PLC mit ihren Isoformen  $\beta, \gamma, \delta$ , die wiederum in Subtypen untergliedert sind und einer unterschiedlichen zellulären Regulation unterliegen, konnte eine N-terminal gelegene PH-Domäne nachgewiesen werden [Essen et al, 1996; Ferguson et al, 1995]. Diese zeigten bei den Isoformen  $\beta_1$  und  $\beta_2$  eine starke, aber Phosphoinositid-unabhängige Assoziation mit Lipidlayern und legt die Vermutung nahe, dass eine Komplexbildung mit der Untereinheit  $\beta\gamma$  von G-Proteinen über eine C-terminal gelegene Bindungsdomäne [Stoffel et al, 1997; Pitcher et al, 1992] die Interaktion mit der Membran vermittelt. Für die  $\gamma$ -Isoform wurde jedoch eine spezifische Bindung an  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  nachgewiesen, die zugleich die katalytische Aktivität der Lipase stimulierte.

PLC  $\delta_1$  bindet mit ihrer PH-Domäne hingegen stark abhängig vom Gehalt an  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  an die Membran, was durch den positiv geladenen Loop im Bereich der Bindungsstelle bedingt ist, der in den  $\beta_1$  und  $\beta_2$  – Isoformen fehlt und ihnen einen polaren Charakter verleiht [Wang et al, 1999].

Für alle bisher identifizierten PH-Domänen, die spezifisch an  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  und  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$  binden, konnte ein sogenanntes Putatives Phosphatidylinositolphosphat – bindendes Motiv (PPBM) identifiziert werden, welches im N-terminalen Bereich der PH-Domänen lokalisiert ist und mit diesen Lipiden direkt interagiert. Eine Ausnahme stellt die  $\delta_1$  – Isoform der PLC dar, welche zwar über eine PPBM verfügt, jedoch keine hohe Affinität für  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  zeigt [Ferguson et al, 1995].

Das PPBM wird von 6 konservierten Aminosäureresten gebildet [Dowler et al, 2000], die aufgrund ihres basischen Charakters vermutlich direkte Interaktionen mit den Monoester – Phosphatgruppen des  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  eingehen [Lemmon et al, 2000;



Fruman et al, 1999; Baraldi et al, 1999]. Die Mutation auch nur einer dieser Reste verhindert die Bindung an  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  [Isakoff et al, 1998].

Auf die PH-Domäne – vermittelte PI-3-Kinase abhängige Translokation der Proteine der Centaurin – Familie und ihre Funktion als potentielle  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  – Rezeptoren wird im Abschnitt 1.4 der Einleitung näher eingegangen.

Proteine der Dbl-Familie sind Guanin Nukleotid Austauschfaktoren (GEF), die die Aktivität von kleinen G-Proteinen durch Austausch von GDP zu GTP regulieren. GEF spielt eine kritische Rolle in der Aktivierung von Rac/Rho GTPasen im Zusammenhang mit der durch Zelloberflächenrezeptoren vermittelten Aktinbündelung [Lemmon et al, 2002]. Die PH-Domänen dieser Proteine weisen eine geringe Affinität und Spezifität für Phosphatidylinositolphosphate auf, was einen komplexeren Regulationsmechanismus vermuten lässt [Snyder et al, 2001]. In der Dbl-Familie sind den PH-Domänen sogenannte DH-Domänen ( Dbl Homology Domain) vorgelagert, die für die GEF – Aktivität verantwortlich sind [Whitehead et al, 1997] und vermutlich durch die Ligandenbindung an die PH-Domäne in ihrer Aktivität reguliert werden [Han et al, 1998].

Auch in SOS (Son of Sevenless), einem GEF des kleinen G-Proteins Ras, das in die Signaltransduktionskaskade des Epidermal Growth Factors (EGF) – Rezeptors einbezogen ist, konnte eine DH-Dom nachgewiesen werden. Die PH-Domäne von SOS weist eine hohe Affinität und Spezifität für  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  auf [Rameh, 1997] und übt in vivo nachweislich einen inhibitorischen Effekt auf die DH-Domäne und damit auf die Bindung von Rac/Rho kleinen G-Proteinen durch SOS aus [Nimnual et al., 1998].

Sowohl Guanin Nukleotid Austauschfaktoren aus der Dbl-Familie, als auch PKB und Pleckstrin-2 erkennen über ihre PH-Domänen spezifisch 3-phosphorylierte Phosphoinositide, mit der Folge, dass sie in Abhängigkeit zur Phosphatidylinositol-3-Kinase–Aktivität an die Membran lokalisieren. Diese Proteine verfügen, wie viele PH-Domänen-tragenden Cytoskelettproteine ( zum Beispiel Spektrin) auch, über eine PH-Domäne – vermittelte Regulation des Aktinbündelns und der Zellpolymerisation.

Die Regulation dieser Aktin-Bindungsproteine erfolgt dabei vor allem durch PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> [Yu et al, 1992; Fukami et al, 1996; Weekes et al, 1996; Gilmore et al, 1996] und tragen zu Veränderungen in der Aktin-Cytoarchitektur bei, die in die Ansammlung von Focal Adhaesions involviert sind [Norman et al, 1998].

Pleckstrin-2, das anders als Pleckstrin nicht PKC-reguliert ist und auch eine wesentlich höhere Spezifität für Phosphatidylinositol-3-Kinase-Produkte hat, induziert die Zellausbreitung, vermutlich durch Aktin-Organisation, sobald es über die Bindung an PI-3-Kinase-Produkte an die Membran rekrutiert wird [Lemmon et al, 2002]. Pleckstrin wird hingegen durch PKC-abhängige Phosphorylierung in einem der N-terminalen PH-Domäne nachgeschalteten Peptidsegment aktiviert und verursacht als negativer Regulator der 3- und 5-Phosphoinositid – Produktion eine Unlöslichkeit der F-Aktin - Stressfasern und eine Erhöhung des F-Aktin – Gehalts der Zellen [Ma et al, 1999].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei den meisten der hier beschriebenen Proteine die PH-Domäne zur Interaktion mit Phosphatidylinositolphosphaten dient, wobei verschiedene PH-Domänen ( circa 10% [Lemmon et al, 2000; Rebecchi et al, 1998]) eine Selektivität und Spezifität für unterschiedliche Lipide zeigen, die zu der Annahme führen, dass auf diese Weise eine vielschichtige Regulation der Plasmamembran – Zielsteuerung von Signaltransduktions – Proteinen durch Phosphoinositide erfolgt [Rameh et al, 1997].

<p><b>PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>:</b> Bruton`s Tyrosin Kinase Δ-Isoform der Phospholipase C SOS (ras-GEF)</p> <p><b>PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>:</b> Phosphoinositid abhängige Kinase 1 (PDK1) Phosphotyrosin- und 3-Phosphoinosid-Adapter Adapterprotein Gab1 Proteinkinase B (Akt) GEFs aus der Dbl-Familie Pleckstrin-2</p> <p><b>PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>:</b> Δ1-Isoform der Phospholipase C</p>
---

**Tabelle 2: Tabellarische Zusammenfassung der mit ihrer PH-Domäne spezifisch an Phosphatidylinositolephosphate bindenden Proteine**

Die verbleibenden 90% der PH-Domänen binden zwar Phosphatidylinositolphosphate, jedoch mit vergleichsweise geringerer Intensität und Spezifität. Möglicherweise werden diese Proteine in ihrer Funktion durch Domänen anderer Proteine unterstützt oder es liegt keine Beschränkung der physiologischen Liganden auf Phosphoinositide vor [Lemmon et al, 2002].

Für die Proteine dieser schwach und unspezifisch bindenden PH-Domänen, die stets im Cytoplasma verbleiben, ist ein klares Membranziel unwahrscheinlich und eine Modulationsfunktion der Protein-Protein-Interaktion durch die PH-Domänen eher zu erwarten ( zum Beispiel die C-terminale PH-Domäne von Tiam-1, Dynamin, IRS-1 PTB [Rameh et al, 1997]).

Die Phosphatidylinositolphosphat – Bindung könnte über die Kooperation der PH-Domäne mit anderen cytosolischen Interaktionspartnern erfolgen. Gezeigt wurde dies für die β-ARK, welche PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> mit sehr geringer Affinität bindet, aber zugleich mit der Gβγ – Untereinheit heterotrimerer G – Proteine interagiert. Eine Membranlokalisation resultierte nur bei simultaner Interaktion der PH-Domäne mit beiden Liganden [Pitcher et al, 1995].

Eine weitere Möglichkeit für ein indirekt PH-Domänen-vermitteltes Membran – Targeting besteht bei Existenz einer separaten Proteinbindungs-Domäne in demselben Protein. Dies konnte für den Rac1 Guanin Nukleotid Austauschfaktor Tiam-1 gezeigt werden [Stam et al, 1997].

Ein weiteres spezifisches Phosphatidylinositolphosphat – Interaktionsmodul stellt eine sogenannte Zink–Finger–Domäne dar, die aus einer hoch hydrophoben Region besteht, welche eine Oberfläche für die Interaktion mit Membranlipiden und hier vor allem mit PtdIns3P bietet. Centaurine, PKC, Chimärine, Rafs, DAG-Kinasen und Early-Endosomal-Antigen-1 sind Proteine, für die derartige Zink-Coordinations-Sites nachgewiesen wurden [Hammonds-Odie et al, 1996; Dowler et al, 2000].

### ***1.3 Die Rolle der ADP-ribosylation factor (Arf) – GTPase Proteine (GAPs) im intrazellulären Membrantransport und dem Cytoskelett - Arrangement***

Arf (ADP ribosylation factor)–GTPase Proteine gehören zur Ras/GTPase-Superfamilie der kleinen GTP–bindenden Proteine (G-Proteine), die mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 20kDa eine Funktion als lösliche, intrazelluläre Signalvermittler haben.

Mit der Fähigkeit von Arf GTP zu binden und somit in einen aktiven Zustand überzugehen, wurde eine Einflussnahme vor allem auf den intrazellulären Vesikeltransport und das Aktin – Cytoskelett der Zelle nachgewiesen [Randazzo et al, 2000]. Durch GAP-abhängige Hydrolyse von gebundenem GTP zu GDP und dadurch bedingter Inaktivierung wird das G-Protein – vermittelte Signal beendet [Donaldson, 2000] und kann erst wieder durch erneute Bindung von GTP umgesetzt werden.

Der GDP–GTP–Austausch erfolgt über GEFs, den sogenannten Guanin Nukleotid Austauschfaktoren (Dbl, SOS, Tiam-1, Grp-1, Cytohesin, ARNO, Vav-1), während die Hydrolyse von GTP zu GDP am G-Protein durch sogenannte GTPase-aktivierende Proteine (GAP) für kleine G-Proteine (Ras-GRF, Ras-GAP, Rac-GAP,

Rho-GAP, Cdc42-GAP) stimuliert wird [Musacchio et al, 1993]. Zu den GTPase-aktivierenden Proteinen, die eine Arf-GAP-Domäne tragen und sehr wahrscheinlich auch eine Hydrolyse am Arf unterstützen, zählen Raf-1, p95APP1, Gcs-1, GIT-1, GIT-2, Centaurin  $\alpha$ -1, Centaurin  $\alpha$ -2, Centaurin  $\beta$ -1 und ASAP-1/Centaurin  $\beta$ -4) [Dubois et al, 2002].

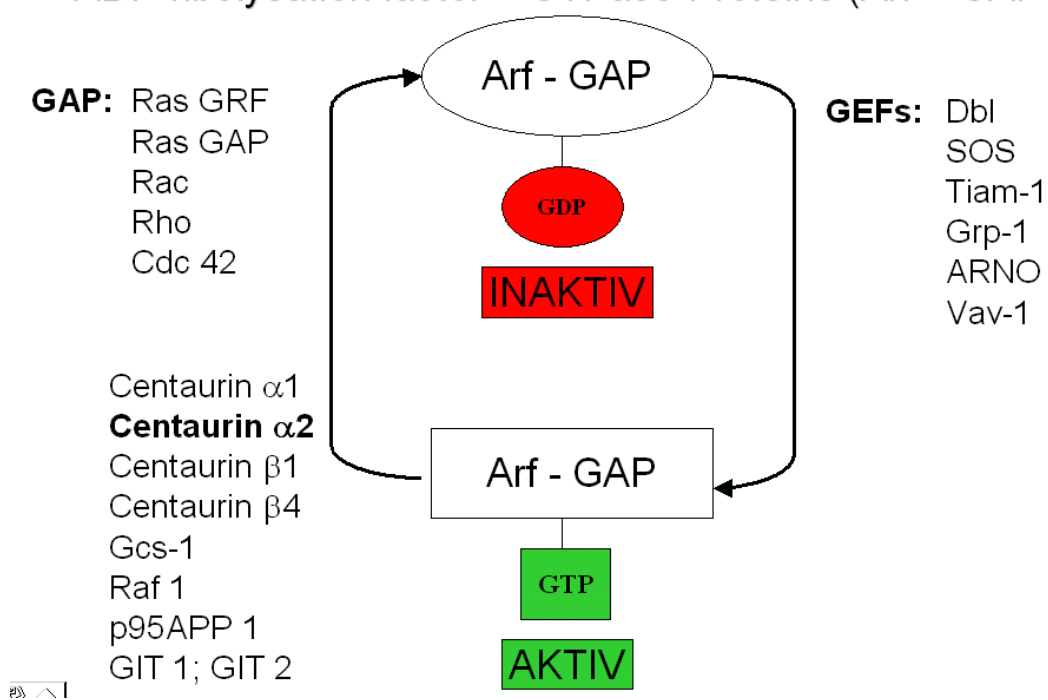


Abbildung 3: Schematische Auflistung bekannter ADP-ribolysation factor – GTPase-Proteine (Arf – GAPs)

### 1.3.1 Arf-GTPasen als multifunktionale Modulatoren des Aktin-Cytoskeletts

Sechs Arf-Gene konnten bisher nachgewiesen werden und die zugehörigen Proteine (Arf1 bis Arf6) zeigten, abhängig vom gebundenen Nukleotid, eine zum Teil unterschiedliche zelluläre Lokalisation [Jackson et al, 2000].

So ist Arf-1-GDP vor allem im Cytosol lokalisiert, Arf-1-GTP hingegen zeigt eine ausgeprägte Membranassoziation am Golgi-Apparat. Diese Beobachtung ist im Hinblick auf das putative Rollenspiel der vor allem in Abschnitt 1.4 näher besprochenen Arf-GAPs sehr interessant.

Arf1 beeinflusst, wie auch die Isoformen Arf-2 bis Arf-5, die Rekrutierung von Transport-Vesikel-Mantelproteinen COPI, AP-1 und AP-3 (Adaptor-related Protein-Complex) am Golgi-Apparat, deren Wiederauflösung und die Vesikelfusion [Roth, 1999] und spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation des Paxillinrekrutments zu Focal Adhesions [Norman et al, 1998].

Diese Arf – Proteine induzieren auf diese Weise die Ausbildung von Paxillin-reichen Focal Adhesions an den Enden der Aktin-Stressfasern [Norman et al, 1998] und haben einen synergistischen Effekt mit den kleinen G-Proteinen der Rho-Familie (Rho, Rac und Cdc42) die nachweislich die dynamischen Eigenschaften des Cytoskeletts durch Zusammenschluß von Focal Adhesions mit Aktin-Stressfasern regulieren [Radhakrishna et al, 1999].

Paxillin ist ein Aktin-assoziiertes Protein, welches, unterstützt durch Arf-1 bei Stimulation mit GTP $\gamma$ S an cytoplasmatische Domänen von  $\beta$ -Integrin [Schaller et al, 1995] und an das Focal Adhesion-Protein Vinculin bindet [Wood et al, 1994]. Als molekularer Adapter oder Gerüstprotein stellt es einen Bezugspunkt für die Protein-Tyrosin Kinasen Src und Focal Adhesion-Kinase dar, die durch Integrin-vermittelte Zelladhärenz oder Wachstumsfaktoren stimuliert werden [Turner, 2000].

Focal Adhesions sind strukturelle Knotenpunkte aus Aktin-Cytoskelett-Aggregaten und plasmamembranständigen Integrinen, die in adhären Zellen der Verbindung zur extrazellulären Matrix dienen. Die Ausbildung dieser auf das geregelte Zellwachstum bedachten Signaltransduktionszentren wird durch Rho-GAP reguliert [Burrige and Chrzanowska-Wodnicka, 1996].

Arf-6 ist anders als die bereits erwähnten Isoformen vor allem in Mechanismen an der nicht adhären Plasmamembran involviert, indem es die Polymerisation von kortikalem Aktin induziert und somit wesentlich die Phagozytose und Endozytose, als auch die Zellausbreitung beeinflusst [Randazzo et al, 2000]. Erst kürzlich konnte für Centaurin  $\alpha$ 2 gezeigt werden, dass es gleichermassen der GAP-Aktivität des Centaurin  $\alpha$ 2, als auch dessen Bindung an die Plasmamembran bedarf, um Arf-6 zu inaktivieren [Venkateswarlu et al., 2007].

Neben dem Einfluss auf das Aktin-Cytoskelett-Remodelling, haben Arf-Proteine auch einen Effekt auf die PDGF (Platelet derived growth factor)-vermittelte Aktivierung der Phospholipase D (PLD) und die Stimulation der Phosphoinositid Kinasen. PLD hydrolysiert das membranständige Phosphatidylcholin zu Phosphatidsäure [Provost et al, 1996], welche durch Induktion der Aktin-Polymerisation zu Veränderungen in der Aktin-Cytoarchitektur beitragen, die in die Ausbildung von Focal Adhesions involviert ist [Norman et al, 1998].

### 1.3.2 Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren der kleinen G-Proteine

Für die Stimulation der kleinen G-Proteine sind Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) von essentieller Bedeutung, da sie die Dissoziation des GDP katalysieren und damit erst die Grundlage für eine Neubindung von GTP an das G-Protein schaffen. Alle GEFs der kleinen G-Proteine verfügen über PH-Domänen, die eine direkte Lokalisation an die membranständigen Phosphatidylinositole ermöglichen. Für das GEF Vav-1 zeigen *in vitro*-Daten, dass hohe Konzentrationen an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> die Austauscherfunktion fördert, während PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> einen inhibitorischen Effekt bedingt [Han et al, 1998].

Das zu der Familie der Arf–nucleotide binding-site opener gehörende GEF Grp-1 (general receptor for phosphoinositides 1) gilt neben Cytohesin-1 als spezifischer Austauschfaktor für Arf-1 [Karlund et al, 1997]. Beide Proteine können über ihre PH-Domänen mit hoher Affinität und Selektivität an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> oder andere 3-phosphorylierte Inositolphosphate binden, was ihre Aktivierung bedingt [Wang et al, 1999; Chardin et al, 1996].

GEFs aus der Familie der Dbl-Proteine weisen, wie im obigen Text bereits erwähnt, eine spezifische Bindung zu Phosphatidylinositol-3-Kinase-Produkten auf. Sie aktivieren hingegen jedoch nur indirekt Arf-Proteine beziehungsweise die Regulation des Aktinbündelns und der Zellpolarisation, indem sie GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) aus der Familie der Rac/Rho-GAPs stimulieren, die im Folgenden eine Hydrolyse an Arf unterstützen [Lemmon et al, 2002].

Durch die spezifische Bindung von Arf-1, Arf-3 und Arf-6 hat auch das eher an der Plasmamembran als am Golgikomplex lokalisierte GEF ARNO ( Arf nucleotide-binding site opener) einen Einfluss auf das Rearrangement des kortikalen Aktincytoskeletts im Rahmen des vesikulären Transports [Frank et al., 1998].

Eine Einflussnahme auf Arf-vermittelte Mechanismen durch Aktivierung von GAPs ist auch für die GEFs SOS und Tiam-1 ( T Lymphom Invasions – und Metastasen-Protein-1) beschrieben, die Ras-GAP beziehungsweise Rac/Rho-GAP stimulieren [Rameh et al, 1997].

### **1.3.3 G-Protein – assoziierte GTPase-aktivierende Proteine (GAPs)**

Wie die GEFs verfügen auch GTPase-aktivierende Proteine über mindestens eine PH-Domäne, die neben der Hydrolyse–Stimulation am kleinen G-Protein ebenfalls eine Rekrutierungsfunktion dieser Proteine ohne Membran-Docking-Domänen sehr wahrscheinlich machen und eine Beteiligung an membranlokalisierten Cytoskelett-Modulationsprozessen rechtfertigen.

So reguliert Rho–GAP den Verbund von Focal Adhesions und Aktin-Stressfasern [Ridley and Hall, 1992], indem es (*in vitro*) die Phosphatidylinositol 4-Phosphat – 5-Kinase aktiviert, ein Enzym, das PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> generiert [Chong et al, 1994]. Dieses Membranlipid beeinflusst eine Reihe von Aktin-Bindungsproteinen und erklärt ansatzweise die Wirkungsweise von Rho [Norman et al, 1998], dessen Induktion die Stressfaser-Ausbildung unterstützt und in die Neupolymerisation von Aktin [Machesky and Hall, 1997], sowie in das Rearrangement von Aktinfilamenten involviert ist. In Muskelzellen aktiviert Rho eine Serin/Threonin-Kinase mit der Folge einer Myosin-Leichtketten-Phosphorylierung, was zu einer Aktivierung einer Myosin-ATPase und zur Ansammlung von bipolaren Myosinfilamenten führt [Burrige and Chrzanowska-Wodnicka, 1996].

Die im Folgenden vorgestellten Arf–GAPs weisen N-terminal ein Zinkfingermotiv auf, welches zusammen mit weiteren aminoterminalen Resten für die GAP-Funktion als essentiell erachtet wird [Cukierman et al, 1995].



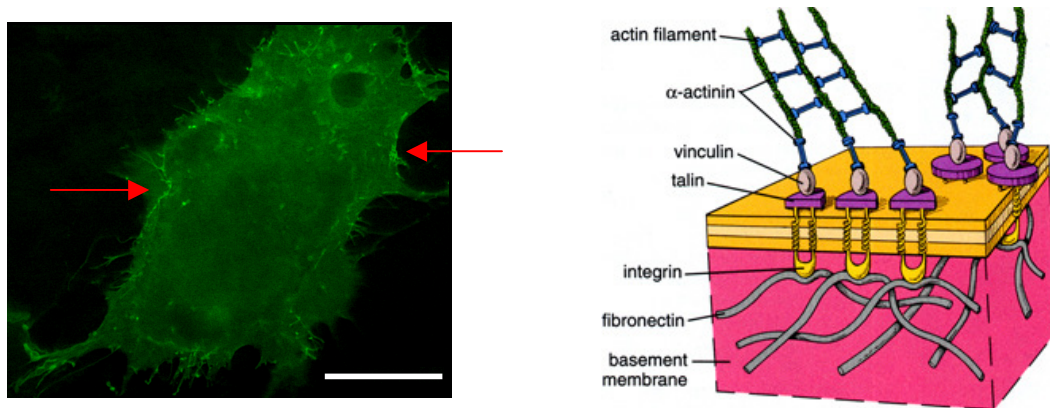
Rac-GAP und Cdc42-GAP, Arf-spezifische GAP-Proteine, sind an der Ausbildung von Filopodien und am Membranruffling beteiligt. Das zur Familie der Rho-GTPasen zählende Cdc42 ( mammalian Cell division cycle protein) [Johnson and Pringle, 1990], welches mit Arf-1 am Golgi-Apparat kolokalisiert ist, triggert die Ansammlung von Focal Adhesion-like Strukturen an Filopodien, die viele Komponenten der größeren, am Ende von Stressfasern lokalisierten Focal Adhesions enthalten [Nobes and Hall, 1995].

p95APP-1, ein putatives Arf-GAP, bindet an das bereits erwähnte Focal Adhesion Protein Paxillin [Turner et al, 1999] und könnte durch eine Komplexbildung mit Arf-1 und der Hydrolyse von gebundenem GTP zu GDP die über das G-Protein vermittelte Focal Adhesion – Bildung als negativer Regulator limitieren.

Die Internalisierung einiger G-Protein gekoppelten Rezeptoren unterliegt der Regulation der Arf-GAP Proteine GIT-1 und GIT-2 (G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinase-assoziiertes Arf GAP Protein) [Premont et al, 2000].

Gcs1, das Hefe-Homolog des im Abschnitt 1.4 näher beschriebenen Arf-GAPs Centaurin  $\alpha$ -1, verfügt über eine Cystein-reiche Domäne, die für seine bei Gcs1 bewiesene Arf-GAP-Aktivität nachweislich notwendig ist [Poon et al, 1996]. Sowohl in der Zellproliferation, als auch in endocytotischen Prozessen spielt es eine Rolle in der Aktin-Cytoskelett Regulation *in vivo* und zeigt *in vitro* eine Bindung an Aktin [Dubois et al, 2001].

Die Tatsache, dass GAPs und GEFs in ihrer Sekundärstruktur PH-Domänen aufweisen, lässt gemeinsam mit den Ergebnissen der neuesten Untersuchungen zur Funktion der PH-Domänen in GTPase-aktivierenden Proteinen [Venkateswarlu et al., 2007] und den Ergebnissen dieser Arbeit darauf schließen, dass Arf-Proteine Phosphatidylinositol-abhängig reguliert werden und somit die Organisation des zellulären Cytoskeletts maßgeblich durch externe, die Phosphoinositidbildung induzierende Stimuli (zum Beispiel über Wachstumsfaktoren) beeinflusst wird.



**Abbildung 4:** Cytoskelett – Transformation in Form von Focal adhesion – Komplexen im dekonvolvierten Schnittbild einer mit Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp transfizierten und EGF-stimulierten NRK-Zelle (Balkenlänge entspricht 10 $\mu$ m); Focal adhesion – Schema aus: [www.funhousefilms.com](http://www.funhousefilms.com)

#### **1.4 Proteine der Centaurin - Familie**

Zur Familie der Centaurine zählen eine Reihe von Proteinen (Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), die nicht nur strukturelle Homologien aufweisen, sondern auch ähnliche zelluläre (putative) Funktionen bekleiden und bereits in unterschiedlichen Spezies nachgewiesen werden konnten.

Die Centaurine wiederum stellen eine Subgruppe aus der Familie der Arf-GAP – Proteine dar, da sie in ihrer Struktur ausnahmslos alle ein N-terminales Zinkfingermotiv aufweisen, welches Ähnlichkeiten zu den katalytischen Domänen des Ratten-Leber Arf-1-GTPase aktivierende Proteins und des Hefe Arf-GAPs Gcs-1 zeigt [Cukierman et al, 1995; Poon et al, 1996]. Eine Vielzahl von Proteinen, die in Signaltransduktionsprozesse involviert sind (unter anderem PKC, Raf und DAG-Kinasen), tragen zwei solcher Domänen. Der diesen Regionen eigene hydrophobe Charakter wird durch eine individuelle Anordnung von Cystein- und Histidinresten geschaffen und vermittelt in den PKC-Isoformen so die Bindung an Diacylglycerol (DAG) [Zhang et al, 1995]. Das nur einfach vorhandene Zinkfingermotiv der Centaurin-Verwandten, welches die höchste Sequenzhomologie zwischen den Familienmitgliedern aufweist, wird dominiert durch 4 Cysteinreste und divergiert hinsichtlich der Reste zu den eben genannten Proteinen [Hammonds-Odie et al, 1996]. Eine weitere Gemeinsamkeit aller Centaurine zeigt sich in der Ausprägung mindestens einer PH-Domäne, die der mehr oder minder spezifisch ausgeprägten

Interaktion mit Phosphatidylinositolen dient [Randazzo et al, 2000]. Des weiteren finden sich 10 Ankyrin-Repeats, wobei die ersten beiden in allen Centaurin-Isoformen hoch konserviert sind und eine konservierte funktionelle Bedeutung vermuten lassen [Hammonds-Odie et al, 1996]. Ankyrin-Repeats stellen zahlreiche repetitive Domänen dar, die Homologien unter anderem zu Domänen des intermediären Filamentproteins Ankyrin aufweisen [Lambert et al, 1990].

**Centaurin  $\alpha$ :**



**p42 IP<sub>4</sub>:**



**PIP<sub>3</sub> BP:**



**Centaurin  $\alpha$ 1:**



**Centaurin  $\alpha$ 2:**



**Centaurin  $\beta$ 2:**



**Centaurin  $\beta$ 3/ PAP:**



**Centaurin  $\beta$ 4/ASAP1:**



Abbildung 5: Bekannte Isoformen der Centaurin – Familie (Subgruppe der Arf – GAPs). Die Balkenschemata der Sekundärstruktur stellen die Länge und wesentliche Strukturelemente der einzelnen Proteine im Vergleich dar ( N = N-terminal; C = C-terminal; Proteinlänge; Zinkfingermotiv; PH-Domäne; Ankyrin-Repeats; SH3-Domäne).

### 1.4.1 Centaurin $\alpha$

Centaurin  $\alpha$  wurde als erstes seiner Gruppe aus Rattenhirn kloniert und hat ein Gewicht von 46 kDa. Die mRNA mit einer Größe von 2,5 kb ist vor allem im Hirn nachweisbar, in wesentlich geringerem Maße ist sie aber auch in Lungen-, Nieren, und Milzgewebe detektierbar. In verschiedenen neuronalen Zelltypen

unterschiedlicher Hirnareale konnten desweiteren kleine mRNA Fragmente isoliert werden, die alternativ gesplice Centaurin  $\alpha$  – mRNAs repräsentieren könnten.

Auffällig stark wird Centaurin  $\alpha$  in kortikalen Pyramidalzellen und im Hypothalamus exprimiert [Sedehizade et al, 2002] und zeigt auch entwicklungsabhängige Lokalisationsunterschiede in den Hirnregionen. Betroffen sind hier vor allem Cerebellum, Hippocampus und Thalamus, während sich im ausgewachsenen Rattenorganismus die höchste Expressionsrate von Centaurin  $\alpha$  im Soma der corticalen, cerebellären und hippocampalen Nervenzellen zeigt. Elektronenmikroskopisch ist Centaurin  $\alpha$  außerdem in Axonen und hier vor allem an den axonalen und präsynaptischen Membranen, sowie an Vesikeln repräsentiert [Aggensteiner und Reiser, 2003].

Centaurin  $\alpha$  enthält ein putatives Zinkfingermotiv, 10 Ankyrin-Repeats und weist strukturelle Homologien zu Hefe- und Säuger-Arf-GAPs auf. Einer 5- lokalisierten, 112 Basenpaare (bp) umfassenden und nicht translatierten Region, die keinerlei Stop Codons aufweist, folgt eine putative Kozak`s Consensus – Sequenz, die dem ersten ATG–Startcodon vorgelagert ist. Der Open-Reading-Frame umfasst ca. 1,4 kbp und beinhaltet einen 3- untranslatierten Bereich, der durch einen Poly-A-Schwanz charakterisiert ist [Hammonds-Odie et al., 1996].

Der zweite Ankyrin-Repeat zeigt eine Sequenzhomologie zu einer Region in den Inositolphosphat-bindenden Proteinen GAP<sup>InsP<sub>4</sub>-BP</sup> [Cullen et al., 1995] und Synaptotagmin II [Fukuda et al, 1994] und schließt auch einen konservierten Lysin-Rest mit ein, der beim Synaptotagmin als wesentlich für die Bindung an Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> erachtet wird und in anderen Centaurin-Verwandten nur partiell erhalten ist. Im Bereich der Aminosäuren 139-161 weist Centaurin  $\alpha$  einen deutlichen Sequenzunterschied zu allen anderen Proteinen in dieser Familie auf [Whitley et al, 2002].

Über je eine C- und N-terminal lokalisierte PH-Domäne bindet Centaurin  $\alpha$  hochaffin an PtdIns-(3,4,5)-P<sub>3</sub> und in sehr viel geringerer Ausprägung neben PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> auch an Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> und stellt somit das mit höchster Affinität aller bisher identifizierten InsP<sub>4</sub>-bindenden Proteine dar.

Die auffällig stark ausgeprägte Bindung an PtdInsP<sub>3</sub> und die aufgrund von Sequenzhomologien vermutete Funktion als Arf-GAP legen die Möglichkeit nahe, dass Centaurin  $\alpha$  als Mittler zwischen Phosphatidylinositol-3-Kinase-Rezeptoren und Arf-abhängigem postendosomalem Membranshuttling [Whitney et al, 1995] fungiert und in Prozessen wie Ruffling, Glucose Transporter Translokation und/oder Neuritenwachstum somit eine regulatorische Funktion hinsichtlich des Transports von Lipid- und Proteinkomponenten zur Plasmamembran einnimmt.

Im Rahmen der Phosphatidylinositol-Signalkaskade sind eine Vielzahl weiterer Funktionen von Centaurin  $\alpha$  denkbar. Möglich wäre eine Vermittlung von extrazellulär durch Wachstumsfaktoren getriggerten PI-3-Kinase-Aktivierung, die hirneigene Folgeereignisse induzieren oder eine Regulation des Aktin-Cytoskeletts und/oder des Vesikel-Transports, bedingt durch Konzentrationsschwankungen von PtdInsP<sub>3</sub> im Lipidlayer. Der Einfluss von Centaurin  $\alpha$  auf das Cytoskelett wird nicht nur durch die Arf-GAP-Domäne, sondern aufgrund eines weiteren homologen Sequenzabschnitts wahrscheinlich. Dieser zeigt sich im Alignment von Centaurin  $\alpha$  mit einigen Vertretern der TERM-Familie (Talin, Ezrin, Radixin, Moesin und Merlin), die über Substrukturen, zum Beispiel in Form von Mikrovilli, Filopodien und Zeljunctions als mögliche Adapter zwischen Aktin-Cytoskelett und Membranproteinen auftreten [Hammonds-Odie et al, 1996].

### 1.4.2 Centaurin $\alpha$ 1

Bei Centaurin  $\alpha$ 1 handelt es sich um das humane Homolog von Centaurin  $\alpha$ . Die cDNA wird fast ausschließlich in Hirngewebe und zum Teil auch in Leukozyten als ein 2,5 kb umfassendes Transkript exprimiert. Die in der Ratte simultan aufgetretenen kleineren mRNA-Varianten konnten im Menschen nicht nachgewiesen werden.

Das Translationsprodukt stellt ein 373 Aminosäuren (AS) umfassendes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 43,5 kDa dar und ist damit im Vergleich zur Ratten-Isoform, wie alle anderen später erwähnten Isoformen auch, am C-terminalen Ende um 45 Aminosäuren verkürzt. Das der N-terminal ( AS 253–357) gelegenen PH-

Domäne vorgeschaltete Zinkfingermotiv ( AS 1–117) zeigt, wie schon für das Centaurin  $\alpha$  aus der Ratte beschrieben, einen Cystein-reichen Bereich, der aus Sequenzalignments schlussfolgernd, am Ehesten einer Arf-GAP-Domäne entspricht [Venkateswarlu und Cullen, 1999]. Eine Deletionsmutation (Centaurin  $\alpha$ 1: Cys21 und Cys24) führt zu vollständigem Funktionsverlust [Venkateswarlu et al, 1999]. Doch obwohl Centaurin  $\alpha$ 1 *in vivo* eine Hefe Gcs-1–Deletionsmutante komplementierte, konnte keine Arf-GAP–Aktivität nachgewiesen werden [Venkateswarlu et al, 1999].

In der C-terminal ( AS 130–231) lokalisierten PH-Domäne legen Sequenzhomologien zu PtdIns(3,4,5) $P_3$ -bindenden PH-Domänen der Arf-GEFs ARNO, Grp-1 und Cytohesin-1 die Vermutung nahe, dass es sich hier um eine spezifische Bindungsstelle für dieses Lipid handelt und eine Regulation PI-3-Kinase – vermittelter intrazellulärer Prozesse durch Centaurin  $\alpha$ 1 erfolgt.

Tatsächlich zeigen Lokalisationsstudien eine schnelle Nerve Growth Factor (NGF) und Epidermal Growth Factor (EGF) induzierte und PI-3-Kinase-abhängige Centaurin  $\alpha$ 1 – Rekrutierung zur Plasmamembran, die durch den PI-3-Kinase – Inhibitor Wortmannin gehemmt wird und sprechen diesem Protein eine Rolle als PtdIns(3,4,5) $P_3$ –Rezeptor *in vivo* zu. Die infolge der extrazellulären Stimulation vollständig stattfindende Umverteilung des in unstimulierten Zellen zu gleichen Teilen im Kern und Cytoplasma lokalisierten Centaurin  $\alpha$ 1 an die Membran vollzieht sich innerhalb 1 Minute und erreicht den Ausgangszustand bereits wieder nach 10 Minuten. Die Dauer von 60 Sekunden entspricht dem Zeitrahmen der EGF-vermittelten PtdIns(3,4,5) $P_3$  – Produktion [Carter und Downes, 1992; Venkateswarlu und Cullen, 1999].

Im Rahmen der Erforschung der neuronalen Funktion von vor allem im Hirn lokalisiertem Centaurin  $\alpha$ 1 ist eine Assoziation mit präsynaptischen Transmittervesikel-Strukturen gezeigt worden [Kreutz et al, 1997], die auf eine Bindung an den Adaptor-related Protein-Komplex 3 (AP3) zurückzuführen ist [Blumstein et al, 2001].

Neben der Plasmamembrantranslokation ist auch ein PI-3-Kinase – induziertes nukleäres Rekrutierung von Centaurin  $\alpha$ 1 denkbar, da NGF- beziehungsweise EGF-

vermittelt ein Anstieg von  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  in der Kernmembran erfolgt [Tanaka et al, 1999]. Diese These wird durch die Identifizierung von Nukleolin als ein Centaurin  $\alpha 1$  – Bindungspartner *in vitro* und *in vivo* untermauert.

Nukleolin (110 kDa) stellt ein im Nukleolus akkumuliertes Protein dar, das eine Rolle in der nukleolären Ribosomen-Synthese spielt [Ginisty et al, 1999]. Für eine putative Kernfunktion liegt Centaurin  $\alpha 1$  möglicherweise in Assoziation mit Nukleolin und anderen identifizierten Bindungspartnern des RNA-Metabolismus ( unter anderem mit RNA Polymerase II Transkriptionsfaktor 4, Ribosomalem Protein S9, prä-mRNA Splicing Faktor SF3) in Form eines Ribonuklein-Komplexes vor [Dubois et al, 2003].

Des weiteren enthält Centaurin  $\alpha 1$  ein putatives N-terminal befindliches Kern-Lokalisations-Signal (NLS) [Tanaka et al, 1999] und ein noch nicht näher untersuchtes potentiell nukleoläres Lokalisations-Signal C-terminal (AS 301-303) [Weber et al, 2000].

Eine Centaurin  $\alpha 1$  – Mutante, in der das N-terminale Zinkfingermotiv deletiert ist, verursacht in der subzellulären Lokalisation einen Kernausschluß und spricht auch dieser Domäne ein putatives Kernlokalisierungssignal zu [Sedehizade et al, 2002].

Im Rahmen möglicher nukleärer Funktionen von Centaurin  $\alpha 1$  hat auch die nachgewiesene Interaktion mit der Casein Kinase 1 (CK1) eine Bedeutung [Dubois et al, 2001], welche über Phosphorylierung neben dem Membranverkehr und dem Aktin-Cytoskelett-Rearrangement [Gross et al, 1995; Faundez und Kelly, 2000] auch prä-mRNA Splicing Faktoren reguliert [Gross et al, 1999] , da CK1 einerseits über keine Lipid-Bindungs-Domäne verfügt, die Assoziation mit den Faktoren ebenfalls nicht direkt erfolgt und Centaurin  $\alpha 1$  somit eine mögliche Adapter-Funktion übernehmen könnte.

Im Zusammenhang mit der klinisch als frühzeitige Demenz imponierenden Alzheimer – Erkrankung (AD) gewinnt die Interaktion von Centaurin  $\alpha 1$  mit CK1-Isoformen, für die eine Beteiligung bereits nachgewiesen ist, zunehmend an Bedeutung. CK1 ist im Hirngewebe von Patienten extrem hochreguliert und trägt zur Phosphorylierung und Assoziation mit AD-spezifischen Tau-Filamenten, Proteinen (  $\beta$ Amyloid precursor

protein  $\beta$ APP), Vakuolen und neuritischen Plaques bei [Yasojima et al, 2000; Ghoshal et al, 1999; Walter et al, 2000]. Da Centaurin  $\alpha$ 1 vor allem temporal in neuritischen Plaques eine deutliche Kolo-kalisation zeigt, aber die Aktivität des Enzyms unbeeinflusst lässt, wird Centaurin  $\alpha$ 1 eine für die AD – Pathogenese (Phosphorylierung von  $\beta$ APP) relevante CK1-Plasmamembranrekrutierungs-Funktion zugeschrieben [Reiser und Bernstein, 2002].

Nukleäre Ereignisse könnten ebenfalls durch Centaurin  $\alpha$ 1 infolge einer direkten und spezifischen Assoziation mit Protein-Kinase C (PKC) beeinflusst werden, da die PKC-Isoformen neben der Cytoskelett-Organisation im Cytoplasma auch nukleäre Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose regulieren [Zemlickova et al, 2003] und die Aktivität der novel und atypischen Isoformen nachweislich durch die sekundären Lipid-Botenstoffe  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$  und  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  induziert wird [Toker, 1998].

Die Interaktion von Centaurin  $\alpha$ 1 mit PKC erfolgt über zwei sogenannte Major PKC-Sites, die sich zum einen im Bereich der C-terminalen PH-Domäne (Thr276) und zum anderen N-terminal in der Arf-GAP-Domäne (Ser87) befinden. Eine Phosphorylierung an diesen Resten soll die Phosphoinosidbindung an Centaurin  $\alpha$ 1 beeinflussen [Zemlickova et al, 2003].

Im Folgenden finden die in den Spezies Schwein (  $\text{p42}^{\text{IP4}}$ ), Rind ( PIP3 BP) und Hefe ( SPS 18 und GTS1/LSR1) bereits identifizierten und bezüglich ihrer Sequenz bis zu 90% Centaurin  $\alpha$ 1 – homologen Proteine Erwähnung.

### 1.4.3 $\text{p42}^{\text{IP4}}$

Das aus dem Cerebellum von Schweinen isolierte 42 kDa große Protein  $\text{p42}^{\text{IP4}}$  weist in zwei Peptidsegmenten eine 100%ige Sequenzhomologie zum Centaurin  $\alpha$  auf, was die Vermutung zulässt, dass dieses Protein eine alternativ gespleißte Isoform von Centaurin  $\alpha$  darstellt.

Mit seinen zwei PH-Domänen bindet es hochaffin an  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  und  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  und liegt daher sowohl membranassoziiert, als auch cytosolisch vor.



Bestätigt wurde diese Beobachtung in Versuchen, die eine Bindung von  $p42^{IP4}$  an PtdIns(3,4,5) $P_3$ -haltige Vesikel und eine sekundenschnelle konzentrationsabhängige Dissoziation durch Zugabe von Ins(1,3,4,5) $P_4$  nachwiesen. Dass dieser Effekt auch *in vivo* relevant zu sein scheint, wird durch quantitative Analysen der Inositolphosphate in Rattenhirnen gestützt, welche eine intrazelluläre Ins $P_4$ -Konzentration zeigen, die für eine Translokation von  $p42^{IP4}$  notwendig ist [Stricker et al, 1997 und 1999].

### 1.4.4 Phosphatidylinositolphosphat (3,4,5)Phosphat<sub>3</sub> Binding–Protein

Das Rinderhirn-spezifische PtdIns(3,4,5) $P_3$  Binding–Protein (PIP3 BP) ist ein 43 kDA großes Protein, dessen Open-Reading – Frame 373 AS umfasst und 1 Zinkfingermotiv, sowie 2 PH – Domänen beinhaltet [Tanaka et al, 1997].

PIP3 BP weist eine Sequenzhomologie zu Centaurin  $\alpha 1$  von 83% auf und bindet mit hoher Affinität und Spezifität an PtdIns(3,4,5) $P_3$ , zeigt aber fast keine Bindung an PtdIns(4,5) $P_2$ , PtdIns(3,4) $P_2$ , PtdIns3P oder Ins(1,3,4,5) $P_4$ . Punktmutationen in den konservierten Anteilen der PH-Domänen führen zu einer eingeschränkten Aktivität des Proteins [Tanaka et al, 1997].

Wie schon bei Centaurin  $\alpha 1$  erwähnt, ist auch für PIP3 BP ein Phosphatidylinositol-3-Kinase-abhängiges Shuttling zwischen Kern und Cytoplasma zu beobachten.

Eine Aktivierung der PtdIns(4,5) $P_2$ -3-Kinase führt hier zu einem Kernexport des Proteins, wobei eine Relokalisation in den Kern binnen 30 Minuten bei Inkubation der Zellen mit dem PtdIns(4,5) $P_2$ -3-Kinase Inhibitor Wortmannin erfolgte. Einen Einfluss durch Leptomycin B, einem Inhibitor des Nukleären Export – Signal (NES)-abhängigen Exports, fand nicht statt.

Punktmutationen in den Phosphatidylinositolphosphat – Bindungsdomänen (PH-Domänen) inhibierten den Export und sprechen für ein PI-3-Kinase – Produkt-abhängiges Geschehen. Ein vorstellbarer Mechanismus könnte die Umwandlung des Kernmembran-Lipids PtdIns(4,5) $P_2$  zu PtdIns(3,4,5) $P_3$  darstellen, welche durch ein

Einwirken der PI-3-Kinase von der cytoplasmatischen Seite aus vermittelt werden könnte.

Des Weiteren wurde im N-terminalen Bereich von PIP3 BP ein Nuklear Localisation – Signal-like Motiv (KERKK) identifiziert, dessen 14 AS für eine Kernlokalisation des Proteins ebenfalls als wesentlich erachtet werden [Tanaka et al, 1999].

### 1.4.5 Centaurin $\alpha 2$

Über das in dieser Arbeit untersuchte Protein Centaurin  $\alpha 2$  ist bezüglich seiner intrazellulären Funktion erst wenig bekannt. Das Protein wurde erstmals in der AG Mayr von Ch. Illies 1997-2002 kloniert [Illies, 2002] und erhielt den Datenbankeintrag NM 018404 in GeneBank.

Eine erste Charakterisierung aus Adipocyten der Ratte (s. nachfolgender Text) wurde 2002 von der Arbeitsgruppe um Paul Whitley veröffentlicht und zeigte eine bis 59% identische Proteinsequenz mit dem Centaurin  $\alpha$  bei abweichender Selektivität für die Phospholipide in den Membranen.

Die aus den oben genannten somatischen Zellen der Ratte klonierte Centaurin  $\alpha 2$  – cDNA enthält die Sequenz von 11 Exons, die für ein 376 AS langes Protein mit einem molekularen Gewicht von 43,5 kDa kodieren [Illies, 2002 ; Hanck et al., 2004]. Ähnlich wie beim Centaurin  $\alpha$  der Ratte, dem nächsten Verwandten dieser Isoform, finden sich in Centaurin  $\alpha 2$ -exprimierenden Zellen zwei mRNA – Transkripte unterschiedlicher Größe von 4,0 kb und 5,2 kb., wobei das kürzere Fragment den Hauptanteil ausmacht.

Die Gewebespezifität von Centaurin  $\alpha 2$  ist eine vollkommen andere als die der bisher bekannten Centaurin – Isoformen, die vor allem im Hirngewebe exprimiert werden. Die höchsten detektierten Centaurin  $\alpha 2$  – Level befinden sich in den Insulin-abhängigen Geweben, wie Fett (Adipocyten), Herz – und Skelettmuskel (Myocyten) und Hirn ( Neurone). In geringerem Maße ist Centaurin  $\alpha 2$  auch in der Niere, Lunge und Leber nachweisbar.

Sequenzalignments zeigen eine 51-59%ige Homologie der Ratten – Centaurin  $\alpha 2$  – Isoform zum Centaurin  $\alpha 1$ , die, verglichen mit einer sequentiellen Übereinstimmung aller anderen Isoformen ( $\alpha$ ,  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $p42^{IP4}$ , PIP3 BP) untereinander von ca. 90%, deutlich geringer ausgeprägt ist. Eine Homologie zwischen dem humanen und dem in Ratte nachgewiesenen Centaurin  $\alpha 2$  besteht zu 83%.

Die Sekundärstruktur von Centaurin  $\alpha 2$  korreliert hingegen eindeutig mit den anderen Vertretern dieser Protein – Familie. N-terminal des Ratten-Centaurin  $\alpha 2$  findet sich ein, bereits als Arf-GAP – Domäne näher beschriebenes Zinkfingermotiv (AS 21-82), gefolgt von je einer PH-Domäne am N-terminalen ( AS 131-232) und am C-terminalen ( AS 254-360) Ende des Proteins.

*In vitro* durchgeführte Inositol- und Lipid-Bindungsassays verschaffen Centaurin  $\alpha 2$  einen neuen Stellenwert innerhalb der Centaurin – Familie. Während die anderen Isoformen eine hohe Spezifität für  $PtdIns(3,4,5)P_3$  zeigen, bindet Centaurin  $\alpha 2$  signifikant, aber unspezifisch an  $PtdIns(3,4)P_2$ ,  $PtdIns(4,5)P_2$  und  $PtdIns(3,4,5)P_3$  und auch an  $Ins(1,3,4,5)P_4$ .

Mutagenesestudien zeigen für alle diese Liganden, ausgenommen für  $PtdIns(3,4)P_2$ , eine Bindung an Centaurin  $\alpha 2$  über dessen N-terminal lokalisierte PH-Domäne, während  $PtdIns(3,4)P_2$ , aber auch  $PtdIns(3,4,5)P_3$  Interaktionspartner der PH-Domäne am C-Terminus darstellen [z.B. Venkateswarlu et al., 2007].

Auch die subzelluläre Verteilung von Centaurin  $\alpha 2$  divergiert von den bisher bekannten Centaurin – Isoformen. Anders als bei Centaurin  $\alpha 1$ , welches in allen Zellkompartimenten, aber abhängig vom zellulären Aktivitätszustand in unterschiedlicher Konzentration nachweisbar ist, stellt den ersten *in vitro* Untersuchungen zufolge die Dense-granuläre/mitochondriale Membranfraktion alleiniges Lokalisationsziel von Centaurin  $\alpha 2$  dar. Unbeeinflusst vom Aktivitätsgrad der Phosphatidylinositol-3-Kinase, welcher in diesen Geweben maßgeblich durch Insulin als extrazelluläres Signalmolekül moduliert wird, ist endogenes Centaurin  $\alpha 2$  in Adipocyten ausschließlich in dieser subzellulären Membranfraktion nachweisbar.

Da eine Membrandissoziation im Vergleich zu  $p42^{IP4}$  schwerer induzierbar ist, wird für die stärkere Centaurin  $\alpha 2$  – Membran – Interaktion nicht nur die hohe Affinität für  $PtdIns(4,5)P_2$  verantwortlich gemacht, sondern auch vermutet, dass diese möglicherweise mit mehreren nachgewiesenen positiv geladenen Aminosäureresten in den PH-Domän-Regionen korreliert sein könnte, die im Centaurin  $\alpha 1$  so nicht existieren ( R150, K236; R269, R321, K326). [Whitley et al, 2002]

Neben den hier vorgestellten Interaktionspartnern sind für Centaurin  $\alpha 2$  bisher keine weiteren Liganden in Form von Proteinen oder Signalmolekülen beziehungsweise Hinweise auf eine zelluläre Funktion bekannt.

Im Rahmen der Erforschung der genetisch bedingten und als Hauterkrankung imponierenden Neurofibromatose wurde Centaurin  $\alpha 2$  lediglich als eines der elf deletierten DNA-Produkte identifiziert. Seine lokalisatorische Nähe auf Chromosom 17 (Position 17q11.2) zum Neurofibromatose1-Gen (NF1) [Hanck et al., 2004] könnte als Hinweis für die Bedeutsamkeit des Centaurin  $\alpha 2$  im Rahmen dieser Erkrankung dienen. Ein Zusammenhang oder eine differenzierte Bedeutung für Centaurin  $\alpha 2$  konnte aus diesen Erkenntnissen aber bisher auch hier nicht abgeleitet werden [Jenne et al, 2000].

### **1.4.6 Centaurin $\beta 2$**

Centaurin  $\beta 2$  ist ein noch weitgehend unbekanntes 778 AS umfassendes und in vielen Geweben exprimiertes Protein, welches über nur eine PH-Domäne ( AS 267-363) verfügt, gefolgt von einer putativen Arf-GAP-Domäne ( AS 399-520) und drei Ankyrin-Repeats an seinem C-Terminus. Die spezifisch und im Fall der Maus-Isoform ausschließlich mit  $PtdIns(3,5)P_2$  interagierende PH-Domäne des humanen Centaurin  $\beta 2$ , als auch das Maus-Centaurin  $\beta 2$  weist einen AS-Austausch an der dritten konservierten Position der PPBM auf.

Da sonst bisher kein spezifischer  $PtdIns(3,5)P_2$  – Rezeptor oder ein durch dieses Lipid regulierter zellulärer Prozess bekannt ist, könnte der AS-Austausch ursächlich

für diesen besonderen Centaurin  $\beta 2$  – Bindungspartner sein und macht PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> als putativen Regulator von Centaurin  $\beta 2$  sehr wahrscheinlich [Dowler et al., 2000].

Lediglich für den Hefe-Organismus ist bekannt, dass PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> bei osmotischem Stress generiert wird [Dove et al. 1997], indem PtdIns3P durch die Fab1-Kinase an der D-5 Position phosphoryliert wird [Odorizzi et al., 1998; Cooke et al., 1998].

Der zelluläre Effekt dieser Lipidproduktion ist jedoch auch hier weiter unklar.

### **1.4.7 Centaurin $\beta 3$ /PAP**

Das funktionell, als auch strukturell dem Centaurin  $\beta 4$  sehr ähnliche Arf-GAP Centaurin  $\beta 3$  (PAP) ist bisher nur in Ansätzen untersucht.

Die Struktur ist durch eine PH-Domäne, mehrere Ankyrin-Repeats, eine Prolin-reiche Region und C-terminale SH3-Domäne charakterisiert. Sie ermöglicht die Interaktion von Centaurin  $\beta 3$  mit Regulatoren des Cytoskeletts, zu denen unter anderem Phosphatidylinositolphosphate, Proteine der Src – Familie und Proteine der Focal Adhesion-Kinase (FAK) – Familie zählen [Randazzo et al., 2000]. Die Kenntnis dieser Bindungseigenschaften erklärt den Einfluss, der für Centaurin  $\beta 3$  im Rahmen der kortikalen Aktin-Organisation während der Zellbewegung beobachtet wurde [Brown et al., 1998; Andreev et al., 1999].

### **1.4.8 Centaurin $\beta 4$ /ASAP1**

Centaurin  $\beta 4$  (ASAP1) ist in seiner vorhergesagten Sekundärstruktur dem Centaurin  $\beta 3$  homolog. Es verfügt neben nur einer PH-Domäne, Ankyrin-Repeats, einer Prolin-reichen Sequenz und einer SH3-Domäne ebenfalls über eine für Arf-1, Arf-5 und Arf-6 spezifische Arf-GAP-Aktivität.

Centaurin  $\beta 4$  bindet die am Cytoskelett-Rearrangement maßgeblich beteiligte Tyrosin-Kinase Src (*in vitro*) [Brown et al., 1998] und ist auch durch die spezifische

Interaktion mit  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  in diese Prozesse involviert. Die Bindungsaffinität für die Focal Adhesion-Kinase (FAK) und eine daraus resultierende putative Aktivierung derselben könnte sich unter anderem in der erniedrigten Ausbildung von Focal Adhesions bei Centaurin  $\beta 4$  – Überexpression widerspiegeln.

Bei einer extrazellulär durch den Wachstumsfaktor PDGF (Platelet derived growth factor) ausgelösten Stimulation der Zellbewegung interagiert das vor allem an den peripheren Focal Adhesions lokalisierte Centaurin  $\beta 4$  zum einen mit den dort ebenfalls assoziierten Proteinen, zum anderen transloziert es an die in der Plasmamembran ausgebildeten Dorsal Ruffles.

Die vermittelte Funktion könnte in der Koordination des für die Zellbewegung essentiellen Membrantransfers und der Cytoskelettveränderungen begründet sein. Diese These wird durch Beobachtungen untermauert, die bei Centaurin  $\beta 4$  – Überexpression eine reduzierte Focal Adhesion-Ausprägung, eine Blockade der Zellausbreitung und einen deutlichen Rückgang der PDGF-induzierten und plasmalemmal ausgebildeten Dorsal ruffles zeigen [Toker, 1998; Siddhanta, 1998]. Diese Aktin-reichen Strukturen stellen wellenförmige Auffaltungen (Lamellipodien) der Plasmamembran dar, in deren Innerem F-Aktin und regulatorische Proteine inserieren und die Grundvoraussetzung für die Ausbildung der cytoplasmatischen Focal Adhesions bilden.

Für diese das PDGF-Signal kontrovers beeinflussende Funktion ist die Arf-GAP – Aktivität von Centaurin  $\beta 4$  ein essentieller Faktor.

Da Centaurin  $\beta 4$  über eine Reihe an regulatorischen Domänen verfügt, deren bis jetzt identifizierte Bindungspartner entscheidende Rollen im Zellstoffwechsel spielen, wäre eine aktivitätsbezogene Beeinflussung anderer Domänen infolge der Arf-GTP-Bindung denkbar. Genauso wahrscheinlich ist der Umkehrschluss, dass die GAP-Aktivität von Centaurin  $\beta 4$ , bedingt durch Interaktionen mit Phosphatidylinositolphosphaten, Src oder FAK, regulatorisch modifiziert wird [Randazzo et al., 2000].

## **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Obwohl die unter Kapitel 1.3. dargestellten Prozesse in Bezug auf eine Beteiligung von Arf-GTPasen *in vitro* und/oder *in vivo* untersucht wurden, ist der genaue molekularbiologische Mechanismus der Arf-Funktionen weitgehend unbekannt geblieben [Randazzo et al, 2000]. Für die schrittweise Entschlüsselung der Signalwege und um ein Verständnis dieser Prozesse auf molekularbiologischer Ebene zu erlangen, stellt die Untersuchung der bereits identifizierten putativ oder aber nachweislich in die Mechanismen involvierten Interaktionspartner einen entscheidenden Arbeitsschritt dar.

Bisher liegen v.a. Daten über Centaurin  $\alpha 2$  *in vitro* vor, die sich aus Lipidbindungsdaten bei Mutagenese der einzelnen oder beider PH-Domänen im Vollängenprotein gewonnen wurden. Nur eine, erst kürzlich veröffentlichte Arbeit, widmet sich der spezifischen, PH-Domäne-abhängigen Bindung von Centaurin  $\alpha 2$  an die Lipidprodukte der Phosphatidylinositolphosphat-3-Kinase *in vivo* [Venkateswarlu et al., 2007].

In dieser Arbeit wird eine Mutagenese am in vitalen Zellen überexprimierten Protein in unstimulierten und EGF-stimulierten Zellen durchgeführt, da vermutet wird, dass der Aktivitätszustand einer Zelle aufgrund des hiermit korrelierten Lipid- und Inositol – Musters eine wesentliche Bedeutung für die Lokalisation von Centaurin  $\alpha 2$  hat. Durch die Stimulation ergeben sich zwei zelluläre Zustände: In den unstimulierten Zellen findet sich sehr viel PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und kein PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Werden die Zellen jedoch mit dem Wachstumsfaktor EGF stimuliert, so befinden sich in den Membranen sehr hohe Spiegel an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, jedoch nur sehr geringe Mengen an PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>.

Untersucht wird die Rolle beider PH-Domänen in ihrem strukturellen Kontext bei der Interaktion mit den Phosphatidylinositolen in intakten Membranen und hierbei insbesondere mit PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, verdeutlicht durch die veränderte Bindung von Centaurin  $\alpha 2$  an die Plasmamembran.

Des Weiteren sollen die Untersuchungen in dieser Arbeit eine Antwort auf die Frage nach einer individuellen Phosphatidylinositolspezifität der C- und N-terminal lokalisierten PH-Domäne im strukturellen Kontext geben und klären, ob die PH-Domänen unabhängig voneinander an die Phosphatidylinositole der Plasmamembranen binden oder die Bindung des Centaurin  $\alpha 2$  im Sinne des Aviditätsphänomens gemeinsam beeinflussen.

Zu den Untersuchungen, die erste richtungsweisende Ansätze bezüglich der Funktionen eines Proteins oder Moleküls und die durch dieses beeinflussten Prozesse liefern, gehören die sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* durchführbaren Lokalisationsstudien.

Zu den *in vitro* anwendbaren Methoden zählen neben den radioaktiv oder mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Antikörper-Markierungsassays wie Immunoblotting oder Immunpräzipitation, auch die nach Größe, Ladung oder Interaktionsspezifität des zu untersuchenden Proteins auftrennenden Techniken wie zum Beispiel die Affinitätschromatographie.

Auch *in vivo* ist es möglich eine intrazelluläre Lokalisation über Antikörper zu ermitteln. Desweiteren bietet die Überexpression eines mit einem Fluorophor gekoppelten Fusionsproteins die Möglichkeit einer Analyse der subzellulären Zielsteuerung, sofern es sich um ein zellulär exprimiertes Protein handelt.

In dieser Arbeit wurde der Centaurin  $\alpha 2$  – Wildtyp, als auch die Centaurin  $\alpha 2$  – Mutanten mit dem grün-gelb fluoreszierenden Markerprotein GFP fusioniert und das Expressionsprodukt in Bezug auf seine subzelluläre Lokalisation untersucht.

Bei nahezu allen Experimenten handelt es sich um in die Wildtyp-Sequenz mittels Quikchange-Mutagenese gezielt eingebrachte Punktmutationen, bei welchen stark polarisierte Aminosäuren durch neutrale Aminosäuren substituiert werden. In zwei Fällen werden die mäßig polaren Reste des Tyrosins durch Glutamin – Reste ersetzt, da Max, 2000 ( Seite 160 und 162) diesen eine Bedeutung in der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zum Phosphatrest an 4-Position des PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> zusprach.



Die Generierung einer Doppelmutante und zweier Mutanten, in denen die Mutationen jeweils als einfache Mutationen vorliegen, nimmt Bezug auf eine der zu Beginn dieser Arbeit neuesten Veröffentlichungen zu Phospholipidbindung von Centaurin  $\alpha 2$  an synthetisch hergestellte Liposomen und aus Geweben der männlichen Wistar Ratte [Whitley et al, 2002] und werden hinsichtlich ihrer zellulären Lokalisation untersucht. *In vitro* durchgeführte Liganden-Bindungs-Assays verwiesen auf zwei Argininreste, die experimentell deutliche Unterschiede in ihrem Bindungsverhalten sowohl gegenüber  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_2$  und  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ , als auch gegenüber  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  aufwiesen.

Bei den für diese Studien ausgewählten Zelllinien handelte es sich um die schon erfolgreich bezüglich der Verteilung des Centaurin  $\alpha 2$  – Wildtyps hin untersuchte Tumorzelllinie PC12 [Illies, 2002] und die NRK – Zellen, welche ebenfalls aus der Ratte stammen, die jedoch eine nicht transformierte Zelllinie darstellen.

Die mit den Fusionsproteinen transfizierten Zellen und das folglich intrazellulär auftretende Protein-Expressionsmuster wird mit Hilfe der Fluoreszenz – Mikroskopie quantitativ und mit der konfokalen Mikroskopie qualitativ und im subzellulären Detail analysiert.

Der rein qualitativen Auszählung der quasikonfokalen Zellbilder bezüglich Plasmamembranbindung oder ausschließlich cytosolischer Verteilung des Proteins, schließt sich eine quantitative, computergestützte Berechnung der Fluoreszenzintensität über eine kleinere ausgewählte Stichprobe von Zellen an.

Die mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie erzeugten Zell – Schnittbilder dienen der qualitativen Untersuchung des zellulären Cytoskeletts, für die, durch Ergebnisse vorausgegangener Transfektionen, eine Assoziation mit Centaurin  $\alpha 2$  vermutet wurde [Illies, 2002].

Ziel dieser Arbeit ist es nun, anhand des entwickelten putativen 3D-Strukturmodells von Centaurin  $\alpha 2$  [Max, 2000] die für die Interaktion mit Phosphatidylinositolphosphaten und Inositolphosphaten vorgeschlagenen Aminosäurereste in den zwei PH-Domänen zu mutieren und den Effekt dieser

Mutation auf das funktionsabhängige subzelluläre Lokalisationsmuster und die zellulären Phänotypveränderungen der Mutante im Vergleich zum Centaurin  $\alpha 2$  – Wildtyp hin zu untersuchen.

Ebenso ist es Ziel dieser Arbeit, die Rolle von Centaurin  $\alpha 2$  bei Membranzytoskelettveränderungen und damit die zelluläre Ausrichtung im Raum durch Volumen – Rekonstruktionen aus konfokalen Schnittserien, sowie die Ausprägung und Assoziation mit Membranstrukturen (Filopodien, Lamellipodien, Focal Adhesions) genauer zu untersuchen. Hierbei sollte es möglich sein durch die EGF-Stimulation der Zellen auch jeweils die Bedeutung von  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  bei diesen Phänomenen zu erkennen.

## 2 Materialien und Methoden

Im Folgenden sind die verwendeten Materialien und die angewandten Methoden in gesonderten Abschnitten aufgeführt.

### 2.1 Materialien

In diesem Abschnitt wird das Arbeitsmaterial in Bezug auf die jeweilige Verwendungsweise vorgestellt.

#### 2.1.1 Expressionsvektoren pEYFP – C1 und pEGFP – N1

Zur intrazellulären Detektion des mittels transienter Transfektion überexprimierten Centaurin  $\alpha 2$  diente die gelb – grüne Variante des grün fluoreszierenden Proteins aus *Aequorea victoria* (EYFP: enhanced yellow fluorescent protein) mit einem Excitationsmaximum bei 513nm und einem Maximum im Emissionsspektrum bei 527nm. Das in einen eukaryotischen Expressionsvektor integrierte Protein (Clontech, Heidelberg) mit einer C-terminal gelegenen multiple cloning site (MCS), diente als Leervektor zur Herstellung des EYFP-Centaurin alpha2-Fusionsproteins [Illies, 2002], dessen Expression sich unter der Kontrolle eines CMV immediate early Promotors befindet.

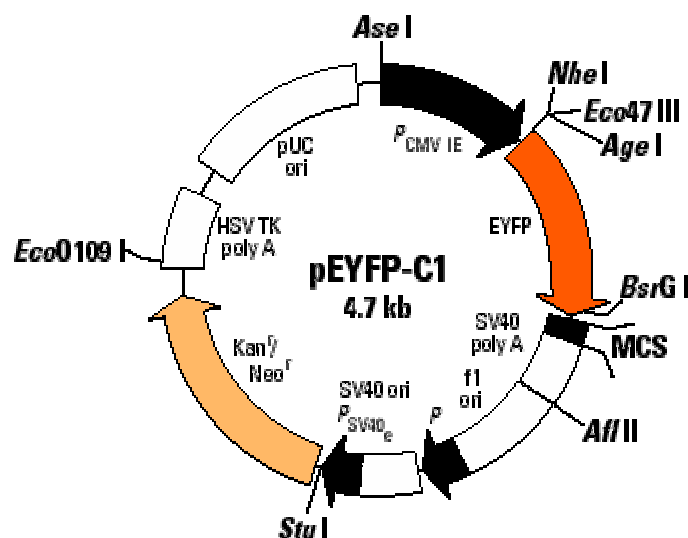


Abbildung 6: Vektorkarte (Quelle: Clontech) und mutiple cloning site des Plasmids pEYFP – C1

Der ebenfalls von Clontech bezogene Vektor pEGFP-N1 enthält eine intensiver grün fluoreszierende Variante (GFP) aus o.g. Cnidaria Spezies mit einem Excitations – bzw. Emissionsmaximum bei 488nm bzw. 507nm. Die MCS befindet sich in diesem Vektor zwischen dem CMV immediate early promotor und der codierenden Sequenz des Fluoreszenzproteins.

pEGFP-N1 als Leervektor wurde in den Transfektionsexperimenten als Kontrolle eingesetzt.

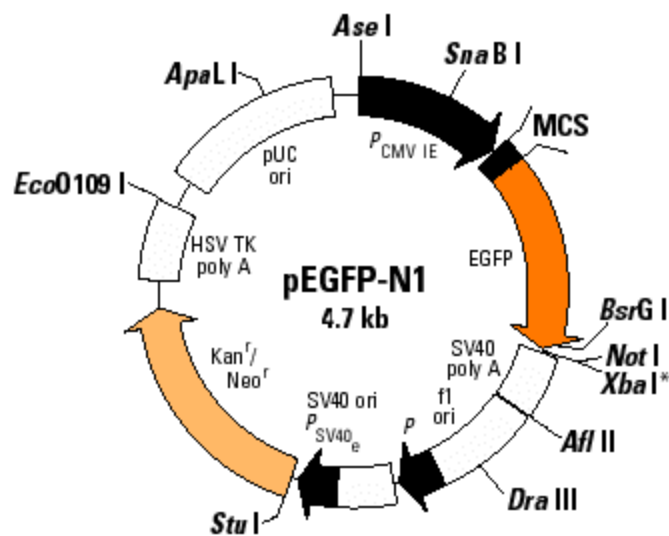


Abbildung 7: Vektorkarte (Quelle: Clontech) und multiple cloning site des Plasmids pEGFP-N1

### 2.1.2 Herstellung eines Centaurin $\alpha 2$ – Wildtyp – EYFP – Fusionsgens

Der bereits durch Ch. Illies (Dissertation am Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Abt. Signaltransduktion, 2002) per Ligation zwischen den Restriktionsenzymchnittstellen *Sma I* und *Xho I* im Plasmid pEGFP-C1 klonierte Vektor, diente als Transfektionselement für die Erhebung der Centaurin  $\alpha 2$  – Wildtypdaten.

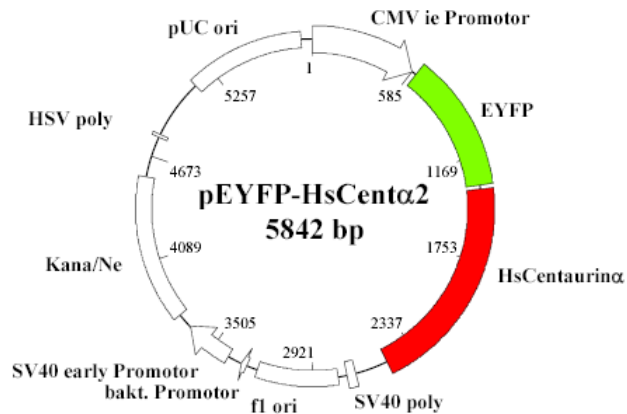


Abbildung 8: (Quelle: Dissertation von Ch.Illies, 2002, Seite 80) Übergang zwischen pEYFP-C1 und Centaurin  $\alpha 2$ .



Abbildung 9: Die Bezifferung der pEYFP-C1/Centaurin  $\alpha 2$ -Vektor – Nukleotide (willkürlich gewählt). Die numerische Bezeichnung der Aminosäuren bezieht sich indes auf das Startcodon des Fusionsproteins und zeigt zudem die für die Klonierung relevanten Restriktionsenzymststellen.

### 2.1.3 Verwendete Primer zur Erzeugung der Centaurin $\alpha 2$ – Punktmutanten mittels QuikChange – Mutagenese

Die Primer wurden online bei MWG Biotech, Ebersberg bestellt.

#### K141Q:

5` GGA TTC CTG TGG CAG CGA GGA AGG GAC 3`  
 5` GTC CCT TCC TCG CTG CCA CAG GAA TCC 3`

#### R152Q:

5` C TCA CAG TTT CTG AGA CAG AAA TTT GTA CTT CTG GC 3`  
 5` GC CAG AAG TAC AAA TTT CTG TCT CAG AAA CTG TGA G 3`

neue Apo I site

## 2 Materialien und Methoden

---

### R152C:

5` AAC TCA CAG TTT CTG AGA TGT AAG TTT GTA CTT CTG GCA 3`

5` TGC CAG AAG TAC AAA CTT ACA TCT CAG AAA CTG TGA GTT 3`

### K153Q:

5` C TCA CAG TTT CTT CGA AGG CAG TTT GTA CTT CTG 3`

5` CAG AAG TAC AAA CTG CCT TCG AAG AAA CTG TGA G 3`

neue *Nsp V* site

### Y165Q:

5` GAA GGC CTC CTT AAG CAG TTC ACA AAG GAA CAG GG 3`

5` CC CTG TTC CTT TGT GAA CTG CTT AAG GAG GCC TTC 3`

neue *Afl II* site

### K264Q:

5` GGC TTC ATG GAA CAG ACC GGT CCA AAG CAG AAA G 3`

5` C TTT CTG CTT TGG ACC GGT CTG TTC CAT GAA GCC 3`

neue *Pin A I* site

### K268Q:

5` GAA AAG ACT GGG CCC CAG CAG AAA GAA CCT TTC 3`

5` GAA AGG TTC TTT CTG CTG GGG CCC AGT CTT TTC 3`

neue *Apa I* site

### K274Q:

5` GAA CCT TTC CAG AAA AGG TGG TTC GCC 3`

5` GGC GAA CCA CCT TTT CTG GAA AGG TTC 3`

### R276C:

5` AAA GAA CCT TTC AAG AAA TGT TGG TTC GCC CTG GAT TGC 3`

5` GCA ATC CAG GGC GAA CCA ACA TTT CTT GAA AGG TTC TTT 3`

### Y289Q:

5` CGG AGG CTG CTG CAG TAC AAG AAC CCA CTG 3`

5` CAG TGG GTT CTT GTA CTG CAG CAG CCT CCG 3`

neue *Pst* I site

**Tabelle 3: Das Glutamin (CAG) bzw. Cystein (TGT) – Triplet als Ziel der Mutagenese ist fettgedruckt wiedergegeben. Die farbig hervorgehobenen Bereiche innerhalb der Primersequenzen stellen selektive Restriktionsenzymchnittstellen dar. Unterstriche kennzeichnen die über QCM eingefügten Punktmutationen.**

### 2.1.4 Enzyme

Verwendet wurden folgende Enzyme der genannten Hersteller:

Pfu – Turbo<sup>®</sup> Polymerase (2,5U/μl)

Statagene, #600252-52

Trypsin

Roche Molecular Biochemicals, #109819

Restriktionsendonukleasen:

<i>Afl</i> II	5` ...C`TTAGG... 3`	NEB, Frankfurt a.M., D
<i>Age</i> I	5` ...A`CCGGT... 3`	MBI, St. Leon-Rot, D
<i>Apa</i> I	5` ...GGGCC`C... 3`	NEB, Frankfurt a.M., D
<i>Apo</i> I	5` ...A/TAATTC/G...3`	MBI, St. Leon-Rot, D
<i>Bst</i> B I	5` ...TT`CGAA...3`	MBI, St. Leon-Rot, D
<i>Dpn</i> I	5` ...GA <sup>m</sup> `TC... 3`	NEB, Frankfurt a.M., D
<i>Nsp</i> V	5` ...TT`CGAA...3`	MBI, St. Leon-Rot, D
<i>Pin</i> A I	5` ...A`CCGGT...3`	MBI, St. Leon-Rot, D
<i>Pst</i> I	5` ...CTGCA`G... 3`	MBI, St. Leon-Rot, D
<i>Sma</i> I	5` ...CCC`GGG... 3`	MBI, St. Leon-Rot, D
<i>Xho</i> I	5` ...C`TCGAG... 3`	MBI, St. Leon-Rot, D

### 2.1.5 Eingesetzte Kits und Fertiglösungen

#### Molekularbiologie:

Quickchange Site – Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Silica Spin Kit for Plaid DNA Minipreparation	Biometra
Plasmid Midiprep Kit	Quiagen
Big Dye Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems

#### Transfektion:

LipofectAMINE Plus™ System	Gibco BRL Life Technologies GmbH, #10964013
Metafectene	Biontex

### 2.1.6 Größenstandards für doppelsträngige DNA

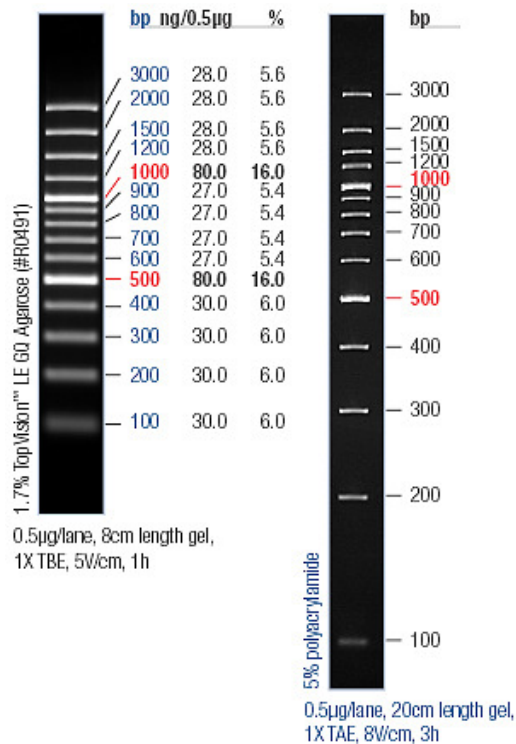


Abbildung 10: 100 bp Ladder Plus GeneRuler™, MBI, St. Leon-Rot, D



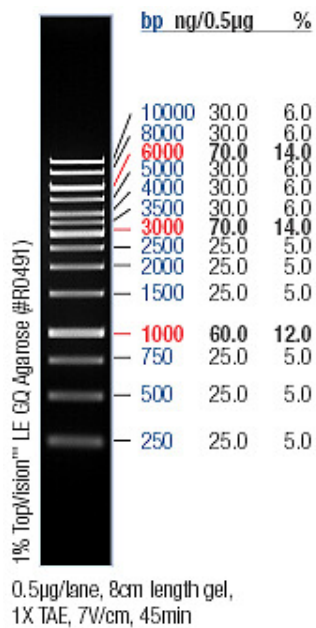


Abbildung 11: 1kb Ladder GeneRuler™, MBI, St. Leon-Rot, D

### 2.1.7 Lösungen

<b>RPMI 1640 – Medium</b>	Suspension 500ml mit Glutamax - I mit 25mM Hepes, pH 7,4	Invitrogen
<b>Dulbecco`s Mem</b>	Suspension 500ml mit Glutamax - I mit 4500 mg/l Glukose mit Pyridoxin ohne Natrium Pyruvat	Invitrogen
<b>PBS</b>	8g NaCl 0,2g KCl 1,44g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,24g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 800ml Aqua dest. pH – Wert – Titrierung auf pH 7,4 mit HCl ad 1000ml Aqua dest. autoklavieren	

<b>Optimem 1</b>	Suspension 500 ml mit Glutamax – I mit 1,2 g Natriumbikarbonat mit Hepes	Invitrogen
<b>200nM EGF</b>	2% 10µM EGF 98% PBS	
<b>Paraformaldehyd 3%-ig</b>	3% Paraformaldehyd 97% Aqua dest.	
<b>6x Loading Puffer</b>	10mM EDTA 15% Ficoll 400 (w/v) ~ 0,03% Bromphenolblau ~ 0,03% Xylencyanol	
<b>1x TAE – Puffer</b>	Ansatz aus 50x TAE – Puffer entspricht: 40mM Tris Acetat 1mM EDTA, pH 8,3	
<b>50x TAE – Puffer</b>	242,00g Tris(hydroxymethyl)aminoethan 57,10g Eisessig 100,00ml 0,5M EDTA, pH 8,0 mit NaOH ad 1l Aqua dest.	
<b>LB – Medium</b>	10g Bacto – Trypton 5g Hefeextrakt 10g NaCl ad 1l Aqua dest. autoklavieren	
<b>Agarplatten (10 Stck)</b>	2g Bacto - Trypton 1g Hefeextrakt 3g Bacto – Agar	

ad 200ml Aqua dest.  
0,5ml 4M NaCl  
autoklavieren  
abkühlen unter Rühren auf 50 °C  
200µl Kanamycin (50µg/ml)

### **2.1.8 Zelllinien**

Die Zellstämme der in dieser Arbeit PC12 – und NRK – Zelllinien wurden ursprünglich vom Cell Line Service (CLS), Heidelberg geordert.

#### **2.1.8.1 PC12 – Zellen**

Diese Zelllinie (CLS Order Number: 0311 RA; ATCC Number: CRL – 1721) stammt aus dem Phäochromocytom einer männlichen Ratte (*Rattus norvegicus*). Die Zellen wachsen in Kultur nur leicht adhären in kleinen Clustern und weisen eine polygonale Morphologie auf. PC12 - Zellen synthetisieren Katecholamine, Dopamin und Norepinephrin, nicht jedoch Epinephrin, und sie sind in ihrer Ausdifferenzierung zum neuronalen Phänotyp durch Nerve Growth Factor (NGF) induzierbar [Biocca S et al., 1983].

#### **2.1.8.2 Normal – Rat – Kidney (NRK) – Zellen**

NRK – Zellen (CLS Order Number: 0427 RA; ATCC Number: CRL – 1570) haben anders als die sehr homogen geformten PC12 – Zellen eine sehr variierend ausgeprägte Morphologie und weisen hinsichtlich ihrer Form Homologien zum Phänotyp von Fibroblasten auf. Diese Zelllinie wächst als Monolayer ebenfalls adhären und exprimiert an der extrazellulären Seite ihrer Plasmamembran Rezeptoren für Epidermal Growth Factor (EGF) und Multiplication Stimulating Activity (MSA) [de Larco JE und Todaro GJ, 1978].

### **2.2 Methoden**

In diesem Abschnitt werden die in dieser Arbeit verwendeten Methoden vorgestellt.

#### **2.2.1 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden**

Die verwendeten Methoden werden entsprechend ihrer grundlegenden Strukturierung in molekular- und mikrobiologische Arbeitsweisen unterteilt.

##### **2.2.1.1 Primerdesign**

Bei der Konstruktion der Primer, die für die Herstellung der Punktmutationen in der Centaurin  $\alpha 2$  – Wildtypsequenz mittels QuikChange – Mutagenese benötigt werden, wurde unmittelbar im Bereich der Mutation durch Veränderung der Basensequenz der einzelnen Triplets (Codons), soweit möglich, jeweils eine selektive, palindromische Restriktionsenzymstichstelle eingebracht. Da die letzte Base eines Codons meist keinen Einfluss auf die Codierung und Ausprägung einer Aminosäure hat (degenerierter genetischer Code) [Streyer, 1990, S. 109], wurde der Basenaustausch meist an dieser Stelle vorgenommen und somit das Aminosäure – Leseraster phänotypisch nicht verändert. Die Einbringung dieser selektiven Schnittstellen ermöglichte unmittelbar nach der Quickchange - Mutagenese durch einen Verdau mit dem jeweiligen Enzym und einer anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung der so erzeugten charakteristischen Fragmente eine erste Voranalyse des QCM – Produktes. Weiterhin musste bei dem Design der Primer darauf Rücksicht genommen werden, die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) weder zu unter-, noch zu überschreiten. Berechnet wurde die  $T_m$  gemäß der Formel aus dem QuikChange Manual.

Im Folgenden sind der Centaurin  $\alpha 2$  – Wildtyp und die einzelnen Centaurin  $\alpha 2$  – Mutanten in ihrer Vektorstruktur mit den jeweiligen selektiven Restriktionsenzymstichstellen dargestellt:

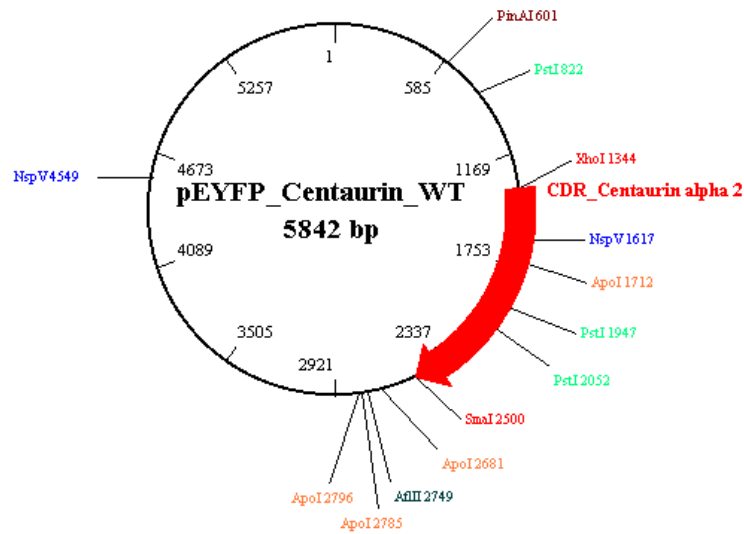


Abbildung 12: Centaurin  $\alpha$ 2-Fusionsvektor mit Kennzeichnung der Restriktionsenzym-Schnittstellen-Lokalisation

Die über die Mutation eingeführte Schnittstelle ist in der Grafik farbig markiert.

Enzym	Fragmentlänge
Afl II	5842 bp
Apo I	11 bp
	104 bp
	969 bp
	4758 bp
Nsp V	2910 bp
	2932 bp
Pin A I	5842 bp
Pst I	105 bp
	1125 bp
	4612 bp

Tabelle 4: Centaurin  $\alpha$ 2 – Wildtyp – EYFP – Fusionsgen nach Verdau

Enzym	Fragmentlänge
Apo I	11 bp
	96 bp
	104 bp
	837 bp
	4758 bp

**Tabelle 5: Mutante R152Q**

Enzym	Fragmentlänge
<i>Nsp V</i>	184 bp
	2748 bp
	2910 bp

**Tabelle 6: Mutante K153Q**

Enzym	Fragmentlänge
<i>Afl II</i>	911 bp
	4931 bp

**Tabelle 7: Mutante Y165Q**

Enzym	Fragmentlänge
<i>Pin A I</i>	1543 bp
	4299 bp

**Tabelle 8: Mutante K264Q**

Enzym	Fragmentlänge
Pst I	105 bp
	165 bp
	1125 bp
	4447 bp

**Tabelle 9: Mutante Y289Q**

### **2.2.1.2 QuikChange Site – Directed Mutagenese und Modifizierte QuikChange – Mutagenese**

#### **QuikChange Site – Directed Mutagenese:**

Verwendet wurde das QuikChange<sup>®</sup> Site – Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA), dessen Effizienz für die Einfügung von Punktmutationen, den Austausch, der Deletion oder der Insertion von Aminosäuren mit ca. 80% relativ hoch ist.

Das Prinzip dieser Methode ist dreistufig aufgebaut:

Sie beginnt mit einem Polymerase – Kettenreaktions – Schritt (PCR) zur Einfügung der Mutation über die spezifischen Primer in das pEYFP – Centaurin  $\alpha 2$  – Wildtyp - Fusionsgen und zur anschließenden Amplifikation unter Einsatz der *Pfu Turbo* DNA Polymerase.

Die als Template dienende Vektor-DNA, die über Plasmidpräparation ursprünglich aus Bakterienzellen gewonnen worden ist und daher Methylierungen aufweist, wird nachfolgend mit der spezifischen Endonuklease für methylierte und hemimethylierte DNA *Dpn I* verdaut und führt somit zur Selektion des mutierten Plasmids.

Die anschließende Transformation im kompetenten E.Coli – Stamm XL 1 – blue dient der Reparatur der schon mutierten aber noch unverknüpften Einzelstränge, der Ausbildung von doppelsträngigen circulären Plasmiden und deren Amplifikation.

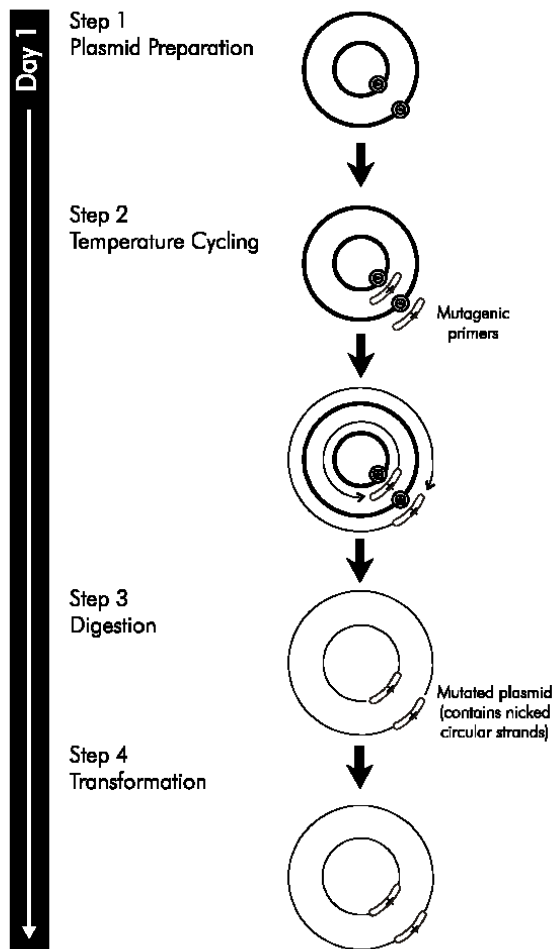


Abbildung 13. Prinzip der QuikChange™ Site – Directed Mutagenesis Methode (Quelle Stratagene)

Reagenz	Menge
10x PCR Puffer	5µl
Plasmid Template	10 ng
10mM dNTP Lösung	1,25µl
10µM Sinnstrangprimer	2µl
10µM Gegenstrangprimer	2µl
Pfu Turbo DNA Polymerase 2,5U/l	1µl
ddH2O	ad 50µl

Tabelle 10: PCR – Ansatz



Schritt	Temperatur	Zeit	Prozess
1	95°C	30 sec	
2	95°C	30 sec	Denaturierung der Template - dsDNA
3	55°C	1 min	Annealing der spez. Primer
4	68°C	14 min	Synthetisierung des Gegenstrangs durch <i>Pfu</i> - Polymerase

**Tabelle 11: PCR – Programm für den Eppendorf Mastercycler Gradient:**

Der Zyklus 2 – 4 wurde 15 Mal wiederholt.

10µl des QCM – Produktes wurde als Kontrolle für die spätere Elektrophorese separiert und die verbleibenden 40µl mit 10U *Dpn* 1 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

### **Modifizierte QuikChange Mutagenese [Wang et al., 1999]:**

Diese QCM – Methode wurde entwickelt, um die Effizienz bei komplexen Basensequenzveränderungen, wie z.B. Deletionen, Insertionen, Substitutionen, multiplen Mutationen oder bei der Mutagenese problembehafteter Templates zu steigern.

In dieser Arbeit wurde die Methode zur Generierung der Doppelmutante R152C/R276C verwendet und weist als Unterschied zur QuikChange Site – Directed Mutagenese zwei unabhängige PCR – Schritte in Folge auf.

Folgendes Protokoll diene als Vorlage:

1) Prä – PCR Schritt: Zwei Ansätze mit je nur einem Primer

Reagenz	Menge
10x <i>Pfu</i> - Polymerase – Puffer	5µl
10mM dNTPs	1,25µl
10µM 5'Primer ODER 3'Primer	2µl
DNA – Template	50ng
<i>Pfu</i> - Turbo Polymerase (2,5U)	1µl
dH <sub>2</sub> O	ad 50µl

Schritte 2 – 4 werden 9x wiederholt:

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95 °C	30 sec
2	95 °C	30 sec
3	55 °C	1 min
4	68 °C	6 min (1min/kb)

2) QCM: Beide Ansätze werden vereinigt

Reagenz	Menge
Ansatz 3´Primer	25µl
Ansatz 5´Primer	25µl
Pfu - Turbo - Polymerase (2,5U)	1µl

Schritte 2 – 4 werden 17x wiederholt:

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95 °C	30 sec
2	95 °C	30 sec
3	55 °C	1 min
4	68 °C	6 min (1min/kb)

Nach Abschluss dieser PCR wurden 40µl des QCM – Produktes  $\geq$  1 Stunde mit 0,5µl *Dpn I* (10 U) bei 37 °C verdaut. Die übrigen 11µl des unverdauten Ansatzes wurden zusammen mit 10µl der verdauten Probe in einem Agarosegel aufgetragen und dienen zu einer ersten Voranalyse der QCM.

### 2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese stellt eine einfache und schnelle Methode zur Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA – Fragmenten dar. Abhängig von dem zugegebenen Anteil an Agarose ist mit simultan aufgetragenen Standardmarkern somit eine Analyse von 0,5 – 25kb DNA – Fragmenten möglich. Durch Zugabe von Ethidiumbromid gelingt eine Visualisierung der Proben im Gel unter UV – Licht (UV – Strahler). Dieser Arbeitsschritt erfolgte unter entsprechenden Sicherheitskautele, da es sich bei Ethidiumbromid um eine kanzerogene Substanz handelt.

In dieser Arbeit wurden Gele mit einem Volumen von 50ml und variierenden Gelstärken zwischen 0,8% - 4% verwendet. Zur Herstellung wurde die Agarose (SeaKem LEagarose BMA, USA) mit 1x TAE – Puffer versetzt und in der Mikrowelle sukzessive erhitzt, bis zum Erhalt einer vollkommen klaren Lösung. Nach einer Abkühlung von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden 5µl der 0,2%igen Ethidiumbromidlösung hinzupipetiert, das noch flüssige Gel zum Aushärten ( ca. 30 Min.) in einen Gelschlitten gegossen und mit einem 10er – Gelkamm versehen.

### **Beschickung der Kammern:**

Der Gelschlitten wurde in eine mit 1x TAE – Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer platziert, die Gelkammern entsprechend der unten aufgeführten Tabellen bestückt und die Proben bei einer konstanten Spannung von 80 Volt 30 – 60 Min. aufgetrennt.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
DNA – Probe	x µl
6x Loading Puffer	4µl
dH2O	ad 24µl

<i>Marker</i>	<i>Menge</i>
1kb Ladder	1µl
6x Loading Puffer	4µl
dH2O	ad 24µl
pBR322Hae3	3µl
6x Loading Puffer	4µl
dH2O	ad 24µl

### **2.2.1.4 Herstellung von Medium und Agarplatten für die Bakterienkultur**

Das für die Transformation von E.coli – Zellen benötigte LB – Medium wurde laut Rezept unter 2.1.5 hergestellt, in 3ml – Fraktionen in Reagenzröhrchen überführt, autoklaviert und steril verschlossen.

Mit der Herstellung des Agars wurde ebenfalls gemäß oben stehender Anleitung verfahren. Nach Zugabe des spezifischen Antibiotikums wurde der noch flüssige Agar auf Petrischalen gegossen und erhärtete unter der Hood. Gegen Kontamination

und Austrocknung geschützt, konnten die Platten gut verschlossen mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

### **2.2.1.5 Transformation von E. coli Zellen**

Bei dem zur Transformation der einzelsträngigen QuikChange – Mutagenese – Produkte, als auch für Re – Transformationen von bereits mutierten und doppelsträngig vorliegenden Plasmiden verwendete E.coli – Stamm handelte es sich um XL 1 – blue kompetente Bakterienzellen (Stratagene, #200249) [Bullock et al, 1987].

Die bei – 80°C gelagerten Aliquots à 100µl Bakteriensuspension wurden 10 Minuten auf Eis aufgetaut. Die Membran der mit Rubidiumchlorid vorbehandelten Zellen wird hierbei aufgelockert, sodaß eine Anlagerung der kationischen Rubidiumchlorid – Partikel an die extrazelluläre Seite der bakteriellen Zellwand erfolgen kann, die als eine Art Docking – Moleküle die Bindung der anionischen DNA vermitteln. Es wurden ~ 10ng DNA in die Bakterien hineinpipettiert und durch vorsichtiges Rühren mit der Pipettenspitze verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten im Eisbad folgte ein Hitzeschock der Bakterien bei 42°C im Thermoblock über 60 Sekunden. Die Membranauflockerung wird auf diese Weise maximal gesteigert und stellt eine wesentliche Voraussetzung für die Aufnahme des Plasmids durch die Bakterienzelle dar, die nach Zugabe von 1ml raumtemperierten LB – Mediums bei 37°C im Schüttelinkubator (600 rpm) erfolgt. Bei Transformationen nach QCM wurde die gesamte Bakteriensuspension auf einer Agarplatte ausgestrichen, da erfahrungsgemäß die Transformationsrate eher gering ausfällt. Bei Re – Transformationen wurden nur ca. 100µl unter der Hood auf den Agar überimpft. Durch wiederholtes Schwenken der antibiotikahaltigen Platten (in diesem Fall Kanamycin, da in den Vektor ein Kanamycin – Resistenz – Gen integriert ist) wurde eine gleichmäßige Verteilung der Zellsuspension angestrebt, die nach ca. 30 Minuten getrocknet war. Die Platten konnten dann in den Brutschrank verbracht und über Nacht bei 37°C bebrütet werden.

### **2.2.1.6 Picken von Bakterienkolonien**

In 3ml LB – Röhren wurden unter der Bakterienhood 3µl Kanamycin (50mg/ml) pipettiert. Unter Verwendung einer 10µl – Pipetten – Spitze wurde eine einzelne, gut abgrenzbare Kolonie gepickt und durch Abwurf der Spitze in die Reagenzgläser verbracht. Die mit einem Metallhütchen verschlossenen Röhren wiederum über Nacht im Inkubator Shaker (Edison, New Jersey USA) bei 37°C und 250 rpm inkubiert.

Die Agarplatte konnte nach Verschluss mit Parafilm bis zu vier Wochen bei 4°C gelagert werden.

### **2.2.1.7 Mini – und Midipräparation von rekombinanter Plasmid – DNA**

#### **Plasmid – Minipräparation:**

Die Gewinnung der Plasmid – DNA aus den bakteriellen Vorkulturen mit einem Volumen von 3ml, erfolgte mit dem Silca Spin Kit for Plasmid DNA Minipreparation der Firma Biometra entsprechend des im Handbuch aufgeführten Protokolls. Die Menge der so erhaltenen Plasmid – DNA, die mit 100µl ddH<sub>2</sub>O von der Silica – Matrix eluiert wurde, lag zwischen 12 – 35µg je Klon.

#### **Plasmid – Midipräparation:**

Aus Vorkulturen mit Volumina von 100ml konnten mittels des Nucleobond AX100 Kits der Firma Macherey und Nagel Plasmidmengen bis zu 100µg gewonnen werden. Die Vorgehensweise richtete sich hier ebenfalls nach den Herstellerangaben.

### **2.2.1.8 Photometrische Konzentrations – und Reinheitsbestimmung von Plasmid – DNA**

Zur Bestimmung des Anteils an Plasmid – DNA in dem bei der Präparation erhaltenen Eluat wurde eine photometrische Messung der Absorption bei 260nm in einem Eppendorf BioPhotometer vorgenommen. Als Küvetten wurden Eppendorf

UVetten (RNase, Protein und DNA frei) verwendet und mit einem Volumen von 60µl beschickt.

Bei einer Verdünnung von 1:12 galten neben der angegebenen Konzentration weitere Parameter als relevant, um eine Aussage über die Qualität der untersuchten Probe hinsichtlich ihrer Reinheit machen zu können:  $OD_{260}/OD_{280} < 1,6$  = Proteinverunreinigung,  $> 2,0$  = RNA - Verunreinigung;  $OD_{260}/OD_{230} < 0,5$  bzw.  $> 2,0$  = Salzverunreinigung;  $OD_{320} > 0,01$  = Ethanolverunreinigung.

Die zu Transfektionsversuchen eingesetzten Plasmide lagen bei dieser Messung alle im Normbereich.

### 2.2.1.9 DNA – Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid – DNA erfolgte im Thermocycler Gradient der Firma Eppendorf, die Auftrennung im Gel wurde nach Aufarbeitung der Cycle – Sequencing – Reaktion im Institut für Zellbiochemie und klinische Neuobiologie am UKE in Auftrag gegeben.

Dem Verfahren liegt die Didesoxy – Methode [Sanger et al., 1977] zugrunde. Verwendet wurde das Big Dye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems) und der Taq Polymerase Puffer Half Term (GENPAK). Als Sequenzierprimer wurde das zum C – Terminus des EYFP komplementäre Oligonukleotid Jarp1 und das zum SV40 polyA rev am N – terminalen Ende des Centaurin  $\alpha 2$  – Gens komplementäre Jarp2 eingesetzt.

Sequenzierprimer	Primersequenz
Jarp 1	5´ - CCTGAGCAAAGACCCCAACG - 3´
Jarp 2	5´ - TTCAGGGGGAGGTGTGGAGG - 3´

**Sequenzieransatz:** Unter Verwendung von 200µl – Eppendorftubes

Reagenz	Menge
Plasmid – DANN	500ng
Primer	15pmol
Half Term	5µl
Big Dye	3µl
dH <sub>2</sub> O	ad 20µl

**Thermocycler – Programm:**

Schritt	Temperatur	Zeit	Prozess
1	96°C	10 sec	Denaturierung
2	50°C	5 sec	Annealing
3	60°C	4 min	Elongation

Der Zyklus 1 – 3 wurde 24 Mal wiederholt.

Nach Abschluss der Sequenzierreaktion erfolgte eine Aufreinigung des DNA - Ansatztes in 1,5ml Eppendorftubes, die mit 40µl 100%igem Ethanol versetzt waren. Die DNA wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gefällt und anschließend 30 Minuten bei 13.000rpm zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abpipettieren des Überstandes erfolgte eine erneute Fällung mit 80µl 70%igem Ethanol. Um das Pellet durch mögliches Aufschwimmen während dieses Vorganges nicht zu verlieren, wurde im Anschluß nochmals für 10 Minuten bei 13.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wie oben beschrieben abgenommen und die Probe bei geöffnetem Tube und Raumtemperatur getrocknet.

In dieser Form wurde das Sevice – Labor des o.g. Instituts damit beauftragt eine Polyacrylamid – Gelelektrophorese mit Detektion der unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Terminatoren unter Verwendung des Applied Biosystems 377A Sequencer durchzuführen.

Die Ergebnisse dieser Methode wurden als Druckversion und elektronisch gespeichert als sog. ABI – Files vom Analytiklabor zur weiteren persönlichen Analyse der DNA – Probe wieder zur Verfügung gestellt.

### **2.2.1.10 Computerbasierte Methoden**

Nach Abschluss der Sequenzierung sollte nun geprüft werden, ob die Einbringung der Punktmutationen entsprechend der Lokalisation und des Aminosäure-Austausches erfolgreich war.

Während die vom Service – Labor erhaltene Text – Datei, die die Sequenz lediglich als Text - File enthielt und mit den gebräuchlichen Textverarbeitungsprogrammen geöffnet werden konnte, bedurfte es zum Öffnen der als ABI – Files bezeichneten Gesamt – Datei eines Spezialprogramms, das unendgeldlich von der Homepage der North Carolina State University zu beziehen und auf dem PC zu installieren ist. Mit Hilfe dieses BIOEDIT – Programms [Hall, 1999] war es unter geringem Aufwand möglich die Sequenz zunächst auf das Vorliegen eines bestimmten Abschnittes z.B. einer Mutation hin zu screenen. Diese Auswertungen wurden durch die, begleitend zur lithografischen Darstellung auch grafisch in Form von aufeinanderfolgenden, Aminosäure-spezifisch farblich gekennzeichneten Peaks ermöglicht. Der gesamte Sequenzabschnitt wurde daraufhin in das BLAST – Programm (Basic Local Alignment Search Tool) [Altschul et al., 1990] transferiert, welches über die Homepage vom National Center for Biological Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) genutzt werden konnte. Dort ist es möglich über die Funktion ‘Blast – 2 – Sequences’ die zu verifizierende Sequenz mit einer anderen Sequenz, z.B. der Centaurin  $\alpha 2$  - Wildtypsequenz zu alignen, Mutationen im direkten Vergleich mit der Ausgangssequenz zu analysieren, als auch unerwünschte Veränderungen in der Basensequenz auszuschließen.



### 2.2.2 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.2.1 Medienherstellung für die Kultur der Zelllinien PC12 und NRK

Zu den 500ml der von Invitrogen bezogenen serumfreien Medien RPMI – Medium with Glutamax (PC12) und Dulbecco´s Medium with Glutamax (NRK) wurden unter sterilen Bedingungen folgende Reagenzien zugegeben:

RPMI – Medium:

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
10 % Pferdeserum	50ml
5% Fetales Kälberserum	25ml
1% Penicillin - Streptomycin	5ml

Dulbecco´s – Medium:

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
10% Fetales Kälberserum	50ml
1% Penicillin - Streptomycin	5ml

Zum Ausschluss einer durch die Pipettierschritte möglicherweise verursachten Kontamination mit Pilzen oder Penicillin als auch Streptomycin resistenten Bakterienstämmen wurden ca. 20ml des angesetzten Mediums vor Verwendung in der Zellkultur 2 – 3 – Tage bei 37°C in einer Petrischale inkubiert und daraufhin mikroskopisch untersucht.

#### 2.2.2.2 Kultur der Zelllinien PC12 und NRK

Die adhärent wachsenden Zellen wurden in Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75cm<sup>2</sup> im Inkubator bei 37°C, 100%iger Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Um ein den Stoffwechsel der Zellen möglicherweise beeinträchtigendes Überwachsen zu vermeiden, wurde alle 2 – 3 Tage eine Passage und Ausdünnung der Zellen durchgeführt.

Gearbeitet wurde unter sterilen Bedingungen in einer Werkbank mit laminarem Luftstrom. Alle hierbei verwendeten Medien waren zuvor im Wasserbad auf 37°C erwärmt worden, um die Belastung der Zellen möglichst gering zu halten.

Zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden wurden das Medium abgesaugt und die noch adhären Zellen einmal mit 10ml PBS gewaschen. Nach Entfernung desselben schloss sich eine 2 – 5 minütige Inkubation mit 1ml Trypsin/EDTA – Lösung (GIBCO) an, während derer ein Lösen der Zellen durch Beklopfen der Flaschenaußenwände unterstützt wurde. Die Zugabe von 9ml des jeweiligen Mediums (RPMI – Medium für PC12; Dulbecco´s – Medium für NRK) beendete die Trypsinierungs – Reaktion. Je nach vorausgegangener Wachstumsdichte wurden bis zu 3ml der Zellsuspension in eine neue sterile Kulturflasche überführt und mit der 4-fachen Menge an Medium überschichtet.

### **2.2.2.3 Konservierung der Zelllinien durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff**

Um den in den Experimenten verwendeten Zellstamm zu erhalten und somit stets mit Klonen einer Kultur arbeiten zu können, wurden unter sterilen Bedingungen zeitweilig Aliquots eingefroren. Benötigt wurde eine größere Charge an Zellen ( $\sim 1 \times 10^7$  Zellen), die in  $100\text{cm}^2$  Kulturflaschen herangezüchtet (ca. 50% konfluentes Wachstum), laut oben stehendem Protokoll abtrypsiniert und in 3ml Medium aufgenommen wurden. Die 4ml Zellsuspension wurde in ein 50ml Falcon – Tube überführt und  $400\mu\text{l}$  100%iges Dimethylsulfoxid (= DMSO; Fa. MERCK) zugegeben. Durch sofortiges Schwenken des Tubes wurde das Auftreten von lokal toxischen Konzentrationen in der Suspension und somit eine Schädigung der Zellen verhindert.

Es folgte eine Inkubation auf Eis für 10 Minuten.

Je 1ml wurden mit Hilfe einer weithalsigen Pipette in sterile Kryotubes gegeben und diese  $\sim 6$  Stunden –  $20^\circ\text{C}$  eingefroren. Es folgte die zweite Stufe der Temperaturreduktion über Nacht bei  $-70^\circ\text{C}$ . Daraufhin konnten die präparierten Zell – Aliquots in flüssigen Stickstoff überführt werden und waren in diesem Zustand maximal ein Jahr lagerbar.

### **2.2.2.4 Auftauen von konservierten Zellen**

Zur Wiederaufnahme in Kultur wurden die Aliquots aus dem flüssigen Stickstoff genommen und direkt in ein auf  $37^\circ\text{C}$  temperiertes Wasserbad verbracht. In eine

Kulturflasche mit 75cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche wurden unter Keimfreiheit 20ml des ebenfalls erwärmten Zellmediums vorgelegt und die Zellen vorsichtig hinzupipettiert. Nach 24 Stunden erfolgte lediglich ein Mediumswechsel, um das DMSO aus der Kultur zu entfernen. Nach einer erneuten Wachstumsphase von 24 – 48 Stunden konnte ein erstmaliges Passagieren der Zellen und eine experimentelle Verwendung vorgenommen werden.

### **2.2.2.5 Transfektion eukaryontischer Zellen**

Die Transfektionsexperimente fanden unter sterilen Bedingungen in einer Hood mit laminarem Luftstrom statt. Transfiziert wurden die Zellen in Chamber Slides mit vier getrennten Kammern. In jeweils zwei Chambers waren am Vortag unterschiedliche Konzentrationen der Zellsuspension ausgesät worden, sodass nach 24 Stunden auf jeden Fall eine für die Transfektion geeignete Zelldichte vorlag.

#### **Transfektion von PC12 – Zellen:**

Unter Verwendung der durch PLUS Reagenz optimierten LIPOFECTAMINE™ PLUS Reagenz – Methode erfolgte eine aktive Aufnahme von Plasmiden durch die Zellen.

Die zu ca. 80% konfluenten Zellen mussten hierfür 24 Stunden zuvor aus einer T75 – Kulturflasche nach einem Waschvorgang mit 10ml PBS mit 2ml Trypsin gelöst und in 4ml RPMI 1640 – Medium mit Serum (Vollmedium) aufgenommen werden. In 15ml Blue – cap – Röhrchen (Greiner) wurden zwei Verdünnungen mit 1ml, sowie 0,5ml Zellsuspension ad 10ml Vollmedium hergestellt. 2x 1ml beider Ansätze wurden in 4er – chamber – slides ausgesät und eine erneute Adhärenz und Konfluenz von 50% - 90% der Zellen bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> bis zum Folgetag abgewartet.

Der experimentelle Ansatz der Reagenzien erfolgte in zwei Stufen (Mengenangaben für die Transfektion von Zellen eines Slides mit 4 Kammern):

Zu 100µl serumreduziertem OPTI - MEM® wurden 1µg der zu transfizierenden Plasmid – DNA gegeben, einmal kurz gevortext, da die DNA sonst präzipitiert und

bei 600rpm anzentrifugiert. Es folgte die Zugabe von 6µl PLUS Reagenz, ein erneutes Vortexen, Zentrifugieren und eine 15 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Diese diente zur Anlagerung der positiv geladenen PLUS – Moleküle an die kationische DNA.

In einem getrennt geführten Ansatz wurden 100µl OPTI - MEM<sup>®</sup> und 4µl des liposomalen LIPOFECTAMINE Reagenz gegeben und gemäß des Vorgehens beim ersten Ansatz ein Mix hergestellt. Dieser wurde schließlich in den ersten Ansatz zugegeben. Es folgte ein kurzes Vortexen und Anzentrifugieren bevor sich erneut eine Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur anschloß, in der sich, durch das PLUS Reagenz vermittelt, ein DNA - Liposomenkomplex ausbilden konnte.

Unterdessen wurden die Zellen in den 4 Kammern der Schlitten 2x mit je 1ml PBS gewaschen, mit dem Ziel das die Transfektionseffizienz negativ beeinflussende Antibiotika – haltige Vollmedium möglichst vollständig aus den Inkubationskammern zu entfernen. In die Kammern erfolgte dann die Zugabe von je 200µl OPTI - MEM<sup>®</sup>, in welches schließlich über eine Pipette tropfenweise, um die o.g. Komplexe nicht nachhaltig zu zerstören, 50µl des Transfektionsmixes verbracht wurden.

Es schloss sich nun eine Inkubationszeit über ~ 5 Stunden im Zellkultur – Brutschrank unter Standardbedingungen an, in der die liposomenvermittelte Adhärenz der DNA an die Zellmembran und die aktive Aufnahme der DNA durch die Zellen stattfindet.

Um die sehr energiereiche intrazelluläre Expression des DNA – Konstruktes zu gewährleisten, wurden nach Ablauf der DNA – Integrationsphase die Transfektionsmedien abgesaugt, die Kammern mit je 1ml Vollmedium überschichtet und die Zellen im Brutschrank über Nacht bebrütet.

### **Transfektion von NRK – Zellen:**

Transfiziert wurden die NRK – Zellen mittels der Metafectene – Methode. Auch hier war eine steriles Arbeiten obligat, um die Zellen vor einer Kontamination mit prokaryontischen (Bakterien) oder eukaryontischen (Pilze) Kulturen zu schützen.

Die Aussaat der Zellen am Vortag der Transfektion erfolgte unter gleichen Bedingungen und nach dem gleichen Protokoll, das auch bei den PC12 – Zellen zur Anwendung kam.

Für jede Versuchsreihe wurden zunächst wiederum zwei separate Ansätze pipettiert. 50µl auf 37°C erwärmtes OPTI - MEM<sup>®</sup> wurden mit 1µg Plasmid – DNA versetzt und durch mehrmaliges Auf – und Abpipettieren gemischt. In dem zweiten Ansatz wurden auf dieselbe Weise eine Suspension aus 50µl OPTI - MEM<sup>®</sup> und 6µl Metafectene hergestellt. Durch Zugabe des letzteren in den ersten Ansatz und einer guten Durchmischung mittels der Pipette wurde ein Transfektionsmix generiert, der nun bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert wurde.

Nach Ablauf der Zeit wurden je 25µl des Transfektionsmixes tropfenweise direkt auf das noch vom Aussäen die NRK – Zellen überschichtende Vollmedium gegeben und die Zellen im Wärmeschrank bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> mindestens 24 Stunden bebrütet.

### **2.2.2.6 Stimulation von transfizierten Zellen mit Epidermal Growth Factor (EGF) und Fixierung mit Paraformaldehyd**

Nach erfolgreicher Transfektion, aber noch vor der Fixierung der Zellen, wurde eine zeitlich definierte und in jedem Versuch reproduzierte Stimulation der Hälfte der Transfektanten mit EGF vorgenommen.

Die Stimulation mit EGF erfolgte unmittelbar in den Chambers – Slides unter sterilen Bedingungen. Nach einem Waschschrift mit 1ml auf 37°C temperiertem PBS pro Kammer wurden die Zellen mit ebenfalls auf 37°C erwärmtem OPTI - MEM<sup>®</sup>, welches als Hungermedium diente, überschichtet und für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach erneuter zweimaliger Waschung mit PBS wurden je 900µl PBS in die Kammern pipettiert und tropfenweise 100µl 200nM EGF zugegeben. Es schloss sich eine Inkubation über 7 Minuten und 30 Sekunden im Brutschrank an. Nach Ablauf der Stimulationsphase wurden die Kammern zweimal mit je 1ml PBS gewaschen und zur Fixation schließlich 250µl 3%iges Paraformaldehyd (37°C) zugegeben, welches für ~

10 Minuten auf den in den Brutschrank verbrachten Zellen belassen und erneut durch zwei Waschungen mit PBS wieder entfernt wurde.

Um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden, wurde jede Kammer mit 1ml PBS überschichtet und konnte in diesem Zustand bis zu 4 Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

### **2.2.2.7 Epifluoreszenzmikroskopie von PC12 – und NRK – Zellen**

Zur Erstellung der epifluoreszenzmikroskopischen Zellbilder wurde ein Leica Fluoreszenzmikroskop (Leitz) mit integrierter Kamera und ein FITC – Filter verwendet, dessen Emmisionsspektrum bei 480nm – 510nm liegt und somit als GFP – Filter diene. Die einzelnen Zellen wurden in der 100-fachen Vergrößerung mit Ölimmersion untersucht und mit einem Video-Aufnahme-Systembild dokumentiert. Die Bilder wurden mit Hilfe des elektronischen Bildverarbeitungsprogramms KAPPA\_IMAGE bearbeitet.

Für jedes unabhängige Experiment wurden  $\geq 100$  unstimulierte und  $\geq 100$  stimulierte Zellen mit der an das Mikroskop angeschlossenen Kamera bild-dokumentiert. Die fixierten Zellen wurden hierfür mit 250 $\mu$ l PBS überschichtet und in diesem Zustand unter 100-facher Vergrößerung mit Ölimmersion mikroskopiert.

Um den Fehler der möglicherweise unbewusst durch den Untersucher vollzogenen Zell-Selektion bezüglich Zellform und Rate des intrazellulär überexprimierten Proteins zu minimieren, wurde die Kammern der Slides mäanderförmig mikroskopiert. Dabei ging jede fluoreszierende Zelle, unabhängig von ihrem Erscheinungsbild, in die Datensammlung mit ein.

Dennoch wurden Ausschlusskriterien definiert, die sich auf solche Zellen bezogen, die mehrlagig wuchsen oder gerade in Teilung bzw. Apoptose waren und damit die Eindeutigkeit der Eigenfluoreszenz in Frage stellten.

Die Wahl der Zellebene und die Fluoreszenzintensität, die durch Überexpression des Centaurin  $\alpha 2$  – EYFP - Fusionsprotein in den Zellen sehr unterschiedlich ausfallen

konnte, erfolgte entsprechend der experimentellen Fragestellung (Plasmamembranbindung positiv oder negativ) für jede Zelle bzw. jedes Bild manuell. Vor jeder Erstellung eines Zellbildes wurde der Zellkörper einmal manuell durchfokussiert und im Falle einer vorhandenen Membranlokalisation die jeweilige Ebene als Zellbild archiviert.

Für den Centaurin  $\alpha 2$  – Wildtyp, den pEYFP-Leervektor und die Mutanten wurden jeweils bis zu drei unabhängige Versuche unter den oben genannten, stets gleichen Bedingungen durchgeführt.

Der Untersuchung der Fluoreszenzintensität über die Zelle, die bei Zellen ungefähr gleicher Größe und einer Stichprobenanzahl von je 12 stimulierten und 12 unstimulierten Zellen je unabhängige Messung erfolgte, ging eine quantitative Auszählung aller Zellen voraus.

Die Ergebnisse dieser quantitativen Analyse, für die als Hauptparameter eine vorhandene oder fehlende Plasmamembranbindung gewählt wurde, ist in den Tabellen in Kapitel 3.3 zusammengefasst. Zeigten sich in den Auswertedaten deutliche Abweichungen zu vorangegangenen oder nachfolgenden unabhängigen Messungen unter gleichen Bedingungen, d.h. waren diese nicht reproduzierbar, so gingen diese Datensätze nicht in die End – Auswertungen mit ein. Sie werden im Ergebnis-Teil somit auch nicht aufgeführt. Neben der Auszählung der Zellen hinsichtlich der Centaurin  $\alpha 2$ -Plasmamembranbindung wurde im selben Untersuchungsgang, wenn vorhanden, ein Kernausschluss (KA) des Centaurin  $\alpha 2$  – Fusionsproteins bei den Zellen vermerkt.

### **2.2.2.8 Quasikonfokale Mikroskopie von PC12 – und NRK – Zellen:**

Als apparative Ausstattung diente ein Leica DM IRBE<sup>®</sup> Fluoreszenzmikroskop mit Objektebenen – Steppervorrichtung und Monochromator, sowie eine Hamamatsu C4742-98 CCD Kamera. Die Bildbearbeitung und – Auswertung erfolgte mit Hilfe des Openlab 2.1.3 (Improvision) – Softwarepakets, welches im Vorwege der Messung eine Programmierung bezüglich der Fokusebene, der Kameraeinstellungen, als auch des Monochromators ermöglichte (Automator – Funktion).

Zur Erstellung der konfokalen Fluoreszenzbilder fand der schon im Mikroskop integrierte GFP – Filter Anwendung, dessen Exzitationswellenlänge auf 488nm gesetzt wurde.

### **Vermessung von PC12 – Zellen:**

Für die Mikroskopie dieser Zelllinie, die große morphologische Unterschiede zu den NRK – Zellen aufweist, wurde ein eigener Automator, d.h. eine feste Programmierung der zur Zellmessung erforderlichen und beabsichtigten Einzelschritte generiert, in dem die kompakte und voluminöse Form der PC12 – Zellen Berücksichtigung fand. Von der am Mikroskop manuell eingestellten Zellebene, die im weiteren Verlauf der Messung durch die programmierte Kamera ( d.h. den Automator) als Mittellinie gespeichert wurde, wurden 2,5µm unterhalb bis 5µm oberhalb von dieser Ebene 30 Zellschnittbilder angefertigt, die jeweils 0,25µm voneinander entfernt waren.

### **Vermessung von NRK – Zellen:**

Da diese Zelllinie eine über die Fläche sehr ausgedehnte Morphologie aufweist, aber eher ein geringes Höhenwachstum zeigt, wurde der Automator darauf programmiert 1,5µm unterhalb und 3,5µm oberhalb der manuell vorgegebenen Mittellinie, wiederum in 0,25µm Schritten 20 Schnittbilder der Zelle zu generieren.

### **Berechnung von Dekonvolutionsbildern aus konfokalen PC12 – und NRK – Bildern:**

Die quasikonfokalen Deconvolutionsbilder, d.h. die isolierten Schnittbilder aus denen die darüber - und daruntergelegenen Ebenen herausgerechnet waren, wurden nach der Two Nearest Neighbour – Methode von der Confocal Imaging Funktion von Openlab 2.1.3. berechnet. Wären auch die Bildinformationen der jeweils zum bearbeiteten Schnittbild unmittelbar benachbarten zwei Ebenen herausgerechnet worden, wäre die dann nur noch zu detektierende Fluoreszenz zu gering gewesen, um adäquat fluoreszierende Bilder zu liefern.



Da die CCD Kamera nur mit Lichtintensitätsunterschieden rechnet, wurden die Rohdaten in Grautönen erstellt, die nachträglich jedoch direkt proportional zur Grauskala in das spezifische GFP – Grün transferiert wurden.

### 3 Ergebnisse

Im Folgenden sind die für die PC12- und NRK-Zellen nach Transfektion mit dem Wildtyp-Centaurin  $\alpha 2$  und seinen Mutanten gewonnenen Daten aufgeführt.

#### 3.1 Das humane Centaurin $\alpha 2$

Den Lokalisationsstudien mit den über QCM erzeugten Centaurin  $\alpha 2$ -Mutanten ging eine Untersuchung der zellulären Verteilung des nativen Proteins, des Wildtyp-Centaurin  $\alpha 2$  voraus. Dieses wurde aufgrund seiner starken Homologie zu Centaurin  $\alpha 1$  über Datenbanksuche von Genbank mit tblastn unter EST-Klonen ermittelt, unter Verwendung unterschiedlicher Verfahren kloniert und in ersten Ansätzen auch bezüglich seines Lokalisationsverhaltens *in vivo* untersucht [Max, 2000; Illies, 2002].

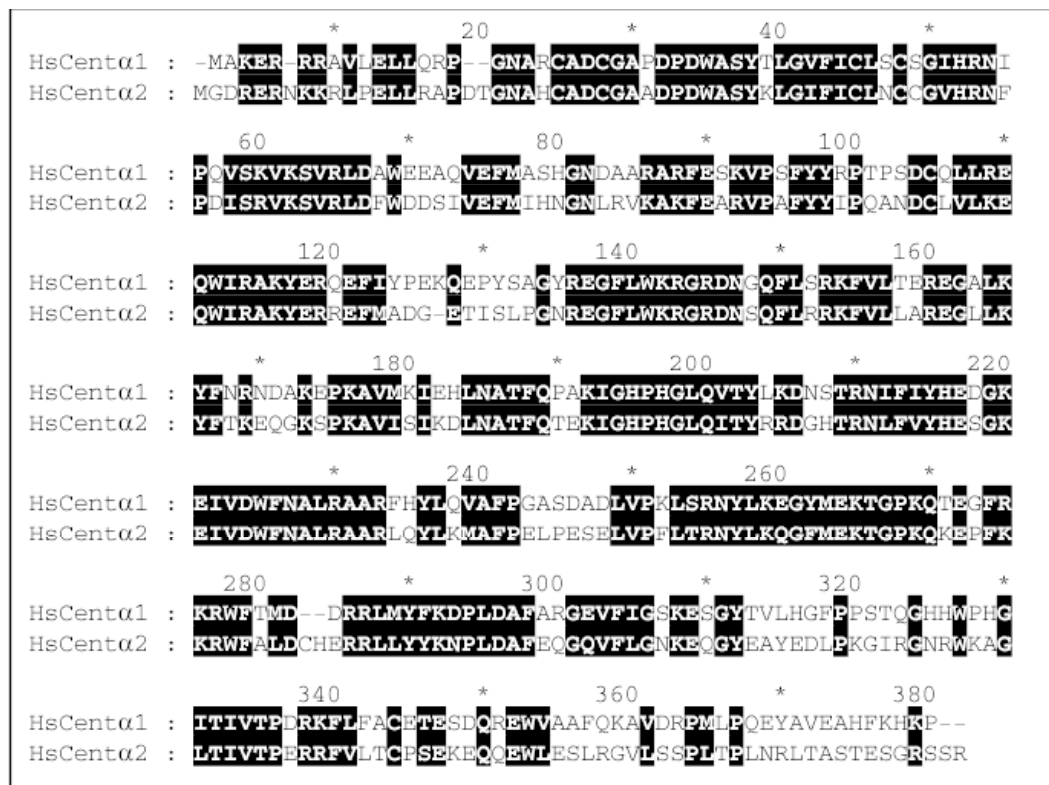


Abbildung 14: Das Alignment des humanen Centaurin  $\alpha 1$  und Centaurin  $\alpha 2$  weist eine Sequenzhomologie von 59% auf (Quelle: Illies, 2002 S. 71)

Die mit dem Wildtyp-Centaurin  $\alpha 2$  erhobenen Daten zur intrazellulären Lokalisation von Centaurin  $\alpha 2$  dienten als Referenzwerte, auf die sämtliche Ergebnisse der Experimente mit den sequenziell veränderten Mutanten bezogen werden.

#### 3.1.1 EYFP-Expressionsvektor von Centaurin $\alpha 2$

In dieser Arbeit wurde der von Ch. Illies 2002 hergestellte Centaurin  $\alpha 2$ -Expressionsvektor verwendet, in den über eine 5`-gelegene *XhoI*-Schnittstelle und eine 3`-gelegene *SmaI*-Schnittstelle die codierende Sequenz des Centaurin  $\alpha 2$  N-terminal vom fluoreszierenden Protein EYFP in den pEYFP-C1-Vektor hineinkloniert worden war.

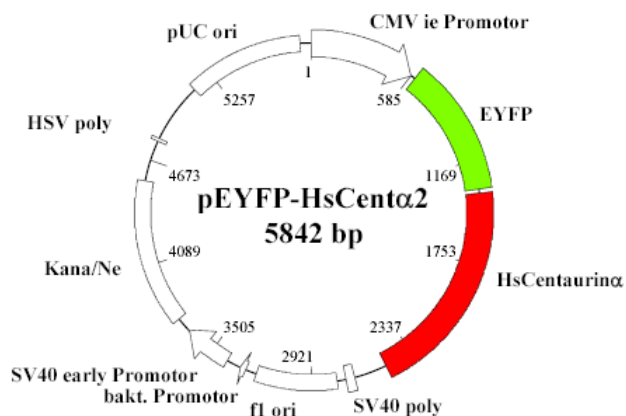
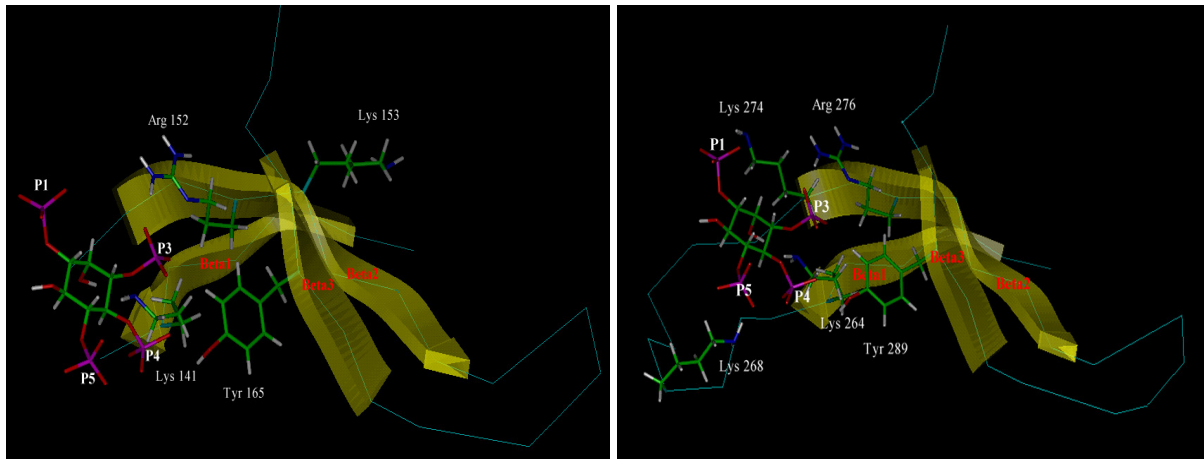


Abbildung EYFP-Centaurin  $\alpha 2$ -Expressionsvektor mit Angabe der Restriktionsenzymchnittstellen

#### 3.2 Mutanten des humanen Wildtyp-Centaurin $\alpha 2$

Für die Planung und Erzeugung der Centaurin  $\alpha 2$  – Mutanten war das bereits 2000 in der AG Mayr von den Centaurin  $\alpha 2$ -PH-Domänen entwickelte Strukturmodell von wesentlicher Bedeutung [Max, 2000]. Es gründet sich auf Alignmentanalysen mit der PLC und der BTK mit dem Ziel die PH-Domänen des Centaurin  $\alpha 2$  genauer zu charakterisieren.



**Abbildung 15:** Abbildung: Strukturmodell der N-terminalen PH-Domäne ( AS 131-232) und der C-terminalen PH-Domäne (AS 254-360) von Centaurin  $\alpha 2$ . Die mit Beta1-3 bezeichneten gelben Pfeile stellen Bereiche dar, die in ihrer Sekundärstruktur ähnlich sind und Träger der putativ für die Ligandenbindung entscheidenden Aminosäurereste sind. Wie die Reste, so ist auch das InsP4 als Stabdiagramm eingezeichnet. P1-P4 kennzeichnen die jeweiligen Phosphatgruppen am Inositolring. (Quelle: Max, 2000, S.159, 162)

Die in diesem Modell für die Interaktion von Centaurin  $\alpha 2$  mit Phosphatidylinositolen und Inositolen als wesentlich propagierte Aminosäurereste wurden neben weiteren putativ bedeutsamen Resten mittels QuikChange<sup>TM</sup> Site – Directed Mutagenese mutiert und der Erfolg der Mutagenese vor der Durchführung von Transfektionsversuchen mit Hilfe von Verdau des Plasmids durch Restriktionsenzyme, Gelelektrophorese und Sequenzierung überprüft.

**Im Folgenden ist die codierende Sequenz des Centaurin  $\alpha 2$  aufgeführt, die der Erstellung der Punktmutanten zugrunde gelegt wurde:**

Der grün gekennzeichnete Einbuchstaben – Code der Aminosäuresequenz entspricht Regionen der PH-Domänen. Die über den einzelnen Aminosäuren dargestellte Basenabfolge ist der Übersicht halber in Triplets untergliedert. In Rot sind die Aminosäuren gekennzeichnet, deren Reste und ihre putative Bedeutung in dieser Arbeit untersucht wurden:

### 3 Ergebnisse

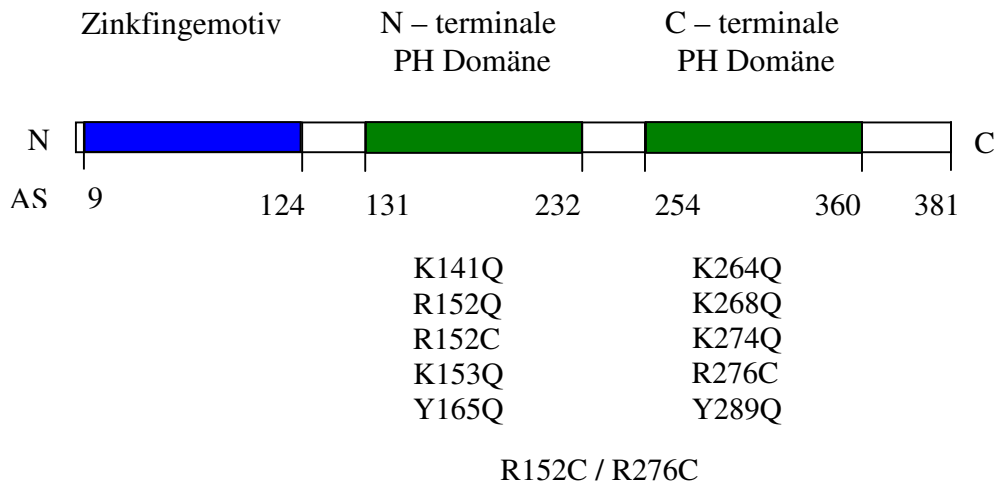
```

1      :ATG GGC GAT CGC GAG CGC AAC AAG AAG CGG CTG CCG GAG CTG CTG CGT GCG
1      M  G  D  R  E  R  N  K  K  R  L      E  L  L      A
52     :CCG GAC ACA GGC AAC GCG CAC TGC GCC GAC TGC GGG GCG GCA GAT CCC
18     P  D  T  G  N  A  H  C  A  D  C  G  A  A  D  P
100    :GAC TGG GCC TCT TAC AAG CTG GGG ATC TTC ATC TGT CTC AAC TGC TGC GGC
34     D  W  A  S  Y  K  L  G  I  F  I  C  L  N  C  C  G
151    :GTC CAC CGT AAC TTC CCT GAC ATC AGC AGA GTT AAA TCT GTG CGA CTT GAC
51     V  H  R  N  F  P  D  I  S  R  V  K  S  V  R  L  D
202    :TTC TGG GAC GAC AGT ATT GTG GAG TTT ATG ATC CAC AAT GGA AAC CTC CGT
68     F  W  D  D  S  I  V  E  F  M  I  H  N  G  N  L  R
253    :GTG AAG GCC AAG TTC GAA GCC AGA GTC CCA GCT TTC TAC TAC ATC CCC
85     V  K  A  K  F  E  A  R  V  P  A  F  Y  Y  I  P
301    :CAG GCC AAC GAC TGC CTG GTC TTA AAG GAA CAA TGG ATT CGA GCT AAG TAT
101    Q  A  N  D  C  L  V  L  K  E  Q  W  I  R  A  K  Y
352    :GAG AGA CGG GAA TTT ATG GCT GAT GGG GAA ACC ATC TCG CTC CCA GGT AAC
118    E  R  R  E  F  M  A  D  G  E  T  I  S  L P G N
403    :CGA GAA GGA TCC CTG TGG AAG CGA GGA AGG GAC AAC TCA CAG TTT CTG AGA
135    R E G F L E K R G R D N S Q F L R
454    :AGG AAG TTT GTA CTT CTG GCA AGA GAA GGC CTC CTG AAG TAC TTC ACA AAG
152    R K F V L L A R E G L L K Y F T K
505    :GAA CAG GGT AAA AGC CCC AAA GCT GTC ATC AGC ATT AAG GAC TTG AAT
169    E Q G K S P K A V I S I K D L N
553    :GCC ACC TTC CAG ACA GAG AAG ATA GGG CAC CCC CAT GGG CTG CAG ATC ACC
185    A T F Q T E K I G H P H G L Q I T
604    :TAC AGG AGA GAT GGC CAC ACC AGG AAC CTG TTT GTG TAT CAT GAA AGT GGG
202    Y R R D G H T R N L F V Y H E S G
655    :AAG GAG ATA GTG GAC TGG TTC AAT GCC CTC CGT GCA GCC CGT CTG CAG
219    K E I V D W F N A L R A A R L Q
703    :TAC CTA AAA ATG GCC TTT CCT GAA CTC CCA GAG TCT GAG CTC GTG CCA TTC
235    Y  L  K  M  A  F  P  E  L  P  E  S  E  L  V  P  S
754    :CTC ACC AGG AAC TAC CTC AAA CAA GGC TTC ATG GAA AAG ACT GGG CCA AAG
252    L  T  R N Y L K Q G F M E K T G P K
805    :CAG AAA GAA CCT TTC AAG AAA AGG TGG TTC GCC CTG GAT TGC CAT GAG
269    Q K E P F K K R W F A L D C H E
853    :CGG AGG CTG CTC TAT TAC AAG AAC CCA CTG GAT GCC TTC GAG CAG GGC CAG
285    R R L L Y Y K N P L D A F E Q G Q
905    :GTT TTT CTT GGG AAC AAG GAG CAG GGA TAT GAA GCC TAC GAA GAC CTG CCC
302    V F L G N K E Q G Y E A Y E D L P
955    :AAG GGC ATC CGA GGA AAT CGC TGG AAA GCC GGA CTC ACC ATT GTC ACC
319    K G I R G N R W K A G L T I V T
1003   :CCA GAG CGG AGA TTT GTC CTC ACT TGC CCC AGT GAG AAG GAA CAG CAG GAA
335    P E R R F V L T C P S E K E Q Q E
1054   :TGG CTG GAA AGT TTG CGG GGT GTC CTG TCC AGC CCC TTG ACG CCC CTC AAC
352    W L E S L R G V L S S P L T P L N
1105   :CGG CTT ACT GCA TCA ACA GAG AGT GGC CGC AGC AGC AGG TGA
369    R  L  T  A  S  T  E  S  G  R  S  S  R

```

Abbildung 16: Codierende Sequenz des Centaurin  $\alpha 2$

Der eukaryotische Expressionsvektor pEYFP-C1 diene als Träger der mutierten Centaurin  $\alpha 2$ -Sequenz. Mit folgenden, entsprechend ihrer Lokalisation und der putativen Funktion der Wildtyp-Reste bewusst ausgewählten neun Punktmutanten, wurde gearbeitet:



**Abbildung 17: Wesentliche Strukturelemente des Centaurin  $\alpha 2$  und Lokalisation der Mutationsstellen auf den jeweiligen PH-Domänen**

### **3.3 *In vivo* Lokalisations- und Translokationsexperimente mittels Epifluoreszenzmikroskopie**

Die als Plasmid, das heißt ringförmig, vorliegende und negativ geladene DNA der Expressionsvektoren wurde, wie im Methodenteil erläutert, abhängig von der Zelllinie unter Verwendung unterschiedlicher Transfektionsmethoden in die Zelle inkorporiert. Inkorporierte Plasmid-DNA wird in den Kern transportiert und das darauf codierte Fusionsprotein wird v.a. aufgrund eines starken CMV Promotors, u.U. auch aufgrund der Aufnahme einer Mehrzahl von Plasmidkopien durch eine einzelne Zelle intrazellulär überexprimiert.

Die Ergebnisse der quantitativen Auszählung und visuellen Auswertung, die der Erstellung der Fluoreszenzprofile für jeden unabhängigen Versuch vorausging und einem rechtzeitigen Erkennen von Versuchsirregularitäten diente, sind nachfolgend tabellarisch dargestellt. In den Tabellen werden die ausgezählten Zellen für jeden unabhängigen Versuch (I-III) und den jeweiligen Funktionszustand der Zellen (unstimuliert oder EGF-stimuliert) aufgelistet (Angaben in Prozent). Alle Zellen, die nicht sicher gegen die Umgebung abgrenzbar oder bezüglich der Fragestellung nicht eindeutig sind, finden sich in den Tabellen unter Spalte „Sonstige“ wieder und gehen nicht in die statistischen Auswertungen mit ein. Des weiteren finden sich Angaben zum Mittelwert, der Standardabweichung vom Mittelwert und dem Bereich innerhalb dessen die Werte divergieren. Der Mittelwert, die Standardabweichung und der

### 3 Ergebnisse

Bereich wurden aus den korrigierten Werten der Einzelmessungen, d.h. abzüglich der nicht eindeutig zu beurteilenden Zellen (Sonstige), ermittelt.

#### 3.3.1 PC12 – Zellen

Es erfolgt die Darstellung der Daten aus den Transfektionsversuchen mit der Phäochromocytom-Zelllinie gruppiert nach Abhängigkeit ihrer lokalisatorischen Zugehörigkeit.

##### 3.3.1.1 pEGFP-N1-Leervektor und Centaurin $\alpha 2$ – Wildtyp

Um einen möglichen Einfluss des mit Centaurin  $\alpha 2$  fusionierten Fluoreszenzproteins EYFP auf die Lokalisation und Translokation desselben zu erkennen beziehungsweise auszuschließen, wurde neben der Transfektion der Zellen mit dem Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp in einem unabhängigen, aber parallelen Kontroll-Ansatz eine Transfektion mit dem pEGFP-N1-Leervektor durchgeführt. Dieser enthielt folglich keine Centaurin  $\alpha 2$ -cDNA und die zu beobachtende Fluoreszenz entsprach somit ausschließlich der intrazellulären Verteilung des als Kontrolle eingesetzten EGFP.

Transfektionsprodukt	Plasmamembran-lokalisierung +	Plasmamembran-lokalisierung -	Sonstige	Zellanzahl
<b>pEGFP I unstimuliert</b>	5,2%	91,4%	3,5%	58
% ohne sonstige	<b>5,4%</b>	<b>94,6%</b>	<b>0,0%</b>	<b>56</b>
<b>pEGFP II unstimuliert</b>	1,6%	95,3%	3,1%	64
% ohne sonstige	<b>1,6%</b>	<b>98,4%</b>	<b>0,0%</b>	<b>62</b>
<b>pEGFP III unstimuliert</b>	0,8%	99,2%	0,00%	127
% ohne sonstige	<b>0,8%</b>	<b>99,2%</b>	<b>0,0%</b>	<b>127</b>
Mittelwert	2,4%	97,4%	2,2%	82
Standardabweichung	+/- 2,4%	+/- 2,4%	-	-
<i>Bereich</i>	<b>0,0 – 4,9%</b>	<b>95,0 – 99,9%</b>		
<b>pEGFP I stimuliert</b>	0,0%	100%	0,0%	53

### 3 Ergebnisse

% ohne sonstige	<b>0,0%</b>	<b>100%</b>	0,0%	<b>53</b>
<b>pEGFP II stimuliert</b>	3,8%	90,6%	5,7%	53
% ohne sonstige	<b>4,0%</b>	<b>96,0%</b>	0,0%	<b>50</b>
<b>pEGFP III stimuliert</b>	0,8%	97,7%	1,5%	130
% ohne sonstige	<b>0,8%</b>	<b>99,2%</b>	0,0%	<b>128</b>
Mittelwert	1,6%	98,4%	2,4%	77
Standardabweichung	+/- 2,1%	+/- 2,1%	-	-
Bereich	<b>0,0 – 3,7%</b>	<b>96,3 – 100,5%</b>		

Tabelle 12: Transfektion mit pEGFP-N1-Leervektor. Quantitative Auszählung der drei unabhängigen Versuche (I, II, III) hinsichtlich vorhandener und fehlender Plasmamembranbindung im unstimulierten und stimulierten Zustand unter Angabe der Zellanzahl in Prozent. Die Zellanzahl bezeichnet die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen.

Transfektionsprodukt	Plasmamembran-lokalisierung +	Plasmamembran-lokalisierung -	Sonstige	Zellanzahl
<b>Wildtyp I unstimuliert</b>	97,8%	0,8%	1,5%	134
% ohne sonstige	<b>99,2%</b>	<b>0,8%</b>	0,0%	<b>132</b>
<b>Wildtyp II unstimuliert</b>	92,3%	5,4%	2,3%	130
% ohne sonstige	<b>94,5%</b>	<b>5,5%</b>	0,0%	<b>127</b>
<b>Wildtyp III unstimuliert</b>	95,1%	2,5%	2,5%	122
% ohne sonstige	<b>97,5%</b>	<b>2,5%</b>	0,0%	<b>119</b>
Mittelwert	97,1%	2,9%	2,1%	126
Standardabweichung	+/- 2,4%	+/- 2,4%	-	-
Bereich	<b>94,8 – 99,5%</b>	<b>0,5 – 5,3%</b>		

<b>Wildtyp I stimuliert</b>	97,9%	2,1%	0,0%	141
% ohne sonstige	<b>97,9%</b>	<b>2,1%</b>	0,0%	<b>141</b>
<b>Wildtyp II stimuliert</b>	99,3%	0,0%	0,7%	137
% ohne sonstige	<b>100%</b>	<b>0,0%</b>	0,0%	<b>136</b>
<b>Wildtyp III stimuliert</b>	98,5%	0,0%	1,5%	131
% ohne sonstige	<b>100%</b>	<b>0,0%</b>	0,0%	<b>129</b>
Mittelwert	99,3%	0,7%	0,7%	135
Standardabweichung	+/- 1,2%	+/- 1,2%	-	-
Bereich	<b>98,1 – 100,5%</b>	<b>0,0 – 1,9%</b>		

Tabelle 13: Transfektion mit pEYFP-Centaurin  $\alpha 2$  Wildtyp-Fusionsprotein



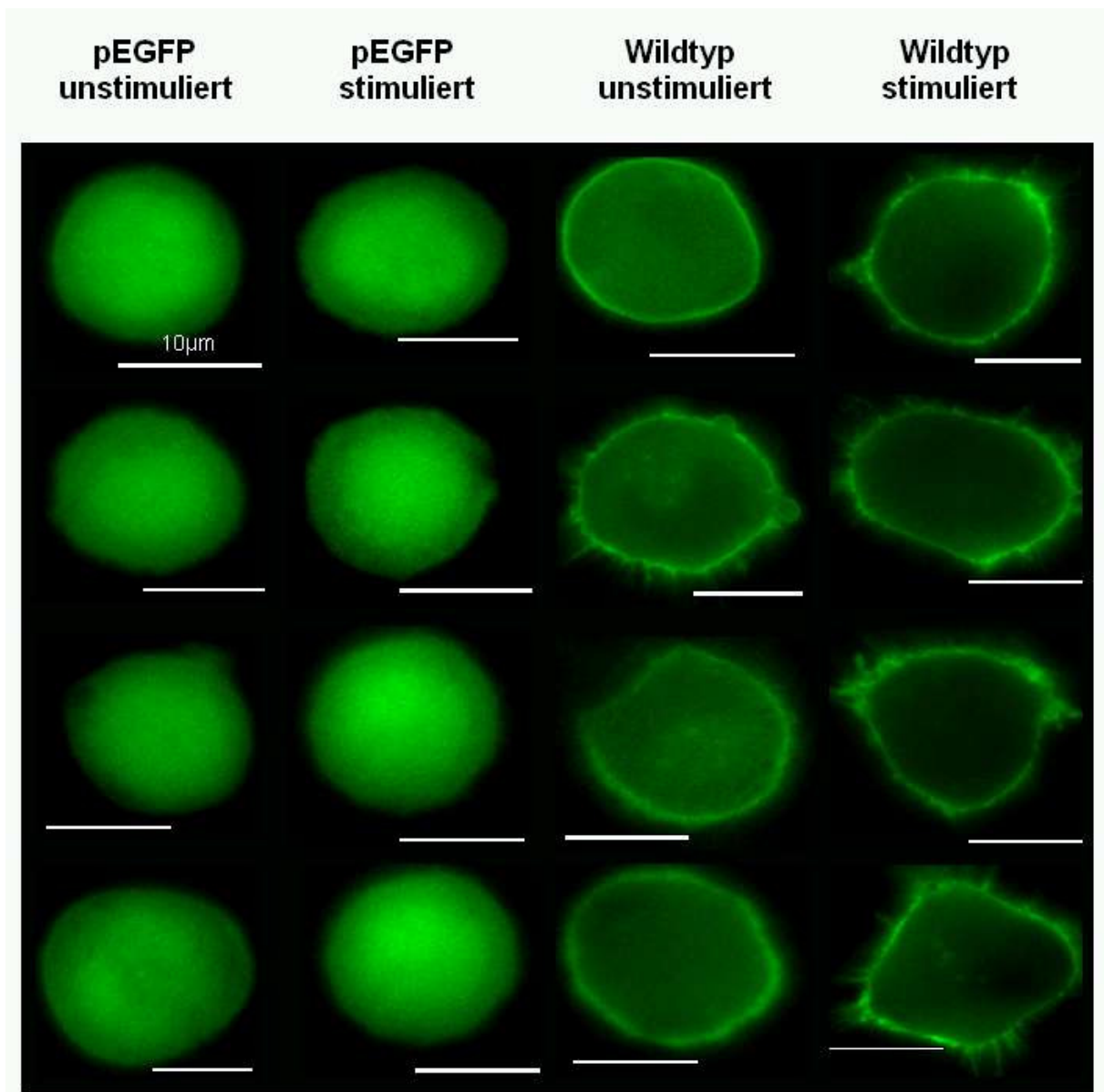


Abbildung 18: PC12: pEGFP-Leervektor und Centaurin  $\alpha$ 2-Wildtyp stimuliert und unstimuliert

Es ist deutlich zu erkennen, dass die mit dem pEGFP-Leervektor transfizierten PC12-Zellen in ihrer Gesamtheit sehr rund und glatt begrenzt sind. Die mit dem Centaurin  $\alpha$ 2-Wildtyp transfizierten Zellen hingegen zeigen eine, abhängig vom Stimulationsgrad ausgeprägte Pseudopodien- und Focal adhesion-Ausbildung.

### 3.3.1.2 Mutanten R152C, R276C und R152C/R276C

In dieser Untersuchungsreihe wurden die in der Centaurin  $\alpha$ 2-Wildtypsequenz bestehenden stark basischen Reste der Aminosäure Arginin an Position 152 und 276

### 3 Ergebnisse

durch Erzeugung zweier Aminosäure-Substitutionen zu Cystein (C) gegen deren unpolare Reste ausgetauscht.

Bei R152C/R276C handelt es sich nicht um eine einfache Punktmutation, sondern um eine Doppelmutante, die jeweils einen Aminosäure-Austausch in jeder PH-Domäne aufweist.

Transfusionsprodukt	Plasmamembran-lokalisierung +	Plasmamembran-lokalisierung -	Sonstige	Zellanzahl
<b>R152C I unstimuliert</b>	89,2%	8,5%	2,3%	130
% ohne sonstige	<b>91,3%</b>	<b>8,7%</b>	0,0%	<b>127</b>
<b>R152C II unstimuliert</b>	84,3%	12,4%	3,3%	121
% ohne sonstige	<b>87,2%</b>	<b>12,8%</b>	0,0%	<b>117</b>
<b>R152C III unstimuliert</b>	91,15%	6,19%	2,7%	113
% ohne sonstige	<b>93,6%</b>	<b>6,4%</b>	0,0%	<b>110</b>
Mittelwert	90,7%	9,3%	2,8%	118
Standardabweichung	+/- 3,3	+/- 3,3	-	-
Bereich	<b>87,5 – 94,0%</b>	<b>6,0 – 12,6%</b>		

<b>R152C I stimuliert</b>	93,7%	2,4%	4,0%	126
% ohne sonstige	<b>97,5%</b>	<b>2,5%</b>	0,0%	<b>121</b>
<b>R152C II stimuliert</b>	93,5%	0,9%	5,6%	108
% ohne sonstige	<b>99,0%</b>	<b>1,0%</b>	0,0%	<b>102</b>
<b>R152C III stimuliert</b>	95,9%	1,6%	2,5%	122
% ohne sonstige	<b>98,3%</b>	<b>1,7%</b>	0,0%	<b>119</b>
Mittelwert	98,3%	1,7%	4,0%	114
Standardabweichung	+/- 0,8	+/- 0,8	-	-
Bereich	<b>97,5 – 99,0%</b>	<b>1,0 – 2,5%</b>		

Tabelle 14: Transfektion mit Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante R152C

Transfektionsprodukt	Plasmamembran-lokalisierung +	Plasmamembran-lokalisierung -	Sonstige	Zellanzahl
<b>R276C I unstimuliert</b>	49,2%	46,7%	4,1%	122

### 3 Ergebnisse

% ohne sonstige	<b>51,3%</b>	<b>48,7%</b>	0,0%	<b>117</b>
<b>R276C IV unstimuliert</b>	61,5%	33,6%	4,9%	122
% ohne sonstige	<b>64,7%</b>	<b>35,3%</b>	0,0%	<b>116</b>
<b>R276C III unstimuliert</b>	52,9%	44,5%	2,5%	119
% ohne sonstige	<b>54,3%</b>	<b>45,7%</b>	0,0%	<b>116</b>
Mittelwert	56,8%	43,3%	3,9%	116
Standardabweichung	+/- 7,0%	+/- 7,0%	-	-
<b>Bereich</b>	<b>49,7 – 63,8%</b>	<b>36,2 – 50,3%</b>		

<b>R276C I stimuliert</b>	89,8%	5,9%	4,2%	118
% ohne sonstige	<b>93,8%</b>	<b>6,2%</b>	0,0%	<b>113</b>
<b>R276C IV stimuliert</b>	90,1%	7,4%	2,5%	121
% ohne sonstige	<b>92,4%</b>	<b>7,6%</b>	0,0%	<b>118</b>
<b>R276C III stimuliert</b>	83,1%	15,3%	1,6%	124
% ohne sonstige	<b>84,4%</b>	<b>15,6%</b>	0,0%	<b>122</b>
Mittelwert	90,2%	9,8%	2,8%	118
Standardabweichung	+/- 5,1%	+/- 5,1%	-	-
<b>Bereich</b>	<b>85,2 – 95,3%</b>	<b>4,8 – 14,9%</b>		

Tabelle 15: Transfektion mit Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante R276C

Transfektionsprodukt	Plasmamembran-lokalisierung +	Plasmamembran-lokalisierung -	Sonstige	Zellanzahl
<b>R152C/R276C I ust.</b>	2,4%	94,3%	3,3%	123
% ohne sonstige	<b>2,5%</b>	<b>97,5%</b>	0,0%	<b>119</b>
<b>R152C/R276C II ust.</b>	0,8%	96,7%	2,5%	121
% ohne sonstige	<b>0,9%</b>	<b>99,2%</b>	0,0%	<b>118</b>
<b>R152C/R276C III ust.</b>	0,0%	99,2%	0,8%	121
% ohne sonstige	<b>0,0%</b>	<b>100%</b>	0,0%	<b>120</b>
Mittelwert	1,1%	98,9%	2,19%	119
Standardabweichung	+/- 1,3%	+/- 1,3%	-	-
<b>Bereich</b>	<b>0,0 – 2,4%</b>	<b>97,6 – 100%</b>		

<b>R152C/R276C I st.</b>	6,3%	90,6%	3,2%	127
--------------------------	------	-------	------	-----

### 3 Ergebnisse

% ohne sonstige	<b>6,5%</b>	<b>93,5%</b>	0,0%	<b>123</b>
<b>R152C/R276C II st.</b>	0,8%	96,8%	2,4%	123
% ohne sonstige	<b>0,8%</b>	<b>99,2%</b>	0,0%	<b>120</b>
<b>R152C/R276C III st.</b>	1,6%	96,8%	1,6%	124
% ohne sonstige	<b>1,6%</b>	<b>98,4%</b>	0,0%	<b>122</b>
Mittelwert	3,0%	97,0%	2,4%	122
Standardabweichung	+/- 3,1%	+/- 3,1%	-	-
Bereich	<b>0,0 – 6,1%</b>	<b>93,9 – 100%</b>		

**Tabelle 16: Transfektion mit Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante R152C/R276C ( ust. = unstimuliert; st. = stimuliert)**

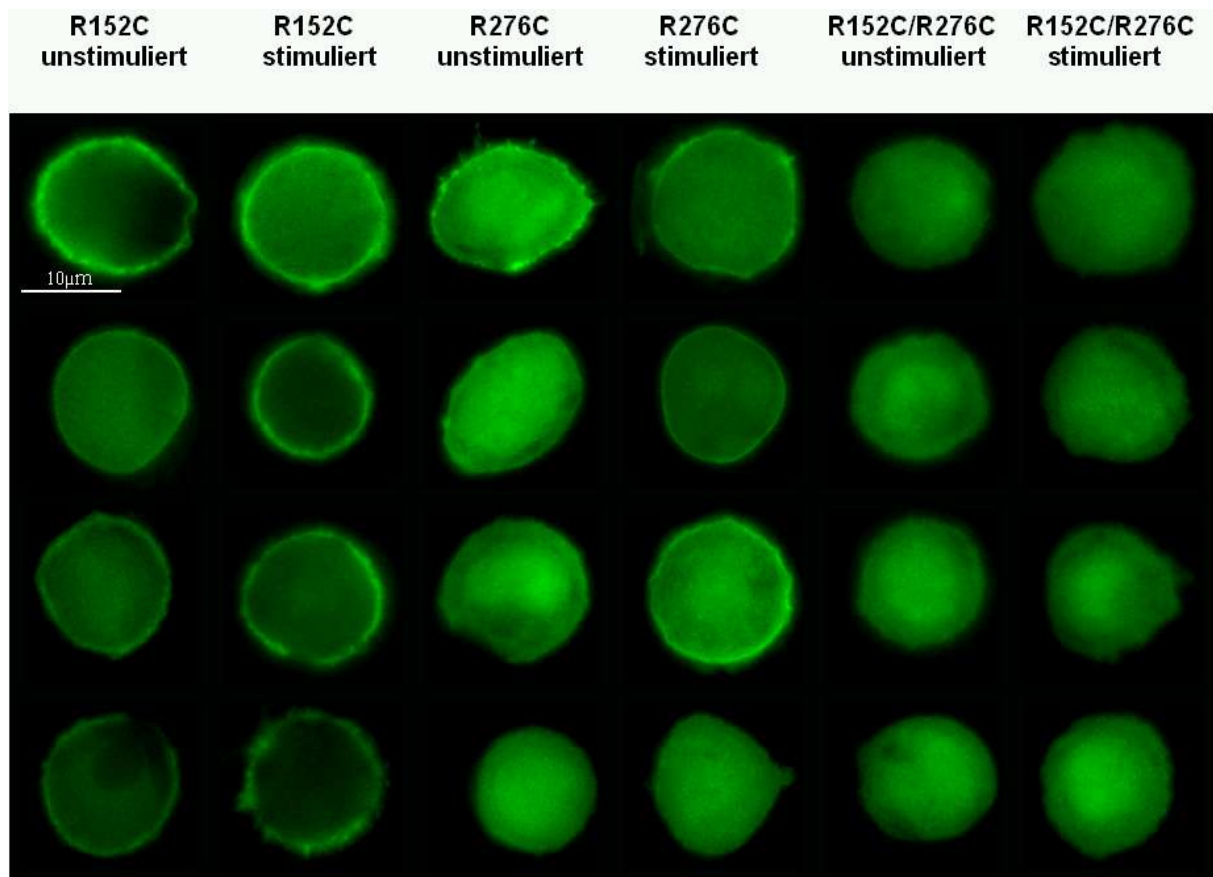


Abbildung 19: PC12: Centaurin  $\alpha$ 2-Mutanten R152C, R276C und R152C/R276C stimuliert und unstimuliert

Die Gesamtheit der Zellen, die mit den o.g. Centaurin  $\alpha$ 2-Mutanten transfiziert wurden, sind rund und bilden, soweit erkennbar, keinerlei Pseudopodien oder Focal adhesion-Komplexe aus. Die Stimulation mit EGF scheint hinsichtlich der Zellmorphologie keinen Einfluss auszuüben.

### 3.3.1.3 Mutanten R152Q und K153Q

Bei diesen Mutanten wurde der Argininrest an Position 152 nicht zu Cystein, sondern zum polaren Glutamin mutiert. An Position 153 erfolgte der Austausch des stark basischen Lysins ebenfalls zu Glutamin.

Transfektionsprodukt	Plasmamembran-lokalisierung +	Plasmamembran-lokalisierung -	Sonstige	Zellanzahl
R152Q I unstimuliert	86,4%	11,9%	1,7%	118

### 3 Ergebnisse

Transfektionsprodukt	Plasmamembran-lokalisierung +	Plasmamembran-lokalisierung -	Sonstige	Zellanzahl
% ohne sonstige	<b>87,9%</b>	<b>12,1%</b>	0,0%	<b>116</b>
<b>R152Q I stimuliert</b>	97,8%	0,8%	1,5%	134
% ohne sonstige	<b>99,2%</b>	<b>0,8%</b>	0,0%	<b>132</b>
<b>R152Q II stimuliert</b>	93,0%	2,6%	4,4%	115
% ohne sonstige	<b>97,3%</b>	<b>2,7%</b>	0,0%	<b>110</b>
Mittelwert	98,3%	1,8%	2,9%	121
Standardabweichung	+/- 1,4%	+/- 1,4%	-	-
Bereich	<b>96,9 – 99,7%</b>	<b>0,4 – 3,1%</b>		

Tabelle 17: Transfektion mit Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante R152Q

Transfektionsprodukt	Plasmamembran-lokalisierung +	Plasmamembran-lokalisierung -	Sonstige	Zellanzahl
<b>K153Q I unstimuliert</b>	92,6%	3,3%	4,1%	122
% ohne sonstige	<b>96,6%</b>	<b>3,4%</b>	0,0%	<b>117</b>
<b>K153Q II unstimuliert</b>	94,3%	4,1%	1,3%	123
% ohne sonstige	<b>95,9%</b>	<b>4,1%</b>	0,00%	<b>121</b>
Mittelwert	96,2%	3,8%	2,7%	119
Standardabweichung	+/- 0,5%	+/- 0,5%	-	-
Bereich	<b>95,7 – 96,7%</b>	<b>3,3 – 4,3%</b>		

<b>K153Q I stimuliert</b>	98,4%	0,0%	1,6%	126
% ohne sonstige	<b>100%</b>	<b>0,0%</b>	0,0%	<b>124</b>
<b>K153Q II stimuliert</b>	99,2%	0,0%	0,8%	125
% ohne sonstige	<b>100%</b>	<b>0,0%</b>	0,0%	<b>124</b>
Mittelwert	100%	0,0%	1,2%	124
Standardabweichung	+/- 0,0%	+/- 0,0%	-	-
Bereich	<b>100%</b>	<b>0,00%</b>		

Tabelle 18: Transfektion mit Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante R153Q

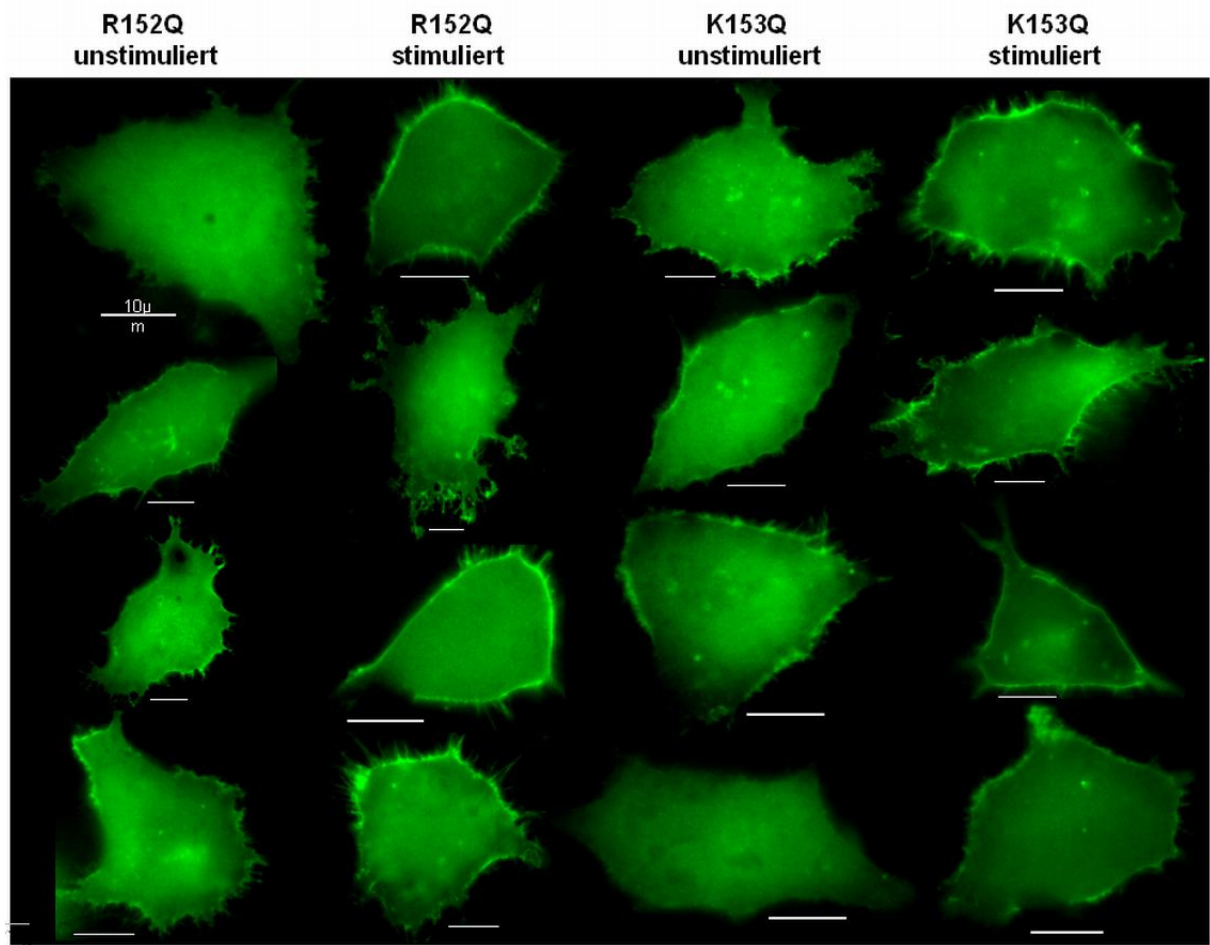


Abbildung 20: PC12: Centaurin  $\alpha$ 2-Mutanten R152Q und K153Q stimuliert und unstimuliert

Sowohl die mit der Mutante R152Q, als auch die mit K153Q transfizierten PC12-Zellen zeigen unabhängig von ihrem Stimulationsgrad eine sehr hohe Pseudopodien- und Focal adhesion-Ausbildung.

### 3.3.1.4 Mutanten K141Q und Y165Q

Bei diesen beiden Mutanten der N-terminalen PH-Domäne wurde an Position 141 das Lysin zu Glutamin verändert und an Position 165 der Tyrosin-Rest ebenfalls durch Glutamin ersetzt.

Transfektionsprodukt	Plasmamembran-lokalisierung +	Plasmamembran-lokalisierung -	Sonstige	Zellanzahl
<b>K141Q I unstimuliert</b>	96,0%	0,8%	3,2%	124
% ohne sonstige	<b>99,2%</b>	<b>0,8%</b>	0,0%	<b>120</b>
<b>K141Q II unstimuliert</b>	91,7%	1,7%	6,7%	120
% ohne sonstige	<b>98,2%</b>	<b>1,8%</b>	0,0%	<b>112</b>
Mittelwert	98,7%	1,3%	5,0%	116
Standardabweichung	+/- 0,7%	+/-0,7%	-	-
<b>Bereich</b>	<b>98,0 – 99,4%</b>	<b>0,6 – 2,0%</b>		

<b>K141Q I stimuliert</b>	96,9%	0,8%	2,3%	128
% ohne sonstige	<b>99,2%</b>	<b>0,8%</b>	0,0%	<b>125</b>
<b>K141Q II stimuliert</b>	97,6%	0,0%	2,3%	126
% ohne sonstige	<b>100%</b>	<b>0,0%</b>	0,0%	<b>123</b>
Mittelwert	99,60%	0,40%	2,36%	124
Standardabweichung	+/- 0,6%	+/- 0,6%	-	-
<b>Bereich</b>	<b>99,0 – 100%</b>	<b>0,2 – 1%</b>		

Tabelle 19: Transfektion mit Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante K141Q

Transfektionsprodukt	Plasmamembran-lokalisierung +	Plasmamembran-lokalisierung -	Sonstige	Zellanzahl
<b>Y165Q I unstimuliert</b>	92,6%	4,6%	2,8%	108
% ohne sonstige	<b>95,2%</b>	<b>4,8%</b>	0,0%	<b>105</b>
<b>Y165Q II unstimuliert</b>	96,8%	2,4%	0,8%	125
% ohne sonstige	<b>97,6%</b>	<b>2,4%</b>	0,0%	<b>124</b>
<b>Y165Q III unstimuliert</b>	96,8%	0,0%	3,3%	123

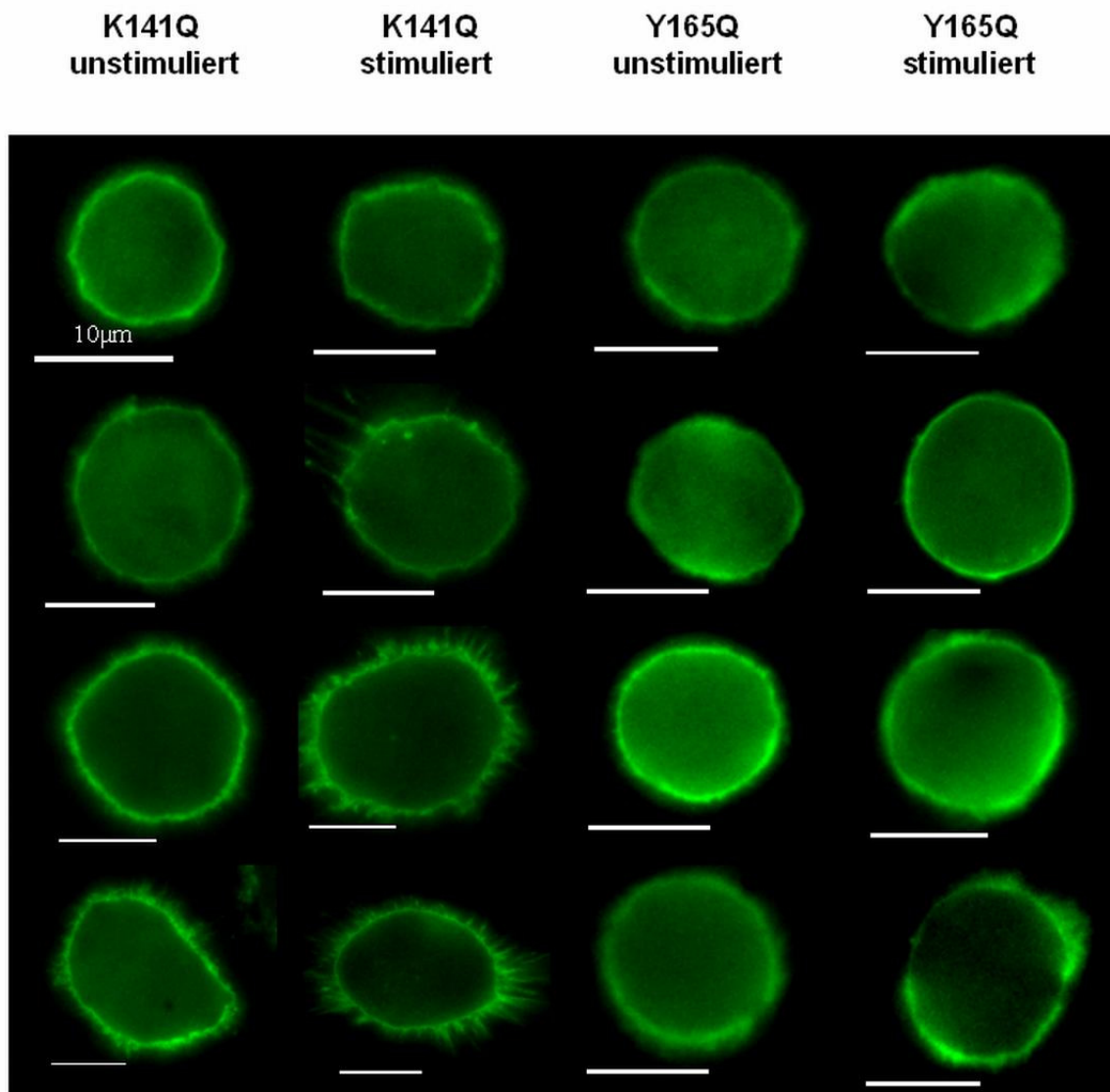


### 3 Ergebnisse

% ohne sonstige	<b>100%</b>	<b>0,0%</b>	0,0%	<b>119</b>
Mittelwert	97,6%	2,9%	2,3%	116
Standardabweichung	+/- 2,4%	+/- 2,4%	-	-
Bereich	<b>95,2 – 100%</b>	<b>0,6 – 5,3%</b>		

<b>Y165Q I stimuliert</b>	99,0%	0,0%	1,0%	101
% ohne sonstige	<b>100%</b>	<b>0,0%</b>	0,0%	<b>100</b>
<b>Y165Q II stimuliert</b>	95,3%	2,4%	2,4%	127
% ohne sonstige	<b>97,6%</b>	<b>2,4%</b>	0,0%	<b>124</b>
<b>Y165Q III stimuliert</b>	95,8%	0,8%	3,3%	120
% ohne sonstige	<b>99,1%</b>	<b>0,9%</b>	0,0%	<b>116</b>
Mittelwert	98,9%	1,1%	2,2%	113
Standardabweichung	+/- 1,2%	+/- 1,2%	-	-
Bereich	<b>97,7 – 100%</b>	<b>0,0 – 2,3%</b>		

**Tabelle 20: Transfektion mit Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante Y165Q**



**Abbildung 21: PC12: Centaurin  $\alpha$ 2-Mutanten K141Q und Y165Q stimuliert und unstimuliert**

Bei den mit der Mutante K141Q transfizierten PC12-Zellen fällt auf, dass sie im unstimulierten Zustand abgerundet sind und auch nur sehr vereinzelt Pseudopodien ausbilden. Nach Zellstimulation steigt der Anteil der Pseudopodien stark an, die runde Zellform bleibt erhalten.

Die mit der Mutante Y165Q transfizierten PC12-Zellen sind unstimuliert und stimuliert ebenfalls rund und weisen keine Plasmamembranausläufer in Form von Pseudopodien auf.

### 3.3.1.5 Mutanten K264Q und K268Q

Die Lysin-Reste im Bereich der C-terminalen PH-Domäne an Position 264 und 268 wurden zu Glutamin-Resten punktmutiert.

Transfektionsprodukt	Plasmamembran-lokalisierung +	Plasmamembran-lokalisierung -	Sonstige	Zellanzahl
<b>K264Q I unstimuliert</b>	58,9%	35,7%	5,4%	112
% ohne sonstige	<b>62,3%</b>	<b>37,7%</b>	0,0%	<b>106</b>
<b>K264Q II unstimuliert</b>	71,3%	24,4%	4,4%	115
% ohne sonstige	<b>74,6%</b>	<b>25,5%</b>	0,0%	<b>110</b>
Mittelwert	68,4%	31,6%	4,9%	108
Standardabweichung	+/- 8,7%	+/- 8,7%	-	-
<b>Bereich</b>	<b>59,7 – 77,1%</b>	<b>22,9 – 40,3%</b>		

<b>K264Q I stimuliert</b>	90,7%	5,6%	3,7%	107
% ohne sonstige	<b>94,2%</b>	<b>5,8%</b>	0,0%	<b>103</b>
<b>K264Q II stimuliert</b>	92,5%	1,9%	5,6%	107
% ohne sonstige	<b>98,0%</b>	<b>2,0%</b>	0,0%	<b>101</b>
Mittelwert	96,1%	3,9%	4,7%	102
Standardabweichung	+/- 2,7%	+/- 2,7%	-	-
<b>Bereich</b>	<b>93,4 – 98,8%</b>	<b>1,2 – 6,6%</b>		

Tabelle 21: Transfektion mit Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante K264Q

Transfektionsprodukt	Plasmamembran-lokalisierung +	Plasmamembran-lokalisierung -	Sonstige	Zellanzahl
<b>K268Q I unstimuliert</b>	83,3%	8,3%	8,3%	120
% ohne sonstige	<b>90,9%</b>	<b>9,1%</b>	0,0%	<b>110</b>
<b>K268Q II unstimuliert</b>	79,5%	10,7%	9,8%	112
% ohne sonstige	<b>88,1%</b>	<b>11,9%</b>	0,0%	<b>101</b>
Mittelwert	89,5%	10,5%	9,1%	106
Standardabweichung	+/- 2,0%	+/- 2,0%	-	-

### 3 Ergebnisse

Bereich	<b>87,5 – 91,5%</b>	<b>8,5 – 12,5%</b>		
<b>K268Q I stimuliert</b>	98,4%	0,0%	1,6%	124
% ohne sonstige	<b>100%</b>	<b>0,0%</b>	0,0%	<b>122</b>
<b>K268Q II stimuliert</b>	96,0%	0,8%	3,2%	126
% ohne sonstige	<b>99,2%</b>	<b>0,8%</b>	0,0%	<b>122</b>
Mittelwert	99,6%	0,4%	2,4%	122
Standardabweichung	+/- 0,6%	+/- 0,6%	-	-
Bereich	<b>99,0–100%</b>	<b>0,2–1,0%</b>		

Tabelle 22: Transfektion mit Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante K268Q

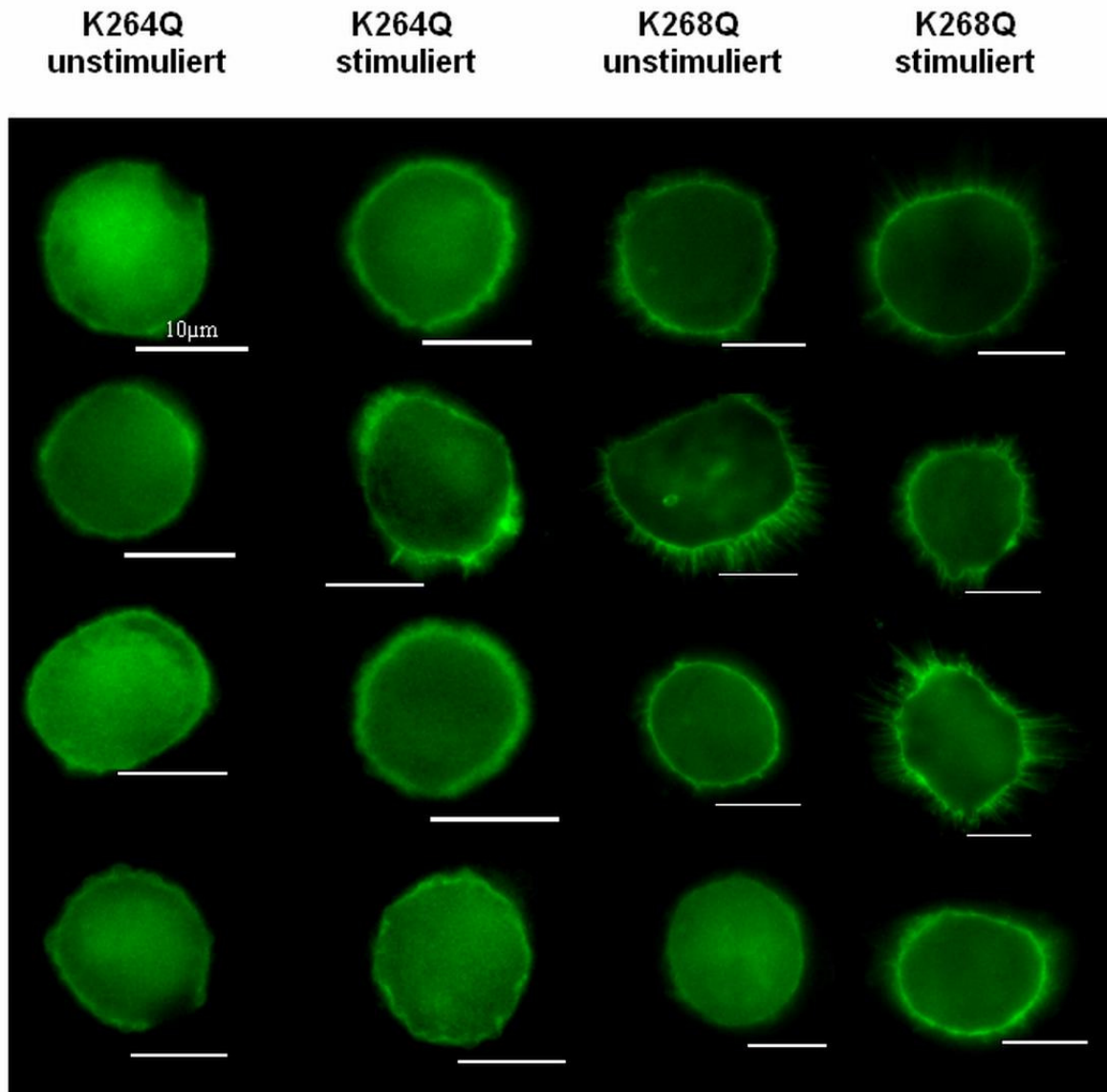


Abbildung 22: PC12: Centaurin  $\alpha$ 2-Mutanten K264Q und K268Q stimuliert und unstimuliert

Die mit der Mutante K264Q transfizierten PC12-Zellen besitzen, sowohl unstimuliert, als auch stimuliert eine runde Zellform ohne Pseudopodien- oder Focal adhesion - Ausbildung.

Eine runde Zellstruktur zeigen auch die mit der Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante K268Q transfizierten PC12-Zellen, die bei Zellstimulation eine deutliche Zunahme der bereits bei fehlender Stimulation geringgradig vorhandenen Pseudopodien und Focal adhesions zeigen.

### 3.3.1.6 Mutanten K274Q und Y289Q

An Position 274 der Centaurin  $\alpha$ 2-Aminosäuresequenz wurde das Lysin zu Glutamin und an Position 289 das Tyrosin zu Glutamin mutiert.

Transfektionsprodukt	Plasmamembran-lokalisierung +	Plasmamembran-lokalisierung -	Sonstige	Zellanzahl
<b>K274Q I unstimuliert</b>	89,8%	8,5%	1,7%	118
% ohne sonstige	<b>91,4%</b>	<b>8,6%</b>	0,0%	<b>116</b>
<b>K274Q II unstimuliert</b>	79,1%	6,7%	6,7%	134
% ohne sonstige	<b>84,8%</b>	<b>7,2%</b>	0,0%	<b>125</b>
Mittelwert	88,1%	7,9%	4,2%	
Standardabweichung	+/- 4,7%	+/- 4,7%	-	-
<b>Bereich</b>	<b>83,4 – 92,7%</b>	<b>3,3 – 12,6%</b>		

<b>K274Q I stimuliert</b>	99,3%	0,7%	0,0%	136
% ohne sonstige	<b>99,3%</b>	<b>0,7%</b>	0,0%	<b>136</b>
<b>K274Q II stimuliert</b>	99,2%	0,0%	0,9%	117
% ohne sonstige	<b>100%</b>	<b>0,0%</b>	0,0%	<b>116</b>
Mittelwert	99,6%	0,4%	0,4%	
Standardabweichung	+/- 0,5%	+/- 0,5%	-	-
<b>Bereich</b>	<b>99,1 – 100%</b>	<b>0,2 – 0,9%</b>		

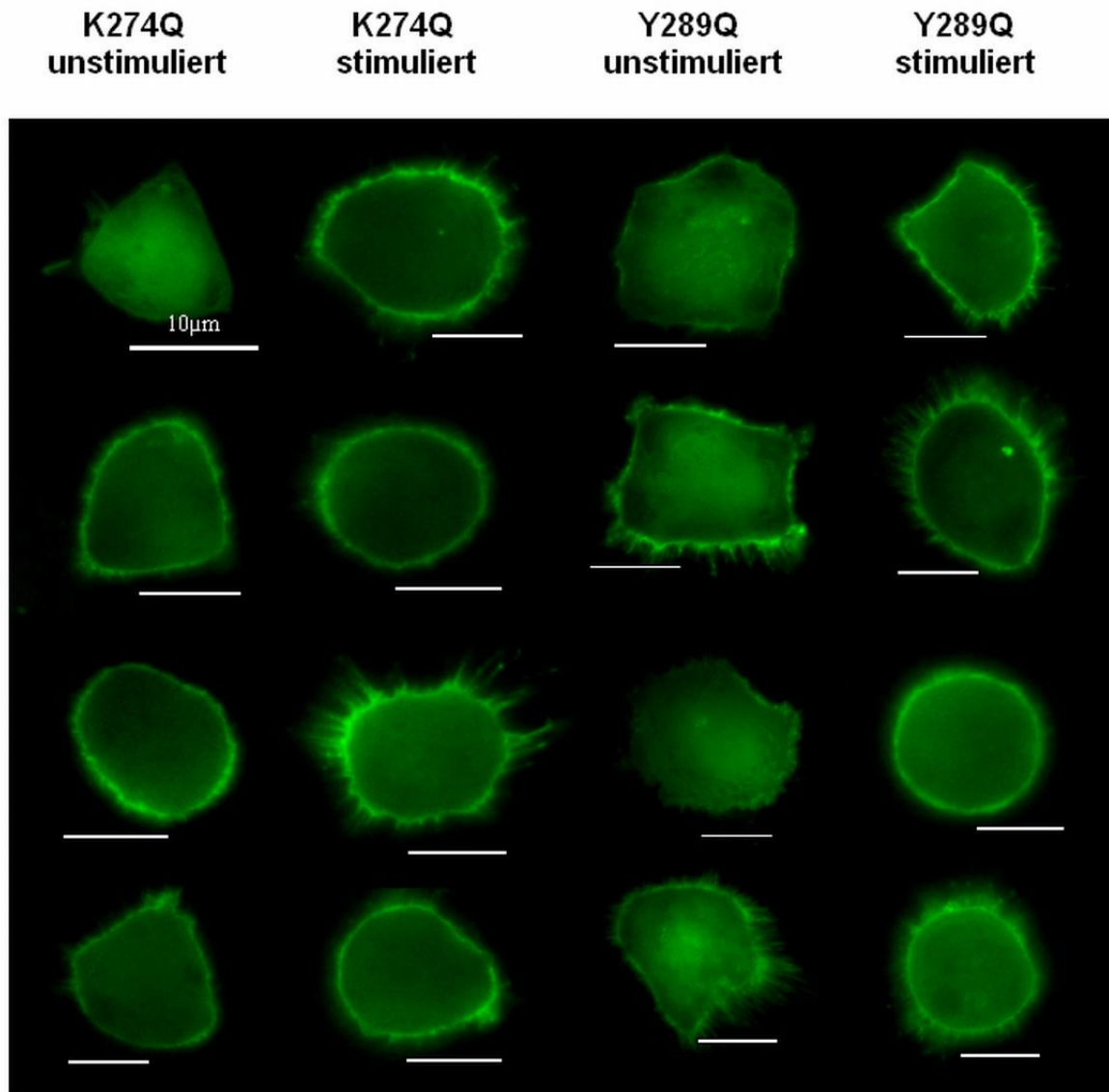
Tabelle 23: Transfektion mit Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante K274Q

Transfektionsprodukt	Plasmamembran-lokalisierung +	Plasmamembran-lokalisierung -	Sonstige	Zellanzahl
<b>Y289Q I unstimuliert</b>	87,3%	10,2%	2,5%	118
% ohne sonstige	<b>89,6%</b>	<b>10,4%</b>	0,0%	<b>115</b>
<b>Y289Q II unstimuliert</b>	94,8%	2,6%	2,6%	116
% ohne sonstige	<b>97,3%</b>	<b>2,7%</b>	0,0%	<b>113</b>
Mittelwert	93,45%	6,54%	2,6%	114
Standardabweichung	+/- 5,5%	+/- 5,5%		

### 3 Ergebnisse

Bereich	<b>88,0 – 99,0%</b>	<b>1,0 – 12,0%</b>		
<b>Y289Q I stimuliert</b>	97,4%	0,9%	1,7%	116
% ohne sonstige	<b>99,1%</b>	<b>0,9%</b>	0,0%	<b>114</b>
<b>Y289Q II stimuliert</b>	99,2%	0,8%	0,0%	122
% ohne sonstige	<b>99,2%</b>	<b>0,8%</b>	0,0%	<b>122</b>
Mittelwert	99,2%	0,9%	0,9%	118
Standardabweichung	+/- 0,0%	+/- 0,0%	-	-
Bereich	<b>99,2 – 99,2%</b>	<b>0,9 – 0,90%</b>		

**Tabelle 24: Transfektion mit Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante Y289Q**

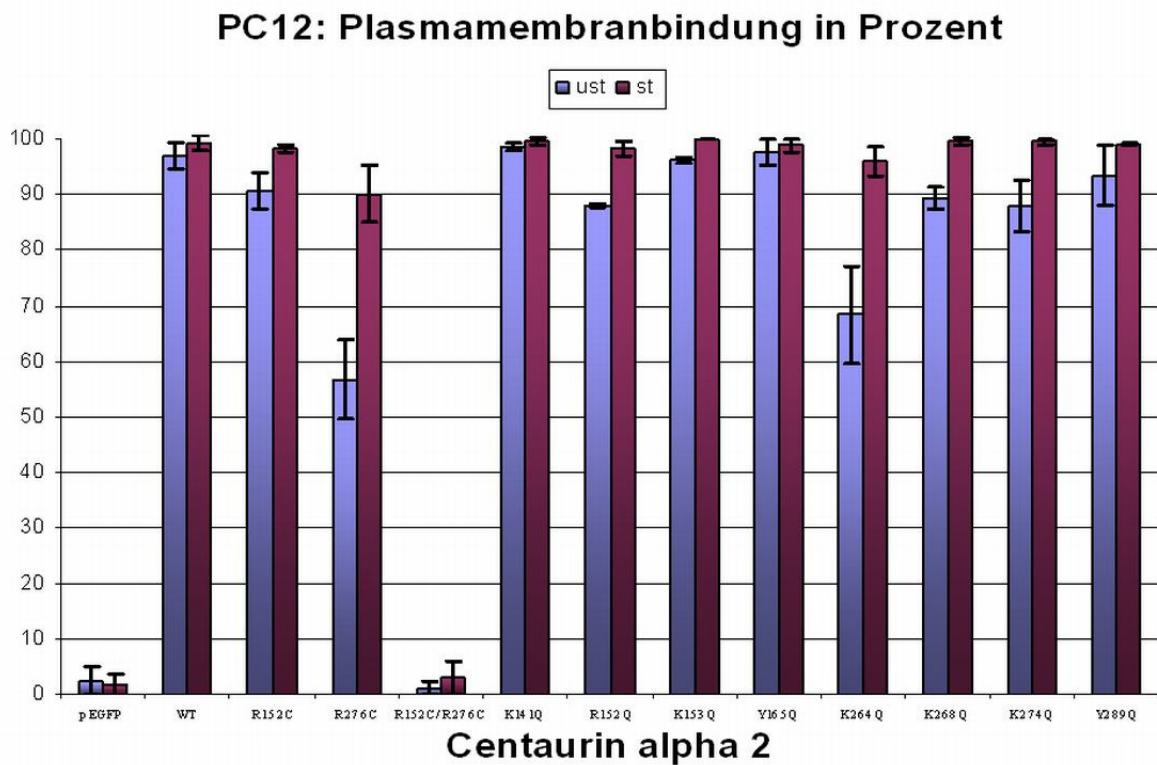


**Abbildung 23: PC12: Centaurin  $\alpha$ 2-Mutanten K274Q und Y289Q stimuliert und unstimuliert**

Die mit der Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante K274Q transfizierten PC12-Zellen haben sowohl in unstimuliertem und stimulierten Zustand eine runde Zellform und bilden nach Zellstimulation geringgradig Pseudopodien aus.

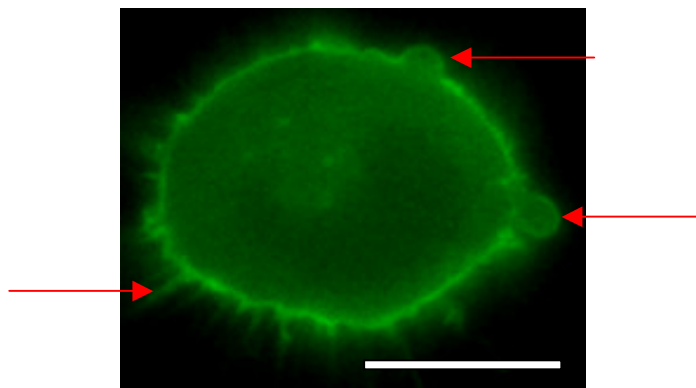
Die PC12-Zellen, die mit der Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante Y289Q transfiziert wurden, sind entrundet und weisen unabhängig vom Stimulationsgrad deutlich Pseudopodien und wenige Focal adhesions auf.





**Abbildung 24:** Graphische Darstellung der Höhe der Plasmamembranbindung von pEGFP-Leervektor, Centaurin  $\alpha 2$  – Wildtyp und seinen Mutanten

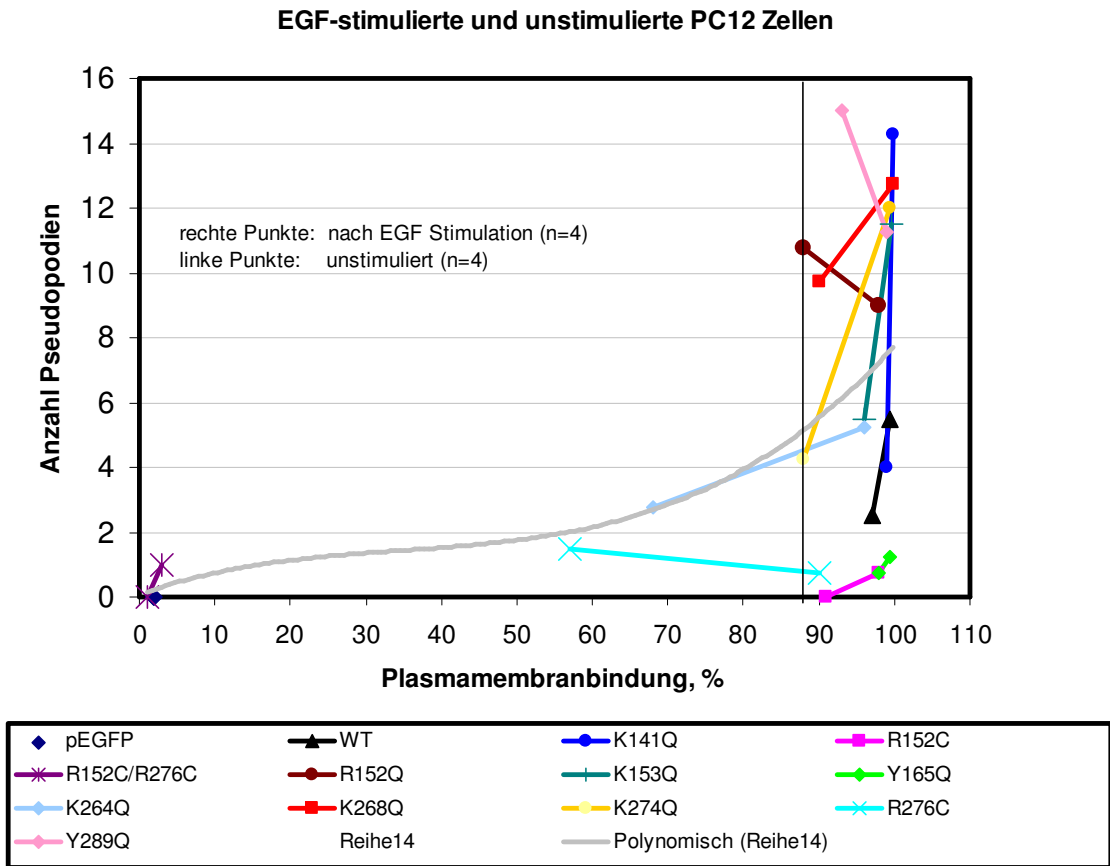
Die beim Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp und einigen Mutanten auffallend häufig ausgeprägten Pseudopodien, die z.B. bei den mit dem pEGFP-Leervektor transfizierten PC12-Zellen überhaupt nicht nachweisbar sind, veranlassten zu einer einfachen Auszählung der Pseudopodien. Gezählt wurden immer nur große, im nicht konfokalen, basisnah fokussierten Bild klar erkennbare Pseudopodien. Deren Anzahl ist aufgrund der Abbildungstechnik und damit ihrer Erkennbarkeit im Vergleich zum konfokalen Messverfahren geringer.



**Abbildung 25:** Pseudopodien (Pfeile) bei unstimulierter, mit dem Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp transfizierter PC12-Zelle, Maßstab entspricht 10 $\mu$ m

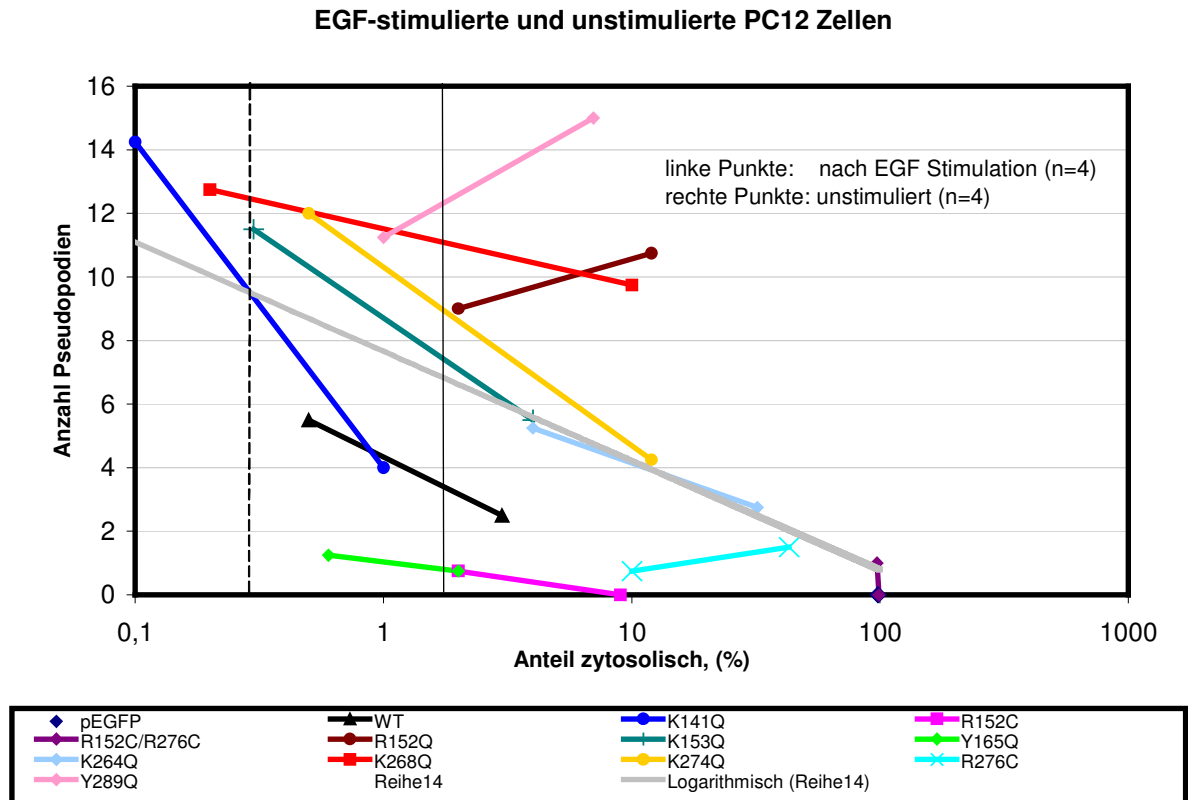
Dies erfolgte bei den jeweils 4 dargestellten Zellen eines jeden Transfektats (pEGFP, Centaurin  $\alpha$ 2-Wildtyp, R152C, R276C, R152C7R276C, K141Q, R152Q, K153Q, Y165Q, K264Q, K268Q, K274Q, Y289Q) und Zellzustandes ( unstimuliert und stimuliert), die dann gemittelt wurden und im Folgenden zur Abschätzung einer möglichen Korrelation zwischen Plasmamembranbindung und Pseudopodienausbildung für die unstimulierten und stimulierten Zellen getrennt graphisch dargestellt werden.

Um eine mögliche Abhängigkeit zwischen Plasmamembranbindung und Pseudopodienausbildung und eine möglicherweise bestehende Mutantenselektivität aufzuzeigen, wurden zwei graphische Darstellungsmöglichkeiten gewählt. Ein numerischer Maßstab dient zur Darstellung der Beziehung zwischen Plasmamembranbindung und Pseudopodienausbildung.



**Abbildung 26:** Abhängigkeit zwischen Anzahl der Pseudopodien  $n$  und dem Grad der Plasamembranbindung in % bei PC 12-Zellen, wobei der EGFP-Leervektor, der Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp und seine Mutanten verschiedenfarbig dargestellt sind. Die im Koordinatensystem rechts angeordneten Punkte entsprechen den spezifischen Werten nach EGF-Stimulation, die linken Punkte verweisen auf den unstimulierten Zellzustand, die jeweilige Verbindungslinie zeigt die Tendenz in Abhängigkeit vom Stimulationsgrad. Die graue Linie entspricht dem Durchschnittswert der im Koordinatensystem aufgetragenen Einzelwerte.

Ein zusätzlich logarithmischer Maßstab wird verwendet zur Fokussierung auf den Anteil cytosolisch gelösten Centaurins und seiner Mutanten in Abhängigkeit vom Stimulationsgrad und gleichzeitig beziehend auf die Pseudopodienausbildungshäufigkeit. Hierbei bedeutet eine Linksverschiebung der Graphen, einen geringen Anteil von cytosolischem Wildtyp- oder mutiertem Centaurin- $\alpha 2$ , gleichbedeutend mit erhöhter Plasamembranbindung.



**Abbildung 27:** Abhängigkeit zwischen Anzahl der Pseudopodien  $n$ , dem Stimulationszustand der PC12-Zellen und dem Grad des zytosolischen Anteils des Proteins in % in logarithmischem Maßstab, wobei der EGFP-Leervektor, der Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp und seine Mutanten verschiedenfarbig dargestellt sind. Die links lokalisierten Punkte einer jeden Farbe entsprechen den Werten der mit EGF stimulierten Zellen, die rechten Punkte denen unstimulierter Zellen, die jeweilige Verbindungslinie zeigt die Tendenz in Abhängigkeit vom Stimulationsgrad. Wenig zytosolisches, d.h. stark plasmamembrangebundenes Protein kommt eher im linken Abschnitt der Graphik zur Darstellung und vice versa.

In den zwei vorangehenden Abbildungen zeigt sich, dass an der Plasmamembran lokalisiertes Centaurin  $\alpha 2$  bei den Trägerzellen häufiger Pseudopodienausbildung induziert und Zellen, die einen hohen Anteil an zytosolisch gelöstem Centaurin aufweisen, kaum Pseudopodien ausbilden. Des weiteren fällt auf, dass EGF-stimulierte Zellen, außer bei den Centaurin  $\alpha 2$ -Mutanten R276C, R152Q und Y289Q immer mehr Pseudopodien ausbilden, als unstimulierte Zellen. Die Mutante K141Q zeigt auch schon ohne EGF-Stimulation eine im Vergleich zum Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp eine höhere Membranaffinität, während die anderen Mutanten im unstimulierten Zustand alle eine geringere Plasmamembranbindung aufweisen, als der Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp.

### 3.3.2 NRK – Zellen

Die in der NRK-Zelllinie durchgeführten Untersuchungen zum Lokalisationsverhalten des Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyps und seiner Mutanten basiert auf derselben Vorgehensweise, wie sie bereits für die PC12-Zellen beschrieben worden ist. Auch hier dient das Verteilungsmuster des Expressionsvektors pEGFP-N1 als von Centaurin  $\alpha 2$  unbeeinflusster Kontrollparameter. Da es sich bei den verwendeten Mutanten um die gleichen handelt, mit denen auch die PC12-Zellen transfiziert wurden, werden sie in den folgenden Abschnitten nicht nochmals vorgestellt.

Zu Beginn der Auswertungen in den NRK-Zellen fiel eine immer wieder zu beobachtende Kernentleerung des Centaurin  $\alpha 2$ -Fusionsproteins hinsichtlich der nukleären Fluoreszenzintensität in seiner nativen, als auch in seiner mutierten Form auf. Die Häufigkeit dieser Erscheinung wurde jeweils nur für die einzelnen unabhängigen Versuche mit ausgezählt und findet sich in einer gesonderten Spalte der ergänzten Tabelle wieder.

#### 3.3.2.1 pEGFP-N1-Leervektor und Centaurin $\alpha 2$ -Wildtyp

Transfektionsprodukt	Plasma- membran- lokalisierung +	Plasma- membran- lokalisierung -	Kern- entleerung +	Sonstige	Zellanzahl
<b>pEGFP I unstimuliert</b>	0,0%	100%	0,0%	0,0%	55
% ohne sonstige	<b>0,0%</b>	<b>100%</b>	-	0,0%	<b>55</b>
<b>pEGFP II unstimuliert</b>	0,0%	98,1%	5,7%	1,9%	53
% ohne sonstige	<b>0,0%</b>	<b>100%</b>	-	0,0%	<b>52</b>
<b>pEGFP III unstimuliert</b>	0,0%	100%	0,0%	0,0%	49
% ohne sonstige	<b>0,0%</b>	<b>100%</b>	-	0,0%	<b>49</b>
Mittelwert	0,0%	100%	1,9%	0,0%	52
Standardabweichung	+/-0,0%	+/-0,0%	-	-	-
Bereich	<b>0,0%</b>	<b>100%</b>			

### 3 Ergebnisse

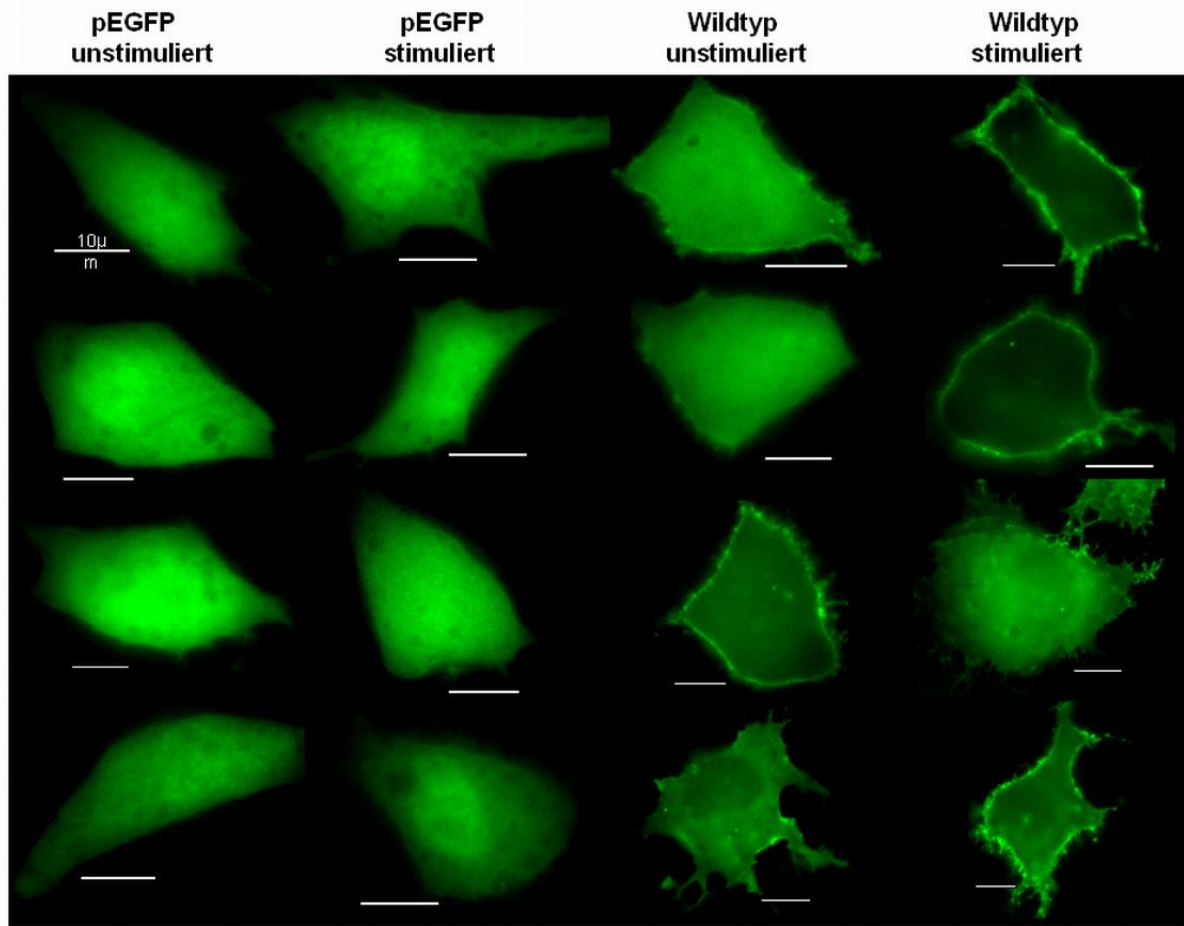
<b>pEGFP I stimuliert</b>	0,0%	96,2%	0,0%	3,9%	52
% ohne sonstige	<b>0,0%</b>	<b>100%</b>	-	0,0%	<b>50</b>
<b>pEGFP II stimuliert</b>	0,0%	100%	0,0%	0,0%	50
% ohne sonstige	<b>0,0%</b>	<b>100%</b>	-	0,00%	<b>50</b>
Mittelwert	0,0%	100%	0,0%	0,0%	50
Standardabweichung	+/- 0,0%	+/- 0,0%	-	-	-
<b>Bereich</b>	<b>0,0%</b>	<b>100%</b>			

Tabelle 25: Transfektion mit pEGFP-Leervektor stimuliert und unstimuliert

Transfektionsprodukt	Plasma- membran- lokalisation +	Plasma- membran- lokalisation -	Kern- entleerung +	Sonstige	Zellanzahl
<b>Wildtyp IV unstimuliert</b>	84,9%	10,3%	4,8%	4,8%	126
% ohne sonstige	<b>89,2%</b>	<b>10,8%</b>	-	0,0%	<b>120</b>
<b>Wildtyp V unstimuliert</b>	93,9%	2,6%	7,9%	3,5%	114
% ohne sonstige	<b>97,3%</b>	<b>2,7%</b>	-	0,0%	<b>110</b>
<b>Wildtyp VI unstimuliert</b>	87,6%	9,3%	13,2%	3,1%	129
% ohne sonstige	<b>90,4%</b>	<b>9,6%</b>	-	0,0%	<b>125</b>
Mittelwert	92,3%	7,7%	8,6%	3,8%	118
Standardabweichung	+/- 0,0	+/- 0,0	-	-	-
<b>Bereich</b>	<b>92,3 – 92,3%</b>	<b>7,7 – 7,7%</b>			

<b>Wildtyp IV stimuliert</b>	96,1%	1,6%	0,8%	2,4%	127
% ohne sonstige	<b>98,4%</b>	<b>1,6%</b>	-	0,0%	<b>124</b>
<b>Wildtyp V stimuliert</b>	100%	0,0%	1,7%	0,0%	116
% ohne sonstige	<b>100%</b>	<b>0,0%</b>	-	0,0%	<b>116</b>
<b>Wildtyp VI stimuliert</b>	98,4%	0,8%	3,3%	0,8%	122
% ohne sonstige	<b>99,2%</b>	<b>0,8%</b>	-	0,0%	<b>121</b>
Mittelwert	99,2%	0,8%	1,9%	1,1%	120
Standardabweichung	+/- 0,0	+/- 0,0	-	-	-
<b>Bereich</b>	<b>99,2 – 99,2%</b>	<b>0,8 – 0,8%</b>			

Tabelle 26: Transfektion mit Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp stimuliert und unstimuliert



**Abbildung 28: NRK: pEGFP-Leervektor und Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp stimuliert und unstimuliert**

Die mit dem Leervektor pEGFP transfizierten NRK-Zellen sind unstimuliert und stimuliert glatt berandet ohne ersichtliche Pseudopodien- oder Focal adhesion-Ausbildung.

Bei Transfektion mit dem Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp sind diese Plasmamembranveränderungen deutlich ausgeprägt und nach Zellstimulation nochmals deutlich verstärkt.

## 3.3.2.2 Mutanten R152C, R276C und R152C/R276C

Transfektionsprodukt	Plasma- membran- lokalisation +	Plasma- membran- lokalisation -	Kern- entleerung +	Sonstige	Zellanzahl
<b>R152C I unstimuliert</b>	71,1%	25,4%	2,8%	3,5%	142
% ohne sonstige	<b>73,7%</b>	<b>26,3%</b>	-	0,0%	<b>137</b>
<b>R152C II unstimuliert</b>	58,5%	38,2%	2,4%	3,3%	123
% ohne sonstige	<b>60,5%</b>	<b>39,5%</b>	-	0,0%	<b>119</b>
<b>R152C III unstimuliert</b>	58,5%	37,4%	15,5%	4,1%	123
% ohne sonstige	<b>61,0%</b>	<b>39,0%</b>	-	0,0%	<b>118</b>
Mittelwert	65,1%	34,9%	6,9%	3,6%	125
Standardabweichung	+/- 7,5	+/- 7,5	-	-	-
Bereich	<b>57,6 – 72,6%</b>	<b>27,4 – 42,4%</b>			

<b>R152C I stimuliert</b>	94,6%	3,9%	0,0%	1,6%	129
% ohne sonstige	<b>96,1%</b>	<b>3,9%</b>	-	0,0%	<b>127</b>
<b>R152C II stimuliert</b>	90,9%	5,2%	0,0%	3,9%	153
% ohne sonstige	<b>94,6%</b>	<b>5,4%</b>	-	0,0%	<b>147</b>
<b>R152C III stimuliert</b>	90,8%	4,2%	5,0%	5,0%	120
% ohne sonstige	<b>95,6%</b>	<b>4,4%</b>	-	0,0%	<b>114</b>
Mittelwert	95,4%	4,6%	1,7%	3,5%	129
Standardabweichung	+/- 0,8	+/- 0,8	-	-	-
Bereich	<b>94,6–96,2%</b>	<b>3,8 – 5,4%</b>			

Tabelle 27: Transfektion mit Centaurin  $\alpha 2$ -Mutante R152C stimuliert und unstimuliert

Transfektionsprodukt	Plasma- membran- lokalisation +	Plasma- membran- lokalisation -	Kern- entleerung +	Sonstige	Zellanzahl
<b>R276C IV unstimuliert</b>	26,3%	71,1%	4,4%	2,6%	114
% ohne sonstige	<b>27,0%</b>	<b>73,0%</b>	-	0,0%	<b>111</b>
<b>R276C II unstimuliert</b>	35,3%	59,0%	3,3%	5,7%	122



### 3 Ergebnisse

% ohne sonstige	<b>37,9%</b>	<b>62,6%</b>	-	0,0%	<b>115</b>
<b>R276C III unstimuliert</b>	32,3%	62,3%	10,0%	5,4%	130
% ohne sonstige	<b>34,2%</b>	<b>65,9%</b>	-	0,0%	<b>123</b>
Mittelwert	33,0%	67,1%	5,9%	4,6%	116
Standardabweichung	+/- 5,5%	+/- 5,5%	-	-	-
Bereich	<b>27,5 – 38,6%</b>	<b>61,6 – 72,7%</b>			

<b>R276C IV stimuliert</b>	72,2%	26,1%	1,7%	2,9%	1115
% ohne sonstige	<b>73,5%</b>	<b>26,6%</b>	-	0,0%	<b>113</b>
<b>R276C II stimuliert</b>	89,6%	6,4%	1,6%	4,0%	125
% ohne sonstige	<b>93,3%</b>	<b>6,7%</b>	-	0,0%	<b>120</b>
<b>R276C III stimuliert</b>	87,4%	7,9%	2,4%	4,7%	127
% ohne sonstige	<b>91,7%</b>	<b>8,3%</b>	-	0,0%	<b>121</b>
Mittelwert	86,1%	13,8%	1,9%	3,9%	118
Standardabweichung	+/- 11,0	+/- 11,0	-	-	-
Bereich	<b>75,1 – 97,1%</b>	<b>2,8 – 24,9%</b>			

Tabelle 28: Transfektion mit Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante R276C stimuliert und unstimuliert

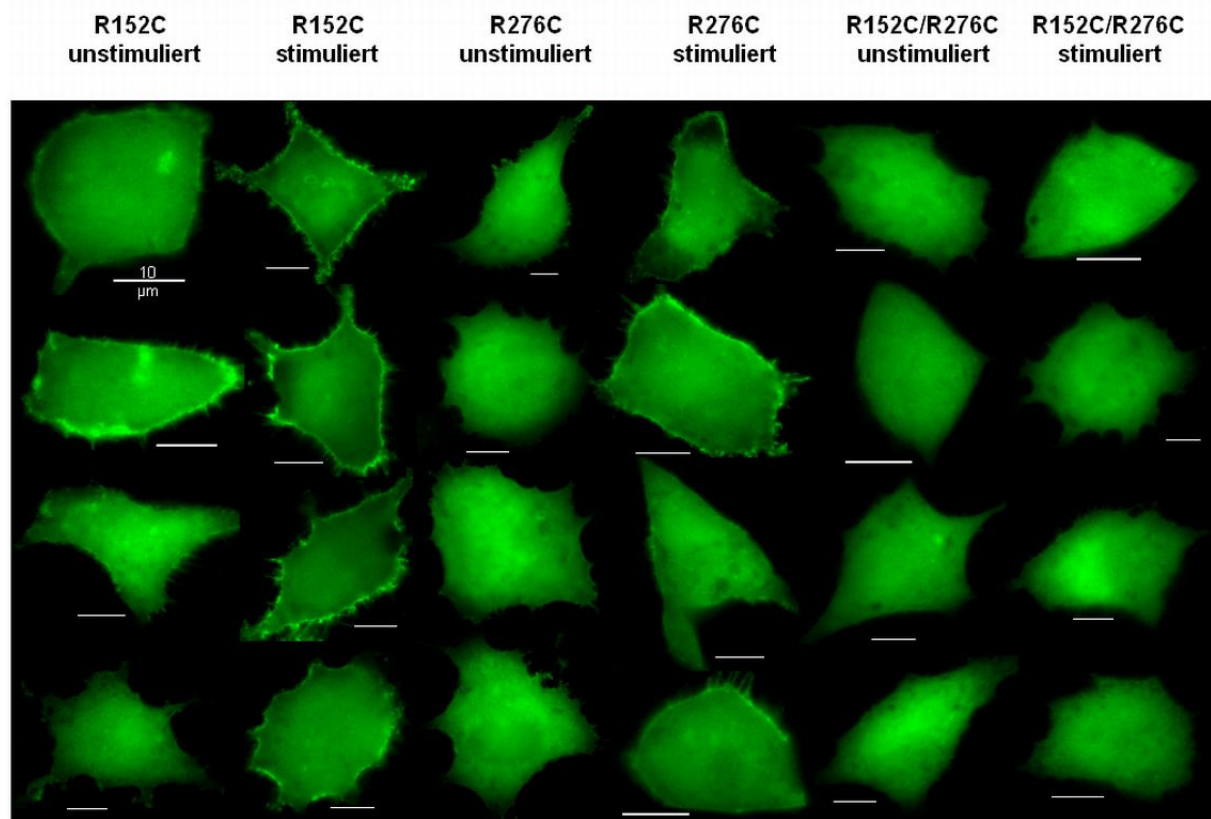
Transfektionsprodukt	Plasma- membran- lokalisation +	Plasma- membran- lokalisation -	Kern- entleerung +	Sonstige	Zellanzahl
<b>R152C/R276C I unst.</b>	0,8%	99,2%	0,0%	0,0%	123
% ohne sonstige	<b>0,8%</b>	<b>99,2%</b>	-	0,0%	<b>123</b>
<b>R152C/R276C II unst.</b>	3,1%	95,3%	2,3%	1,6%	128
% ohne sonstige	<b>3,2%</b>	<b>96,8%</b>	-	0,0%	<b>126</b>
<b>R152C/R276C III unst.</b>	2,1%	95,8%	1,4%	2,1%	143
% ohne sonstige	2,1%	97,9%	-	0,0%	<b>140</b>
Mittelwert	2,0%	98,0%	1,3%	1,2%	130
Standardabweichung	+/- 1,2	+/- 1,2	-	-	-
Bereich	<b>0,9 – 3,2%</b>	<b>96,8 – 99,1%</b>			

<b>R152C/R276C I st.</b>	3,1%	94,5%	0,0%	2,3%	128
% ohne sonstige	<b>3,2%</b>	<b>96,8%</b>	-	0,0%	<b>125</b>

### 3 Ergebnisse

<b>R152C/R276C II st.</b>	3,0%	93,2%	2,3%	3,8%	132
% ohne sonstige	<b>3,2%</b>	<b>96,9%</b>	-	0,0%	<b>127</b>
<b>R152C/R276C III st.</b>	4,8%	92,1%	2,4%	3,2%	126
% ohne sonstige	<b>4,9%</b>	<b>95,1%</b>	-	0,0%	<b>122</b>
Mittelwert	3,8%	96,3%	1,6%	3,1%	125
Standardabweichung	+/- 1,0	+/- 1,0	-	-	-
Bereich	<b>2,8 – 4,8%</b>	<b>95,3 – 97,3%</b>			

**Tabelle 29: Transfektion mit Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante R152C/R276C stimuliert (st.) und unstimuliert (unst.)**



**Abbildung 29: NRK: Centaurin  $\alpha$ 2-Mutanten R152C, R276C und R152C/R276C stimuliert und unstimuliert**

Bei Transfektion der NRK-Zellen mit der Mutante R152C steigt die Anzahl der bereits in unstimuliertem Zustand dezent ausgeprägten Pseudopodien nach Zellstimulation nochmals deutlich.

Die Stoffwechselaktivität macht hinsichtlich der Pseudopodien-Ausbildung bei den mit der Mutante R276C transfizierten NRK-Zellen keinen Unterschied: Sowohl die

### 3 Ergebnisse

unstimulierten, als auch die stimulierten Zellen weisen eine gleichermassen geringe Pseudopodienanzahl auf.

Die Zellen, die mit der Doppelmutante transfiziert wurden, sind vor Stimulation glatt berandet und zeigen danach auch nur eine sehr geringe Pseudozyten-Ausprägung.

#### 3.3.2.3 Mutanten R152Q und K153Q

Transfektionsprodukt	Plasma- membran- lokalisierung +	Plasma- membran- lokalisierung -	Kern- entleerung +	Sonstige	Zellanzahl
<b>R152Q I unstimuliert</b>	69,8%	28,6%	5,9%	1,7%	119
% ohne sonstige	<b>70,9%</b>	<b>29,1%</b>	-	0,0%	<b>117</b>
<b>R152Q II unstimuliert</b>	82,8%	13,1%	2,5%	4,1%	122
% ohne sonstige	<b>86,3%</b>	<b>13,7%</b>	-	0,00%	<b>117</b>
Mittelwert	78,6%	21,4%	4,2%	2,9%	117
Standardabweichung	+/- 10,9	+/- 10,9	-	-	-
<b>Bereich</b>	<b>67,8 – 89,5%</b>	<b>10,5 – 32,3%</b>			

<b>R152Q I stimuliert</b>	96,9%	2,3%	0,8%	0,8%	129
% ohne sonstige	<b>97,7%</b>	<b>2,3%</b>	-	0,0%	<b>128</b>
<b>R152Q II stimuliert</b>	95,2%	3,2%	2,4%	1,6%	126
% ohne sonstige	<b>96,8%</b>	<b>3,2%</b>	-	0,0%	<b>124</b>
Mittelwert	97,2%	2,8%	1,6%	0,8%	126
Standardabweichung	+/- 0,6	+/- 0,6	-	-	-
<b>Bereich</b>	<b>96,6 – 97,9%</b>	<b>2,2 – 3,4%</b>			

Tabelle 30: Transfektion mit Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante R152Q stimuliert und unstimuliert

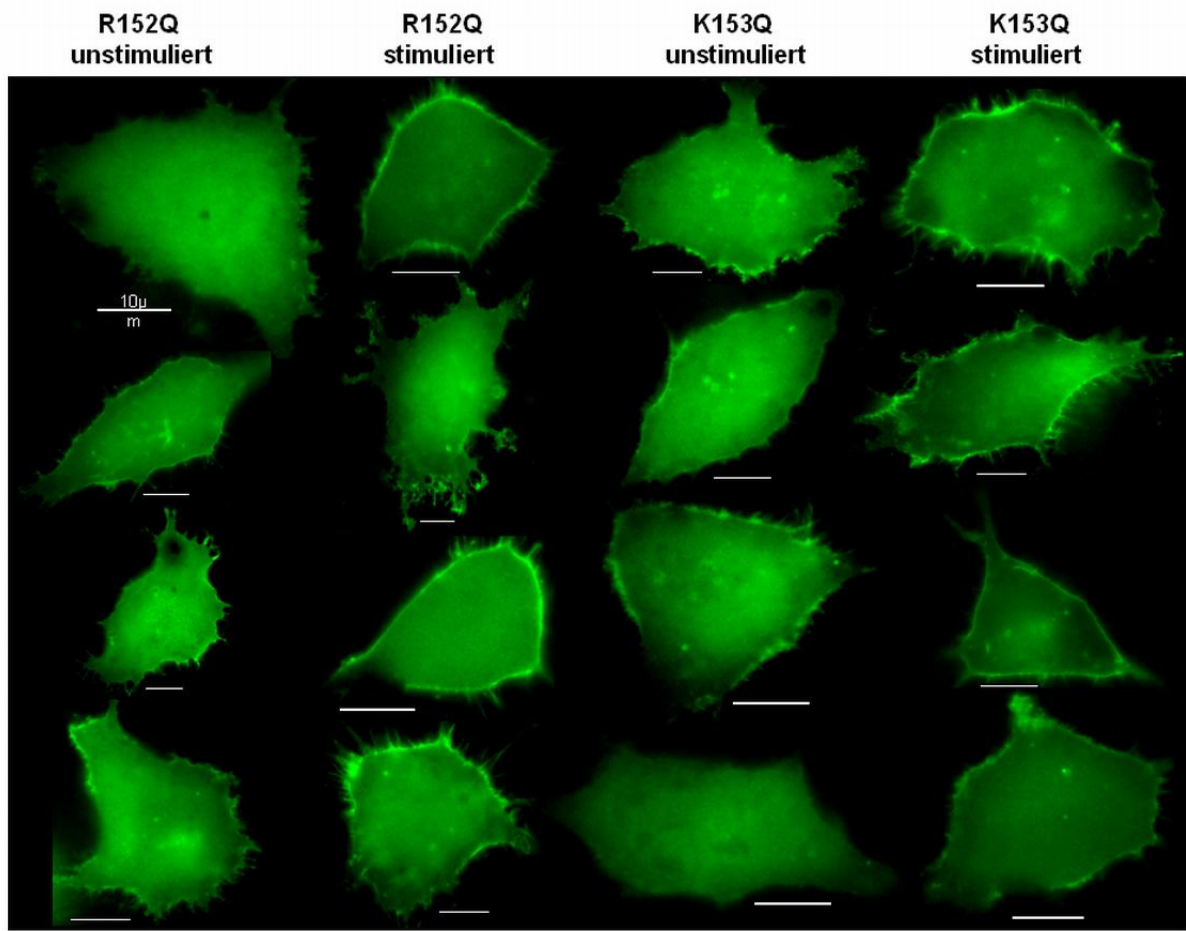
Transfektionsprodukt	Plasma- membran- lokaliation +	Plasma- membran- lokalisierung -	Kern- entleerung +	Sonstige	Zellanzahl
<b>K153Q I unstimuliert</b>	90,8%	6,2%	1,5%	3,1%	130

### 3 Ergebnisse

% ohne sonstige	<b>93,7%</b>	<b>6,4%</b>	-	0,0%	<b>126</b>
<b>K153Q II unstimuliert</b>	77,8%	16,7%	11,1%	5,6%	90
% ohne sonstige	<b>82,4%</b>	<b>17,7%</b>	-	0,0%	<b>85</b>
Mittelwert	88,0%	12,0%	6,3%	4,3%	106
Standardabweichung	+/- 8,0	+/- 8,0	-	-	-
Bereich	<b>80,0 – 96,0%</b>	<b>4,0 – 20,0%</b>			

<b>K153Q I stimuliert</b>	92,3%	3,1%	1,6%	4,7%	129
% ohne sonstige	<b>96,8%</b>	<b>3,3%</b>	-	0,0%	<b>123</b>
<b>K153Q II stimuliert</b>	92,9%	3,2%	9,5%	4,0%	126
% ohne sonstige	96,7%	3,3%	-	0,0%	<b>121</b>
Mittelwert	96,7%	6,6%	5,5%	6,7%	122
Standardabweichung	+/- 0,0	+/- 0,0	-	-	-
Bereich	<b>96,7 – 96,7%</b>	<b>6,6 – 6,6%</b>			

Tabelle 31: Transfektion mit Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante K153Q stimuliert und unstimuliert



**Abbildung 30: NRK: Centaurin  $\alpha$ 2-Mutanten R152Q und K153Q stimuliert und unstimuliert**

Bei den mit den Centaurin  $\alpha$ 2-Mutanten R152Q und K153Q transfizierten NRK-Zellen steigt die im unstimulierten Zustand schon gleichermassen vorhandene Pseudopodien-Ausprägung nach Zellstimulation nachmals deutlich an.

## 3.3.2.4 Mutanten K141Q und Y165Q

Transfektionsprodukt	Plasma- membran- lokalisation +	Plasma- membran- lokalisation -	Kern- entleerung +	Sonstige	Zellanzahl
<b>K141Q I unstimuliert</b>	86,7%	8,6%	2,3%	4,7%	128
% ohne sonstige	<b>91,0%</b>	<b>9,0%</b>	-	0,0%	<b>122</b>
<b>K141Q II unstimuliert</b>	89,3%	9,9%	14,9%	0,8%	121
% ohne sonstige	<b>90,0%</b>	<b>10,0%</b>	-	0,00%	<b>120</b>
Mittelwert	90,5%	9,5%	8,6%	2,8%	121
Standardabweichung	+/- 0,7	+/- 0,7	-	-	-
<b>Bereich</b>	<b>89,8 – 91,2%</b>	<b>8,8 – 10,2%</b>			

<b>K141Q I stimuliert</b>	96,1%	0,8%	0,8%	3,1%	129
% ohne sonstige	<b>99,2%</b>	<b>0,8%</b>	-	0,0%	<b>125</b>
<b>K141Q II stimuliert</b>	96,2%	1,5%	0,8%	2,3%	132
% ohne sonstige	<b>98,5%</b>	<b>1,6%</b>	-	0,0%	<b>129</b>
Mittelwert	98,8%	1,2%	0,8%	2,7%	127
Standardabweichung	+/- 0,5	+/- 0,5	-	-	-
<b>Bereich</b>	<b>98,3 – 99,4%</b>	<b>0,7 – 1,7%</b>			

Tabelle 32: Transfektion mit Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante K141Q stimuliert und unstimuliert

Transfektionsprodukt	Plasma- membran- lokalisation +	Plasma- membran- lokalisation -	Kern- entleerung +	Sonstige	Zellanzahl
<b>Y165Q I unstimuliert</b>	83,6%	13,6%	22,7%	2,7%	110
% ohne sonstige	86,0%	14,0%	-	0,0%	<b>107</b>
<b>Y165Q II unstimuliert</b>	80,9%	11,8%	10,9%	7,3%	110
% ohne sonstige	<b>87,3%</b>	<b>12,8%</b>	-	0,0%	<b>102</b>
Mittelwert	86,6%	13,4%	16,8%	5,0%	105
Standardabweichung	+/- 0,9	+/- 0,9	-	-	-
<b>Bereich</b>	<b>85,7 – 87,5%</b>	<b>12,5 – 14,3%</b>			

### 3 Ergebnisse

<b>Y165Q – I st</b>	89,3%	6,3%	7,1%	4,5%	112
% ohne sonstige	<b>93,5%</b>	<b>6,5%</b>	-	0,0%	<b>107</b>
<b>Y165Q – II st</b>	90,0%	5,5%	0,9%	4,6%	110
% ohne sonstige	<b>94,3%</b>	<b>5,7%</b>	-	0,0%	<b>105</b>
Mittelwert	93,9%	6,1%	4,0%	4,5%	106
Standardabweichung	+/- 0,6	+/- 0,6	-	-	-
Bereich	<b>93,3 – 94,5%</b>	<b>5,5 – 6,7%</b>			

Tabelle 33: Transfektion mit Centaurin  $\alpha 2$ -Mutante Y165Q stimuliert und unstimuliert

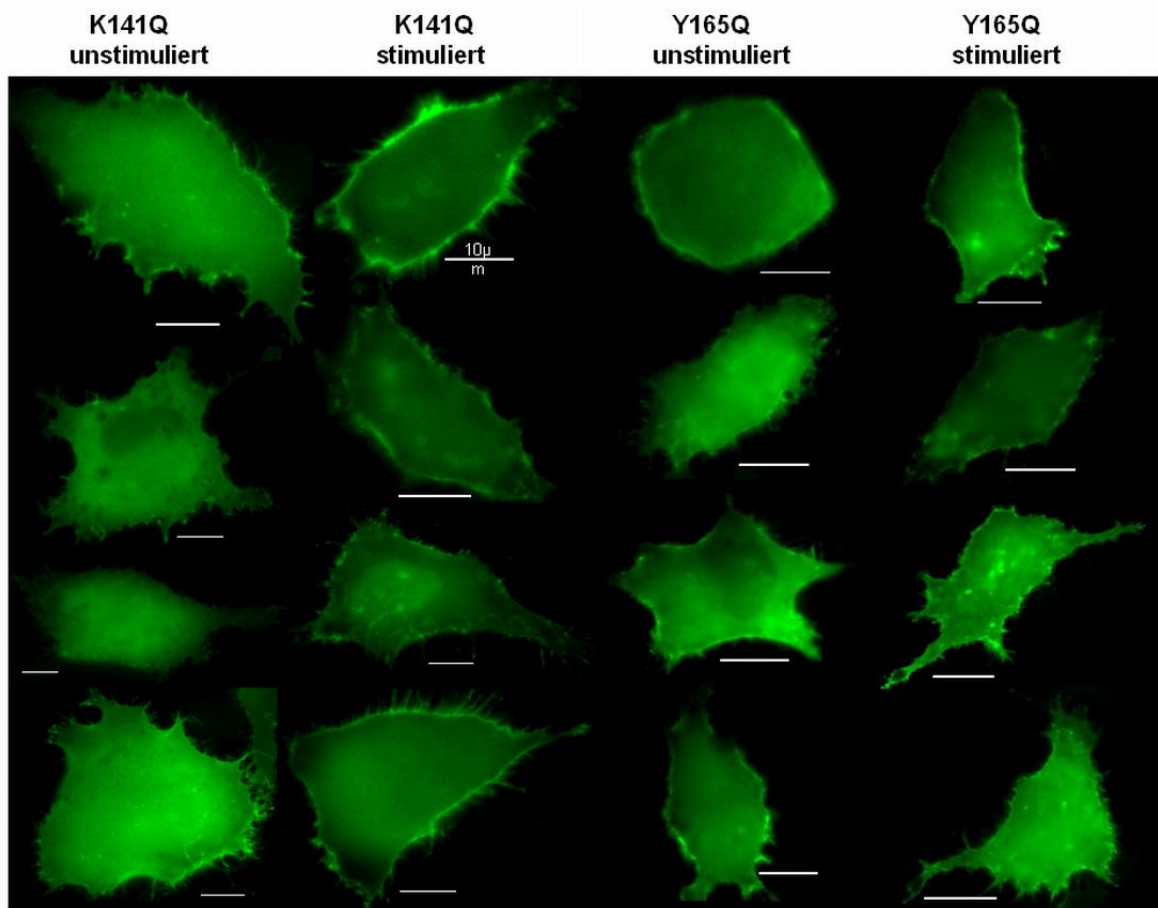


Abbildung 31: NRK: Centaurin  $\alpha 2$ -Mutanten K141Q und Y165Q stimuliert und unstimuliert

Die mit der Mutante K141Q transfizierten Zellen zeigen eine Zunahme der Pseudopodien nach Zellstimulation. Bei den mit der Mutante Y165Q transfizierten NRK-Zellen bleibt der dezente Ausprägungsgrad der Pseudopodien nach Zellstimulation gleich.

## 3.3.2.5 Mutanten K264Q und K268Q

Transfektionsprodukt	Plasma- membran- lokalisation +	Plasma- membran- lokalisation -	Kern- entleerung +	Sonstige	Zellanzahl
<b>K264Q I unstimuliert</b>	48,2%	46,3%	4,6%	5,6%	108
% ohne sonstige	<b>51,0%</b>	<b>49,0%</b>	-	0,0%	<b>102</b>
<b>K264Q III unstimuliert</b>	44,8%	48,3%	5,2%	6,7%	116
% ohne sonstige	<b>48,2%</b>	<b>51,9%</b>	-	0,0%	<b>108</b>
Mittelwert	49,6%	50,4%	4,9%	6,1%	105
Standardabweichung	+/- 2,0	+/- 2,0	-	-	-
<b>Bereich</b>	<b>47,6 – 51,6%</b>	<b>48,4 – 52,4%</b>			

<b>K264Q I stimuliert</b>	62,6%	32,2%	0,0%	5,2%	115
% ohne sonstige	<b>66,1%</b>	<b>33,9%</b>	-	0,0%	<b>109</b>
<b>K264Q III stimuliert</b>	53,9%	41,9%	3,4%	4,3%	117
% ohne sonstige	<b>56,3%</b>	<b>43,8%</b>	-	0,0%	<b>112</b>
Mittelwert	61,2%	38,9%	1,7%	4,8%	106
Standardabweichung	+/- 6,9	+/- 6,9	-	-	-
<b>Bereich</b>	<b>54,2 – 68,1%</b>	<b>31,9 – 45,8%</b>			

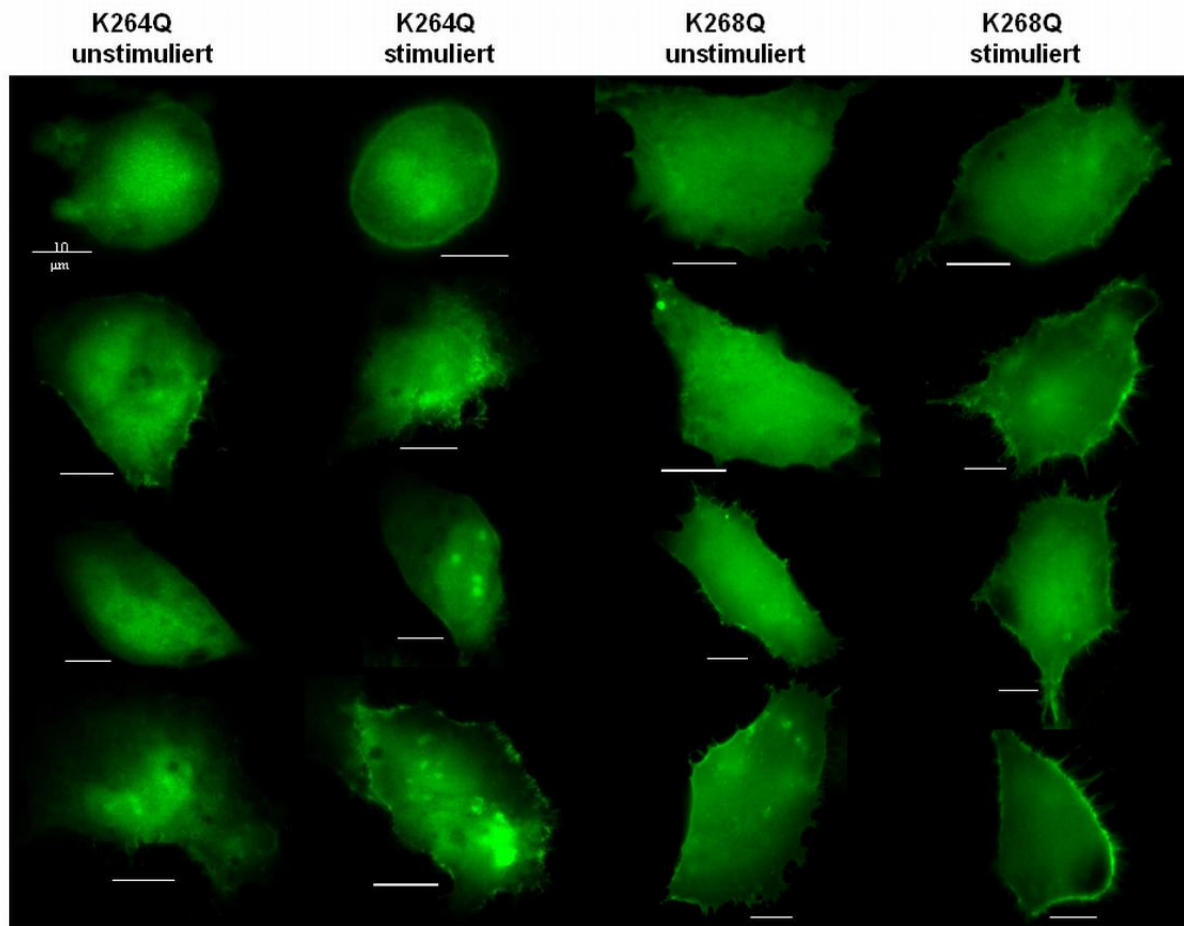
Tabelle 34: Transfektion mit Centaurin  $\alpha 2$ -Mutante K264Q stimuliert und unstimuliert

Transfektionsprodukt	Plasma- membran- lokalisation +	Plasma- membran- lokalisation -	Kern- entleerung +	Sonstige	Zellanzahl
<b>K268Q I unstimuliert</b>	73,5%	19,7%	2,3%	4,6%	132
% ohne sonstige	<b>77,0%</b>	<b>20,6%</b>	-	0,0%	<b>126</b>

<b>K268Q I stimuliert</b>	91,8%	3,7%	0,8%	3,7%	134
% ohne sonstige	<b>95,4%</b>	<b>3,9%</b>	-	0,0%	<b>129</b>

Tabelle 35: Transfektion mit Centaurin  $\alpha 2$ -Mutante K268Q stimuliert und unstimuliert





**Abbildung 32: NRK: Centaurin  $\alpha$ 2-Mutanten K264Q und K268Q stimuliert und unstimuliert**

Die mit der Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante K264Q transfizierten Zellen sind vor EGF-Stimulation glatt berandet und zeigen auch danach nur eine geringgradig Pseudopodien.

Die Zellen, die mit der Mutante K268Q transfiziert wurden, bilden unabhängig von der Zellstimulation in deutlichem Maße Pseudopodien aus.

## 3.3.2.6 Mutanten K274Q und Y289Q

Transfektionsprodukt	Plasma- membran- lokalisation +	Plasma- membran- lokalisation -	Kern- entleerung +	Sonstige	Zellanzahl
<b>K274Q I unstimuliert</b>	72,8%	21,6%	0,0%	5,6%	125
% ohne sonstige	<b>77,1%</b>	<b>22,9%</b>	-	0,0%	<b>118</b>

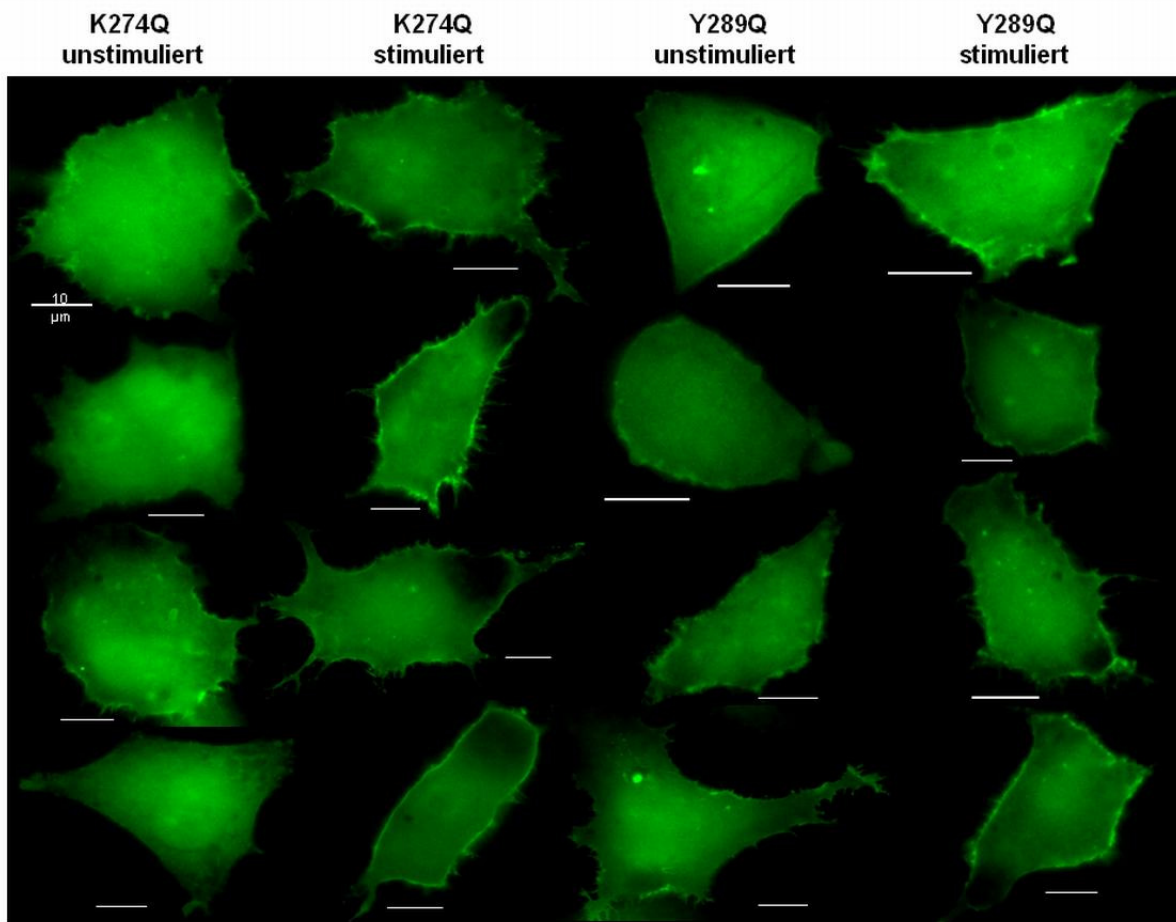
<b>K274Q I stimuliert</b>	91,7%	3,8%	1,5%	3,0%	133
% ohne sonstige	<b>94,6%</b>	<b>3,9%</b>	-	0,0%	<b>129</b>
<b>K274Q II stimuliert</b>	94,1%	3,4%	0,8%	2,5%	119
% ohne sonstige	<b>96,6%</b>	<b>3,5%</b>	-	0,0%	<b>116</b>
Mittelwert	95,6%	3,7%	1,2%	2,8%	123
Standardabweichung	+/- 1,4	+/- 1,4	-	-	-
Bereich	<b>94,2 – 97,0%</b>	<b>2,3– 5,1%</b>			

Tabelle 36: Transfektion mit Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante K274Q stimuliert und unstimuliert

Transfektionsprodukt	Plasma- membran- lokalisation +	Plasma- membran- lokalisation -	Kern- entleerung +	Sonstige	Zellanzahl
<b>Y289Q I stimuliert</b>	92,2%	3,9%	3,1%	3,9%	128
% ohne sonstige	<b>95,9%</b>	<b>4,1%</b>	-	0,0%	<b>123</b>

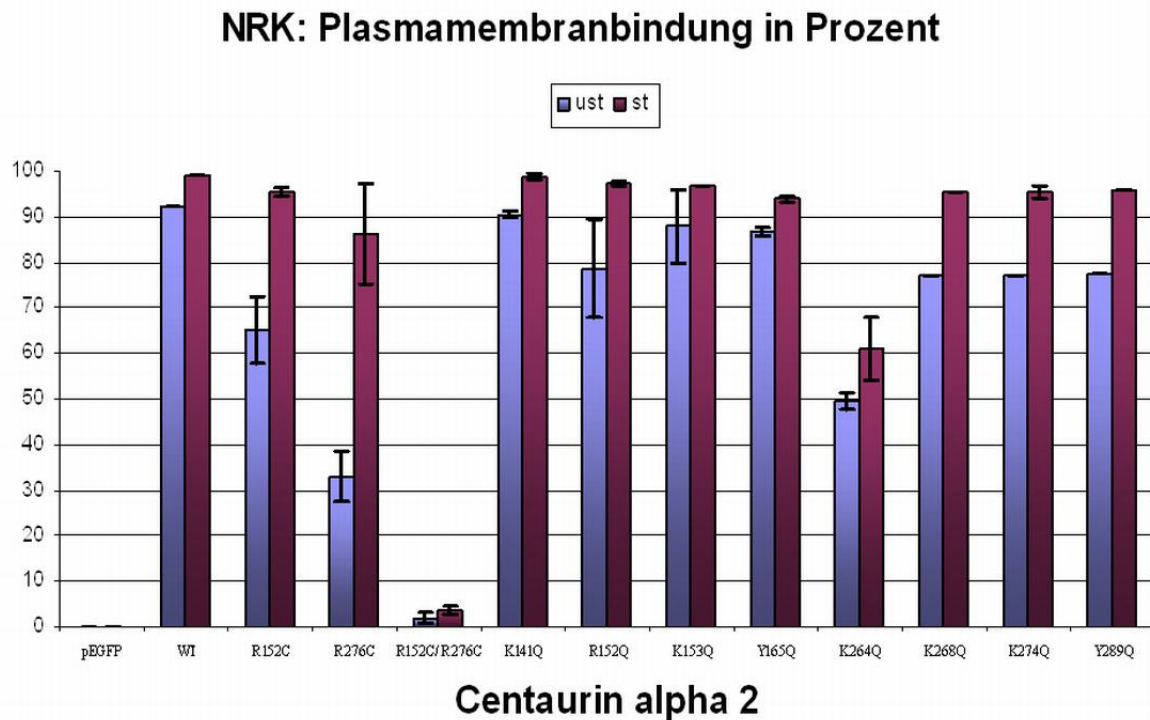
<b>Y289Q I unstimuliert</b>	73,3%	21,5%	2,2%	5,2%	135
% ohne sonstige	<b>77,3%</b>	<b>22,7%</b>	-	0,0%	<b>128</b>

Tabelle 37: Transfektion mit Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante Y289Q stimuliert und unstimuliert



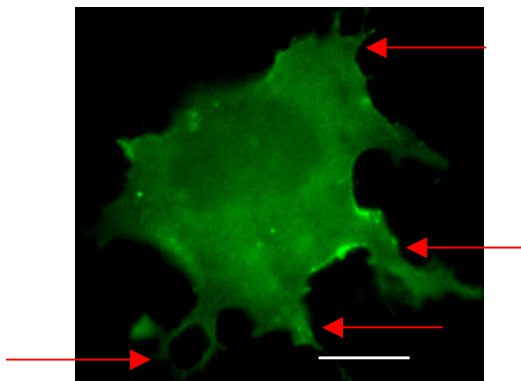
**Abbildung 33: NRK: Centaurin  $\alpha$ 2-Mutanten K274Q und Y289Q stimuliert und unstimuliert**

Die NRK-Zellen, die mit den Centaurin  $\alpha$ 2-Mutanten K274Q und Y289Q transfiziert wurden, weisen schon vor Zellstimulation eine deutliche Pseudopodien-Ausprägung auf, die sich nach EGF-Inkubation nochmals verstärkt.



**Abbildung 34:** Graphische Darstellung der Höhe der Plasmamembranbindung von pEGFP-Leervektor, Centaurin  $\alpha 2$  – Wildtyp und seinen Mutanten

Die schon in den PC12-Zellen bei einer Zahl von transfizierten Zellen aufgefallenen Pseudopodien, waren bei den NRK-Zellen im Vergleich noch stärker ausgeprägt, sodass auch hier eine einfache Auszählung der Pseudopodien durchgeführt wurde.

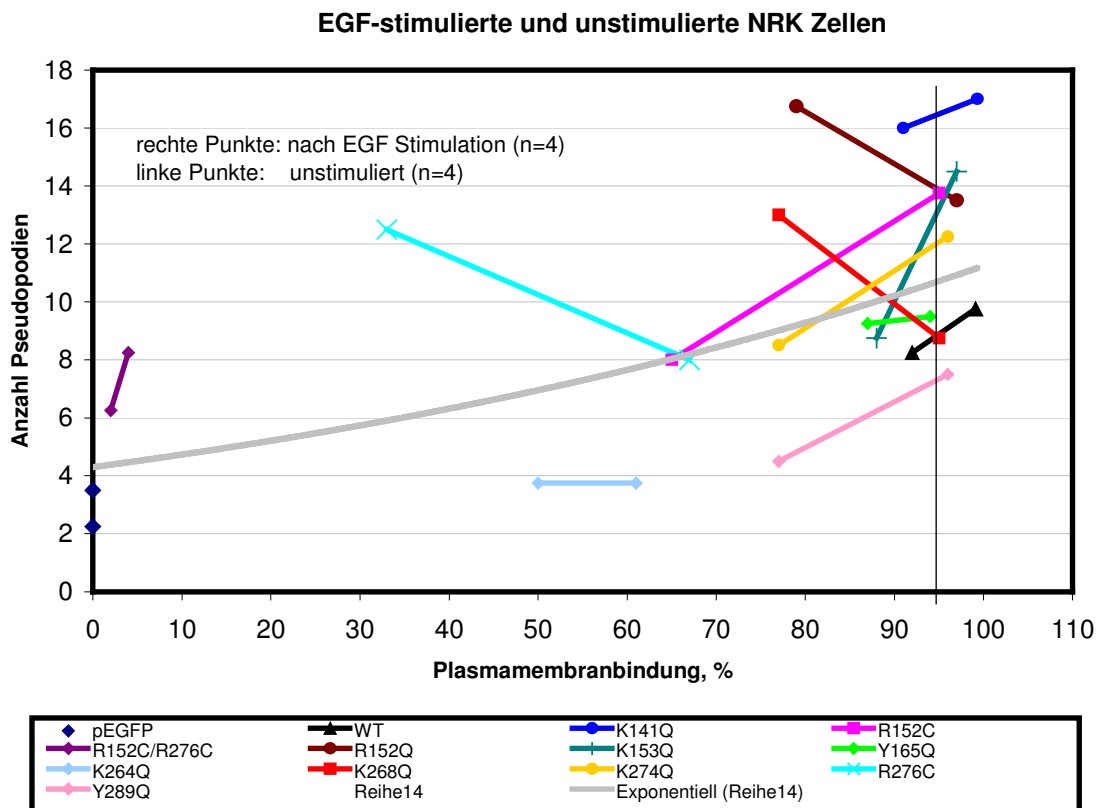


**Abbildung 35:** Pseudopodien (Pfeile) bei unstimulierter, mit dem Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp transfizierter NRK-Zelle, Maßstab entspricht 10 $\mu$ m

Wie schon für die PC12-Zellen erfolgte diese Zählung bei den jeweils 4 dargestellten Zellen eines jeden Transfektats (pEGFP, Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp, R152C, R276C, R152C/R276C, K141Q, R152Q, K153Q, Y165Q, K264Q, K268Q, K274Q, Y289Q)

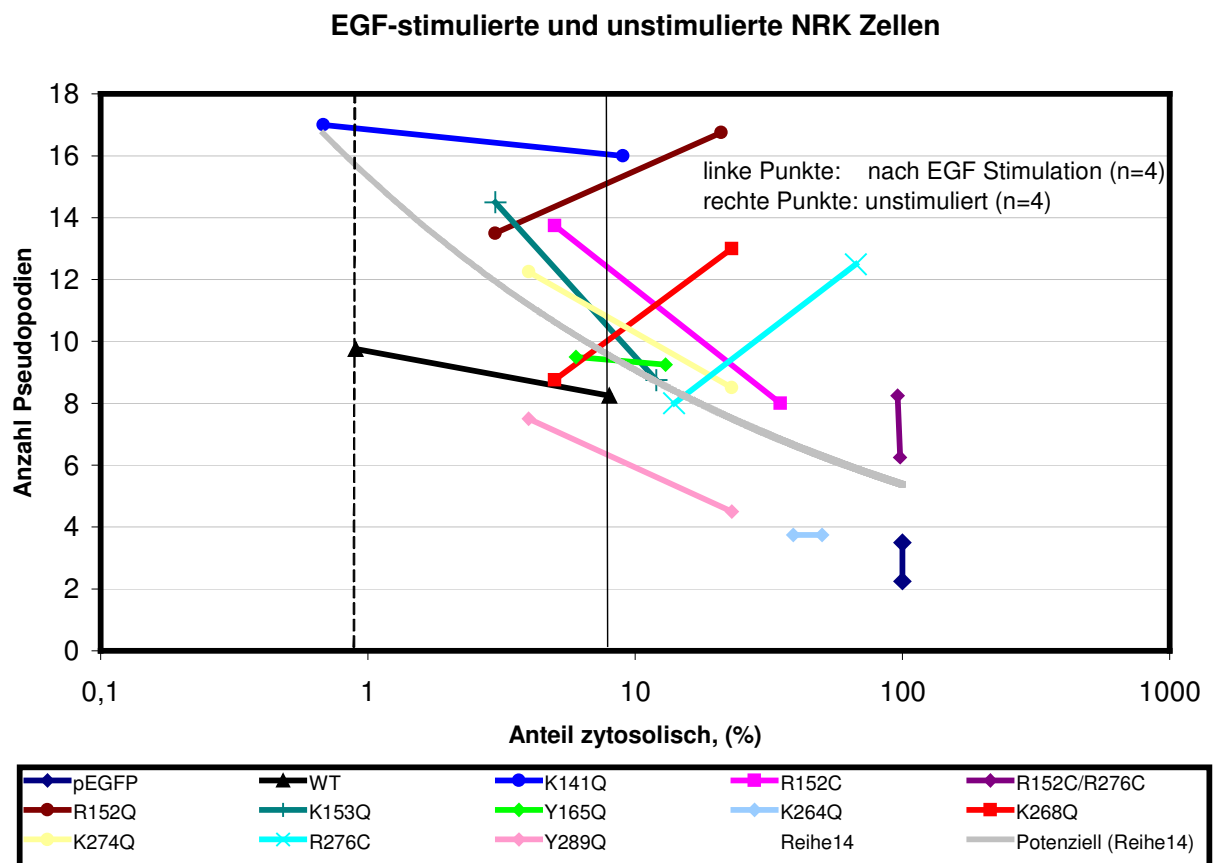
### 3 Ergebnisse

und Zellzustandes ( unstimuliert und stimuliert), die dann gemittelt wurden und im Folgenden zur Abschätzung einer möglichen Korrelation zwischen Plasmamembranbindung und Pseudopodienausbildung für die unstimulierten und stimulierten Zellen getrennt, sowohl polynomisch, als auch logarithmisch graphisch dargestellt werden.



**Abbildung 36:** Abhängigkeit zwischen Anzahl der Pseudopodien  $n$  und dem Grad der Plasmamembranbindung in % bei NRK-Zellen, wobei der EGFP-Leervektor, der Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp und seine Mutanten verschiedenfarbig dargestellt sind. Die im Koordinatensystem rechts angeordneten Punkte entsprechen den spezifischen Werten nach EGF-Stimulation, die linken Punkte verweisen auf den unstimulierten Zellzustand, die jeweilige Verbindungslinie zeigt die Tendenz in Abhängigkeit vom Stimulationsgrad. Die graue Linie entspricht dem Durchschnittswert der im Koordinatensystem aufgetragenen Einzelwerte.

Der zusätzlich verwendete logarithmische Maßstab dient zur Fokussierung auf den Anteil cytosolisch gelösten Centaurins und seiner Mutanten in Abhängigkeit vom Stimulationsgrad und gleichzeitig nimmt gleichzeitig Bezug auf die Pseudopodienausbildungshäufigkeit. Hierbei bedeutet eine Linksverschiebung der Graphen, einen geringen Anteil von cytosolischem Wildtyp- oder mutiertem Centaurin- $\alpha 2$ , gleichbedeutend mit erhöhter Plasmamembranbindung.



**Abbildung 37:** Abhängigkeit zwischen Anzahl der Pseudopodien  $n$ , dem Stimulationszustand der NRK-Zellen und dem Grad des zytosolischen Anteils des Proteins in % in logarithmischem Maßstab, wobei der EGFP-Leervektor, der Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp und seine Mutanten verschiedenfarbig dargestellt sind. Die links lokalisierten Punkte einer jeden Farbe entsprechen den Werten der mit EGF stimulierten Zellen, die rechten Punkte denen unstimulierter Zellen, die jeweilige Verbindungslinie zeigt die Tendenz in Abhängigkeit vom Stimulationsgrad. Wenig zytosolisches, d.h. stark plasmamembrangebundenes Protein kommt eher im linken Abschnitt der Graphik zur Darstellung und vice versa.

Auch bei den NRK-Zellen zeigt sich in den voranstehenden Graphiken, dass der Grad der Plasmamembranbindung mit der Pseudopodienausbildung korreliert. Ausser bei den Mutanten R276C, R268Q und R152Q führt eine EGF-Stimulation zu einem erhöhten Ausprägungsgrad der Pseudopodien, wobei hier die Mutanten K141Q und Y165Q bereits im unstimulierten Zustand im Vergleich zum Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp häufiger Pseudopodien ausbilden.

### **3.4 Berechnung von Fluoreszenzprofilen aus nicht-konfokalen, epifluoreszenzmikroskopischen Datensätzen**

Die Auszählung und tabellarisch unter Kapitel 3.3 zusammengefassten epifluoreszenzmikroskopisch erstellten Datensätze erfolgte unter qualitativen Gesichtspunkten. Zum einen diente es der Beurteilung einer vorhandenen oder nicht vorhandenen Plasmamembranbindung des Centaurin  $\alpha 2$  und seiner Mutanten, unabhängig von dessen Intensitätsgrad, und zum anderen konnte so eine grobe Einschätzung des Erfolges in der Versuchsdurchführung vorgenommen werden. Wenn die so erhaltenen Daten eines unabhängigen Versuches im Vergleich zu den Datensätzen eines anderen unabhängigen Versuches mit demselben Fusionsprotein deutliche Abweichungen zeigten, musste die Möglichkeit eines Versuchsfehlers in Betracht gezogen werden und die Verwertung der Daten neu diskutiert bzw. ausgeschlossen werden.

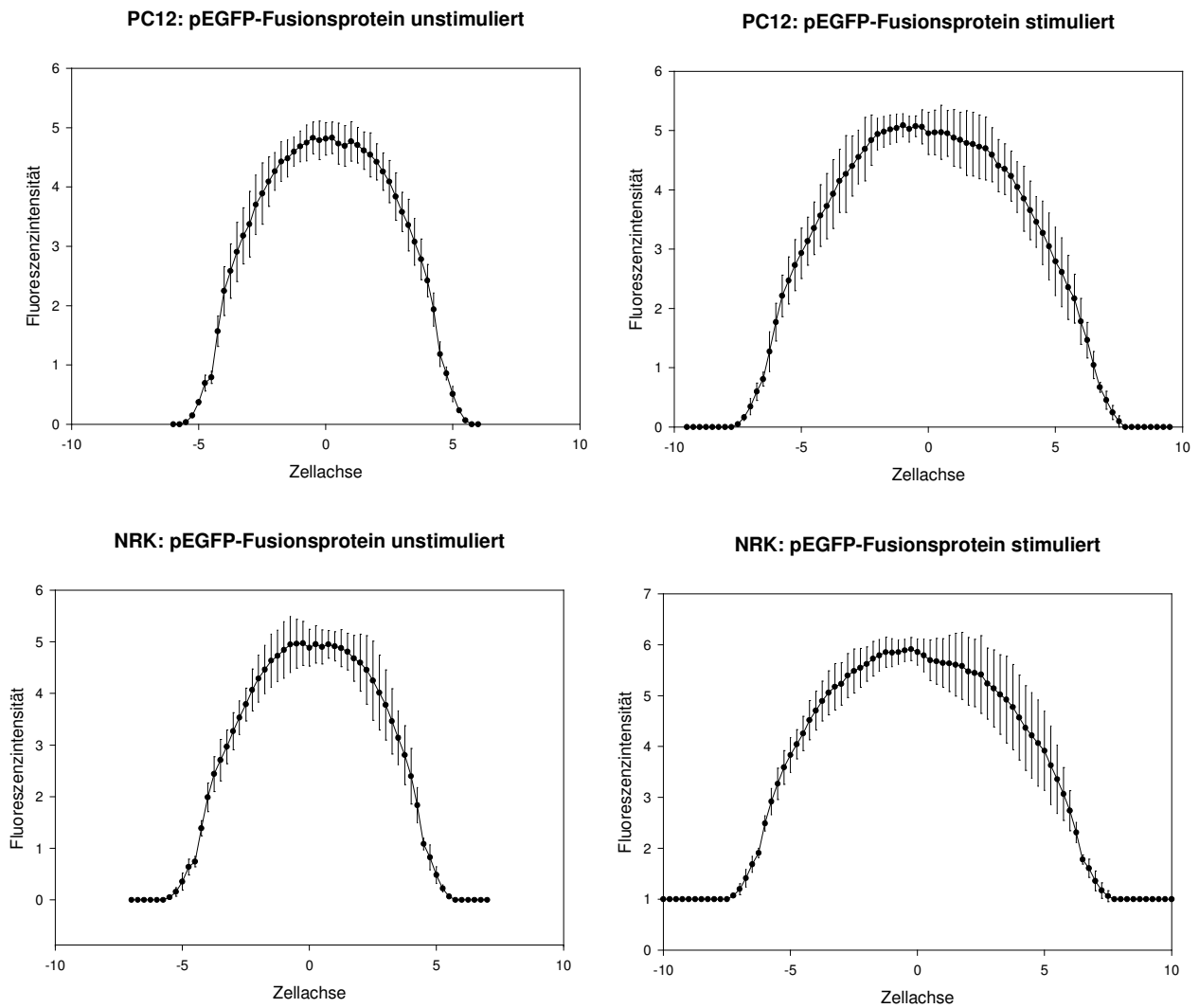
Im Zentrum des Interesses der epifluoreszenzmikroskopisch generierten Daten stand nun die Fluoreszenzintensität über die Zellen, d.h. wie messbar hoch der Grad der Plasmamembranlokalisation des Centaurin  $\alpha 2$  und seiner Mutanten in den Zellen tatsächlich ist.

Das quantitative Messverfahren gliedert sich in mehrere Schritte, zu denen jeweils unterschiedliche Softwareprogramme benötigt wurden. Aus einer Stichprobenauswahl von 12 Zellen für jeden Zellstoffwechsellzustand (unstimuliert, stimuliert) und jeden unabhängigen Versuch (I bis max. III) wurde mit Hilfe des Programms ImageJ und hier mittels Scannen des Zellkörpers in einer Ebene ein Fluoreszenzprofil der untersuchten Zelle generiert. Der Datensatz dieses Profils wurde folglich in ein Programm geschrieben und als Transform in SigmaPlot 8.0 übertragen. Dieses Programm berechnete aus dem Kollektiv der zusammengehörigen Daten (Datensätze von 12 einzeln gescannten Zellen) ein mittleres Fluoreszenzprofil über den Zelldurchmesser.

Dieses Endprodukt der Messung ermöglicht einen direkten Vergleich der einzelnen Verteilungsmuster- und Intensitäten des Centaurin  $\alpha 2$  Wildtyps und seiner Mutanten innerhalb einer Zelllinie, als auch zwischen der PC12- und der NRK-Zelllinie.

### 3 Ergebnisse

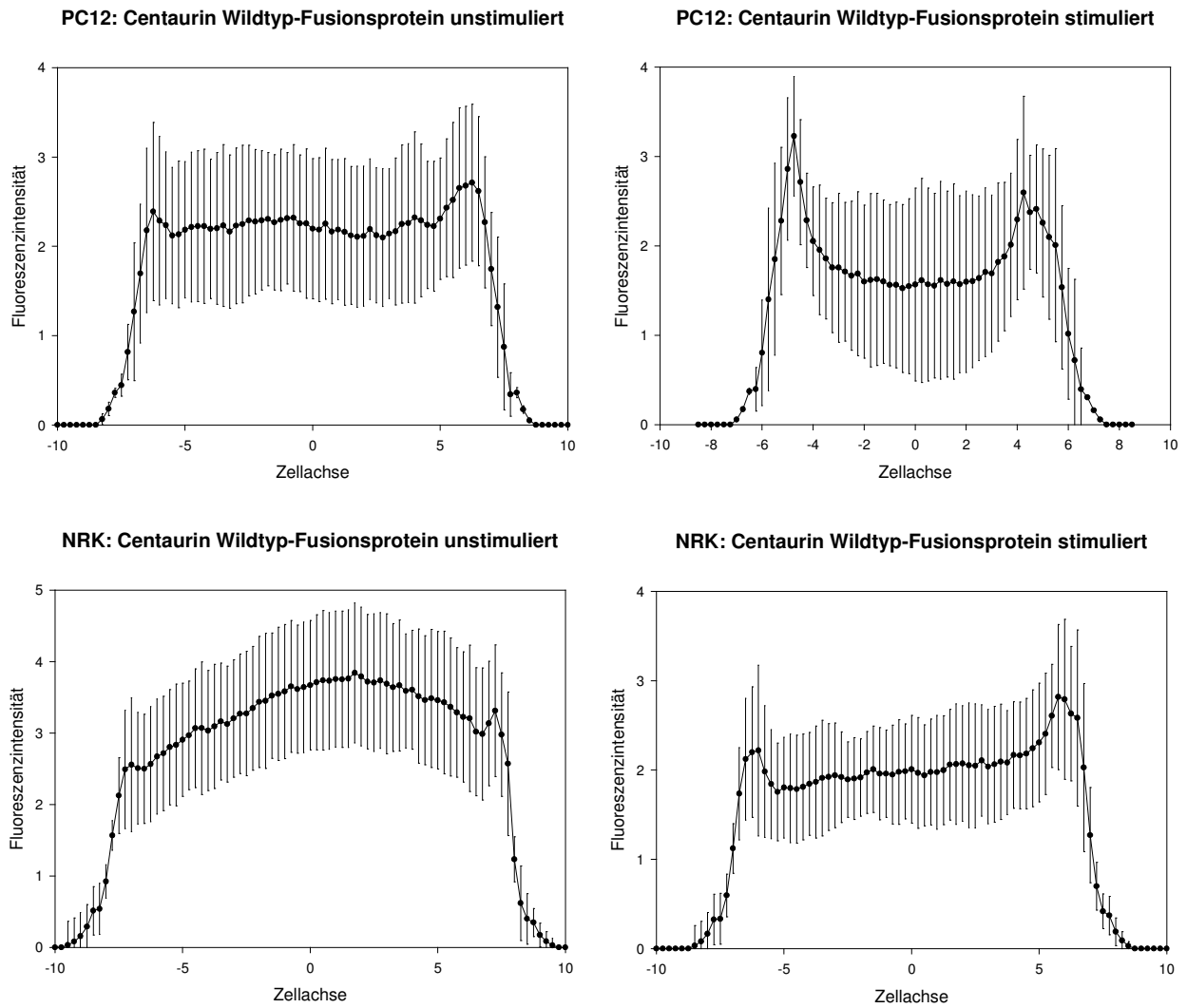
Im Folgenden sind die Fluoreszenzprofile des Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyps, seiner Mutanten und der Negativ-Kontrolle pEGFP dargestellt. Dabei werden die jeweiligen Profile unstimulierter und stimulierter PC12-Zellen den Fluoreszenzprofilen der NRK-Zellen zum besseren visuellen Vergleich gegenübergestellt.



**Abbildung 38: Fluoreszenzprofile des pEGFP-Fusionsproteins in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert**

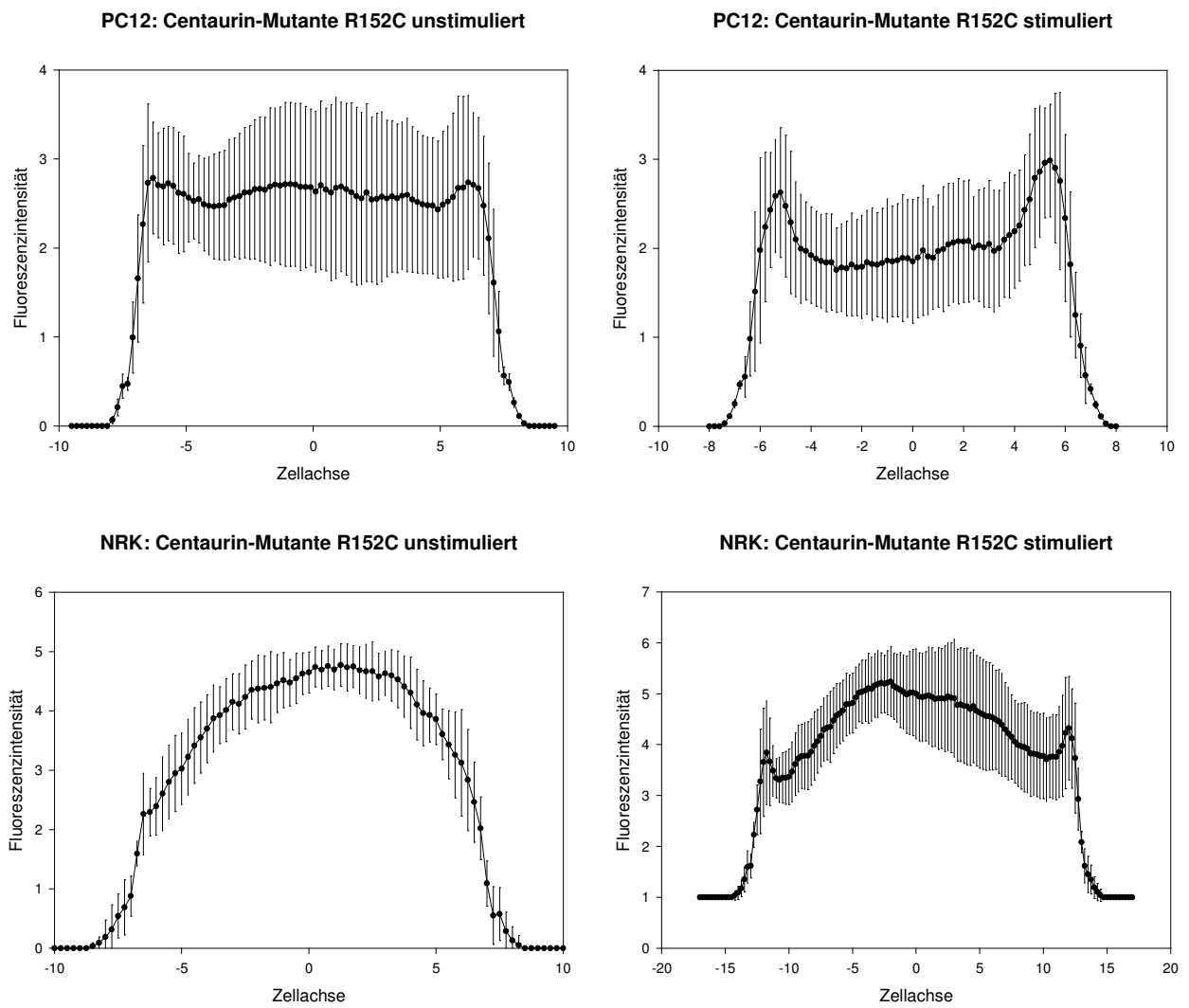


### 3 Ergebnisse



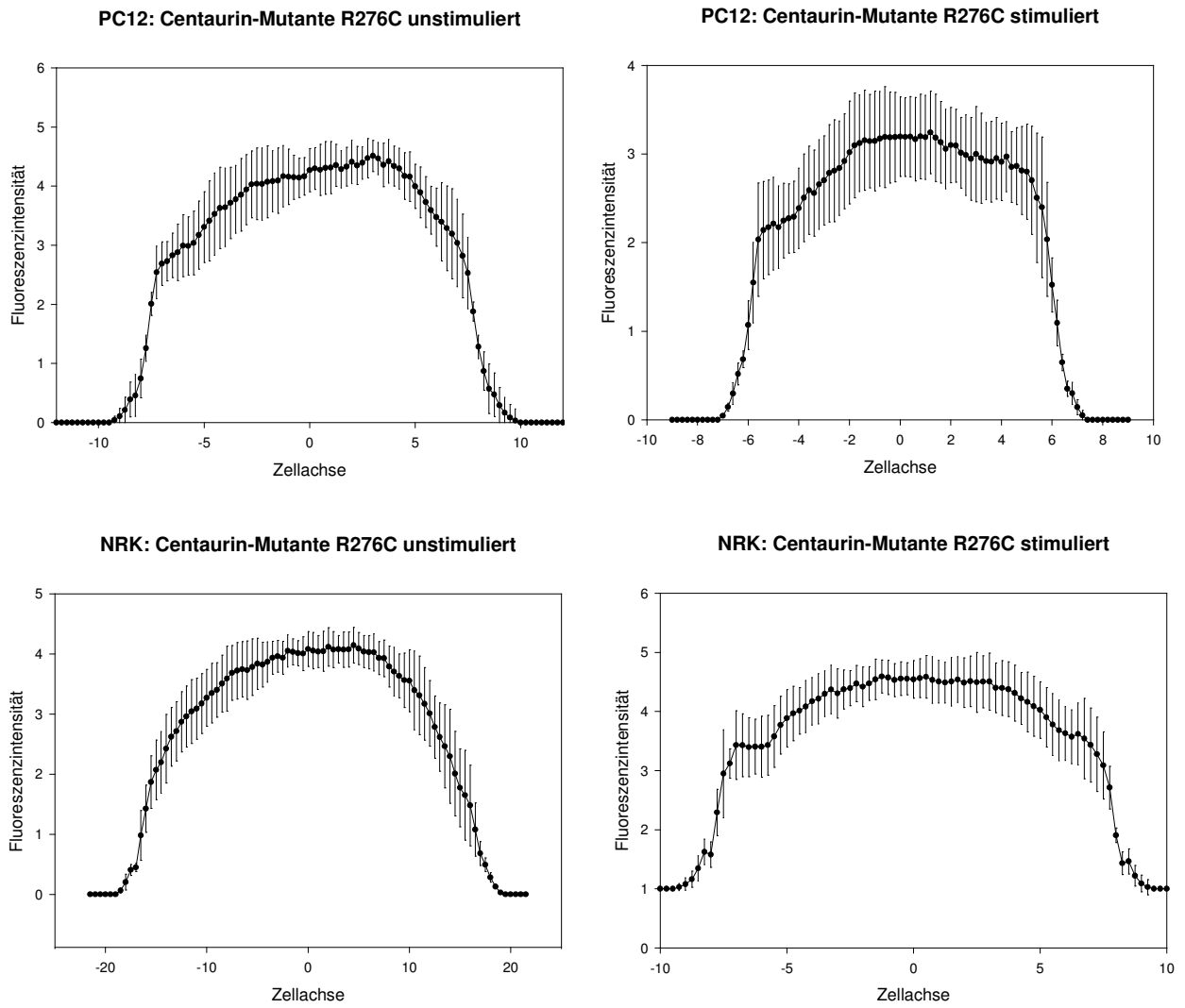
**Abbildung 39** Fluoreszenzprofile des Centaurin  $\alpha 2$  – Wildtyp-Fusionsproteins in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert

### 3 Ergebnisse



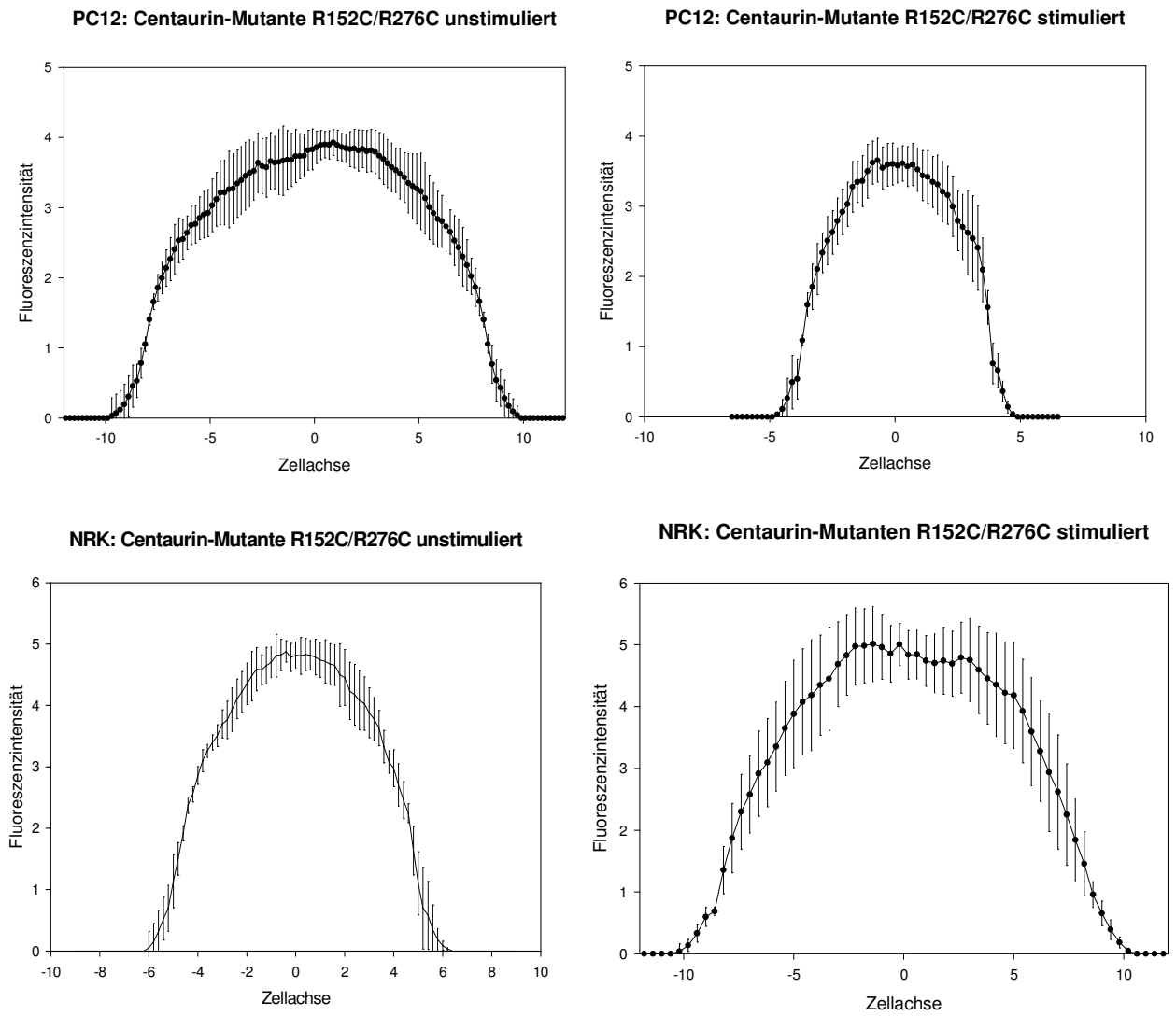
**Abbildung 40** Fluoreszenzprofile der Centaurin  $\alpha 2$ -Mutante R152C in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert

### 3 Ergebnisse



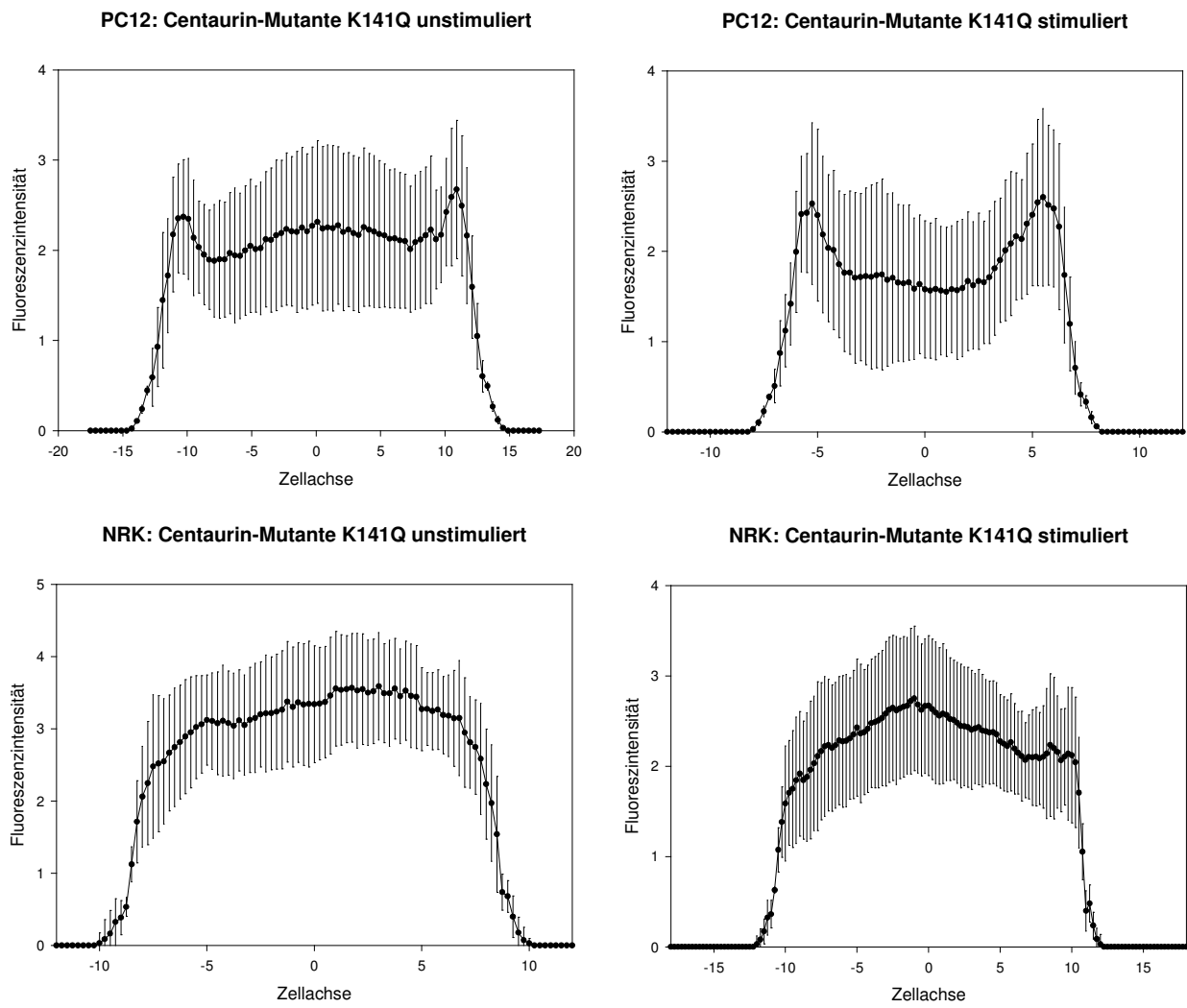
**Abbildung 41: Fluoreszenzprofile der Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante R276C in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert**

### 3 Ergebnisse



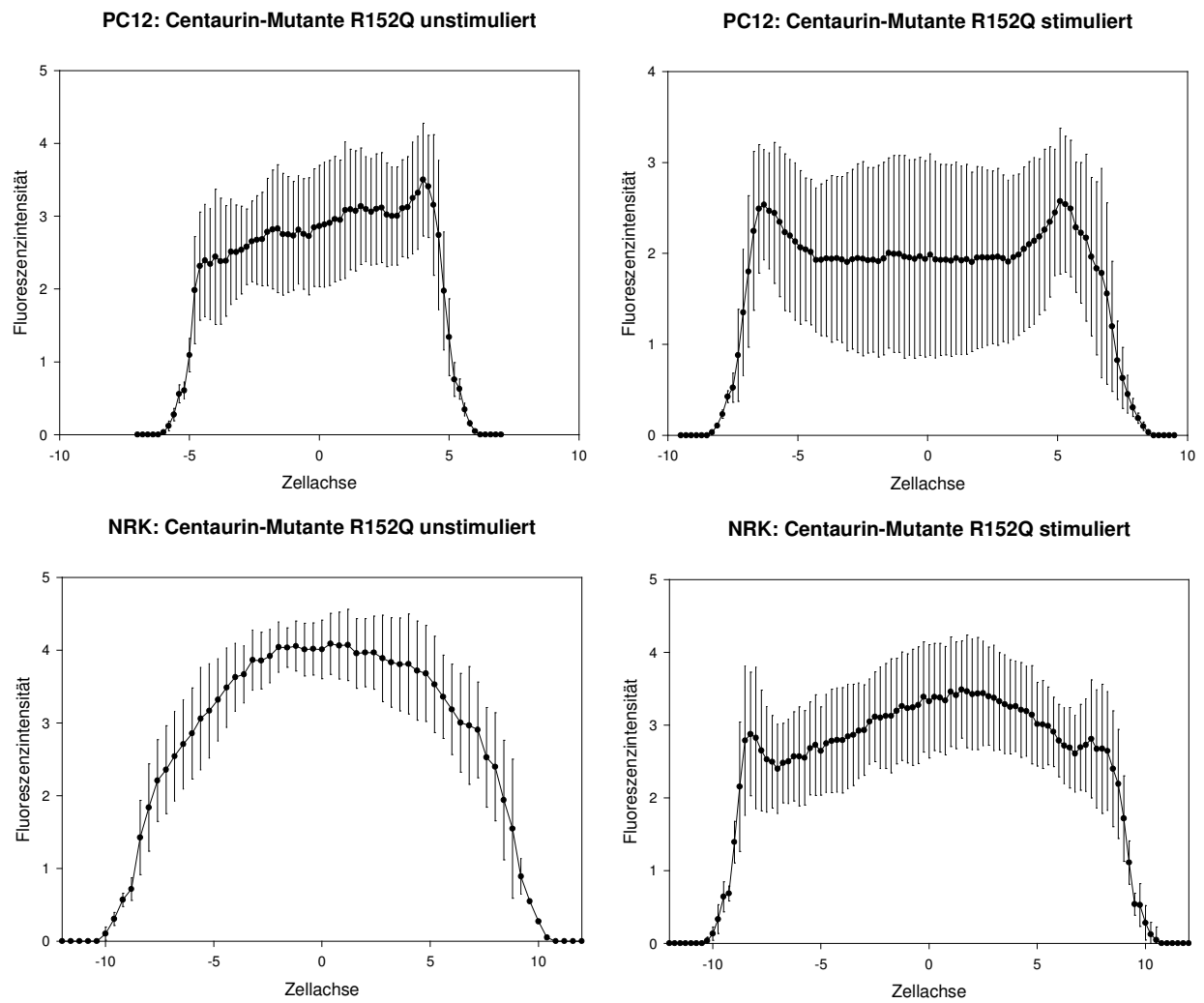
**Abbildung 42: Fluoreszenzprofile der Centaurin  $\alpha 2$ -Mutante R152C/R276C in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert**

### 3 Ergebnisse



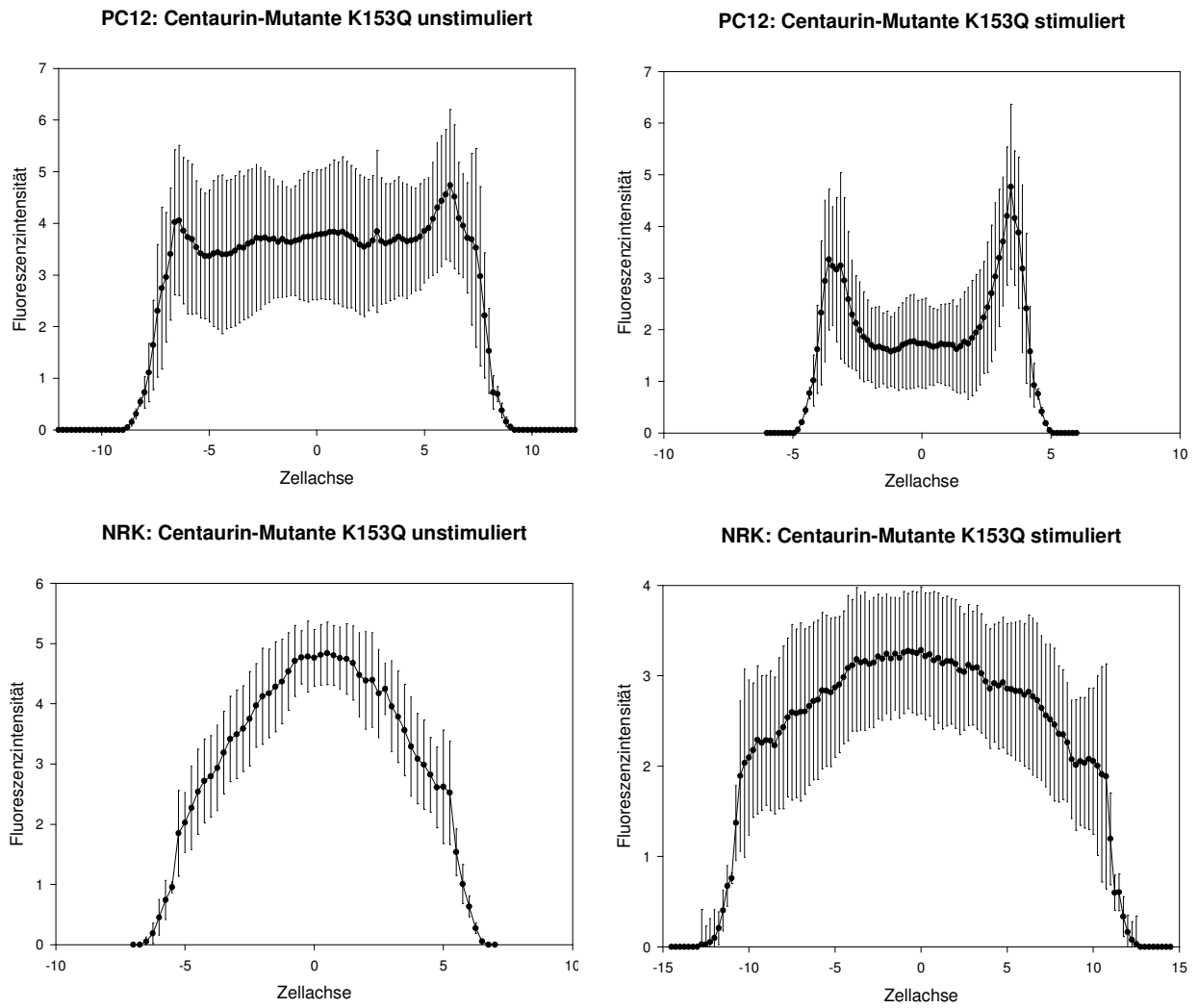
**Abbildung 43: Fluoreszenzprofile der Centaurin  $\alpha 2$ -Mutante K141Q in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert**

### 3 Ergebnisse



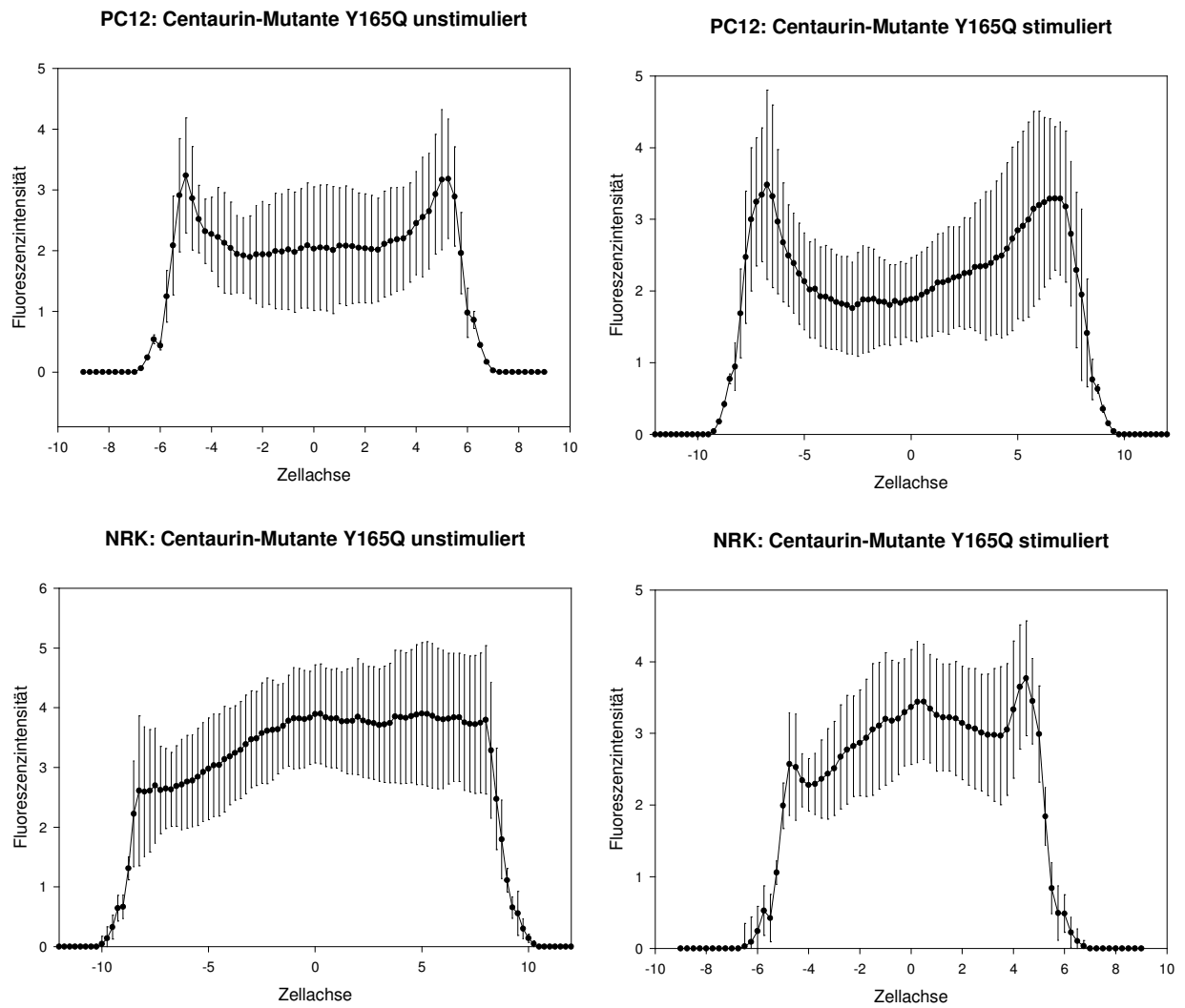
**Abbildung 44: Fluoreszenzprofile der Centaurin  $\alpha 2$ -Mutante R152Q in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert**

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 45: Fluoreszenzprofile der Centaurin  $\alpha 2$ -Mutante K153Q in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert**

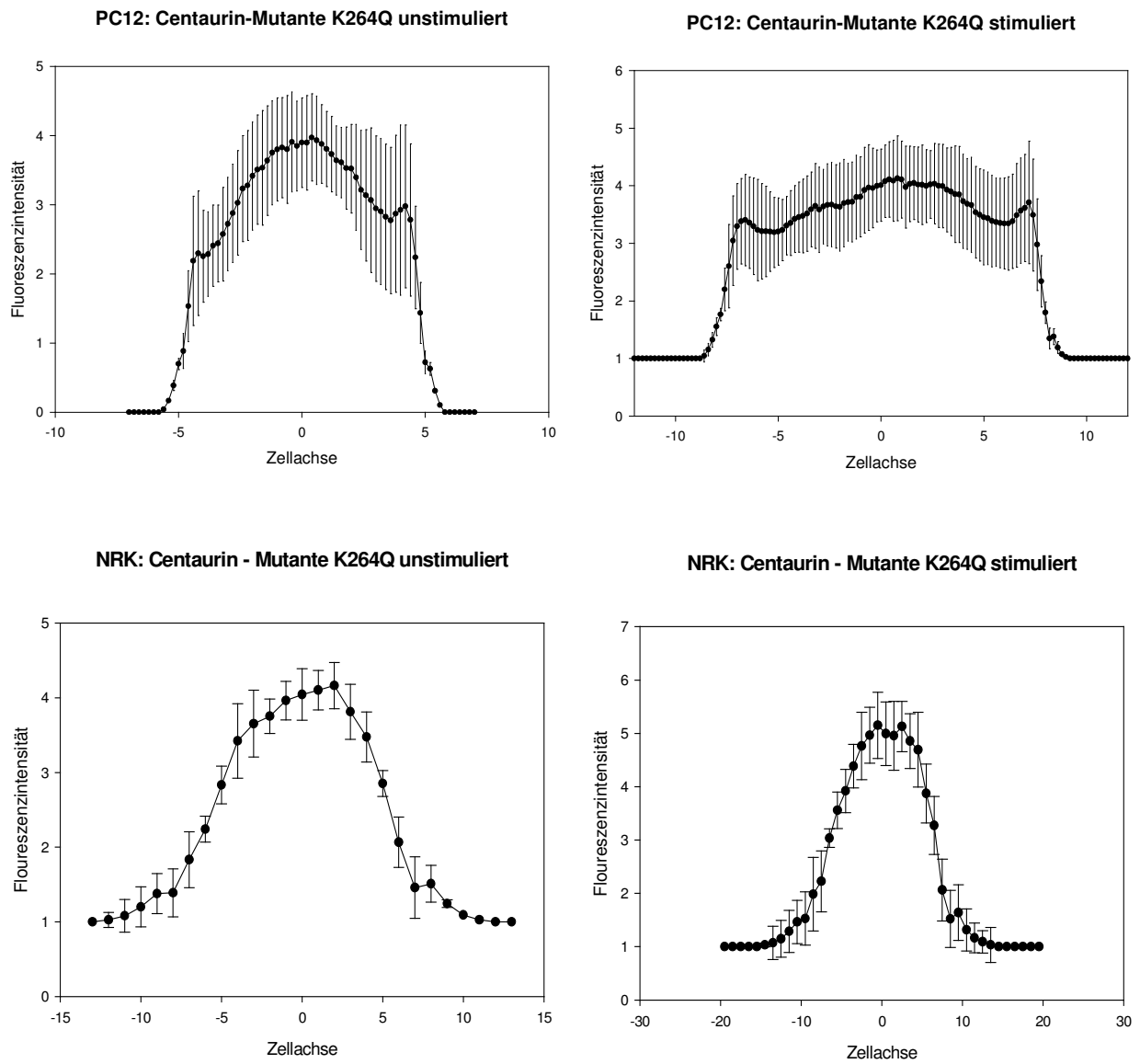
### 3 Ergebnisse



**Abbildung 46: Fluoreszenzprofile der Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante Y165Q in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert**

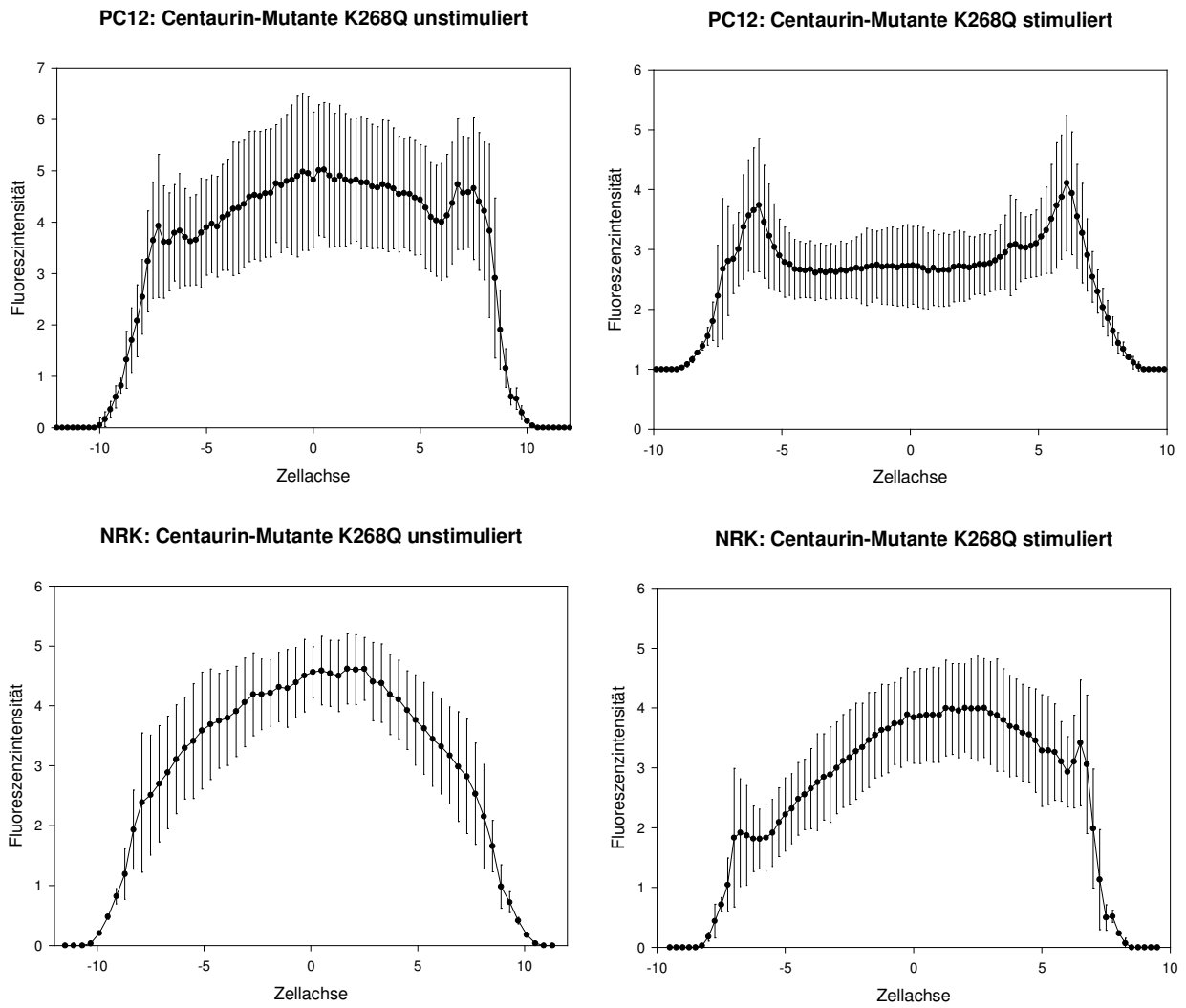


### 3 Ergebnisse



**Abbildung 47: Floureszenzprofile der Centaurin  $\alpha 2$ -Mutante K264Q in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert**

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 48: Fluoreszenzprofile der Centaurin  $\alpha 2$ -Mutante K268Q in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert**

3 Ergebnisse

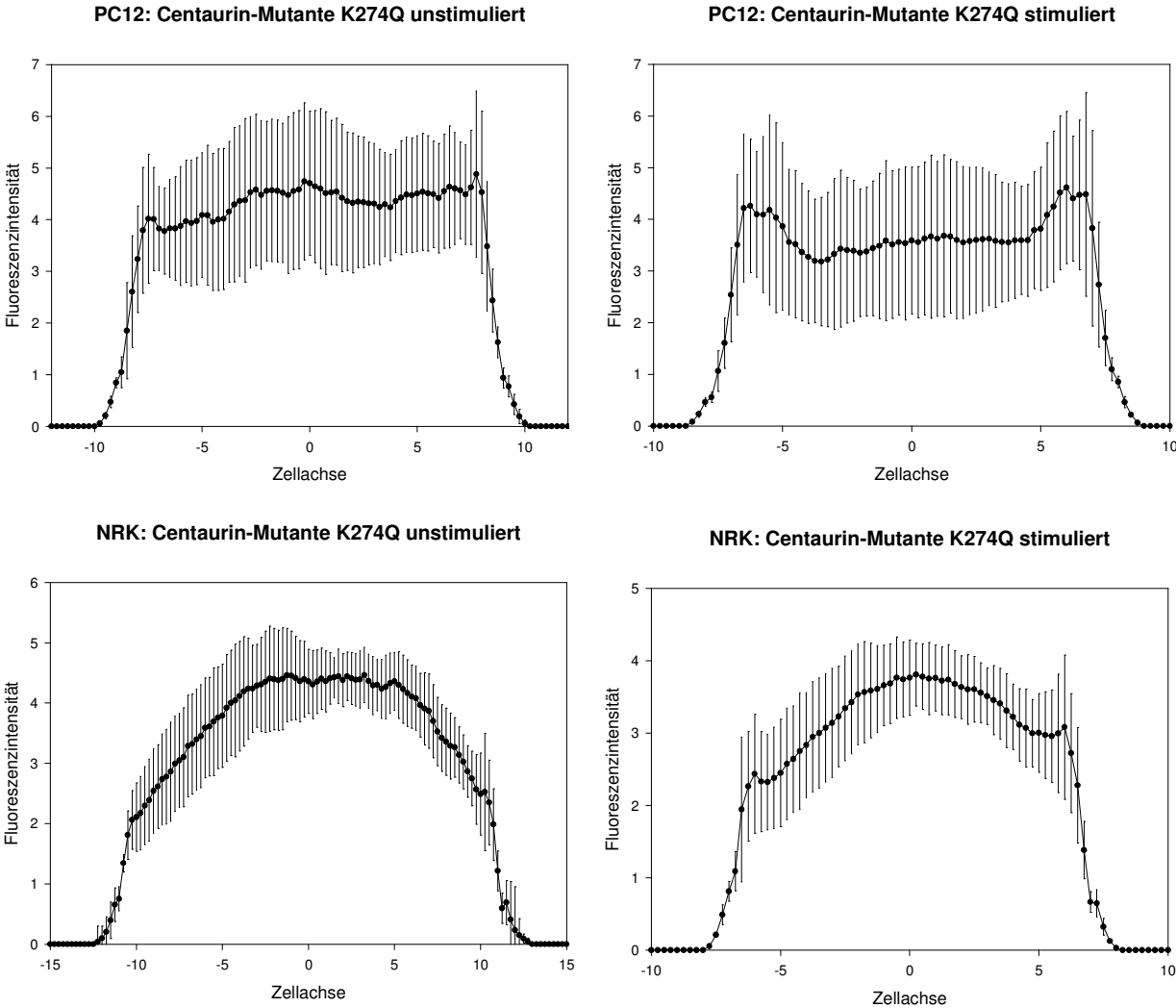


Abbildung 49: Floureszenzprofile der Centaurin  $\alpha 2$ -Mutante K274Q in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert

3 Ergebnisse

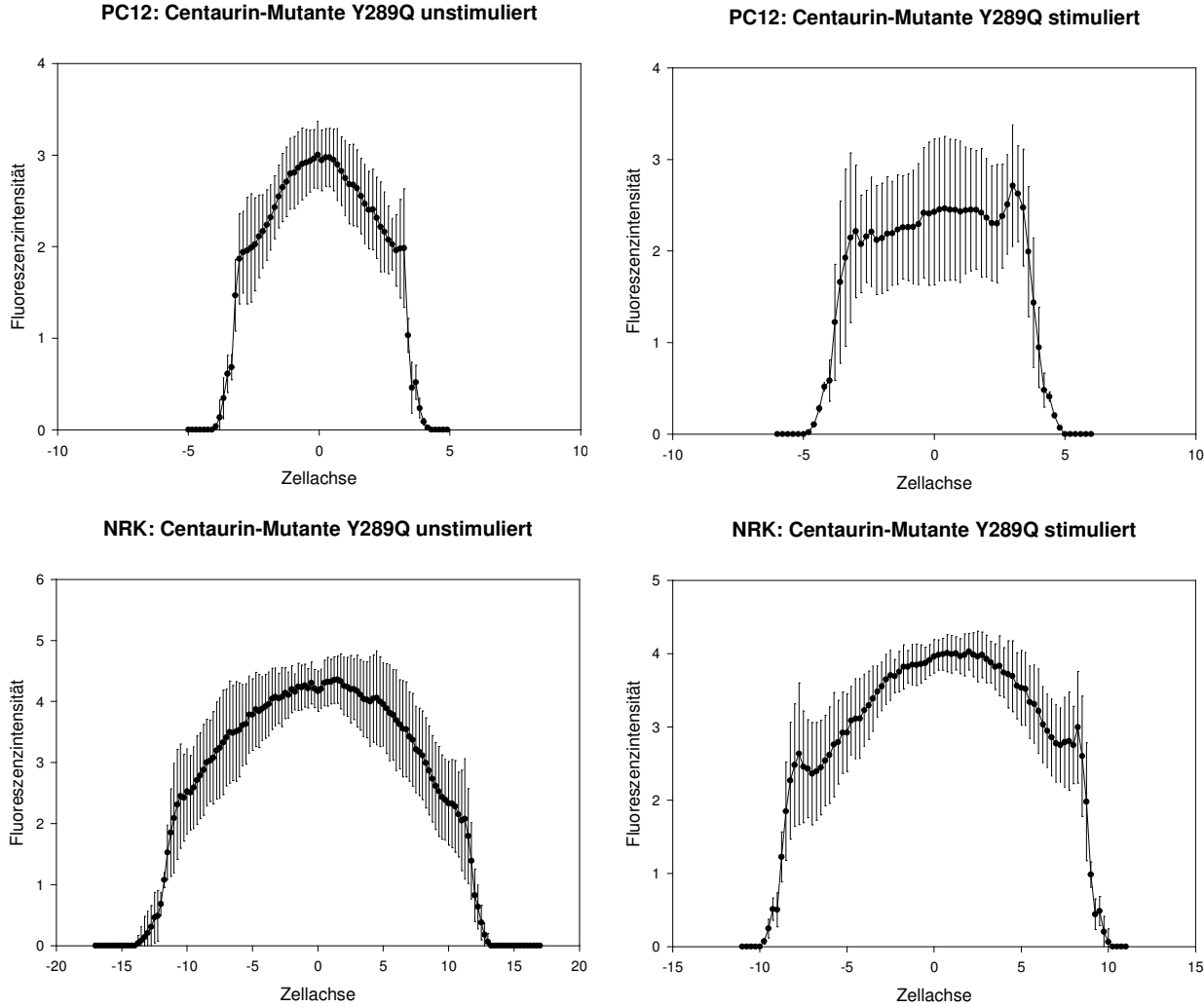


Abbildung 50: Floureszenzprofile der Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante Y289Q in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert

### **3.5 *In vivo* Lokalisations- und Translokationsexperimente mittels quasikonfokaler Mikroskopie**

Zur Untersuchung der durch die Arf-GAP-Funktion möglicherweise vermittelten Assoziation von Centaurin  $\alpha 2$  mit intrazellulären Strukturelementen wurde die konfokale Mikroskopie als hochauflösendes Darstellungsverfahren gewählt. In dieser Arbeit wurde sich auf die Untersuchung des pEGFP-Leervektors, des Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyps und der Centaurin  $\alpha 2$ -Mutanten R152C, R276C und R152C/R276C in PC12- und NRK-Zellen beschränkt.

In Kapitel 2.2.2.8 wird das Prinzip dieses mikroskopischen Verfahrens ausführlich erläutert.

#### **3.5.1 PC12 – Zellen**

Im Folgenden sind ausgewählte Bildbeispiele aufgeführt, die in Form der grünen Fluoreszenz, die besondere Lokalisation des pEGFP-Leervektors, des Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyps und der Centaurin  $\alpha 2$ -Mutanten R152C, R276C und R152C/R276C in PC12-Zellen zeigen:

### 3.5.1.1 pEGFP – N1 – Leervektor

PC12: pEGFP - Leervektor unstimuliert

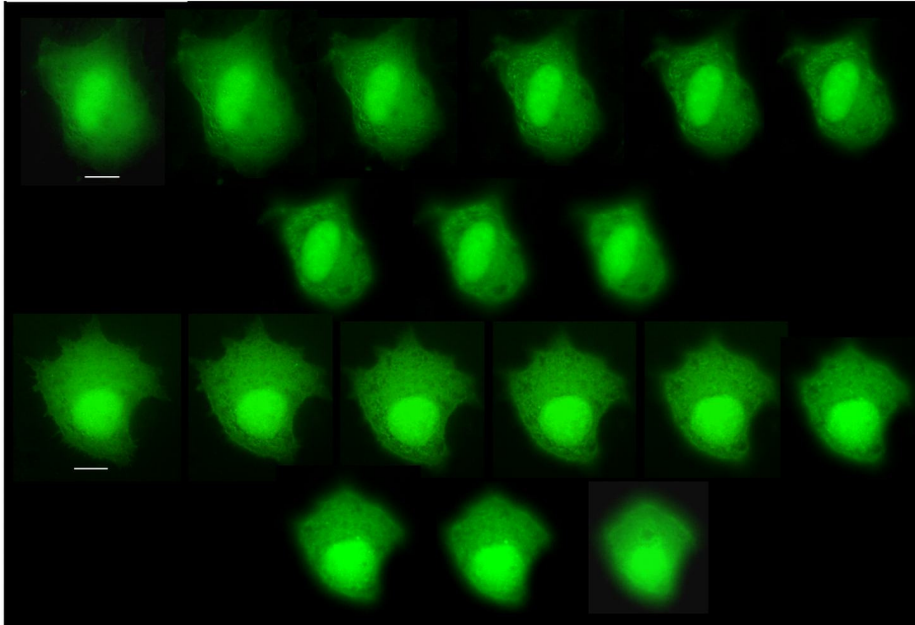


Abbildung 51: Zwei unstimulierte PC12-Zellbeispiele und ihre dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit dem pEGFP – Leervektor (Balkengröße entspricht 10  $\mu\text{m}$ )

PC12: pEGFP - Leervektor stimuliert

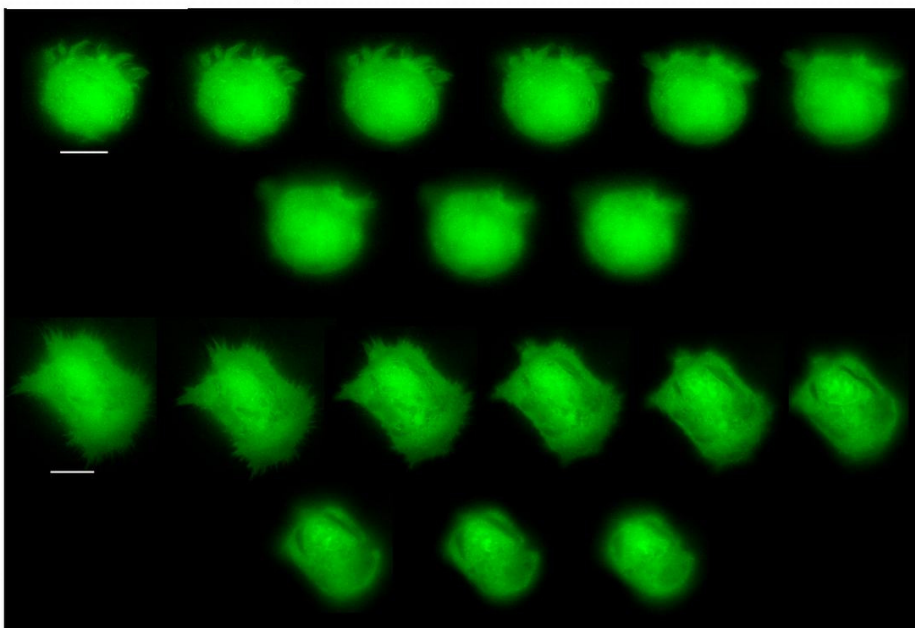


Abbildung 52: Zwei stimulierte PC12-Zellbeispiele und ihre dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit dem pEGFP – Leervektor (Balkengröße entspricht 10  $\mu\text{m}$ )

### 3.5.1.2 Centaurin $\alpha 2$ – Wildtyp

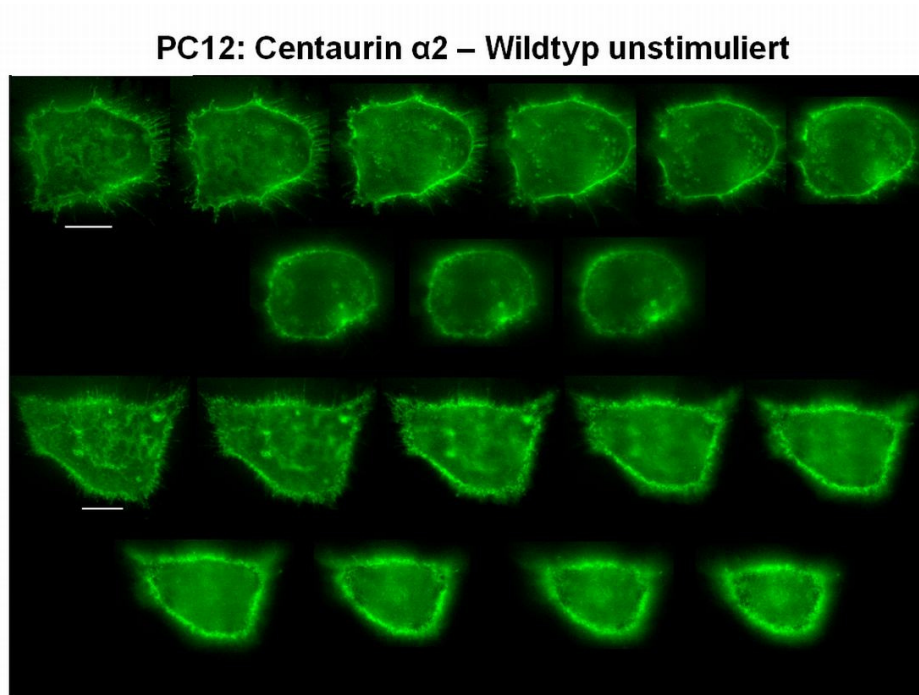


Abbildung 53: Zwei unstimulierte PC12-Zellbeispiele und ihre dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit dem Centaurin  $\alpha 2$  - Wildtyp (Balkengröße entspricht 10  $\mu\text{m}$ )

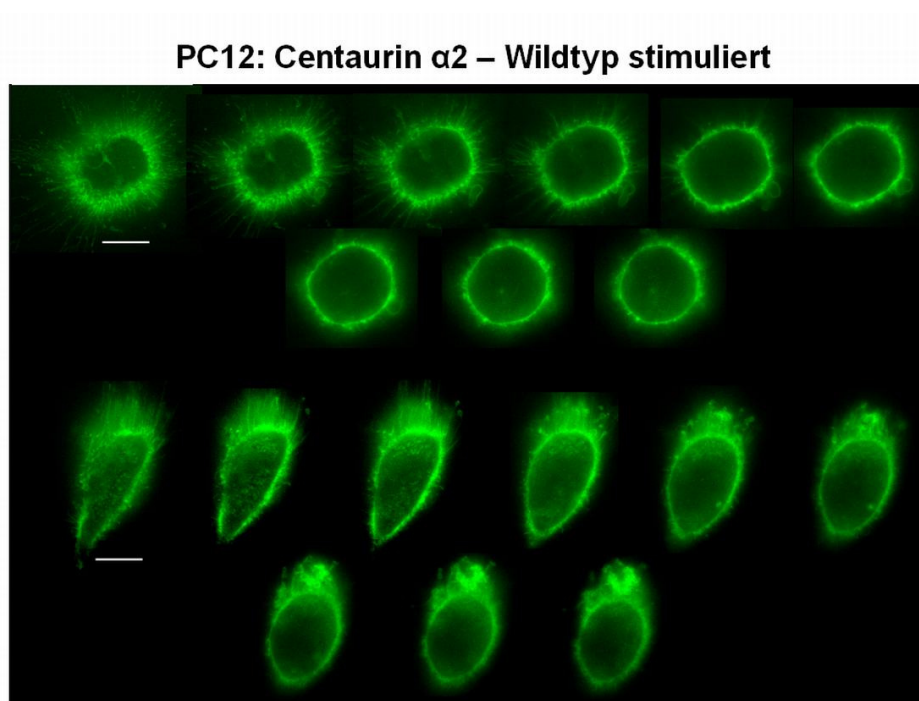


Abbildung 54: Zwei stimulierte PC12-Zellbeispiele und ihre dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit dem Centaurin  $\alpha 2$  - Wildtyp (Balkengröße entspricht 10  $\mu\text{m}$ )

### 3.5.1.3 Mutante R152C

#### PC12: R152C unstimuliert und stimuliert

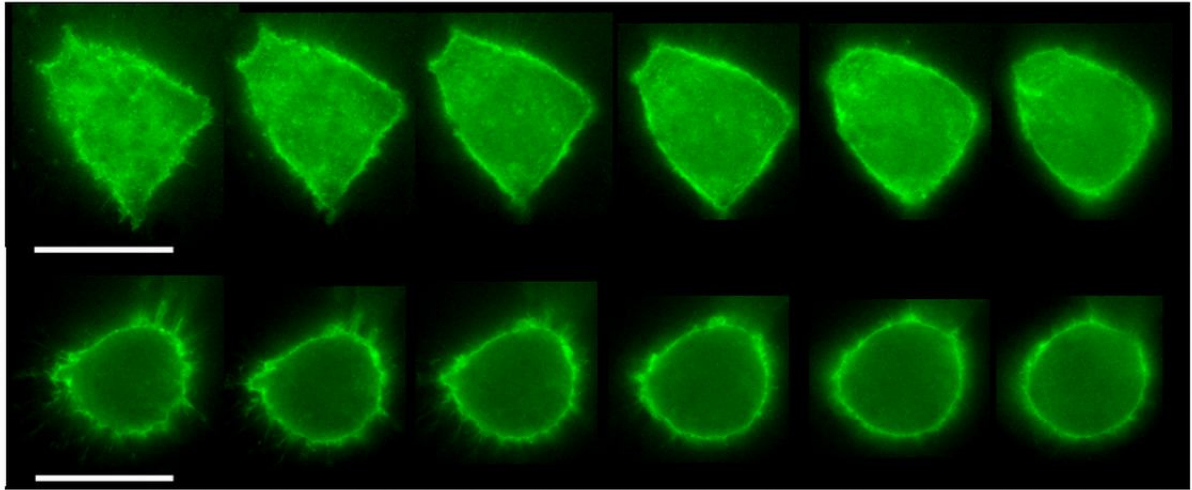


Abbildung 55: Zellbeispiel mit dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit der Centaurin  $\alpha 2$  – Mutante R152C im unstimulierten (obere Reihe) und stimulierten (untere Reihe) Zustand (Balkengröße entspricht 10  $\mu\text{m}$ )



### 3.5.1.4 Mutante R276C

#### PC12: R276C unstimuliert und stimuliert

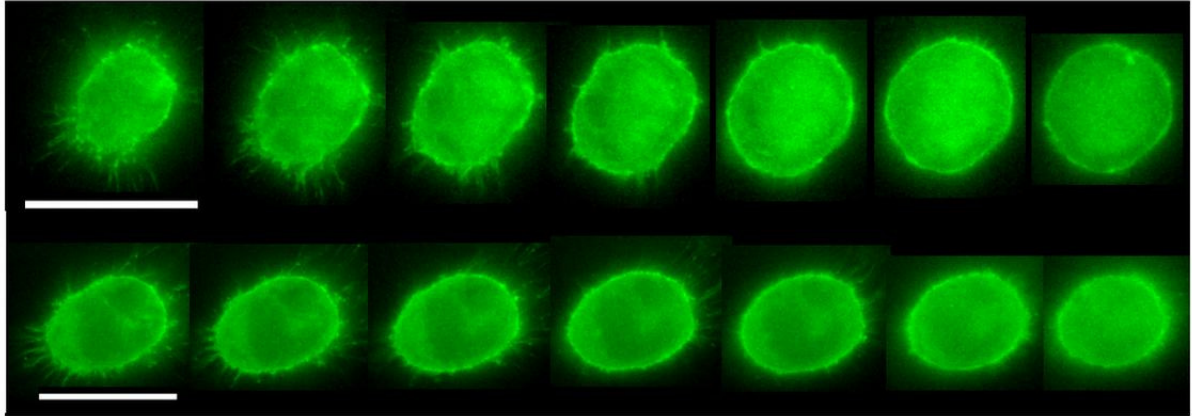


Abbildung 56: Zellbeispiel mit dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit der Centaurin  $\alpha 2$  – Mutante R276C im unstimulierten (obere Reihe) und stimulierten (untere Reihe) Zustand (Balkengröße entspricht 10  $\mu\text{m}$ )

### 3.5.1.5 Doppelmutante R152C/R276C

#### PC12: R152C/R276C stimuliert und unstimuliert

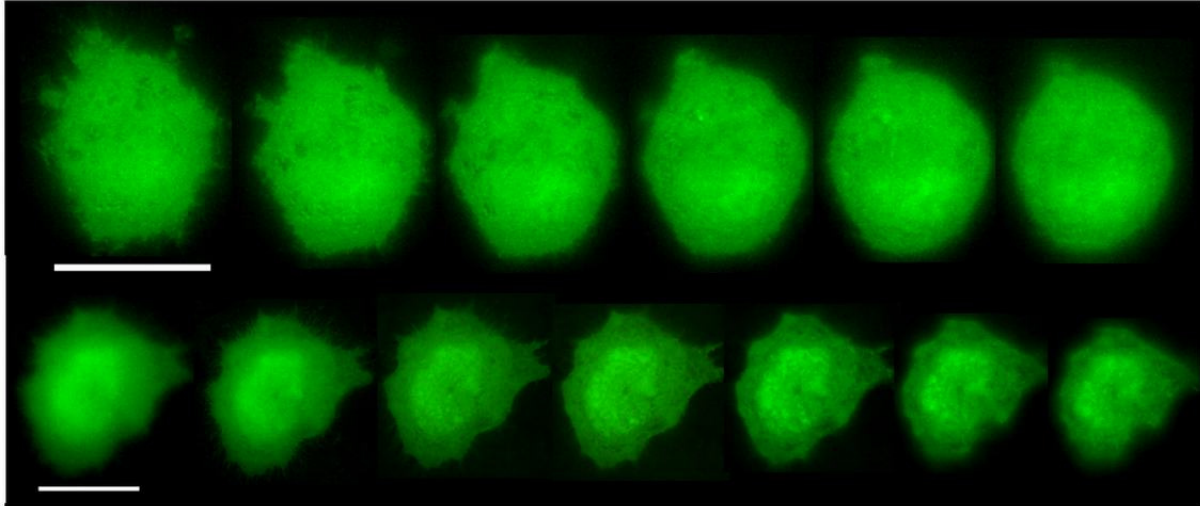
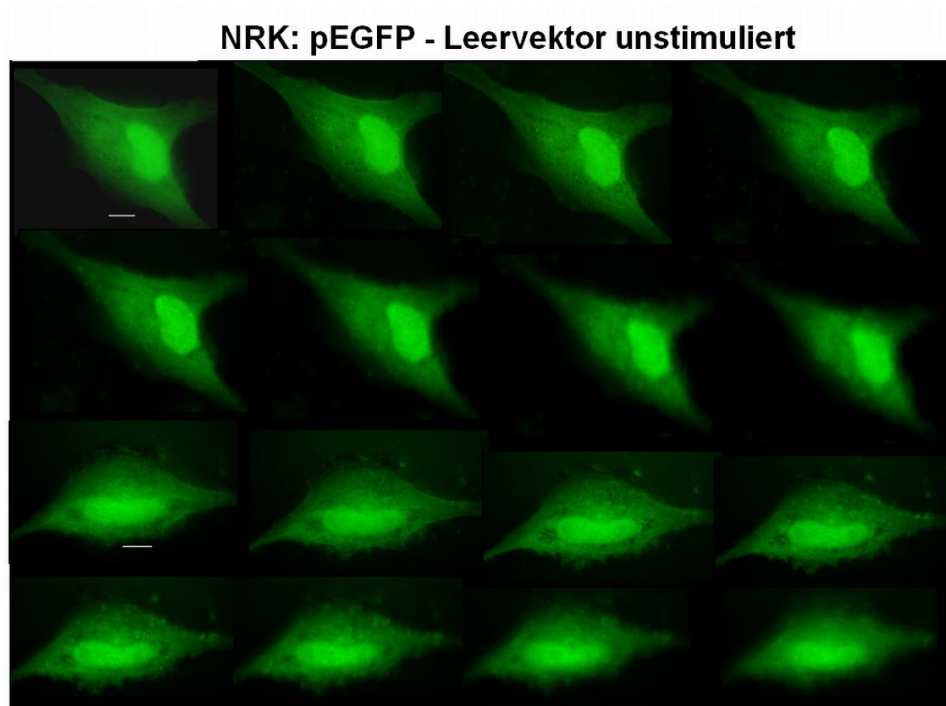


Abbildung 57: Zellbeispiel mit dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit der Centaurin  $\alpha 2$  – Mutante R152C/R276C im unstimulierten (obere Reihe) und stimulierten (untere Reihe) Zustand (Balkengröße entspricht 10  $\mu\text{m}$ )

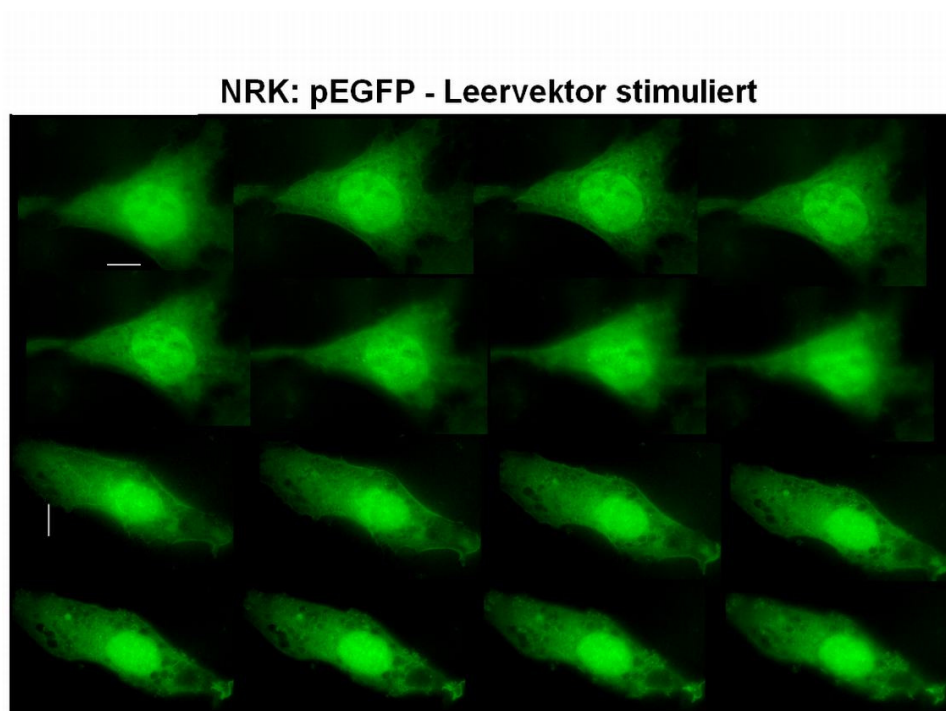
### 3.5.2 NRK-Zellen

Im Folgenden sind ausgewählte Bildbeispiele aufgeführt, die in Form der grünen Floureszenz, die besondere Lokalisation des pEGFP-Leervektors, des Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyps und der Centaurin  $\alpha 2$ -Mutanten R152C, R276C und R152C/R276C in NRK-Zellen zeigen:

### 3.5.2.1 pEGFP – N1 – Leervektor



**Abbildung 58: Zwei unstimulierte NRK-Zellbeispiele und ihre dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit dem pEGFP – Leervektor (Balkengröße entspricht 10  $\mu\text{m}$ )**



**Abbildung 59: Zwei stimulierte NRK-Zellbeispiele und ihre dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit dem pEGFP – Leervektor (Balkengröße entspricht 10  $\mu\text{m}$ )**

### 3.5.2.2 Centaurin $\alpha 2$ – Wildtyp

NRK: Centaurin  $\alpha 2$  - Wildtyp unstimuliert

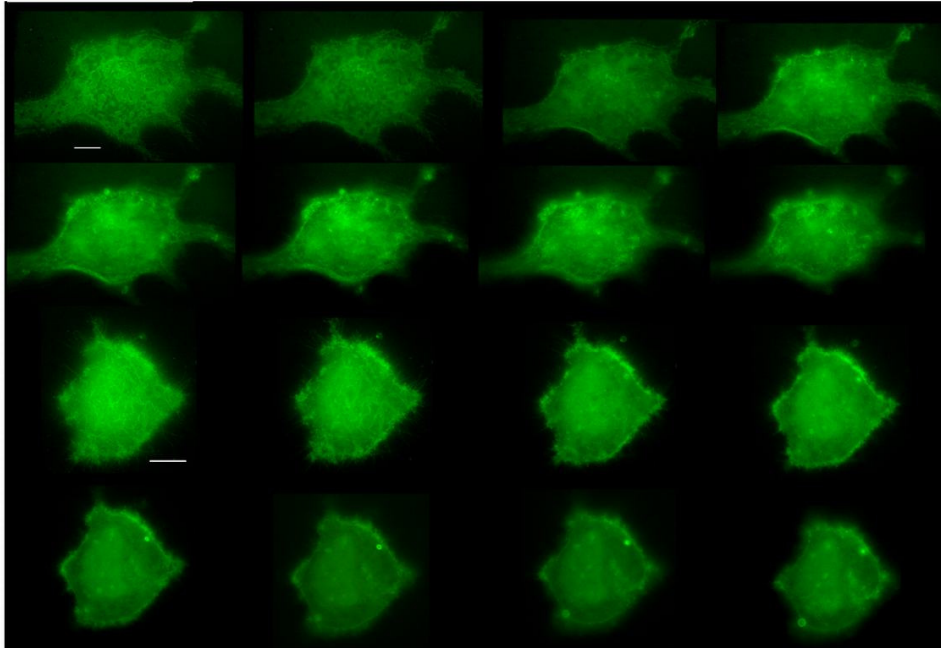


Abbildung 60: Zwei unstimulierte NRK-Zellbeispiele und ihre dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit dem Centaurin  $\alpha 2$  - Wildtyp (Balkengröße entspricht 10  $\mu\text{m}$ )

NRK: Centaurin  $\alpha 2$ - Wildtyp stimuliert

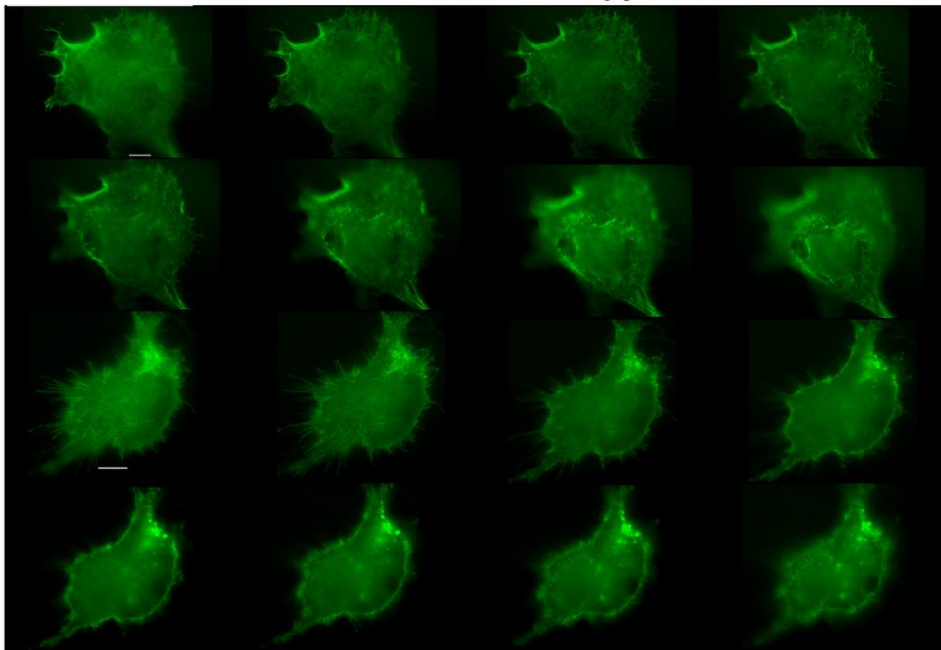


Abbildung 61: Zwei stimulierte NRK-Zellbeispiele und ihre dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit dem Centaurin  $\alpha 2$  - Wildtyp (Balkengröße entspricht 10  $\mu\text{m}$ )

### 3.5.2.3 Mutante R152C

#### NRK: R152C unstimuliert und stimuliert

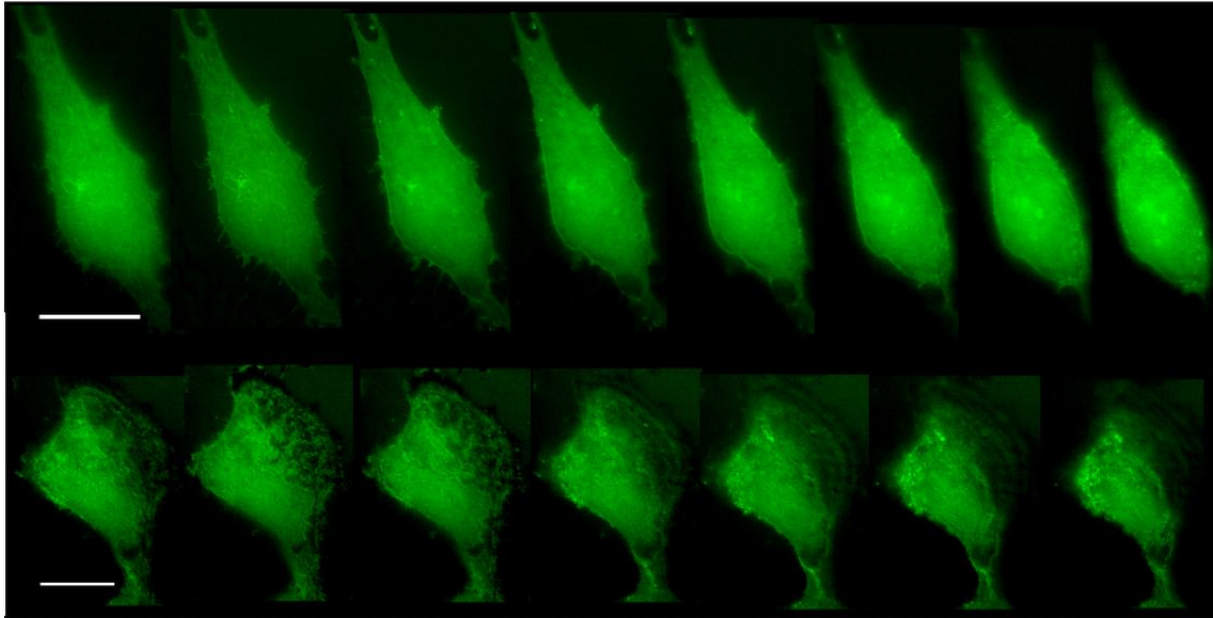


Abbildung 62: Zellbeispiel mit dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit der Centaurin  $\alpha 2$  – Mutante R152C im unstimulierten (obere Reihe) und stimulierten (untere Reihe) Zustand (Balkengröße entspricht 10  $\mu\text{m}$ )



### 3.5.2.4 Mutante R276C

#### NRK: R276C unstimuliert und stimuliert

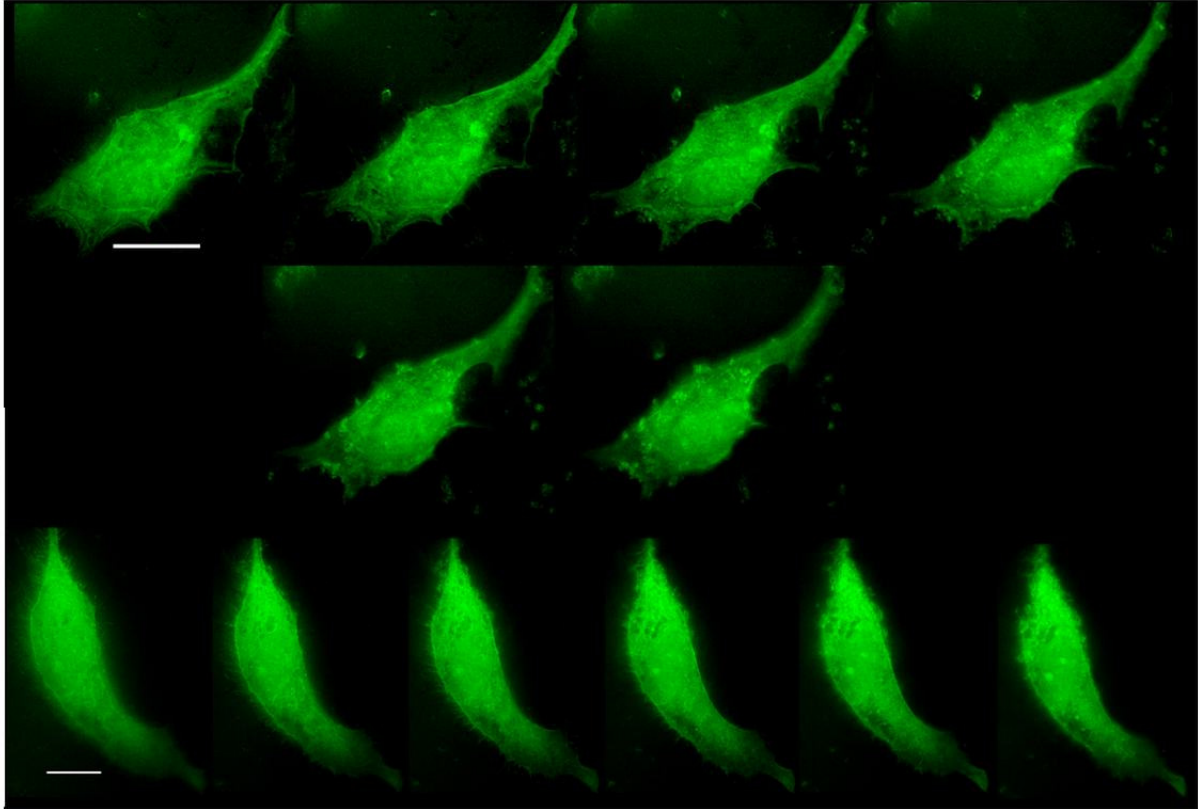
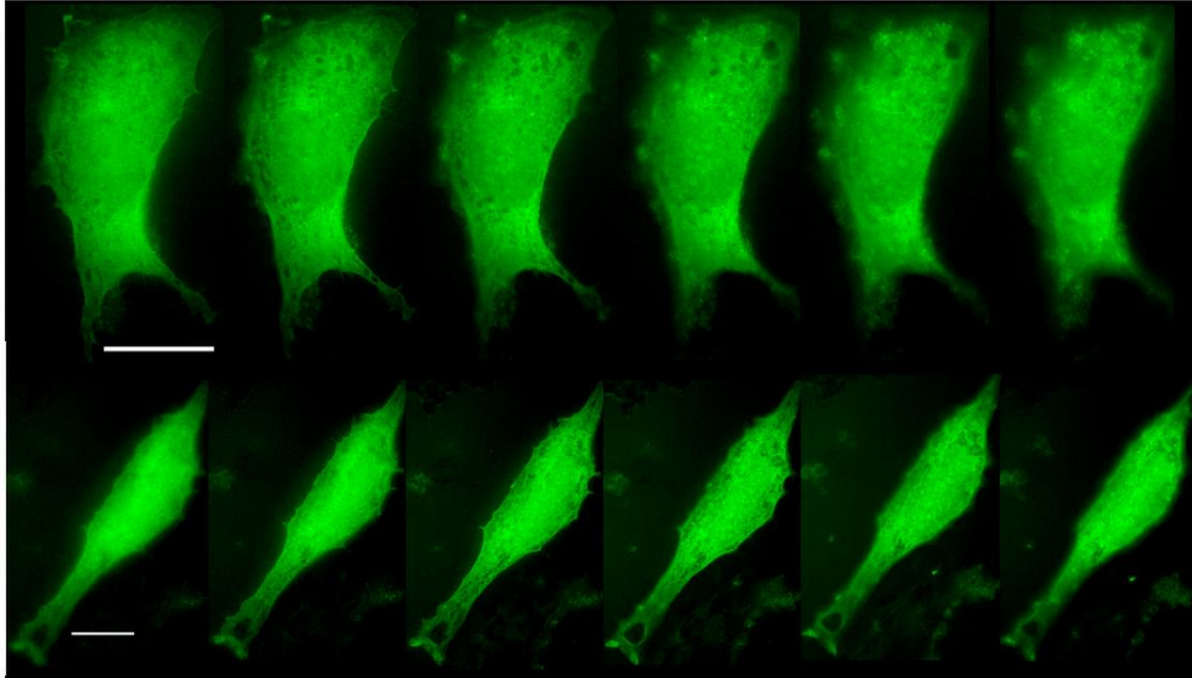


Abbildung 63: Zellbeispiel mit dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit der Centaurin  $\alpha 2$  – Mutante R276C im unstimulierten (obere Reihe) und stimulierten (untere Reihe) Zustand (Balkengröße entspricht 10  $\mu\text{m}$ )

### 3.5.2.5 Doppelmutante R152C/R276C

**NRK: R152C/R276C unstimuliert und stimuliert**



**Abbildung 64: Zellbeispiel mit dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit der Centaurin  $\alpha 2$  – Mutante R152C/R276C im unstimulierten (obere Reihe) und stimulierten (untere Reihe) Zustand (Balkengröße entspricht 10  $\mu\text{m}$ )**



### **3.6 Generierung von Zellformprofilen (*Cell-Shape profiles*) für PC12- und NRK-Zellen aus konfokalen Datensätzen**

Die Voreinstellungen zur Generierung der konfokalen Bilder wurde mit dem Wissen um eine unterschiedliche Zellmorphologie der PC12-Zellen im Vergleich zu den NRK-Zellen bereits begonnen. So musste die Anzahl der durch die Zellen einer Zelllinie gelegten Schnittebenen im sog. Automator des Programms zu Beginn festgelegt werden, um eine einheitliche Reproduktion der Bilderstellung zu gewährleisten. Bei Vorversuchen fiel bereits eine Veränderung der Zellmorphologie innerhalb einer Zelllinie auf, wenn eine Stimulation mit EGF vorausgegangen war. Unter Kenntnis des Vergrößerungsgrades und des verwendeten Maßstabes beim Mikroskopieren wurden die einzelnen dekonvolvierten Bilder einer mit dem pEGFP-Leervektor und dem Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp transfizierten Zelle waagrecht und senkrecht vermessen (x-Werte) und in Bezug zur Höhe der Schnittebene (y-Werte) gesetzt. Auf diese Weise wurden je acht Zellen vermessen. Die Zellkörperprofile der einzelnen Zellen sind, jeweils durch eine andere Farbe des Graphen voneinander abgrenzbar, in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt. Das mit roter Farbe gekennzeichnete Profil stellt den Mittelwert der Einzelvermessungen dar.

Die mit Hilfe eines speziellen Berechnungsverfahrens so erstellte Form der Zellkörper sind im Folgenden dargestellt.

#### **3.6.1 PC12-Zellen**

Im Folgenden sind die PC12-Zellkörper in ihrem unteren und mittleren Bereich dargestellt. Die apikale Zellmorphologie kann nicht dargestellt werden, da die Anzahl der zur Verfügung stehenden Schnittebenen entsprechend der vertikalen Zellausdehnung zu gering war.

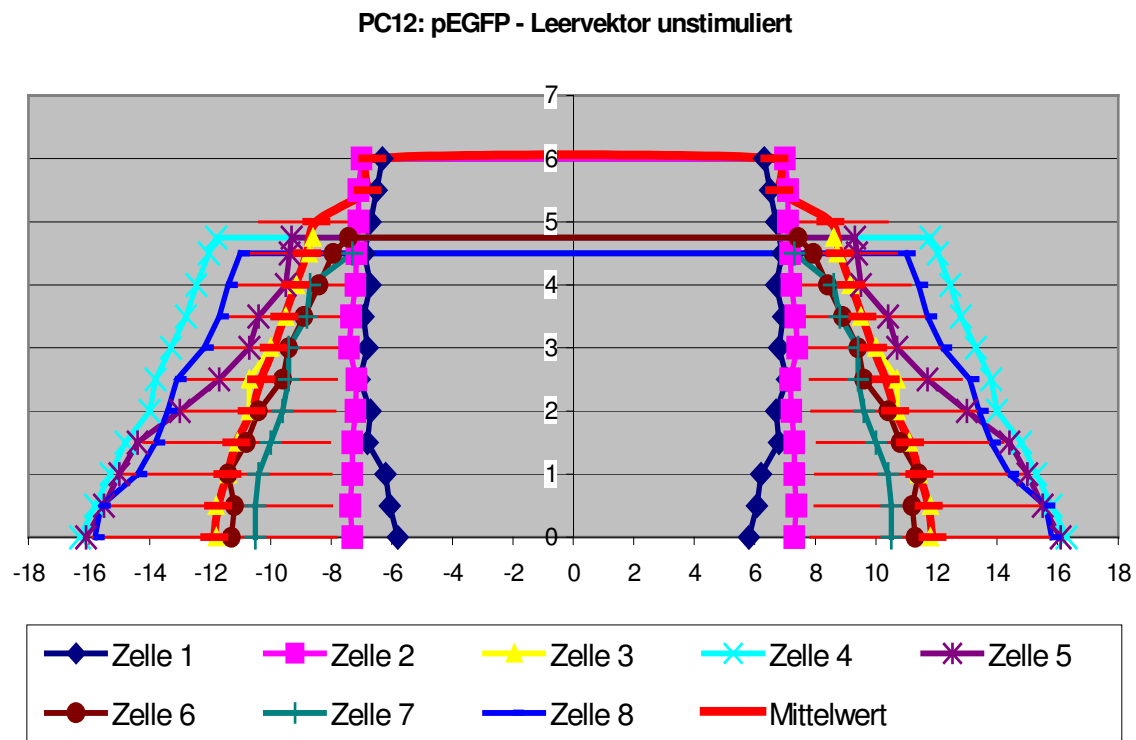


Abbildung 65: Gemittelt PC12-Cellshape (rot) von 8 unstimulierten Zellen, die mit dem pEGFP-Leervektor transfiziert wurden

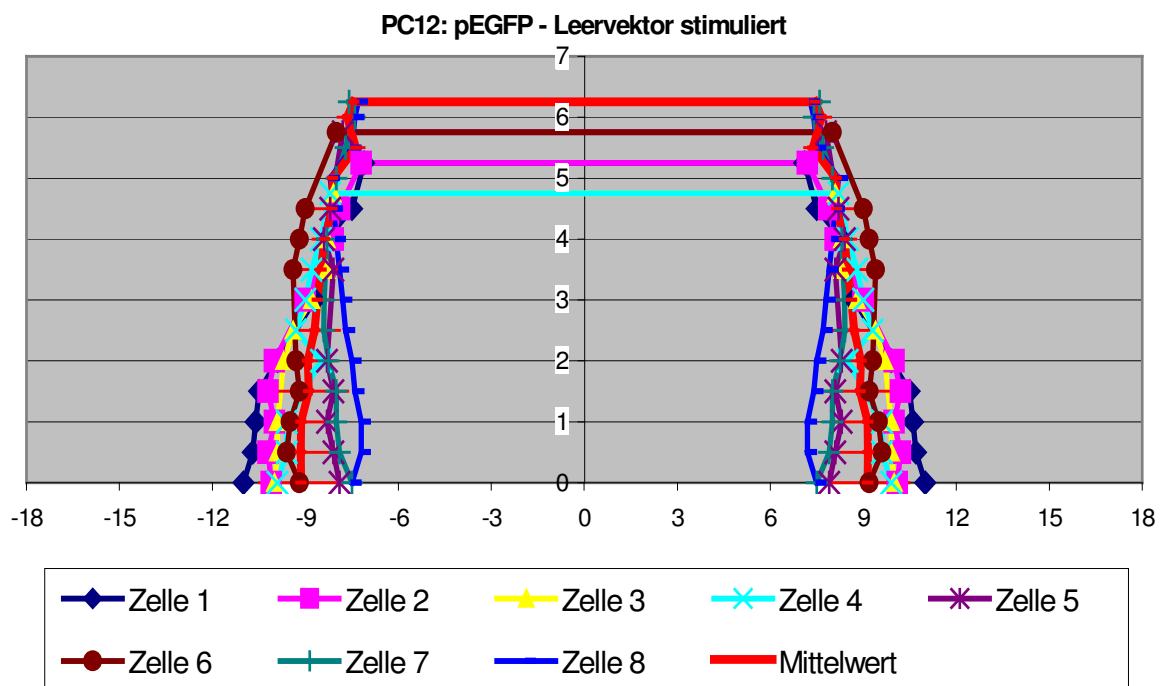
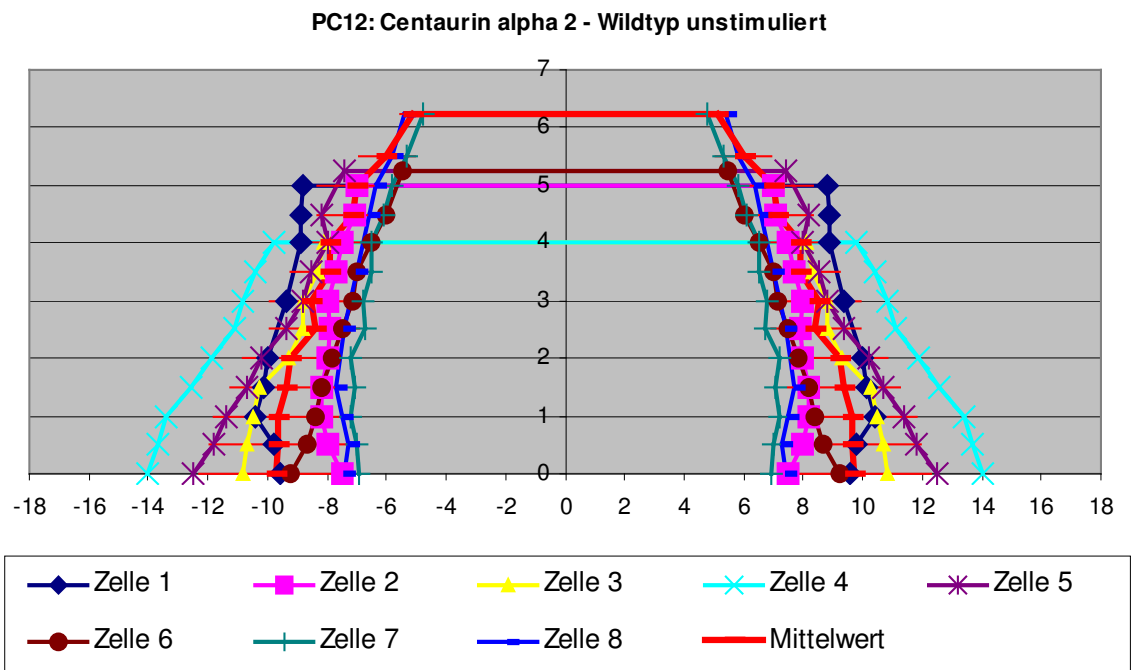
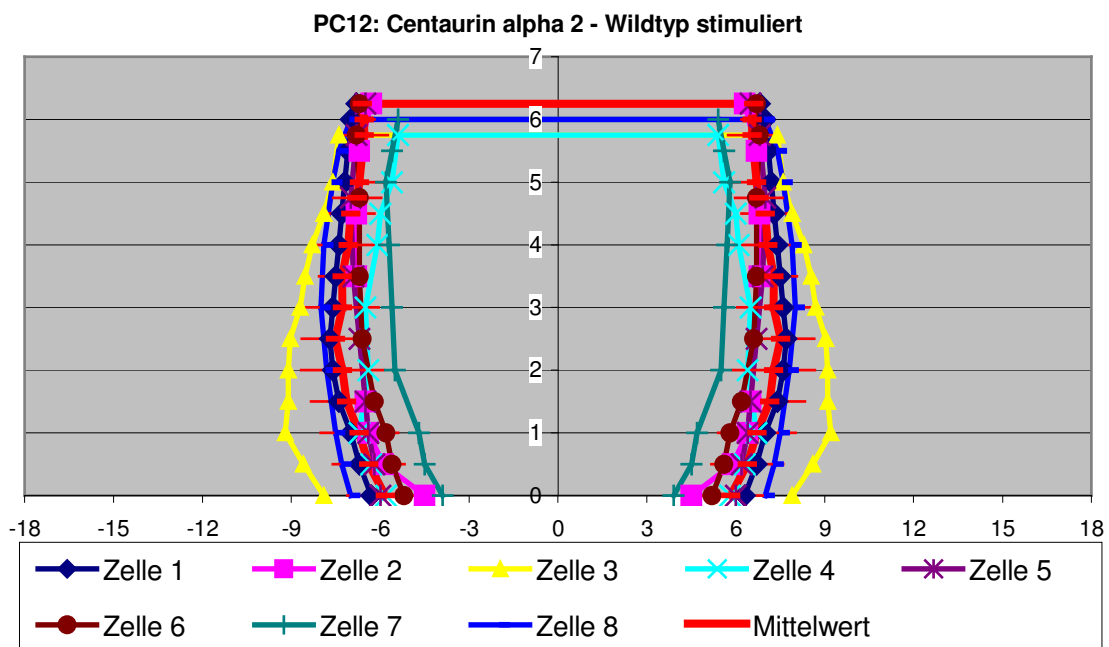


Abbildung 66: Gemittelt PC12-Cellshape (rot) von 8 stimulierten Zellen, die mit dem pEGFP-Leervektor transfiziert wurden

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 67: Gemittelt PC12-Cellshape (rot) von 8 unstimulierten Zellen, die mit dem Centaurin  $\alpha 2$  – Wildtyp transfiziert wurden**



**Abbildung 68: Gemittelt PC12-Cellshape (rot) von 8 stimulierten Zellen, die mit dem Centaurin  $\alpha 2$  - Wildtyp transfiziert wurden**

### 3.6.2 NRK-Zellen

Im Folgenden sind die NRK-Zellkörper in ihrem unteren und mittleren Bereich dargestellt. Die apikale Zellmorphologie kann nicht dargestellt werden, da die Anzahl der zur Verfügung stehenden Schnittebenen entsprechend der vertikalen Zellausdehnung zu gering war.

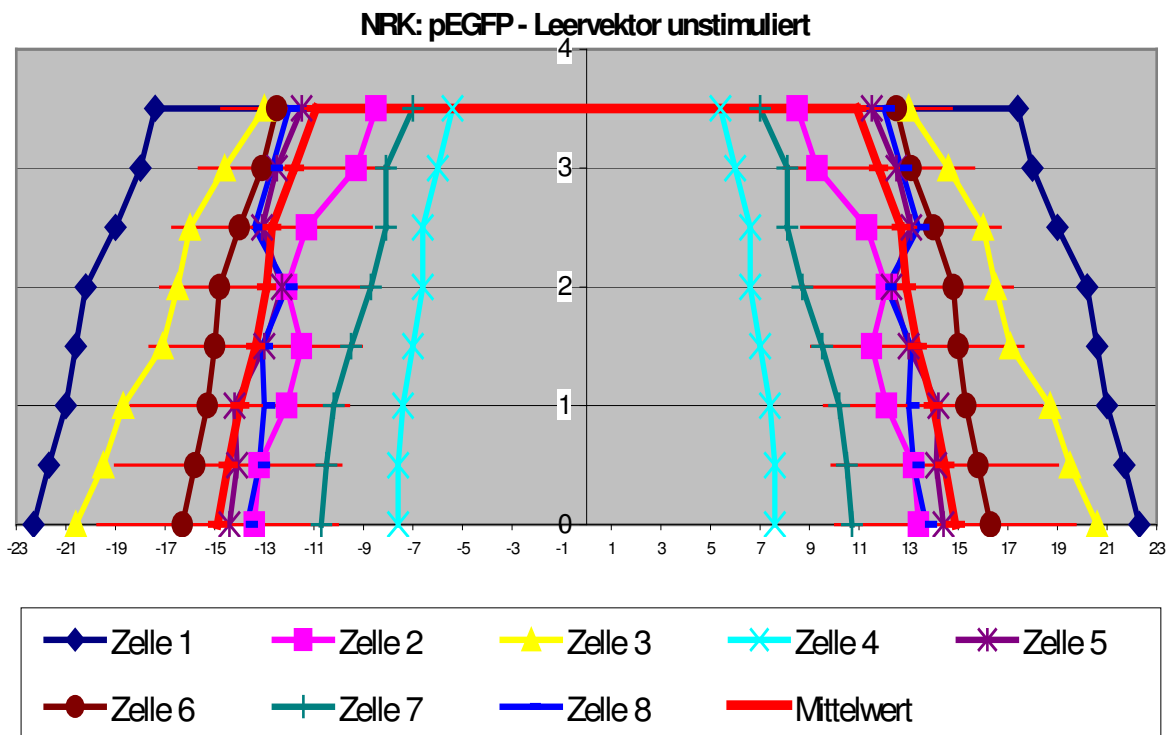
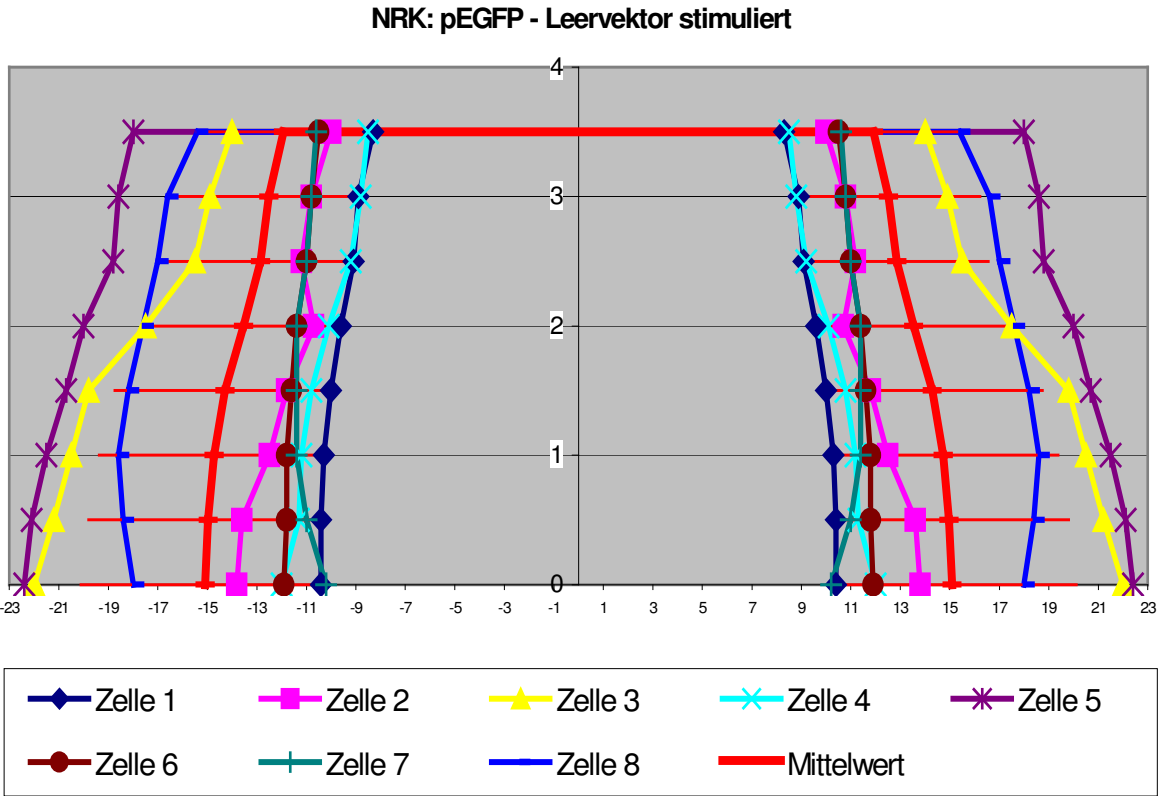


Abbildung 69: Gemitteltes NRK-Cellshape (rot) von 8 unstimulierten Zellen, die mit dem pEGFP-Leervektor transfiziert wurden



**Abbildung 70: Gemittelt NRK-Cellshape (rot) von 8 stimulierten Zellen, die mit dem pEGFP-Leervektor transfiziert wurden**

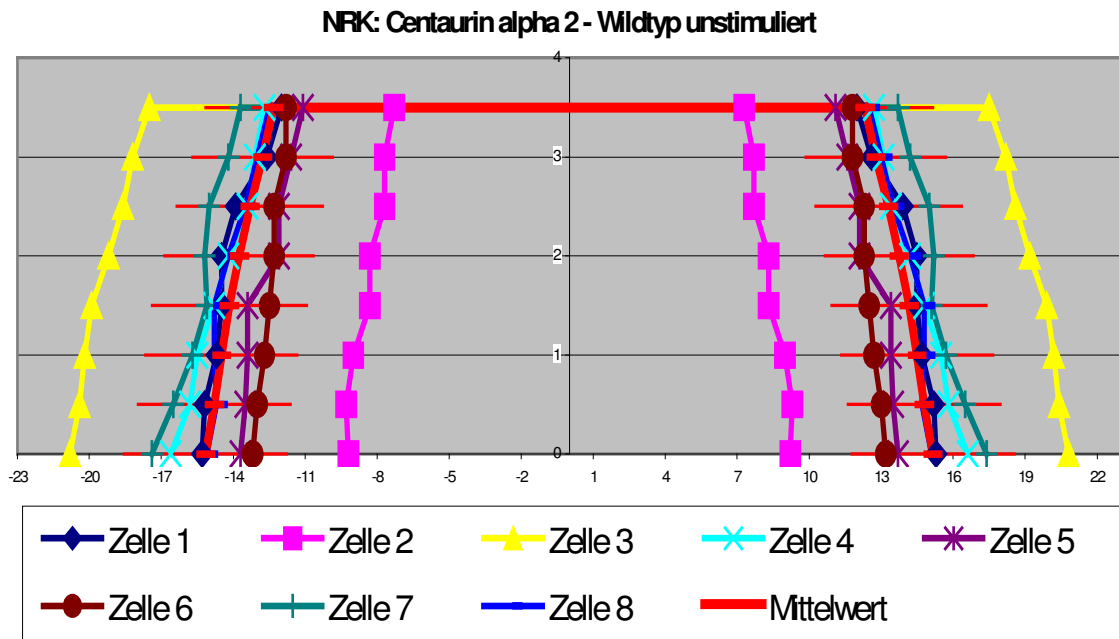


Abbildung 71: Gemitteltetes NRK-Cellshape (rot) von 8 unstimulierten Zellen, die mit dem Centaurin  $\alpha 2$  - Wildtyp transfiziert wurden

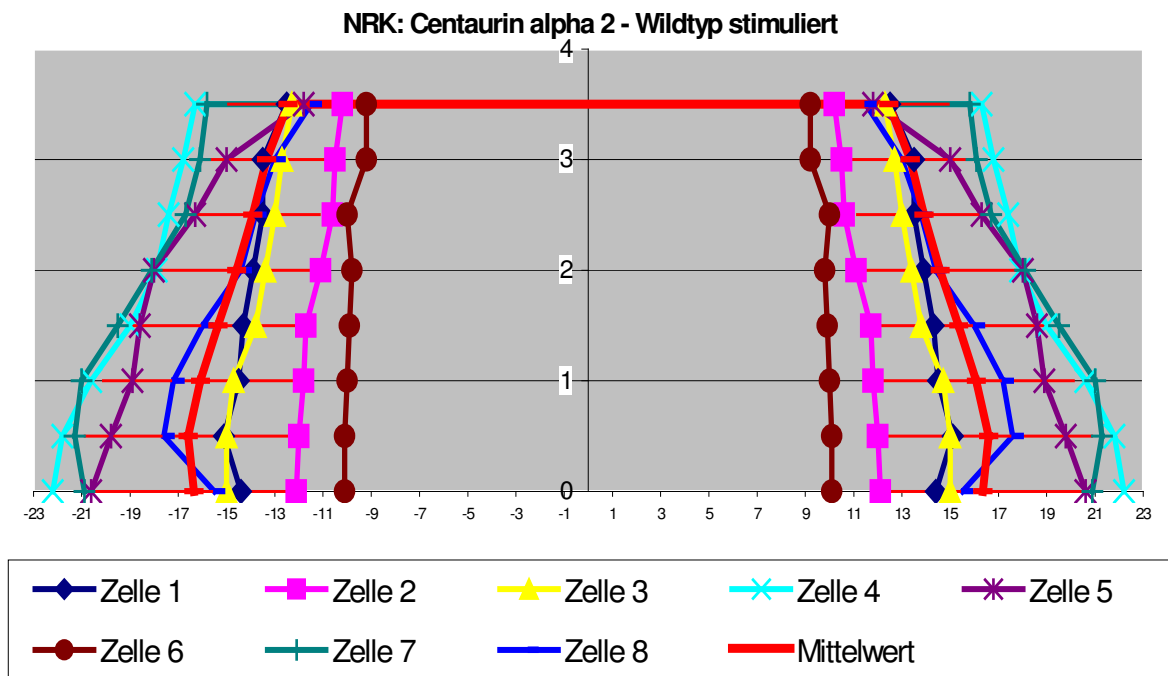


Abbildung 72: Gemitteltetes NRK-Cellshape (rot) von 8 stimulierten Zellen, die mit dem Centaurin  $\alpha 2$  - Wildtyp transfiziert wurden

## 4 Diskussion

### 4.1 Struktur des experimentellen Vorgehens

Die Vermutungen über die intrazellulären Funktionen des humanen Centaurin  $\alpha 2$  als Arf-GAP und damit als Modulator der dynamischen Zellstruktur legte als arbeitstechnischen Schwerpunkt die Untersuchung der möglichen Verbindung von Centaurin  $\alpha 2$  mit zellulären Strukturelementen nahe. Dynamische Prozesse wie Zellteilung, adhäsives Wachstum oder eine koordinierte Ausbreitung von Zellen innerhalb einer Gewebestruktur finden durch Signalwahrnehmung und –vermittlung vor allem an der Zellperipherie statt. Die Untersuchung der Centaurin  $\alpha 2$  – Membranlokation war daher von wesentlichem Interesse. Die Versuchsergebnisse zum Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp spielen hier die zentrale Rolle. Durch Mutation der Wildtyp-Sequenz an mittels Strukturmodellen möglicherweise funktionell als bedeutsam erscheinenden Bereichen, konnte die Art und Form der Interaktion von Centaurin  $\alpha 2$  mit zellulären Liganden zumindest eingegrenzt werden. Die Möglichkeit der unterschiedlichen visuellen Datenerhebung in Form der nichtkonfokalen und der konfokalen Mikroskopie erlaubte es einen Versuchsansatz hinsichtlich der quantitativen zellulären Verteilung von Centaurin  $\alpha 2$ , als auch in Bezug auf seine Assoziation mit Strukturelementen der Zelle zu beurteilen. Mit Hilfe diverser Rechenprogramme konnten die so gewonnen Daten schließlich noch Informationen über den Einfluß von Centaurin  $\alpha 2$  auf die zelluläre 3-D-Struktur liefern.

Da die untersuchten Zelllinien in den einzelnen Versuchsreihen zeitgleich auch immer unter gleichen Bedingungen ohne das Centaurin  $\alpha 2$ -Protein durchgeführt wurden, wurde die Gefahr der Fehlinterpretation der Ergebnisse minimiert.

#### 4.1.1 Mögliche Einflussnahme des GFP auf die Versuchsergebnisse

Bei der Transfektion der PC12- und NRK-Zellen mit dem pEGFP-N1-Leervektor (GFP) wurde sowohl in der zur Übersicht dienenden nichtkonfokalen, als auch in der hochauflösenden konfokalen Mikroskopie eine homogene Verteilung des

Expressionsproduktes nachgewiesen. Die ausbleibende Lokalisierungstendenz läßt darauf schließen, daß das GFP alleine keinen Einfluss auf den Ort der Lokalisation von Centaurin  $\alpha 2$  ausübt, wenn es als GFP-Centaurin  $\alpha 2$ -Fusionsprotein exprimiert wird. Die Lokalisationstendenz und alle gemessenen Abweichungen in der Fluoreszenzverteilung können daher der Einflussnahme des Centaurin  $\alpha 2$  bzw. den strukturellen Veränderungen in Form der Centaurin  $\alpha 2$ -Mutanten zugeschrieben werden.

In vorausgehenden Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, daß die Position des GFP innerhalb des Fusionsvektors im Hinblick auf das Ligandenbindungs-Verhalten von Centaurin eine Rolle spielt. Hier konnte gezeigt werden, daß ein C-terminal der Multiple-cloning-Site befindliches GFP vermutlich durch sterische Effekte mit der C-terminalen PH-Domäne eine tendenziell geringere Membranlokalisation, d.h. PtdIns(3,4,5) $P_3$ -Bindung von Centaurin verursacht [Illies, 2002]. Des weiteren könnte auch ein N-terminales GFP z.B. durch Beeinflussung des für die nukleoläre Lokalisation als putativ wichtig erachteten Zinkfingermotivs die Interpretation der zellulären Centaurin  $\alpha 2$ -Lokalisation stören [Tanaka et al, 1999].

### **4.1.2 Überexpression eines Proteins und die mögliche Einflussnahme auf den Stoffwechsel der Zelle**

Die Begrenztheit der mikroskopischen Auflösung und Darstellungsmöglichkeit erforderte eine über die physiologischen Maße der nativen Zelle hinausgehende und für den Proteinsyntheseapparat der Zelle belastende Überexpression von Centaurin  $\alpha 2$ .

Centaurin  $\alpha 2$  gehört zu den signalvermittelnden Proteinen, die im physiologischen Zellstoffwechsel einer sehr diffizilen, damit aber für die stoffwechselaktive Zelle sehr effizienten Regulierung unterliegen. Eine Überexpression von Centaurin  $\alpha 2$  als nachweislich PtdIns(3,4,5) $P_3$ -Bindungspartner führt zu einer übermäßigen Besetzung der Liganden, die damit für die Bindung an andere Moleküle oder Proteine nicht mehr zur Verfügung stehen. Mit der Überexpression eines Proteins wird also der native,



physiologische Zellmechanismus gestört und eine z.T. künstliche, versuchsbedingte Situation hergestellt.

Um durch diesen Einfluß toxisch geschädigte und damit für die Fragestellung nicht verwertbare Zellen nicht in die Datenerhebung mit aufzunehmen, wurden nur Zellen erfaßt, die den nicht transfizierten im Aussehen glichen und keine übermäßige Fluoreszenzintensität aufwiesen. Die hiermit bewußt getroffene Selektion kann eine möglich Ergebnismodifikation bedingen. Die bis zu dreimal durchgeführten Versuchswiederholungen mit jeweiliger Datengewinnung sollten den möglicherweise infolge obiger Selektion geschaffenen Tendenzen entgegenwirken.

### **4.1.3 Gesichtspunkte zur Verwendung der nichtkonfokalen neben der konfokalen Mikroskopie**

Die mit Centaurin  $\alpha 2$  transfizierten Zellen sollten unter zwei verschiedenen Gesichtspunkten hinsichtlich der intrazellulären Centaurin  $\alpha 2$ -Lokalisation beurteilt werden. Die nichtkonfokale Mikroskopie diente zur Darstellung der im gesamten Zellkörper befindlichen fluoreszierenden Centaurin  $\alpha 2$ -Proteinmoleküle. Manuell wurde eine Fokusebene gewählt, in der sich jedoch sämtliche Zellebenen aufsummieren. Der Summationseffekt bedingt eine gewisse Unschärfe der einzelnen Zellstrukturen, macht jedoch eine quantitative Messung der Centaurin  $\alpha 2$ -Verteilung über die Zelle möglich, die sich in den graphisch dargestellten Fluoreszenzprofilen widerspiegelt.

Die konfokale Mikroskopie zeichnet sich hingegen dadurch aus, daß sie durch einen sog. Deconvolutions-Prozess, einem computergesteuerten komplexen Rechenvorgang, unter Kenntnis der ungefähren zellulären 3-D-Struktur ein Schnittbild aus sämtlichen Fokusebenen berechnet. Details zellulärer Morphologien treten in den Vordergrund und machen eine Aussage über qualitative Aspekte des Centaurin  $\alpha 2$ , z.B. an Focal adhesions oder Pseudopodien möglich.

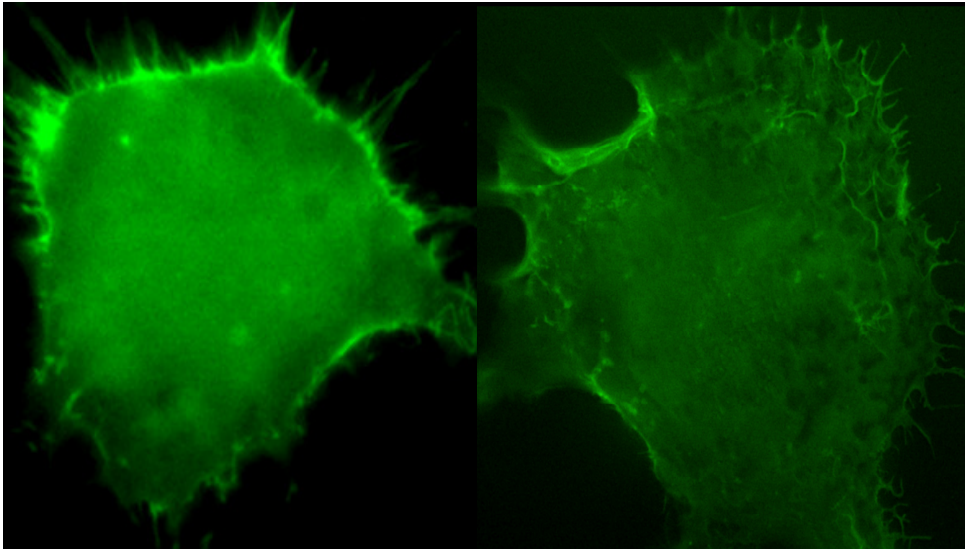


Abbildung 73: Bildliche Auflösung der Zellmorphologie bei NRK-Zellen unter nichtkonfokaler (links) und konfokaler (rechts) Mikroskopie

### **4.2 Subzelluläres Lokalisationsverhalten der Centaurin $\alpha 2$ – Mutanten im Vergleich zum Centaurin $\alpha 2$ – Wildtyp in PC12 – Zellen**

Nachdem die nichtkonfokal erstellten Zellbilder hinsichtlich der Membranlokalisierung von Centaurin  $\alpha 2$  ausgezählt und die Daten in Folgeversuchen reproduzierbar und damit verwertbar waren, wurde aus den für ein Genkonstrukt bis zu 720 angefertigten Zellbildern je 12 Zellbilder ohne EGF-Stimulation und 12 Zellbilder unter EGF-Stimulation zufällig ausgewählt. Das Fluoreszenzprofil dieser Zellen wurde mittels dem Programm ImageJ vermessen, die so für jede Zelle erhaltenen Datensätze in SigmaPlot 8.0 transferiert, mit Hilfe dieses Programms gemittelt und als Kurvenverlauf graphisch dargestellt.

Im Zentrum des Interesses stand zunächst die zelluläre Verteilung des Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyps bei Wachstumssfaktor-Stimulation mit EGF, im Vergleich zu dessen Verteilung bei niedrigerem intrazellulären Aktivitätsniveau, wenn keine externen Stimuli die Stoffwechselprozesse der Zelle übermäßig ankurbeln. In den Grafiken ist eine deutliche Zunahme der Membranlokalisierungstendenz von Centaurin  $\alpha 2$  ersichtlich, wobei schon im unstimulierten Zustand ein hoher Anteil des intrazellulären Centaurin  $\alpha 2$ -Proteins im Bereich der Zellperipherie lokalisiert ist. Dies

wird insbesondere deutlich, wenn vergleichend hierzu die Verteilung des als Kontrolle dienenden EGFP-Fusionsproteins betrachtet wird. Die homogene Verteilung des EGFP-Fusionsproteins und die Tatsache, daß adhäsiv wachsende Zellen einen nach apikal konvexen Zellkörper ausbilden, bedingt den glockenförmigen Kurvenverlauf in der Fluoreszenzprofil-Grafik, der sich bei den mit Centaurin  $\alpha 2$  transfizierten PC12-Zellen nicht wiederfindet und auf eine inhomogene, membranbetonte Lokalisation schießen läßt. Die vermutete Funktion des Centaurin  $\alpha 2$  als Ligand von dem vor allem in stimulierten Membranen reich vorkommenden  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  und als intrazellulärer Vermittler im Zusammenhang mit der Signalkaskade der kleinen G-Proteine, kann durch das gezeigte Lokalisierungsverhalten bekräftigt werden.

Das Lysin an Position 141 der Centaurin  $\alpha 2$ -Proteinsequenz gehört mit dem Lysin 153 zu konservierten basischen Resten innerhalb der ersten PH-Domäne, die chemisch das alpha-helicale Loop1-Umfeld, eines der Sekundärstrukturen des Centaurin  $\alpha 2$  charakterisieren und über Ausbildung von Salzbrücken mit Liganden interagieren könnten. Das Fluoreszenzprofil der Mutante K141Q weist im unstimulierten Zustand eine höhere Membranlokalisation auf, als der Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp ohne EGF-Stimulation. Bei Stimulation gleicht die intrazelluläre Verteilung der Centaurin  $\alpha 2$ -Mutante der des Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyps. Diese Beobachtung gibt Anlass zu der Vermutung, daß die Aminosäure an Position 141 keinen Einfluss auf die Bindung an membranlokalisierte Liganden ausübt und in unstimulierten Zellen diese sogar eher noch behindert.

Die Membranlokalisation der Centaurin  $\alpha 2$ -Mutante K153Q war von Interesse, da bei dem Lysin-Rest an Position 153 der ersten PH-Domäne der Verdacht bestand, daß „die Seitenkette von Lysin 153 zwar nicht an der Bindung des Liganden, jedoch an seiner anisotropen Diffusion in die Bindungstasche beteiligt ist“ [Max, 2000, S.159]. Die Annahme, daß keine direkte Ligandenbindung vom Lysin 153 ausgeht, kann durch die Versuchsergebnisse in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Diffusions-Theorie muß in Frage gestellt werden, da sich sowohl in unstimulierten, als auch in unstimulierten PC12-Zellen der Grad der Membranlokalisation von Centaurin  $\alpha 2$ -K141Q-Mutante und -Wildtyp gleicht.

Bei dem Arginin an Position 152 handelt es sich um einen bei Sequenzalignments mit den PH-Domänen der Phospholipase C und der Bruton`s Tyrosinkinase aufgefallenen konservierten basischen Rest im Bereich des zweiten Betastranges der ersten Centaurin  $\alpha 2$ -PH-Domäne. In der Dissertation von K. Max wird eine von diesem Aminosäurerest ausgehende Interaktion mit der Phosphatgruppe des PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> an 3-Position für möglich gehalten [Max, 2000, S.160]. Die mit der Mutation des basischen Arginins zum neutralen Glutamin chemisch nicht mehr zu vermittelnde Bindung, übt keinen Einfluss auf die Fähigkeit des Centaurin  $\alpha 2$  zur Membranlokalisation in PC12-Zellen aus, da sich die Fluoreszenzprofile der Mutante R152Q und dem Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp nicht wesentlich unterscheiden.

Bei dem Tyrosin-Rest 165 im dritten Betastrang der ersten PH-Domäne stellte sich die Frage, ob es bei der Ligandenbindung hier zu einer für den Prozess wesentlichen Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zur Phosphatgruppe an 4-Position von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> kommt. Die im Vergleich zum Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp geringgradig erhöhte Membranlokalisation der Mutante, sowohl bei Stimulation, als auch im unstimulierten Zustand der Zelle, läßt die Vermutung zu, daß der aromatische Ring des Tyrosins die Ligandeninteraktion möglicherweise behindert.

Alignmentanalysen der zweiten PH-Domäne von Centaurin  $\alpha 2$  mit den PH-Domänen der Phospholipase C und der Bruton`s Tyrosin-Kinase haben gezeigt, daß es sich beim Lysin 264, Lysin 274 und Arginin 276 um konservierte Aminosäuren handelt [Max, 2000].

Das Lysin 264 prägt den zweiten Betastrang an seinem Ende. Über den basischen Aminosäurerest könnte eine Interaktion mit dem 3- oder 4-Phosphatrest des PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> vermittelt werden. Eine Einflussnahme dieser Art auf die Membranlokalisation von Centaurin  $\alpha 2$  kann im Vergleich der Fluoreszenzprofile von Mutante K264Q mit dem Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp eindeutig bestätigt werden. Vor allem im unstimulierten Zustand der PC12-Zellen verhindert die Mutation an Position 264 die im Wildtyp schon nicht unerhebliche Membranlokalisation.

Bei dem konservierten Lysin-Rest an Position 274 wäre nach dem Strukturmodell der Centaurin-PH-Domänen eine Bindung an die 1-Phosphatgruppe des löslichen

Liganden von  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$   $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  denkbar. In den Versuchsergebnissen zeigt sich jedoch in Bezug auf die Membranlokalisation in PC12-Zellen keine bedeutsame Funktion dieses Aminosäurerestes.

Der Lysin-Rest 268 zeichnet sich im bereits schon mehrfach erwähnten PH-Domänen-Strukturmodell durch eine räumliche Nähe und daher durch eine putative Bindung zum 5-Phosphatrest des  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  aus. Die Untersuchungen zu der unter diesen Gesichtspunkten hergestellten Mutante K268Q zeigen, daß keine signifikante Einflussnahme von diesem Lysin-Rest hinsichtlich der Ligandenbindung bei EGF-Stimulation in PC12-Zellen ausgeht. Dennoch fällt auf, daß die Mutation im unstimulierten Zustand der Zelle eine im Vergleich zum Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp geringere Membranlokalisation bedingt und gibt Grund zu der Annahme, dass in ruhenden Zellen dieser polare Aminosäurerest eine relative Affinität zum 5-Phosphatrest des  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  besitzt, der bei Zellstimulation aufgrund der dann bestehenden Wechselwirkungsprozesse an Deutlichkeit verliert.

Die Möglichkeit einer Wasserstoffbrückenbindung vom Tyrosin-Rest 289 in der Mitte des dritten Betastranges zum Phosphatrest an 4-Position des  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  wurde mittels Mutation von Tyrosin zu Glutamin untersucht. Hier spiegelt sich in den Fluoreszenzprofilen eine deutliche Einflussnahme des Tyrosins 289 auf die Membranlokalisation des Centaurin  $\alpha 2$  wider, da die Mutante sowohl in unstimulierten, als auch in stimulierten PC12-Zellen eine signifikant geringere Membranbindung aufweist.

### **4.2.1 Relative Kernanfärbung in PC12-Zellen**

In unstimulierten PC12-Zellen findet sich teilweise bei nichtkonfokalen Zellbildern eine als Kernanfärbung imponierende Fluoreszenzintensitätserhöhung, die jedoch am Wahrscheinlichsten durch die Morphologie der PC12-Zellen bedingt ist. Anders als die sich v.a. horizontal ausbreitenden, planen NRK-Zellen, sitzen die im Vergleich dazu gedrungenen PC12-Zellen ihrer Unterfläche kugelig auf, sodass der Zellkern nicht horizontal, sondern vertikal ausgerichtet ist.

In dem angefertigten nicht-konfokalen Zellbild summiert sich dann die gesamte Fluoreszenzintensität über den Kern und tritt im zellulären Ruhestand deutlich hervor, wenn der Phosphatidylinositol-3-Gehalt am cortikalen Aktin, der Plasmamembran und den Pseudopodien und damit die Affinität des Centaurin  $\alpha 2$  an diesen Strukturen vermindert ist.

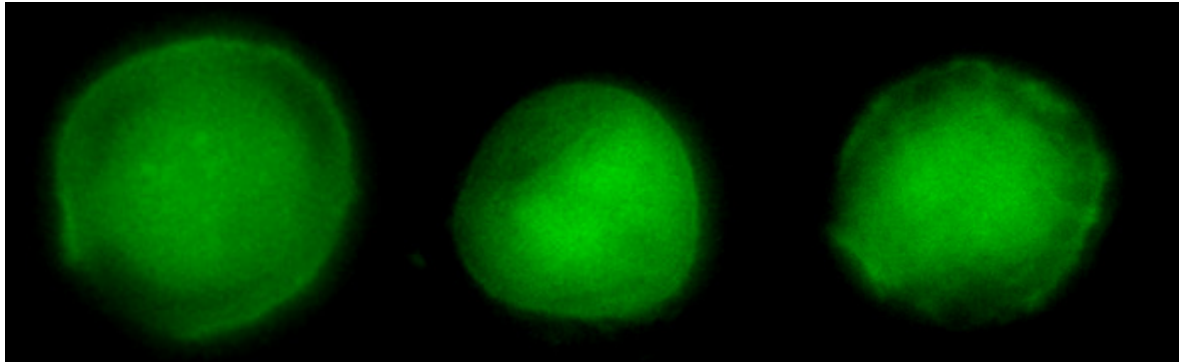


Abbildung 74: Unstimulierte, mit der Mutante K264Q transfizierte PC12-Zellen

### **4.3 Subzelluläres Lokalisationsverhalten der Centaurin $\alpha 2$ – Mutanten im Vergleich zum Centaurin $\alpha 2$ – Wildtyp in NRK – Zellen**

Die Genkonstrukte mit denen die Transfektionen in den PC12-Zellen durchgeführt wurden, dienten ebenfalls bei den NRK-Zellen als experimentelles Material. Auch die Fragestellung unter der die einzelnen Mutanten und die Fluoreszenzprofile der transfizierten Zellen hier begutachtet und bewertet werden, ist mit derjenigen der PC12-Versuchsreihe identisch (s. Kapitel 4.2).

Der Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp zeichnet sich in den NRK-Zellen durch eine Membranlokalisierung aus, die im Vergleich zu den lediglich mit dem EGFP-N1-Fusionsvektor transfizierten Zellen von deutlichem Ausmaß ist. Bei Stimulation der Zellen mit EGF wird die Translokation von Centaurin  $\alpha 2$  aus dem Cytosol an die Membran gesteigert.

Bei der Mutante K141Q ist die absolute Membranlokalisierung gegenüber dem Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp geringgradig vermindert, zeigt jedoch hinsichtlich des Translokationsprozesses dieselbe Dynamik unter Wachstumsfaktorstimulation.

Der Austausch von Arginin 152 gegen Glutamin führt in unstimulierten NRK-Zellen zu einer fast mit dem GFP-Leervektor vergleichbaren homogenen Verteilung intrazellulär. Eine Membranlokalisierung des mutierten Centaurin  $\alpha 2$  findet in diesem Zustand nicht statt. Dies kann Folge des mutationsbedingten Ausbleibens der Bindungsfähigkeit von Centaurin  $\alpha 2$  über den basischen Rest an das 3-Phosphat des PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> sein. Bei Stimulation wird die Bindung von Centaurin  $\alpha 2$  an das membranständige Phosphatidylinositol möglicherweise durch die Bindungskapazität anderer hierfür essentieller Aminosäurereste in der Sekundärstruktur bewerkstelligt, sodaß die Intensität in der Lokalisation im Vergleich zu der des Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyps nur noch geringgradig ausgeprägt ist.

Während die Mutante R152Q lediglich einen bedeutsamen Einfluss auf die Translokationsfähigkeit des Centaurin  $\alpha 2$  in unstimulierten NRK-Zellen nimmt, führt eine Mutation an Position 153 von Lysin zu Glutamin zu einem vollständigen Verlust der Membranlokalisierung des Centaurin  $\alpha 2$ , unabhängig von der zellulären Stoffwechselaktivität. Hier könnte die Theorie einer Einflussnahme des Lysins 153 an der anisotropen Diffusion des Liganden in die Bindungstasche der ersten PH-Domäne von Centaurin  $\alpha 2$  [Max, 2000, S.159] als erklärende Möglichkeit in Betracht gezogen werden.

Die vom Tyrosin 165 theoretisch mögliche Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung an den membranassoziierten Liganden kann für die NRK-Zellen anhand der Versuchsergebnisse, zumindest für die Membranlokalisierung des Centaurin  $\alpha 2$  als unwesentlich bewertet werden. Sowohl in den unstimulierten, als auch in den stimulierten NRK-Zellen führt die Mutation dieses Aminosäurerestes zu keinem vom Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp abweichenden Lokalisationsbild.

Schon in den, der Generierung der Fluoreszenzprofile vorausgehenden Zellauszählungen fiel auf, dass die Mutante K264Q in unstimulierten, als auch in stimulierten NRK-Zellen ein vollkommen anderes Plasmamembranbindungsverhalten aufweist, als dieselbe Mutante in PC12-Zellen (s. Kapitel 4.4). Die Profile weisen auf eine vollständig fehlende Plasmamembranbindung der Mutante K264Q hin und haben daher eine große Ähnlichkeit mit der Negativ-Kontrolle, dem GFP-Fusionsprotein. Mit diesen Ergebnissen muss ein sehr großer Einfluss des Lysin-

Restes an Position 264 auf die Translokations- und Bindungsmöglichkeit des Centaurin  $\alpha 2$  in NRK-Zellen vermutet werden. Eine eingehendere Untersuchung dieser Beobachtung in weiterführenden Experimenten erscheint hier sinnvoll.

Die Mutante K268Q zeigt ein ähnliches Fluoreszenzprofil, wie bereits die Mutante K153Q. In unstimulierten NRK-Zellen wird eine Lokalisation des Centaurin  $\alpha 2$  an die Membran vollständig unterbunden und auch bei EGF-Stimulation verbleibt der größte Anteil des zellulären Centaurin  $\alpha 2$  im Zellzentrum. Die Möglichkeit einer von diesem Lysin ausgehenden Bindung, am ehesten an die Phosphatgruppe an 5-Position des PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, wird hier als Ursache für die ausbleibende Membranlokalisation vermutet. Das hohe Ausmaß des Verlustes des Translokationsvermögens der Mutante K268Q, läßt darauf schließen, daß der Lysin-Rest an Position 268 der Centaurin  $\alpha 2$ -Aminosäuresequenz für die Membranlokalisation essentiell ist.

Das Lysin 274 scheint in NRK-Zellen, neben dem Arginin 153 und Arginin 268 einen entscheidenden Einfluss auf das Membranlokalisationsvermögen von Centaurin  $\alpha 2$  auszuüben. Bei fehlender Stimulation durch extrazelluläre Reize, findet sich eine homogene, unspezifische intrazelluläre Verteilung des mutierten Proteins. In EGF-stimulierten NRK-Zellen ist eine geringgradige, nicht signifikante Tendenz zur Membrantranslokation zu beobachten, ähnlich den Daten, die zu den unstimulierten, den Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp exprimierenden Zellen erhoben wurden.

Die Centaurin  $\alpha 2$ -Mutante Y289Q scheint ebenfalls eine beachtenswerte Funktion im Lokalisations- und Translokationsmodus von Centaurin  $\alpha 2$  zu erfüllen. Vermutlich spielt eine vom Tyrosin 289 ausgehende Wasserstoffbrückenbindung zum Phosphatrest an 4-Position des PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> für den Membranlokalisationsmechanismus von Centaurin  $\alpha 2$  eine entscheidende Rolle, da die Fluoreszenzprofile eine im Vergleich zum Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp unbedeutende Membranlokalisation der Mutante Y289Q nachweisen.

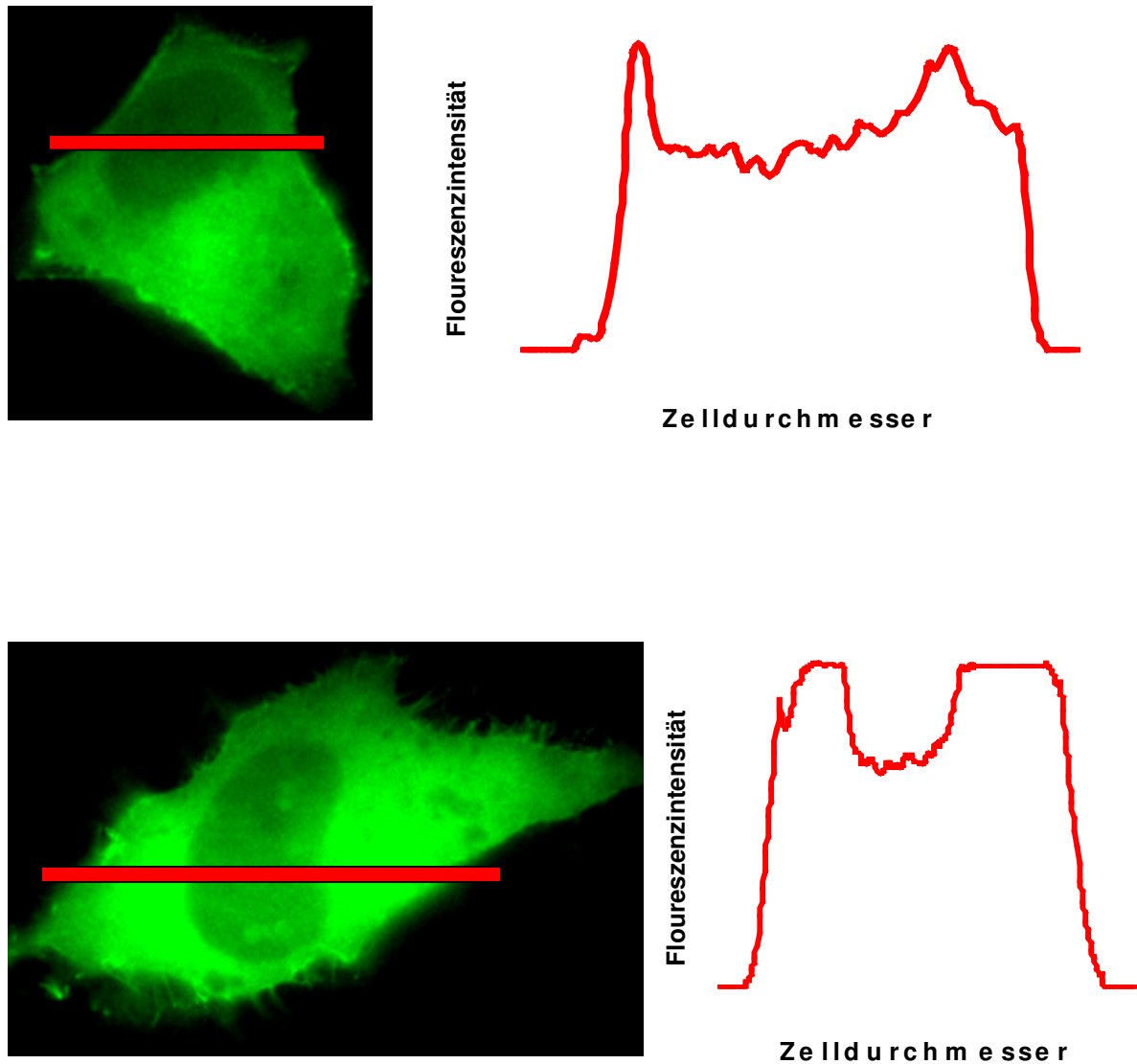
Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die N-terminale PH-Domäne des Centaurin  $\alpha 2$  für die physiologischen Translokationsprozesse dieses Proteins in NRK-Zellen die Hauptrolle spielt.



### **4.3.1 Kernausschluss als möglicher Hinweis auf Vermittlung eines nukleolären Lokalisationssignals durch Centaurin $\alpha 2$**

Für die Generierung der zellulären Fluoreszenzprofile wurde eine kleine Zellanzahl (je Fusionsprotein  $n=24$ ) zufällig aus dem großen Pool an angefertigten mikroskopischen Bildern ausgewählt. Dieser Pool setzte sich aus sämtlichen Zellbildern zusammen, die in den voneinander unabhängigen Versuchen angefertigt worden waren. Damit das Bilderkontingent eines Versuches in den Pool aufgenommen wurde, wurde bei den meisten Mutanten Wert darauf gelegt, daß in mindestens ein bis zwei weiteren unabhängigen Versuchen die Ergebnisse des ersten Experimentes zumindest hinsichtlich der Quote einer sichtbaren Membranlokalisation reproduzierbar waren. Bei diesen Auszählungen (s. Ergebnisse 3.3.2 ff) fiel bei den NRK-Zellen ein gelegentlich zu beobachtender Kernausschluss auf, dessen Häufigkeit in die Datenerhebung mit aufgenommen wurde.

Bei intensiverer Betrachtung dieser quantitativen Analyse wird deutlich, daß die Häufigkeit eines Kernausschlusses des Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyps bzw. der Centaurin  $\alpha 2$ -Mutanten in unstimulierten NRK-Zellen im Vergleich zu EGF-stimulierten Zellen bis zu achtfach erhöht ist.



**Abbildung 75: Nichtkonfokale Zellbeispiele (hier: Mutante Y165Q ust), die einen deutlichen Kernausschluss in NRK-Zellen zeigen (durch Messung der Floureszenzintensität über die Zelle, jeweils auch graphisch dargestellt)**

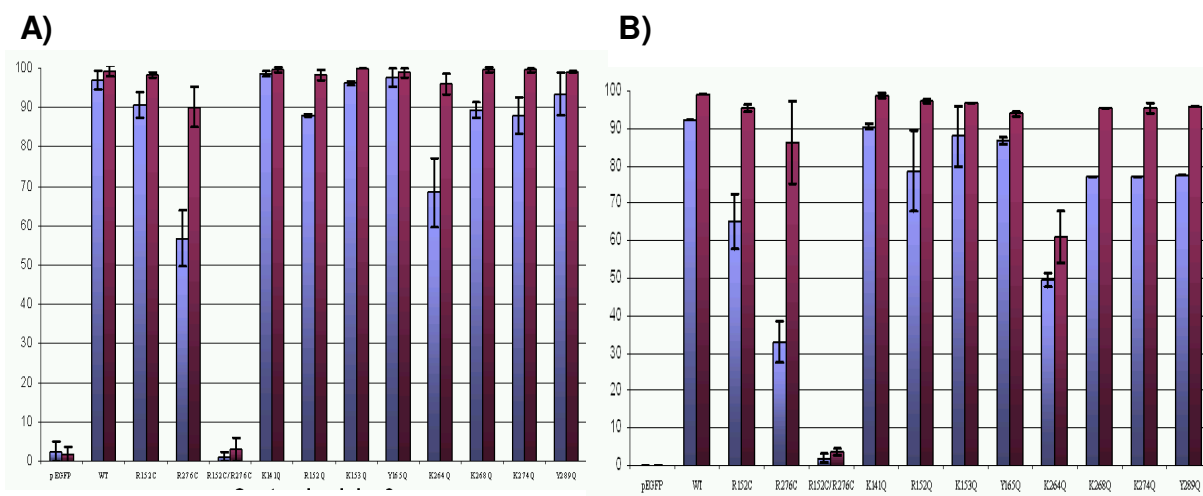
Da in den NRK-Zellen mit Kernausschluss perinukleär keine erhöhte Floureszenzintensität in Form eines Nuclear Envelope zu beobachten ist, ist die Existenz eines für das Centaurin  $\alpha 1$  nachgewiesenen Kern-Lokalisationssignals [Tanaka et al, 1999; Weber et al 2000] im Centaurin  $\alpha 2$  als Ursache für den Kernausschluss nicht wahrscheinlich. Eine mögliche Erklärung für den v.a. in unstimulierten NRK-Zellen auftretenden Kernausschluss ist ggf. das Fehlen von Phosphatidylinositol 3-reichen, nukleär befindlichen Nuclear Speckles [Hall et al,

2006], die sich bei zellulärer EGF-Stimulation ausbilden und das im Cytosol befindliche Centaurin  $\alpha 2$  hochaffin binden. Ein Kernausschluss ist in stimulierten NRK-Zellen daher deutlich seltener zu beobachten.

Solche Funktionen und Signalwege des Centaurin  $\alpha 2$  sind denkbar, lassen aber ungeklärt, warum nicht zumindest alle unstimulierten NRK-Zellen diesen Kernausschluss zeigen.

#### 4.4 Lokalisationsunterschiede von Centaurin $\alpha 2$ und seinen Mutanten im Zelllinienvergleich

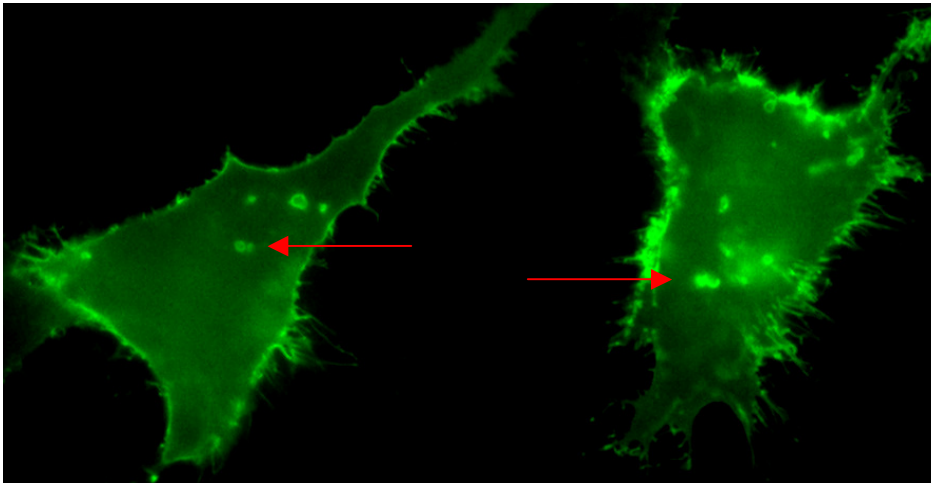
Schon in den Vorversuchen fiel auf, daß das Centaurin  $\alpha 2$  in PC12-Zellen im Vergleich zur Expression in NRK-Zellen eine unabhängig vom zellulären Stimulationszustand durchschnittlich höhere Membranaffinität aufweist (s. nachstehende Grafiken).



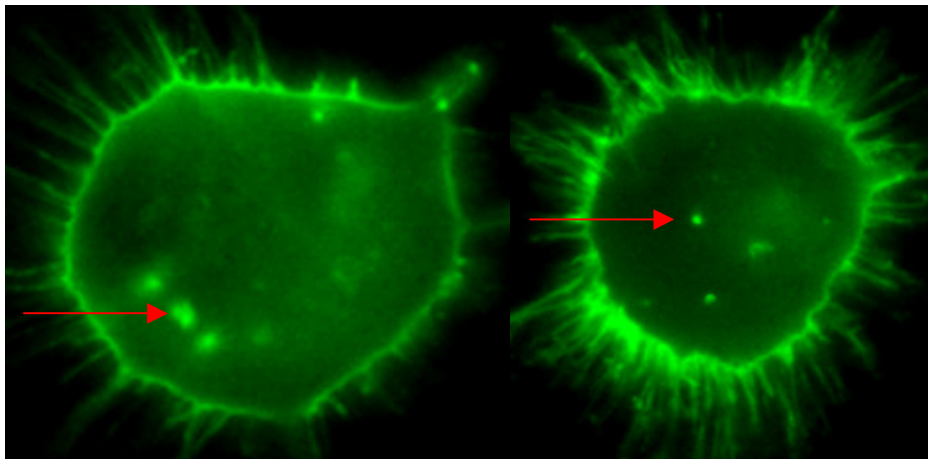
**Abbildung 76:** Graphische Darstellung des Zellanteils aus bis zu 3 unabhängigen Versuchen mit Plasmamembranbindung ( in %) vom Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp (WT) und seinen Mutanten in unstimulierten (lila) und stimulierten (burgund) PC12- (A) und NRK-Zellen (B).

Da auch die Fluoreszenzintensität über die gesamte Zelle und damit die Expressionsrate des Centaurin  $\alpha 2$  in den PC12-Zellen deutlich stärker ausgeprägt war, als in den NRK-Zellen, läßt einen gesteigerten Zellstoffwechsel in der tumorösen Zelllinie vermuten.

In beiden Zelllinien sind eine Anzahl von Zellen zu finden, die im Cytosol sehr stark fluoreszierende, runde Strukturen aufweisen. Sie könnten eine Folge der Proteinüberexpression in Form sog. Streßgranulen darstellen.



**Abbildung 77: Streßgranulen in mit Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp transfizierten und mit EGF stimulierten NRK-Zellen**



**Abbildung 78: Streßgranulen in mit Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp transfizierten PC12-Zellen ( links: unstimuliert; rechts: EGF-stimuliert)**

Streßgranulen treten in Zellen auf, die z.B. oxidativem, osmotischem und thermischem Streß, UV-Strahlung oder viralen Infektionen, ggf. auch einer unphysiologisch hohen Proteinüberexpression ausgesetzt sind. Abhängig vom dadurch bedingten Phosphorylierungsgrad eukaryotischer Zellen wird die mRNA cytoplasmatisch gebündelt. Vermittelt wird dieser Prozess durch RNA-bindende Proteine wie TIA-1 ( T-cell internal antigen-1) und TIAR (TIA-1-related protein), welche bei zellulärem Streß aus dem Kern migrieren, im Cytoplasma an die dort befindliche RNA binden und sie in Form dieser Streßgranulen, ggf. als Zwischenlager zusammenschließen, um die mRNA möglicherweise nach Abklingen der

Stresssituation dann für die Translation wieder freizugeben [Kadersha, N und Anderson, P, 2002].

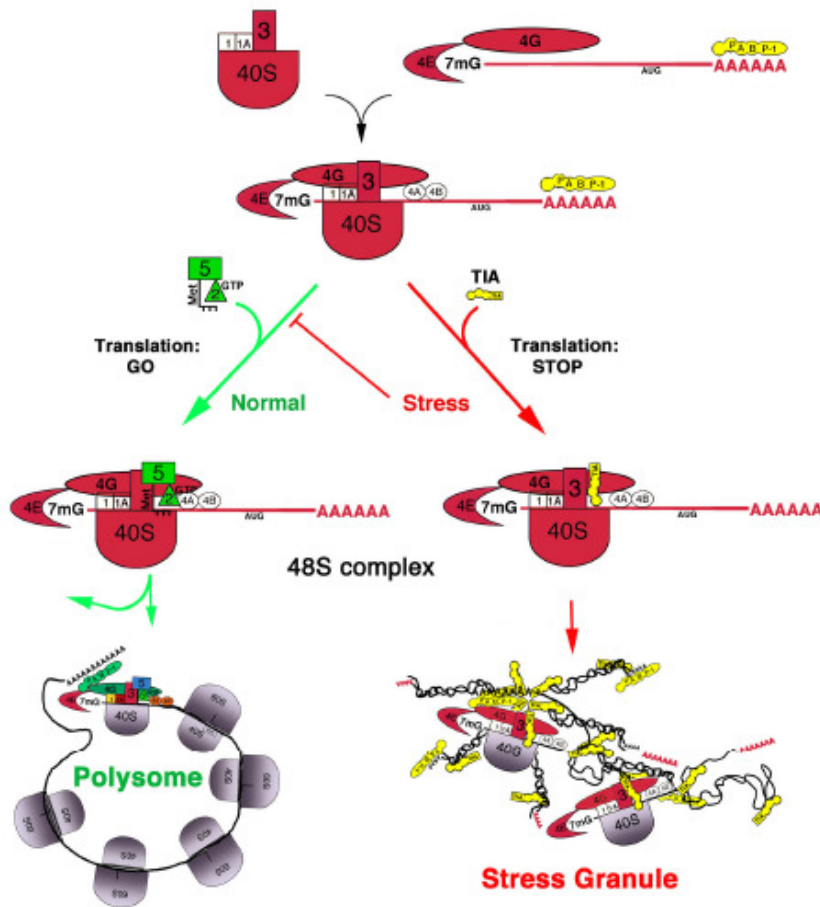


Abbildung 79: Schematische Darstellung der cytoplasmatisch lokalisierten Translation in Abwesenheit (grün) und Anwesenheit von zellulärem Streß (rot). Der Translationsprozess wird durch das Anlagern der methionierten tRNA ans Startcodon die ribosomale 40S-Untereinheit initiiert (links). Bei zellulärem Streß blockiert die Bindung von TIA-1 den Translationsprozess und führt zur Ausbildung von Streßgranulen (rechts). [Kadersha, N und Anderson, P, 2002]

Im Zelllinienvergleich zeigt das exprimierte, lediglich fluoreszierende GFP-Protein eine gleichmäßig ungerichtete intrazelluläre Verteilung und bestätigt dadurch seine Funktion als Negativkontrolle und gilt als Beweis dafür, daß das Fluoreszenzprotein selbst keine Lokalisationstendenz besitzt, die bei Kopplung mit dem Centaurin  $\alpha$ 2-Protein dessen Lokalisationsverhalten beeinflusst. Werden die Fluoreszenzprofile des Centaurin  $\alpha$ 2-Wiltyps und der Mutante R152Q unter den Zelllinien verglichen, fällt auf, daß vor allem im unstimulierten Zustand die Membranbindung in den NRK-Zellen geringer ausgeprägt ist, während bei der Mutante Y289Q keine eindeutigen Lokalisationsunterschiede auffallen. Bei der Mutante K141Q und Y165Q sind dagegen deutliche Abweichungen zwischen PC12- und NRK-Zellen zu verzeichnen.

Mutante K141Q zeigt in PC12-Zellen selbst bei ausbleibender Stimulation eine Membranlokalisation. Die Expression dieser Mutante in NRK-Zellen führt, sowohl im unstimulierten, als auch im stimulierten Zustand dagegen zu keiner nennenswerten membranösen Protein-Translokation. Bei Mutante Y165Q liegt in den PC12-Zellen unabhängig vom zellulären Aktivitätszustand eine gleichmäßig hohe Plasmamembranbindung vor. Ebenfalls unabhängig von der EGF-Stimulation verbleibt diese in den NRK-Zellen hingegen auf einem gleichbleibend niedrigen Niveau.

Das Lokalisationsmuster der Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante K264Q zeigt Unterschiede zwischen den Zelllinien. Im Vergleich zum Centaurin  $\alpha$ 2-Wildtyp ist die Plasmamembranbindung der Mutante geringer ausgeprägt. Während aber in den PC12-Zellen, vielleicht aufgrund der schon vorangehend erwähnten höheren Basisstoffwechsel-Aktivität der Tumor-Zellen, eine dezente Bindung der Mutante K264Q an der Membran noch nachweisbar ist, bleibt diese bei den NRK-Zellen komplett aus, was einem glockenförmigen Verlauf des Fluoreszenzprofils entspricht.

Das im Vergleich zu in PC12-Zellen auffallend geringer ausgeprägte Plasmamembranbindungsverhalten der Centaurin  $\alpha$ 2-Mutanten K153Q, K268Q und K274Q in NRK-Zellen könnte als Hinweis auf die Bedeutsamkeit dieser Aminosäurereste im Translokationsmechanismus der nativen, nicht-tumorösen Zelle gewertet werden.

Die hier in Kürze zusammengefassten Lokalisationsunterschiede und – Abweichungen zwischen PC12- und NRK-Zellen legen die Vermutung nahe, daß die Funktion des Centaurin  $\alpha$ 2 als putatives Adapterprotein in Tumor-Zellen einer weniger komplexen Regulierung bedarf bzw. eine Ligandenbindung eher unabhängig von der Proteinstruktur möglich ist, als im von Stimulatoren und Inhibitoren bestimmten geregelten Stoffwechsel einer nicht-tumorösen Zelle.

#### **4.5 Vergleich der *in vivo* Ergebnisse der Centaurin $\alpha 2$ - Mutanten R152C, R276C und R152C/R276C mit *in vitro* ermittelten Daten in Bezug auf eine mögliche Phosphatidylinositol-Selektivität**

Die Arbeitsgruppe um Paul Whitley hat 2002 mittels Sequenzanalysen und Klonierung das zu Centaurin  $\alpha 1$  51-59% sequenzhomologe Centaurin  $\alpha 2$  der Ratte erstmals als ein weiteres Mitglied der Centaurine vorgestellt.

*In vitro* wurden zur Identifizierung von Liganden und zur Abschätzung des *in vivo*-Verhaltens Lipid-Bindungsassays mit Liposomen-tragenden PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> durchgeführt. Der Vergleich der Ergebnisse mit den bereits vorliegenden experimentellen Daten zum Ratten-Centaurin  $\alpha 1$  zeigten Abweichungen, die auf ein anderes zelluläres Signalling und somit eine andere Funktion des Centaurin  $\alpha 2$  schließen ließen. Die Daten wurden nicht nur für den Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp, sondern auch für drei Punkt-Mutanten entwickelt, die sich durch Mutation von Arginin-Resten zu Cystein (C-terminale PH-Domäne: R151C, N-terminale PH-Domäne: R275C, R151C/R275C) innerhalb der PH-Domänen auszeichneten.

Diese Veröffentlichung wurde zum Anlass genommen, die o.g. Mutanten in dieser Arbeit mit zu untersuchen, um vergleichbare *in vivo*-Daten zu schaffen. Da hier nicht mit der Ratten-, sondern der zu 83% sequenzhomologen humanen Isoform des Centaurin  $\alpha 2$  gearbeitet wurde, divergiert die Bezeichnung der Mutanten geringfügig. Bei den mutierten Aminosäure-Resten R152 und R276 handelt es sich jedoch dennoch um lokalimatorisch die entsprechenden polaren Aminosäuren des Centaurin  $\alpha 2$  der Ratte.

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, steigt bei Zellstimulation der Plasmamembrangehalt an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> und cytosolisch ist ein Anstieg von IP<sub>4</sub> zu verzeichnen. Unterliegt die Zelle keinen akuten externen Stimuli durch Wachstumsfaktoren, Hormone etc., ist v.a. das PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> und sehr viel Phosphatidylinositol in der Zellmembran repräsentiert. Diese Kenntnis begründet die direkte Vergleichbarkeit der *in vitro*-Daten von Whitley et al. mit den *in vivo*-Erkenntnissen.

Die Lipid-Bindungsassays wiesen bei den Mutanten auf eine Selektivität der PH-Domänen für die Phosphatidylinositol-Bindung hin. PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>-Bindung erfolgte v.a. durch die N-terminale PH-Domäne, während das in stimulierten Zellen in hohem Maße vorkommende PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> von beiden PH-Domänen gleichermaßen gebunden wird. Die *in vivo*-Ergebnisse (s. Kapitel 3.4) können diese Beobachtungen nur zum Teil bestätigen:

Die Fluoreszenzprofile für die Centaurin  $\alpha$ 2-Mutante R152C in der unstimulierten Zelle machen durch eine vollständig ausbleibende Plasmamembranlokalisation v.a. in den NRK-Zellen deutlich, daß das Arginin an Position 152 für die PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>- oder PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindung an unstimulierten Membranen, d.h. bei fehlendem PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> mit verantwortlich ist. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu dem mit PI(3,4)P<sub>2</sub> durchgeführten Lipid-Bindungsassay, in welchem gezeigt wird, daß die R151-Mutation die Bindung an PI(3,4)P<sub>2</sub> nicht beeinflusst. Der bereits besprochene erhöhte Basal-Stoffwechsel in den PC12-Zellen kann für die dennoch nachweisbare, wenn auch geringgradige Membranlokalisation in den unstimulierten Tumor-Zellen verantwortlich sein. Es ist möglich, dass die N-terminale und die C-terminale PH-Domäne von Centaurin  $\alpha$ 2 eine Bindung an PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> mediierten, die jedoch stark von der Intaktheit der N-terminalen PH-Domäne abhängig ist.

Das Arginin 276 scheint sowohl in den NRK-, als auch in den PC12-Zellen für eine PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>- oder PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindung essentiell zu sein, da eine Translokation der Mutante zur Plasmamembran hier in beiden Zelllinien ausbleibt. Diese durch R276 vermittelte Ligandenbindung findet sich im Lipidbindungsassay für die Mutante R275 gleichermaßen bestätigt. Die Doppelmutation R152C/R276C führt zu einem maximalen Verlust der PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>- oder PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindung durch Centaurin  $\alpha$ 2 und bestätigt auch hier die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse.

Die im Rahmen der Lipidbindungsassays beobachtete, ca. um 50% reduzierte PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-Bindung von R151C ist *in vivo* reproduzierbar. V.a. in den stimulierten NRK-Zellen führt der Verlust des Arginin an Position R152 zu einer im Vergleich zum Centaurin  $\alpha$ 2-Wildtyp ebenfalls um die Hälfte reduzierten Plasmamembranlokalisation. Von noch wesentlicherer Bedeutung ist die Mutation



R276C. In stimulierten NRK- und PC12-Zellen bleibt die Membrantranslokation des mutierten Centaurin  $\alpha 2$  fast vollständig aus. Mit dieser Beobachtung tritt erneut eine Diskrepanz zu den *in vitro*-Daten auf, die eine mit dem Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp vergleichbare, also durch die Mutation unbeeinflusste Bindungsaffinität für PI(3,4,5)P<sub>3</sub> der Mutante R275C zeigen.

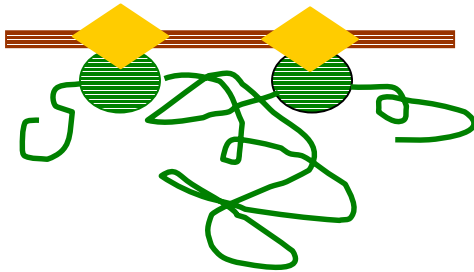
Für die Doppelmutante R152C/R276C wird *in vitro* ein fast vollständiger Verlust der PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, als auch der PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-Bindung beschrieben, der sich durch ein maximales Ausbleiben der Plasmamembranbindung in beiden Zelllinien im unstimulierten und stimulierten Zustand *in vivo* bestätigt.

Als Ursache für die von den *in vitro*-Ergebnissen abweichenden Beobachtungen hinsichtlich der Affinität der Mutante R151C bzw. R152C für PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> und der Mutante R275C bzw. R276C für die Bindung an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> müssen mögliche Unterschiede im Ligandenbindungsverhalten und Funktionsunterschiede des von der Ratten-Isoform strukturell zumindest in 17% abweichenden humanen Centaurin  $\alpha 2$  in Betracht gezogen werden. Des weiteren könnte die Möglichkeit bestehen, daß das Centaurin  $\alpha 2$  nicht immer direkt an die in den Membranen lokalisierten Phosphatidylinositole bindet, sondern noch im Cytosol eine unbekannte Ligandenbindung eingeht, über die letztlich die Plasmamembranbindung vermittelt wird. Die Schlussfolgerungen der *in vitro*-Experimente setzen eine direkte vermittelte Assoziation zwischen Centaurin  $\alpha 2$  und den membranständigen Phosphatidylinositolen voraus. Die diesen Ergebnissen gegenübergestellten *in vivo*-Daten, lassen auf einen komplexeren Bindungs- und Translokationsmechanismus von Centaurin  $\alpha 2$  an die Plasmamembran vermuten.

Eine durchaus mögliche Interaktion des Centaurin  $\alpha 2$  mit den Phosphatidylinositolen in der Plasmamembran, welches die starke Plasmamembranaffinität bzw. den Verlust der Plasmamembran-Bindungskapazität bedingt, wäre das Phänomen der Avidität. Avidität beschreibt einen Prozess, in dem zwei miteinander verbundene Liganden mit zwei zusammenhängenden Bindungsdomänen wechselwirken. Aus dieser multivalenten Bindungskapazität resultiert eine bis zu 1000-fach erhöhte Bindungsstärke als bei einer 1:1 Wechselwirkung. Hinsichtlich der in dieser Arbeit gewonnenen experimentellen Ergebnisse liefert das Phänomen der Avidität eine

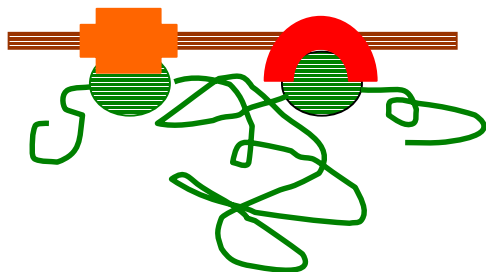
sinnvolle Erklärung der mit Centaurin  $\alpha 2$  und seinen Mutanten auf zellulärer Ebene gemachten Beobachtungen:

**Ruhende Zelle**



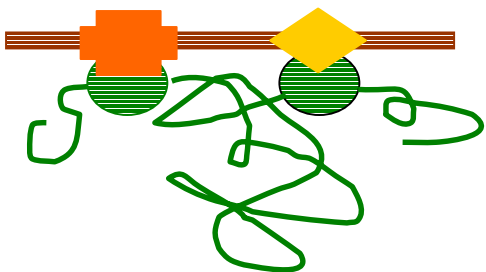
Schwache  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  vermittelte Plasmamembran-Bindung

**Zellstimulation, Frühphase**



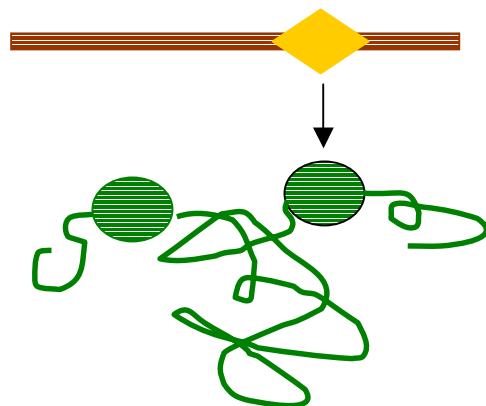
Starke  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$  und  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  vermittelte Plasmamembran-Bindung

**Zellstimulation, Spätphase**



Nachlassende  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$  und  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  vermittelte Plasmamembran-Bindung

**Nach Zellstimulation**



Durch  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  insuffizient vermittelte Plasmamembran-Bindung

Abbildung 80: Schematische Darstellung der durch die Bindung der **intakten PH-Domänen** des Centaurin  $\alpha 2$  an die Phosphatidylinositole der Plasmamembran vermittelten multivalenten Bindung ( Erläuterung s. folgender Text)

Centaurin  $\alpha 2$  geht bei unstimulierten Zellen mit beiden PH-Domänen eine Bindung mit dem in unstimulierten Membranen v.a. vorkommenden  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  ein. Für diese schwach ausgeprägte Bindung ist die Intaktheit beider PH-Domänen des Centaurin  $\alpha 2$  essentiell.

Erfolgt in der Frühphase der durch Wachstumsfaktoren induzierten Zellstimulation nun der Plasmamembrangehalt an  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  und v.a.  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$  an und fällt der  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ -Spiegel in der Spätphase deutlich ab, bindet das Centaurin  $\alpha 2$  über seine C-terminal und N-terminal lokalisierte PH-Domäne an diese Phosphatidylinositole hochaffin. Der Arginin-Rest an Position 276 der Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtypsequenz scheint hierfür essentiell zu sein, da die Plasmamembranbindung bei der Mutante R276C sowohl im unstimulierten, als auch im stimulierten Zustand fast vollständig ausbleibt. Das Arginin der C-terminalen PH-Domäne an Position 152 zeigt die gleiche Tendenz in weniger starker Ausprägung. Werden nun die Funktionen beider Aminosäure-Reste in Form der Doppelmutante R152C/R276C ausgeschaltet bzw. fällt nach Zellstimulation der Plasmamembrangehalt an  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  unter ein Mindestmaß, kann gar keine Plasmamembranlokalisierung des Centaurin  $\alpha 2$  mehr vermittelt werden und die ausbleibende Avidität zwischen Phosphatidylinositolen der Plasmamembran und den PH-Domänen des Centaurin  $\alpha 2$  spiegelt sich in Form einer ungerichteten und unspezifischen Fluoreszenzverteilung in der Zelle wider.

Eine Erklärung, warum die mutationsbedingten Fluoreszenzveränderungen hinsichtlich ihrer Intensität bei Zellstimulation in den nativen Nierenzellen (NRK) deutlicher ausgeprägt sind, als bei den Tumorzellen (PC12), könnte ein durch den erhöhten Basalstoffwechsel der Tumorzelle bedingter höherer Grundgehalt an  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$  und  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  in seiner Plasmamembran verantwortlich sein, der dazu führt, dass die Bindung von Centaurin  $\alpha 2$  an die Plasmamembran der PC12-Zelle schon im zellulären Ruhezustand im Vergleich zur NRK-Zelle erhöht ist.

Dieser doch sehr wahrscheinliche Mechanismus revidiert zusammen mit der nachgewiesenen intrazellulären Lokalisationsdynamik des Centaurin  $\alpha 2$  (s. Fluoreszenzprofiländerungen bei Stimulation und ausbleibender Stimulation) die von Whitley et al. gemachte Aussage, daß das Centaurin  $\alpha 2$  nur membrangebunden in

Zellen vorkommt und zu einem membranunabhängigen Translokationsprozess in der Zelle nicht fähig ist.

### **4.6 Einfluss des Centaurin $\alpha 2$ auf die Ausbildung spezifischer zellulärer Strukturelemente**

Die von Whitley et al. 2002 aufgestellte Schlussfolgerung, daß Centaurin  $\alpha 2$  im Gegensatz zu Centaurin  $\alpha 1$  nur membrangebunden in der Zelle vorliegt, wurde neben der Datenerhebung für die Fluoreszenzprofilmessungen noch mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie eingehender untersucht. Eine weitere Fragestellung im Rahmen der detailreichen Darstellungsmöglichkeit dieses mikroskopischen Verfahrens war die in vorangehenden zellulären Versuchen bereits beobachtete Lokalisation der Centaurine in Bereichen der Cytoarchitektur, die nicht der Plasmamembran entsprachen [Max, 2000; Illies 2002].

#### **4.6.1 Assoziation des Centaurin $\alpha 2$ mit Cytoskelettarealen**

Die in Kapitel 1.3.1 bereits ausführlich erläuterte mögliche Einflussnahme des Arf-GAP Centaurin  $\alpha 2$  auf den aktiven Prozess des Cytoskeletts vor allem im Bereich der als Knotenpunkte bezeichneten Focal adhesions wurden in dieser Arbeit zum Anlass genommen den transfizierten Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp, seine Mutanten R152C, R276C und R152C/R276C, sowie das als Negativ-Kontrolle dienende pEGFP auf eine Lokalisation in diesem Bereich hin zu untersuchen. Im Ergebnisteil (Abschnitt 3.5) werden die dekonvolvierten und hier besprochenen Zellschnitt-Bilder von ausgesuchten PC12- und NRK-Zellen, in denen die Fluoreszenz des Fusionsproteins Cytoskelettareale demarkiert, demonstriert.

Die mit dem Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp transfizierten Zellen zeigen in beiden Zelllinien, in erhöhtem Maße bei EGF-Stimulation, die Lokalisation des Proteins an faserigen Ausläufern der Plasmamembran und an den intrazellulären Strukturen des Cytoskeletts. Des weiteren werden im Bereich der Zellmembranen kompakte, basisnahe Fluoreszenzareale sichtbar, bei denen es sich am Ehesten um die sog. Focal adhesions handelt. Eine genauere Unterscheidung zwischen Cytoskelett und

Centaurin  $\alpha 2$  und damit die gezielte Sichtbarmachung der miteinander assoziierten Moleküle könnte durch Erzeugen von zellulärer Doppelfluoreszenz, z.B. der Markierung der Mikrotubuli mit dsRed erreicht werden. Da dieses Verfahren einen großen zusätzlichen versuchstechnischen Aufwand bedeutet hätte, wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet.

Bei den Zellen, die das Leervektor-Protein pEGFP exprimieren, sind vergleichbare fluoreszierende Bereiche nicht zu finden. Es ist jedoch auffällig, dass vor allem bei den PC12-Zellen unter Stimulation die Fluoreszenzintensität im dadurch klar markierten Zellkern stark erhöht zu sein scheint und als relative Kernanfärbung imponiert. Dies ist am Ehesten auf die konvexe Zellform der adhären wachsenden PC12-Zellen und den dadurch optisch als nukleäre Abgrenzung resultierenden Summationseffekt zurückzuführen.

Bei den Mutanten R152C und R276C nimmt zwar der Fluoreszenzintensitätsunterschied zwischen Cytosol und Plasmamembran und damit die visuell bessere Abgrenzbarkeit der sich an den Zellgrenzen abzeichnenden Strukturen ab, das Auftreten der als Focal adhesions interpretierten Verdichtungen ist dennoch nachweisbar.

Die mit der Doppelmutante R152C/R276C transfizierten Zellen bestätigen die Beobachtungen, die bereits in der nicht-konfokalen Mikroskopie gemacht wurden. Auch in der stark detaillierten Darstellungsweise, wie sie mit der konfokalen Mikroskopie möglich ist, zeigt diese Mutante eine auffallend gleichsinnige und damit ungerichtete Lokalisation mit dem pEGFP-Leervektor-Protein.

Bei der Anfertigung der Zellbilder fielen die als Pseudopodien imponierenden Aussackungen der Zellmembran, sowohl in den NRK-, als auch in den PC12-Zellen auf, die jedoch nicht regulär nachzuweisen waren, sondern abhängig vom Stimulationszustand und vom transfizierten Fusionsprotein in Erscheinung traten. Diese besondere Form der Zelladhäsions- und Kontakt-Fläche wurde daraufhin gesondert Beachtung geschenkt.

Es fiel zunächst auf, dass die Pseudopodien tendenziell anzahlmäßig in den PC12-Zellen geringer als in den NRK-Zellen ausgeprägt waren. Es besteht in den PC12-Zellen also auch eine verringerte Anheftungs- und Kontaktfläche, welche zellmorphologisch nochmals den Unterschied zwischen Tumor- und Nichttumor-Zellen und dem Wissen um das gestörte Wachstumsverhalten einer tumorös entarteten Zelle bestätigt.

Bei den NRK-Zellen scheint insgesamt das Maß der Plasmamembranbindung von Centaurin  $\alpha 2$  v.a. nach EGF-Stimulation mit dem Grad der Pseudopodienbildung zu korrelieren. Dennoch gibt es ein paar wenige Mutanten, die eine gegensätzliche Beobachtung zulassen. Bei den Mutanten R152Q, K268Q und R276C nimmt die Ausprägung der Pseudopodien bei EGF-Stimulation hingegen ab. Die Doppelmutante R152C/R276C zeigt eine leichte Zunahme der Pseudopodienanzahl unter Stimulationsbedingungen bei fast vollständigem Verlust der Plasmamembranbindung. Die Mutante K141Q und in geringerem Maße auch Y165Q zeigt im Vergleich zum Centaurin  $\alpha 2$  – Wildtyp hingegen bereits ohne EGF-Stimulation eine erhöhte Membranaffinität.

PC12-Zellen neigen schon bei Transfektion mit dem Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp geringer zur Ausbildung von Pseudopodien, als die entsprechend transfizierten NRK-Zellen. Dennoch verstärkt sich die Abrundung der Zellen bei den Mutanten R152C, R276C, K264Q und der Doppelmutante R152C/R276C bei gleichzeitiger Abnahme der Plasmamembranbindung des mutierten Centaurin  $\alpha 2$ . Werden Plasmamembranbindungsverhalten und Quantität der Pseudopodien auch hier ins Verhältnis gesetzt, so ist für die PC12-Zellen im Vergleich zu den NRK-Zellen die Korrelation deutlich ausgeprägter, wobei auch hier die stimulierten Zellen eher zur Pseudopodien-Ausbildung neigen. Bei der Mutante Y165Q fällt jedoch auf, dass bei erhaltener Membranbindungskapazität die Ausbildung von Pseudopodien nicht nachweisbar ist und bei der Mutante bereits die Membranaffinität ohne EGF-Stimulation ausgeprägter ist, als bei dem Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass unter EGF-Stimulation und damit unter erhöhtem zellulären PIP3 und ggf. infolge der IP4-Generierung die Translokation von Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp und der Mehrzahl seiner Mutanten an die

Plasmamembran zunimmt. Des weiteren korreliert hochsignifikant der Grad der Bindung von Centaurin  $\alpha 2$  an die Plasmamembran direkt mit der zellulären Pseudopodienausbildung, die bei den PC12-Zellen noch deutlicher ausgeprägt ist, als bei den NRK-Zellen. Ebenfalls scheint die zelluläre EGF-Stimulation die Pseudopodienanzahl zu erhöhen, obwohl dies nur als Trend zu beobachten ist und vermutlich daran liegt, dass die Anzahl ausgewerteter Zellen zu gering war, um diese Korrelation deutlicher hervorzuheben. Einzelne Mutanten (PC12-Zellen: K141Q, R152C/R276C, R152Q, R276C, Y289Q; NRK-Zellen: K141Q, R152C/R276C, R152Q, K268Q, R276C) zeigen starke Abweichungen von diesen Beobachtungen und zeigen somit ggf. die spezifische Selektivität der PH-Domänen für  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ,  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  und  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ , sowie für unterschiedliche Texturen der zytosolischen Seiten beider Membranen auf. Diese kann geprägt sein durch eine andere Lipidzusammensetzung, anderen kortikales Zytoskelett, unterschiedliche, ebenfalls PIP3 und PIP2 bindende Proteine, mit denen das Centaurin  $\alpha 2$  als ein Mitglied der Arf-Gap-Familie möglicherweise, genauso wie unter Umständen mit F-Aktin direkt, interagiert.

Insgesamt binden die PC12-Zellen häufiger an die Plasmamembran als NRK-Zellen unter vergleichbaren Bedingungen, vielleicht weil sie weniger kompetitierende PIP3-Bindeproteine besitzen oder bereits im Basalstoffwechsel mehr PIP3 und/oder IP4 vorrätig haben und/oder nach EGF-Stimulation generieren.

### **4.6.2 Veränderung der räumlichen Ausrichtung von PC12- und NRK-Zellen unter Centaurin $\alpha 2$ –Überexpression**

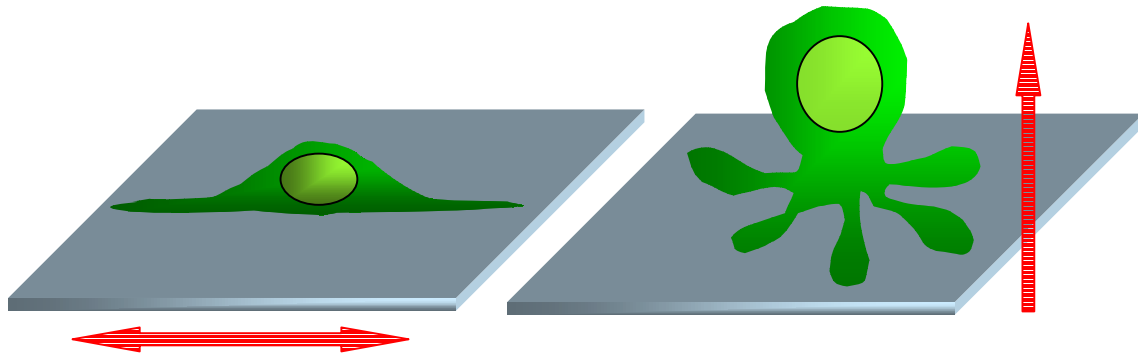
Die bei den konfokalen Zelluntersuchungen aufgefallenen intrazellulären Lokalisationsfoki des Centaurin  $\alpha 2$  führten weitergehend zu der Frage, ob auch die Zellgestalt als Ganzes durch den Einfluß des Centaurin  $\alpha 2$  beeinflusst wird.

Mit Hilfe der konfokalen Daten konnte unter Kenntnis der Abstände zwischen Bildern (vertikal) einer Zellreihe und dem jeweiligen Zelldurchmesser der Zellschnitte (horizontal) ein räumlicher Querschnitt der untersuchten Zelle berechnet werden. In Kapitel 3 sind unter 3.6. die Ergebnisse dieser Untersuchung aufgeführt.

Es zeigt sich in erstaunlich eindrücklicher Weise, daß die EGF-Stimulation bei den PC12-Zellen deutlicher als bei den NRK-Zellen zu einer Zunahme der Zellhöhe bei gleichzeitiger Verminderung der horizontalen Ausdehnung und der Anheftungsfläche führt. Dies ist schon schwächer bei den lediglich mit dem pEGFP-Leervektor transfizierten Zellen zu beobachten, sodaß die Stimulation bei gleichzeitiger Überexpression von Centaurin  $\alpha 2$  in den Tumorzellen diese Dynamik in der Zellmorphologie in hohem Maße verstärken.

Andersartig und daher spezifischer ist die Änderung der Zellgestalt bei Centaurin  $\alpha 2$ -Wildtyp exprimierenden Zellen. Das Centaurin  $\alpha 2$  führt bereits ohne gleichzeitige exogene Zellstimulation (im Gegensatz zum unstimulierten GFP-Fusionsprotein) zu einer wenn auch geringgradig ausgeprägten Reduktion der basalen Adhärenzfläche. Werden die PC12- und NRK-Zellen mit EGF stimuliert, verlieren die Zellen ihre Glockenform, deren Adhärenzfläche die Basis darstellt und verringern diese, indem sie sich abkugeln. Auch hier tritt diese Dynamik in den PC12-Zellen deutlicher hervor, als in den NRK-Zellen.





**Abbildung 81:** Schematische Darstellung der durch Centaurin  $\alpha 2$  vermittelten zellmorphologischen Veränderung (links: Im Ruhezustand; rechts: Nach EGF-Stimulation)

Die Sichtbarmachung der Zellgestaltveränderung in Form einer Grafik, hat hier dynamische Prozesse offengelegt, die zu gering sind, als das sie bei Betrachten des mikroskopischen Zellbildes aufgefallen wären. Dennoch sind sie im Vergleich zur Kontrolle (pEGFP-Leervektor) so signifikant, daß sie dem Einfluß des Centaurin  $\alpha 2$  zugeschrieben werden können und damit einen weiteren Hinweis dafür bieten, daß das sog. Aktin-Remodelling durch Centaurin  $\alpha 2$  wesentlich beeinflußt und die Arf-GAP-Funktion mit ihrem Einfluss auf die Zellmorphologie und –Dynamik immer wahrscheinlicher wird.

Insgesamt scheint Centaurin  $\alpha 2$  nach EGF-Stimulation eine Abkuglung der vorher glockenförmig breit adhäsiven Zellen unter gleichzeitiger Erhöhung der Zahl pseudopodienartiger basaler Haftfortsätze zu bewirken. Alle diese Teilprozesse involvieren sowohl Fokale Adhäsions-Komplexe, als auch das kortikale Aktinnetzwerk.

Bei den PC12-Zellen könnte diese nachgewiesene und sehr eindrücklich erfolgende Gestaltänderung die morphologische Voraussetzung für die Blutgefäß-Invasion und metastatische Extravasation von Tumorzellen darstellen.

### **4.7 Weiterführende Arbeitshypothesen**

Die hinsichtlich der Plasmamembranlokalisation und Zellmorphologie beobachteten Unterschiede zwischen NRK und PC12-Zellen machen auf einen wesentlichen Aspekt aufmerksam, der mit ein Grund dafür ist, die in dieser Arbeit vorgestellten

Ergebnisse und die daraus resultierenden speziellen Folgerungen nicht leichtfertig in andere Zusammenhänge zu übertragen. Jede Zelle ist eine sehr komplexe Einheit, deren Stoffwechsel und biochemisches Verhalten von einer Vielzahl von exogenen und endogenen Faktoren beeinflusst wird, die heute noch aufwendig erforscht werden oder deren Existenz noch gar nicht vermutet wird.

Das untersuchte Lokalisationsverhalten des Centaurin  $\alpha 2$  in PC12- und NRK-Zellen läßt, wenn überhaupt nur klare Aussagen in Bezug auf diese zwei Zelllinien zu. Allerdings können die hier gewonnen Erkenntnisse als Grundlage für aufbauende Arbeitshypothesen und gezielte weitergehende Forschungsansätze dienen.

Um eine globalere Aussage über das intrazelluläre Lokalisationsverhalten von Centaurin  $\alpha 2$  treffen zu können, wäre die Durchführung gleichsinniger und damit vergleichbarer Experimente, mit bestenfalls größerer Zellzahlen in anderen Zelllinien (wünschenswerter Weise humanen Ursprungs) hilfreich. Für HEK-293-Zellen (Human Embryonic Kidney) wurde z.B. mittels *in vivo*-Lokalisationsstudien eine ausschließliche Plasamembranbindung von Centaurin  $\alpha 2$  beobachtet und die Möglichkeit eines zytosolischen Transfers negiert [Hanck et al., 2004].

Weiterhin finden sich in der Primärstruktur des Centaurin  $\alpha 2$  –Protein noch eine Reihe positive geladener Aminosäurereste, die im Rahmen von Mutagenesestudien zur Aufklärung des Funktionsmechanismus wesentlich beitragen könnten ( N-terminale PH-Domäne: R150, K236; C-terminale PH-Domäne: R269, R321, K326).

Nachdem für die adhärent wachsenden PC12- und NRK-Zellen die direkte Einflussnahme des Centaurin  $\alpha 2$  auf die Cytoskelett-Dynamik nachgewiesen werden konnte, stellt sich die Frage, ob derartige morphologische Veränderungen durch Centaurin  $\alpha 2$  auch in Suspensions-Zellen nachweisbar sind. Eine diesen Mechanismus auf höchster molekularbiologischer Ebene zu untersuchendes Verfahren, stellt die Elektronenmikroskopie dar. Sie könnte ergänzende Aussagen darüber liefern, ob die Centaurin  $\alpha 2$ -Ligandenbindung direkt oder als Zusammenschluss mit anderen zellulären Molekülen zu einer funktionellen Einheit vermittelt wird.

Die bisher sehr schemenhafte Idee von den zellulären Eigenschaften, funktionellen Mechanismen und der eigentlichen Existenzbegründung des bisher nur in Vertebraten nachgewiesenen Centaurin  $\alpha 2$  [Hanck et al., 2004] wurde mit den Ergebnissen dieser Arbeit durch richtungsweisende Elemente bereichert. Diese stellen nun wiederum die Ausgangs-Basis erweiternder Aufklärungsuntersuchungen dar, mit deren Hilfe das Ausmaß der durch Centaurin  $\alpha 2$  vermittelten regulatorischen Funktion auf Ebene der u.a. für die Zellteilung essentiellen Strukturen ergründet und damit die Bedeutsamkeit und der Wert einer z.B. im Rahmen der Tumorforschung pharmakologisch vermittelten exogenen Einflussnahme abgeschätzt werden kann.

### 5 Zusammenfassung

Das humane Protein Centaurin  $\alpha 2$  ist intrazellulär in einer Vielzahl menschlicher Gewebe nachweisbar. Durch Struktur- und Sequenzanalysen konnten in dem Protein Elemente detektiert werden, wie sie bei den Signaltransfer innerhalb der Zelle regulierenden Proteinen häufig zu finden sind. Diese Homologien begründeten die Hypothese, dass das Centaurin  $\alpha 2$ , bei *in vitro* nachgewiesener hoher Bindungskapazität für Phosphatidylinositole, ein vor allem an Membranen assoziiertes Protein darstellt. Die Plasmamembran als Barriere zwischen Intra- und Extrazellulärraum und damit die für ein gesundes und geregeltes Zellwachstum essentielle Kommunikationsebene ist hierbei der Haupt-Assoziationsort des Centaurin  $\alpha 2$ .

Es zeigt sich, dass Centaurin  $\alpha 2$  in PC12- und NRK-Zellen, abhängig vom zellulären Aktivierungsgrad an die Plasmamembran transloziert und für eine Bindung an die Phosphatidylinositolphosphatkopfgruppen derselben, positiv geladene Aminosäure-Reste der im Centaurin  $\alpha 2$  zweifach vorhandenen Pleckstrin Homology-Domänen notwendig sind ( PC12: R152, K264, R276; NRK: K141, R152, K153, K264, K268, K274, R276). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die vor kurzem veröffentlichten Erkenntnisse, dass das Membranrekrutment, vermittelt über die spezifische Bindung von Centaurin  $\alpha 2$  an  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$  und  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  wesentlich von der Intaktheit der C-terminalen PH-Domäne abhängig ist [Venkateswarlu et al., 2007]. Ergänzend zu dieser erst kürzlich erschienen Veröffentlichung muss hinzugefügt werden, dass der N-terminalen PH-Domäne im Sinne des o.a. Aviditätsphänomens und anhand der Ergebnisse zu den noch ergänzend untersuchten Mutanten im Bereich dieser PH-Domäne (K264Q, K268Q, K274Q, Y289Q) v.a. in NRK-Zellen eine ebenfalls entscheidende Rolle nicht abgesprochen werden darf.

Die Expressions- und Translokationsantwort ist dabei in den Ratten-Phäochromocytom-Zellen (PC12) deutlich stärker ausgeprägt, als in den nativen Nierenzellen der Ratte (NRK). Auch die möglicherweise über Tyrosin-Reste vermittelte Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen Centaurin  $\alpha 2$

und seinen Liganden sind für die Plasmamembranlokalisation entscheidend ( PC12: Y165, Y289; NRK: Y289).

Da mittels hochauflösender mikroskopischer Verfahren neben der Plasmamembranlokalisation auch eine Lokalisation von Centaurin  $\alpha 2$  an strukturellen Knotenpunkten des Cytoskeletts (Focal adhesions) nachweisbar ist, ist dem Protein eine signalvermittelnde Rolle zuzuschreiben. Die Wirkung dieser Assoziation wird am Cytoskelettsystem, an der Zellmorphologie und dem Anheftungsverhalten bei Stimulation der Zelle mit dem Wachstumsfaktor Epidermal-Growth-Factor sichtbar. Die adhären wachsenden PC12- und NRK-Zellen verkleinern ihre basale Adhärenzfläche, bei gleichzeitiger Erhöhung ihrer vertikalen Ausdehnung und Erhöhung der Zahl pseudopodienartiger Anheftungen.

Für das humane Centaurin  $\alpha 2$  wird in dieser Arbeit eine von singulären Aminosäure-Resten abhängige intrazelluläre Translokationskapazität aufgezeigt und lässt die Einflussnahme der bereits in dem zum Centaurin  $\alpha 1$  homologen Gcs1 der Hefe durch Poon et al. 1996 nachgewiesenen Arf-GAP-Funktion auf die Cytoarchitektur der eukaryotischen Zelle sehr wahrscheinlich werden.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Interkonversionskaskaden und intrazellulärer Verteilungsmodus der Phosphatidylinositole und Inositolphosphate ( Abel et al, 2001).....	2
Abbildung 2: Darstellung der im Wesentlichen in der Plasmamembran vorkommenden Phosphatidylinositole mit farblicher Markierung der Inositolgruppe (blau) und der Phosphatgruppen (rot).....	5
Abbildung 3: Schematische Auflistung bekannter ADP-ribolysation factor – GTPase-Proteine (Arf – GAPs).....	14
Abbildung 4: Cytoskelett – Transformation in Form von Focal adhesion – Komplexen im dekonvolvierten Schnittbild einer mit Centaurin $\alpha$ 2-Wildtyp transfizierten und EGF-stimulierten NRK-Zelle (Balkenlänge entspricht 10 $\mu$ m); Focal adhesion – Schema aus: <a href="http://www.funhousefilms.com">www.funhousefilms.com</a> .....	19
Abbildung 5: Bekannte Isoformen der Centaurin – Familie (Subgruppe der Arf – GAPs). Die Balkenschemata der Sekundärstruktur stellen die Länge und wesentliche Strukturelemente der einzelnen Proteine im Vergleich dar ( N = N-terminal; C = C-terminal; Proteinlänge; Zinkfingermotiv; PH-Domäne; Ankyrin-Repeats; SH3-Domäne). .....	20
Abbildung 6: Vektorkarte (Quelle: Clontech) und mutiple cloning site des Plasmids pEYFP – C1 .....	36
Abbildung 7: Vektorkarte (Quelle: Clontech) und multiple cloning site des Plasmids pEGFP-N1 .....	37
Abbildung 8: (Quelle: Dissertation von Ch.Illies, 2002, Seite 80) Übergang zwischen pEYFP-C1 und Centaurin $\alpha$ 2.....	38
Abbildung 9: Die Bezifferung der pEYFP-C1/Centaurin $\alpha$ 2-Vektor – Nukleotide (willkürlich gewählt). Die numerische Bezeichnung der Aminosäuren bezieht sich indes auf das Startcodon des Fusionsproteins und zeigt zudem die für die Klonierung relevanten Restriktionsenzymchnittstellen.....	38
Abbildung 10: 100 bp Ladder Plus GeneRuler™, MBI, St. Leon-Rot, D.....	41
Abbildung 11: 1kb Ladder GeneRuler™ , MBI, St. Leon-Rot, D .....	42
Abbildung 12: Centaurin $\alpha$ 2-Fusionsvektor mit Kennzeichnung der Restriktionsenzym-Schnittstellen-Lokalisation.....	46

Abbildung 13. Prinzip der QuikChange™ Site – Directed Mutagenesis Methode (Quelle Stratagene) .....	49
Abbildung 14: Das Alignment des humanen Centaurin $\alpha$ 1 und Centaurin $\alpha$ 2 weist eine Sequenzhomologie von 59% auf (Quelle: Illies, 2002 S. 71) .....	67
Abbildung 15: Abbildung: Strukturmodell der N-terminalen PH-Domäne ( AS 131- 232) und der C-terminalen PH-Domäne (AS 254-360) von Centaurin $\alpha$ 2. Die mit Beta1-3 bezeichneten gelben Pfeile stellen Bereiche dar, die in ihrer Sekundärstruktur ähnlich sind und Träger der putativ für die Ligandenbindung entscheidenden Aminosäurereste sind. Wie die Reste, so ist auch das InsP4 als Stabdiagramm eingezeichnet. P1-P4 kennzeichnen die jeweiligen Phosphatgruppen am Inositolring. (Quelle: Max, 2000, S.159, 162) .....	69
Abbildung 16: Codierende Sequenz des Centaurin $\alpha$ 2.....	70
Abbildung 17: Wesentliche Strukturelemente des Centaurin $\alpha$ 2 und Lokalisation der Mutationsstellen auf den jeweiligen PH-Domänen .....	71
Abbildung 18: PC12: pEGFP-Leervektor und Centaurin $\alpha$ 2-Wildtyp stimuliert und unstimuliert .....	74
Abbildung 19: PC12: Centaurin $\alpha$ 2-Mutanten R152C, R276C und R152C/R276C stimuliert und unstimuliert.....	78
Abbildung 20: PC12: Centaurin $\alpha$ 2-Mutanten R152Q und K153Q stimuliert und unstimuliert .....	80
Abbildung 21: PC12: Centaurin $\alpha$ 2-Mutanten K141Q und Y165Q stimuliert und unstimuliert .....	83
Abbildung 22: PC12: Centaurin $\alpha$ 2-Mutanten K264Q und K268Q stimuliert und unstimuliert .....	86
Abbildung 23: PC12: Centaurin $\alpha$ 2-Mutanten K274Q und Y289Q stimuliert und unstimuliert .....	89
Abbildung 24: Graphische Darstellung der Höhe der Plasmamembranbindung von pEGFP-Leervektor, Centaurin $\alpha$ 2 – Wildtyp und seinen Mutanten .....	90
Abbildung 25: Pseudopodien (Pfeile) bei unstimulierter, mit dem Centaurin $\alpha$ 2- Wildtyp transfizierter PC12-Zelle, Maßstab entspricht 10 $\mu$ m.....	90
Abbildung 26: Abhängigkeit zwischen Anzahl der Pseudopodien n und dem Grad der Plasmamembranbindung in % bei PC 12-Zellen, wobei der EGFP-Leervektor, der Centaurin $\alpha$ 2-Wildtyp und seine Mutanten verschiedenfarbig dargestellt sind. Die im Koordinatensystem rechts angeordneten Punkte entsprechen den	

spezifischen Werten nach EGF-Stimulation, die linken Punkte verweisen auf den unstimulierten Zellzustand, die jeweilige Verbindungslinie zeigt die Tendenz in Abhängigkeit vom Stimulationsgrad. Die graue Linie entspricht dem Durchschnittswert der im Koordinatensystem aufgetragenen Einzelwerte. ....	92
Abbildung 27: Abhängigkeit zwischen Anzahl der Pseudopodien n, dem Stimulationszustand der PC12-Zellen und dem Grad des zytosolischen Anteils des Proteins in % in logarithmischem Maßstab, wobei der EGFP-Leervektor, der Centaurin $\alpha 2$ -Wildtyp und seine Mutanten verschiedenfarbig dargestellt sind. Die links lokalisierten Punkte einer jeden Farbe entsprechen den Werten der mit EGF stimulierten Zellen, die rechten Punkte denen unstimulierter Zellen, die jeweilige Verbindungslinie zeigt die Tendenz in Abhängigkeit vom Stimulationsgrad. Wenig zytosolisches, d.h. stark plasmamembrangebundenes Protein kommt eher im linken Abschnitt der Graphik zur Darstellung und vice versa.....	93
Abbildung 28: NRK: pEGFP-Leervektor und Centaurin $\alpha 2$ -Wildtyp stimuliert und unstimuliert .....	96
Abbildung 29: NRK: Centaurin $\alpha 2$ -Mutanten R152C, R276C und R152C/R276C stimuliert und unstimuliert.....	99
Abbildung 30: NRK: Centaurin $\alpha 2$ -Mutanten R152Q und K153Q stimuliert und unstimuliert .....	102
Abbildung 31: NRK: Centaurin $\alpha 2$ -Mutanten K141Q und Y165Q stimuliert und unstimuliert .....	104
Abbildung 32: NRK: Centaurin $\alpha 2$ -Mutanten K264Q und K268Q stimuliert und unstimuliert .....	106
Abbildung 33: NRK: Centaurin $\alpha 2$ -Mutanten K274Q und Y289Q stimuliert und unstimuliert .....	108
Abbildung 34: Graphische Darstellung der Höhe der Plasmamembranbindung von pEGFP-Leervektor, Centaurin $\alpha 2$ – Wildtyp und seinen Mutanten .....	109
Abbildung 35: Pseudopodien (Pfeile) bei unstimulierter, mit dem Cenaturin $\alpha 2$ -Wildtyp transfizierter NRK-Zelle, Maßstab entspricht 10 $\mu$ m .....	109
Abbildung 36: Abhängigkeit zwischen Anzahl der Pseudopodien n und dem Grad der Plasmamembranbindung in % bei NRK-Zellen, wobei der EGFP-Leervektor, der Centaurin $\alpha 2$ -Wildtyp und seine Mutanten verschiedenfarbig dargestellt sind. Die im Koordinatensystem rechts angeordneten Punkte entsprechen den	



spezifischen Werten nach EGF-Stimulation, die linken Punkte verweisen auf den unstimulierten Zellzustand, die jeweilige Verbindungslinie zeigt die Tendenz in Abhängigkeit vom Stimulationsgrad. Die graue Linie entspricht dem Durchschnittswert der im Koordinatensystem aufgetragenen Einzelwerte.....	110
Abbildung 37: Abhängigkeit zwischen Anzahl der Pseudopodien $n$ , dem Stimulationszustand der NRK-Zellen und dem Grad des zytosolischen Anteils des Proteins in % in logarithmischem Maßstab, wobei der EGFP-Leervektor, der Centaurin $\alpha 2$ -Wildtyp und seine Mutanten verschiedenfarbig dargestellt sind. Die links lokalisierten Punkte einer jeden Farbe entsprechen den Werten der mit EGF stimulierten Zellen, die rechten Punkte denen unstimulierter Zellen, die jeweilige Verbindungslinie zeigt die Tendenz in Abhängigkeit vom Stimulationsgrad. Wenig zytosolisches, d.h. stark plasmamembrangebundenes Protein kommt eher im linken Abschnitt der Graphik zur Darstellung und vice versa.....	111
Abbildung 38: Floureszenzprofile des pEGFP-Fusionsproteins in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert .....	113
Abbildung 39 Floureszenzprofile des Centaurin $\alpha 2$ – Wildtyp-Fusionsproteins in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert .....	114
Abbildung 40 Floureszenzprofile der Centaurin $\alpha 2$ -Mutante R152C in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert .....	115
Abbildung 41: Floureszenzprofile der Centaurin $\alpha 2$ -Mutante R276C in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert .....	116
Abbildung 42: Floureszenzprofile der Centaurin $\alpha 2$ -Mutante R152C/R276C in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert .....	117
Abbildung 43: Floureszenzprofile der Centaurin $\alpha 2$ -Mutante K141Q in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert .....	118
Abbildung 44: Floureszenzprofile der Centaurin $\alpha 2$ -Mutante R152Q in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert .....	119
Abbildung 45: Floureszenzprofile der Centaurin $\alpha 2$ -Mutante K153Q in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert .....	120
Abbildung 46: Floureszenzprofile der Centaurin $\alpha 2$ -Mutante Y165Q in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert .....	121
Abbildung 47: Floureszenzprofile der Centaurin $\alpha 2$ -Mutante K264Q in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert .....	122

Abbildung 48: Floureszenzprofile der Centaurin $\alpha$ 2-Mutante K268Q in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert .....	123
Abbildung 49: Floureszenzprofile der Centaurin $\alpha$ 2-Mutante K274Q in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert .....	124
Abbildung 50: Floureszenzprofile der Centaurin $\alpha$ 2-Mutante Y289Q in PC12- und NRK-Zellen stimuliert und unstimuliert .....	125
Abbildung 51: Zwei unstimulierte PC12-Zellbeispiele und ihre dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit dem pEGFP – Leervektor (Balkengröße entspricht 10 $\mu$ m).....	127
Abbildung 52: Zwei stimulierte PC12-Zellbeispiele und ihre dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit dem pEGFP – Leervektor (Balkengröße entspricht 10 $\mu$ m).....	127
Abbildung 53: Zwei unstimulierte PC12-Zellbeispiele und ihre dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit dem Centaurin $\alpha$ 2 - Wildtyp (Balkengröße entspricht 10 $\mu$ m).....	128
Abbildung 54: Zwei stimulierte PC12-Zellbeispiele und ihre dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit dem Centaurin $\alpha$ 2 - Wildtyp (Balkengröße entspricht 10 $\mu$ m).....	128
Abbildung 55: Zellbeispiel mit dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit der Centaurin $\alpha$ 2 – Mutante R152C im unstimulierten (obere Reihe) und stimulierten (untere Reihe) Zustand (Balkengröße entspricht 10 $\mu$ m) .....	129
Abbildung 56: Zellbeispiel mit dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit der Centaurin $\alpha$ 2 – Mutante R276C im unstimulierten (obere Reihe) und stimulierten (untere Reihe) Zustand (Balkengröße entspricht 10 $\mu$ m) .....	130
Abbildung 57: Zellbeispiel mit dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit der Centaurin $\alpha$ 2 – Mutante R152C/R276C im unstimulierten (obere Reihe) und stimulierten (untere Reihe) Zustand (Balkengröße entspricht 10 $\mu$ m) .....	131
Abbildung 58: Zwei unstimulierte NRK-Zellbeispiele und ihre dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit dem pEGFP – Leervektor (Balkengröße entspricht 10 $\mu$ m).....	133
Abbildung 59: Zwei stimulierte NRK-Zellbeispiele und ihre dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit dem pEGFP – Leervektor (Balkengröße entspricht 10 $\mu$ m).....	133

Abbildung 60: Zwei unstimulierte NRK-Zellbeispiele und ihre dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit dem Centaurin $\alpha 2$ - Wildtyp (Balkengröße entspricht 10 $\mu\text{m}$ ).....	134
Abbildung 61: Zwei stimulierte NRK-Zellbeispiele und ihre dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit dem Centaurin $\alpha 2$ - Wildtyp (Balkengröße entspricht 10 $\mu\text{m}$ ).....	134
Abbildung 62: Zellbeispiel mit dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit der Centaurin $\alpha 2$ – Mutante R152C im unstimulierten (obere Reihe) und stimulierten (untere Reihe) Zustand (Balkengröße entspricht 10 $\mu\text{m}$ ) .....	135
Abbildung 63: Zellbeispiel mit dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit der Centaurin $\alpha 2$ – Mutante R276C im unstimulierten (obere Reihe) und stimulierten (untere Reihe) Zustand (Balkengröße entspricht 10 $\mu\text{m}$ ) .....	136
Abbildung 64: Zellbeispiel mit dekonvolvierten Schnittebenen nach Transfektion mit der Centaurin $\alpha 2$ – Mutante R152C/R276C im unstimulierten (obere Reihe) und stimulierten (untere Reihe) Zustand (Balkengröße entspricht 10 $\mu\text{m}$ .....	137
Abbildung 65: Gemittelt PC12-Cellshape (rot) von 8 unstimulierten Zellen, die mit dem pEGFP-Leervektor transfiziert wurden .....	139
Abbildung 66: Gemittelt PC12-Cellshape (rot) von 8 stimulierten Zellen, die mit dem pEGFP-Leervektor transfiziert wurden .....	139
Abbildung 67: Gemittelt PC12-Cellshape (rot) von 8 unstimulierten Zellen, die mit dem Centaurin $\alpha 2$ –Wildtyp transfiziert wurden .....	140
Abbildung 68: Gemittelt PC12-Cellshape (rot) von 8 stimulierten Zellen, die mit dem Centaurin $\alpha 2$ -Wildtyp transfiziert wurden.....	140
Abbildung 69: Gemittelt NRK-Cellshape (rot) von 8 unstimulierten Zellen, die mit dem pEGFP-Leervektor transfiziert wurden .....	141
Abbildung 70: Gemittelt NRK-Cellshape (rot) von 8 stimulierten Zellen, die mit dem pEGFP-Leervektor transfiziert wurden .....	142
Abbildung 71: Gemittelt NRK-Cellshape (rot) von 8 unstimulierten Zellen, die mit dem Centaurin $\alpha 2$ -Wildtyp transfiziert wurden.....	143
Abbildung 72: Gemittelt NRK-Cellshape (rot) von 8 stimulierten Zellen, die mit dem Centaurin $\alpha 2$ -Wildtyp transfiziert wurden.....	143
Abbildung 73: Bildliche Auflösung der Zellmorphologie bei NRK-Zellen unter nichtkonfokaler (links) und konfokaler (rechts) Mikroskopie .....	147
Abbildung 74: Unstimulierte, mit der Mutante K264Q transfizierte PC12-Zellen.....	151

Abbildung 75: Nichtkonfokale Zellbeispiele (hier: Mutante Y165Q ust), die einen deutlichen Kernausschluss in NRK-Zellen zeigen (durch Messung der Floureszenzintensität über die Zelle, jeweils auch graphisch dargestellt) .....	155
Abbildung 76: Graphische Darstellung des Zellanteils aus bis zu 3 unabhängigen Versuchen mit Plamamembranbindung ( in %) vom Centaurin $\alpha$ 2-Wildtyp (WT) und seinen Mutanten in unstimulierten (lila) und stimulierten (burgund) PC12- (A) und NRK-Zellen (B). .....	156
Abbildung 77: Streßgranulen in mit Centaurin $\alpha$ 2-Wildtyp transfizierten und mit EGF stimulierten NRK-Zellen.....	157
Abbildung 78: Streßgranulen in mit Centaurin $\alpha$ 2-Wildtyp transfizierten PC12-Zellen ( links: unstimuliert; rechts: EGF-stimuliert) .....	157
Abbildung 79: Schematische Darstellung der cytoplasmatisch lokalisierten Translation in Abwesenheit (grün) und Anwesenheit von zellulärem Streß (rot). Der Translationsprozess wird durch das Anlagern der methionierten tRNA ans Startcodon die ribosomale 40S-Untereinheit initiiert (links). Bei zellulärem Streß blockiert die Bindung von TIA-1 den Translationsprozess und führt zur Ausbildung von Streßgranulen (rechts). [Kadersha, N und Anderson, P, 2002] .....	158
Abbildung 80: Schematische Darstellung der durch die Bindung der intakten PH-Domänen des Centaurin $\alpha$ 2 an die Phospatidylinositole der Plasmamembran vermittelten multivalenten Bindung ( Erläuterung s. folgender Text) .....	163
Abbildung 81: Schematische Darstellung der durch Centaurin $\alpha$ 2 vermittelten zellmorphologischen Veränderung (links: Im Ruhezustand; rechts: Nach EGF-Stimulation) .....	170

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bekannte Funktionen der einzelnen Inositolphosphat – Isomere (Poly-Phosphoinositide).....	4
Tabelle 2: Tabellarische Zusammenfassung der mit ihrer PH-Domäne spezifisch an Phosphatidylinositolephosphate bindenden Proteine .....	12
Tabelle 3: Das Glutamin (CAG) bzw. Cystein (TGT) – Triplet als Ziel der Mutagenese ist fettgedruckt wiedergegeben. Die farbig hervorgehobenen Bereiche innerhalb der Primersequenzen stellen selektive Restriktionsenzymchnittstellen dar. Unterstriche kennzeichnen die über QCM eingefügten Punktmutationen.....	40
Tabelle 4: Centaurin $\alpha 2$ – Wildtyp – EYFP – Fusionsgen nach Verdau.....	46
Tabelle 5: Mutante R152Q.....	47
Tabelle 6: Mutante K153Q.....	47
Tabelle 7: Mutante Y165Q.....	47
Tabelle 8: Mutante K264Q.....	47
Tabelle 9: Mutante Y289Q.....	47
Tabelle 10: PCR – Ansatz .....	49
Tabelle 11: PCR – Programm für den Eppendorf Mastercycler Gradient:.....	50
Tabelle 12: Transfektion mit pEGFP-N1-Leervektor. Quantitative Auszählung der drei unabhängigen Versuche (I, II, III) hinsichtlich vorhandener und fehlender Plasmamembranbindung im unstimulierten und stimulierten Zustand unter Angabe der Zellanzahl in Prozent. Die Zellanzahl bezeichnet die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen. ....	73
Tabelle 13: Transfektion mit pEYFP-Centaurin $\alpha 2$ Wildtyp-Fusionsprotein .....	73
Tabelle 14: Transfektion mit Centaurin $\alpha 2$ -Mutante R152C.....	75
Tabelle 15: Transfektion mit Centaurin $\alpha 2$ -Mutante R276C.....	76
Tabelle 16: Transfektion mit Centaurin $\alpha 2$ -Mutante R152C/R276C ( ust. = unstimuliert; st. = stimuliert).....	77
Tabelle 17: Transfektion mit Centaurin $\alpha 2$ -Mutante R152Q .....	79
Tabelle 18: Transfektion mit Centaurin $\alpha 2$ -Mutante R153Q .....	79
Tabelle 19: Transfektion mit Centaurin $\alpha 2$ -Mutante K141Q.....	81
Tabelle 20: Transfektion mit Centaurin $\alpha 2$ -Mutante Y165Q.....	82
Tabelle 21: Transfektion mit Centaurin $\alpha 2$ -Mutante K264Q.....	84

## 7 Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 22: Transfektion mit Centaurin $\alpha$ 2-Mutante K268Q.....	85
Tabelle 23: Transfektion mit Centaurin $\alpha$ 2-Mutante K274Q.....	87
Tabelle 24: Transfektion mit Centaurin $\alpha$ 2-Mutante Y289Q.....	88
Tabelle 25: Transfektion mit pEGFP-Leervektor stimuliert und unstimuliert .....	95
Tabelle 26: Transfektion mit Centaurin $\alpha$ 2-Wildtyp stimuliert und unstimuliert .....	95
Tabelle 27: Transfektion mit Centaurin $\alpha$ 2-Mutante R152C stimuliert und unstimuliert .....	97
Tabelle 28: Transfektion mit Centaurin $\alpha$ 2-Mutante R276C stimuliert und unstimuliert .....	98
Tabelle 29: Transfektion mit Centaurin $\alpha$ 2-Mutante R152C/R276C stimuliert (st.) und unstimuliert (unst.) .....	99
Tabelle 30: Transfektion mit Centaurin $\alpha$ 2-Mutante R152Q stimuliert und unstimuliert .....	100
Tabelle 31: Transfektion mit Centaurin $\alpha$ 2-Mutante K153Q stimuliert und unstimuliert .....	101
Tabelle 32: Transfektion mit Centaurin $\alpha$ 2-Mutante K141Q stimuliert und unstimuliert .....	103
Tabelle 33: Transfektion mit Centaurin $\alpha$ 2-Mutante Y165Q stimuliert und unstimuliert .....	104
Tabelle 34: Transfektion mit Centaurin $\alpha$ 2-Mutante K264Q stimuliert und unstimuliert .....	105
Tabelle 35: Transfektion mit Centaurin $\alpha$ 2-Mutante K268Q stimuliert und unstimuliert .....	105
Tabelle 36: Transfektion mit Centaurin $\alpha$ 2-Mutante K274Q stimuliert und unstimuliert .....	107
Tabelle 37: Transfektion mit Centaurin $\alpha$ 2-Mutante Y289Q stimuliert und unstimuliert .....	107

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AD	Alzheimer disease
ADAR	Adenosin desaminase that act on RNA
ADAT	Adenosin desaminase that act on tRNA
ADP.	Adenosindiphosphat
AP.	Adaptor-related Protein-Complex
ARNO	Arf nucleotide-binding site opener
ARF.	ADP-ribosylation factor
AS	Aminosäure
ASAP 1	Centaurin $\beta$ 4
$\beta$ APP	$\beta$ Amyloid precursor protein
$\beta$ ARK	$\beta$ -adrenerge Rezeptor Kinase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BTK	Bruton`s Tyrosin Kinase
Cdc42	Mammalian cell division cycle protein
CDP	Cytidindiphosphat
CK 1	Casein-Kinase 1
CMP	Cytidinmonophosphat
CMV	Cytomegalie Virus
DAG	Diacylglycerol
DH-Domäne	Dbl Homology Domain
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonuclein-Acid
EGF	Epidermal growth factor
EYFP	Enhanced yellow fluorescent protein
FA	Focal adhesion
FAK	Focal adhesion kinase
GAP	G-Protein associated GTPase-activating protein
GEF	Guanin nucleotid exchange factor
GFP	Green fluorescence protein
Grp 1	General receptor for phosphoinositides 1
GTP	Guanosintriphosphat

## 8 Abkürzungsverzeichnis

---

HPIs	Hochphosphorylierte Inositole
InsP3	InsP3 = Inositol 1,4,5 – trisphosphat
InsP4	Inositol 1,3,4,5 – tetrakisphosphat
InsP5	Inositol 1,3,4,5 – pentakisphosphat
InsP6	Inositol 1,2,3,4,5,6 – hexakisphosphat
Kbp	Kilobasenpaare
KDa	Kilodalton
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
MCS	multiple cloning site
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
NES	nucleus export signal
NF	Neurofibromatose
NGF	nerve growth factor
NHEJ	non homologous end joining
NLS	nucleus localization signal
Nm	Nanometer
NRK	natural rat kidney
PAP	Centaurin β3
PC12	phäochromocytoma cell from rat
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth-factor
PDK-1	phosphoinosid-dependend protein kinase 1
PH-Domain	Pleckstrin-Homology-Domain
PI	Phosphoinosid
PIP3 BP	PtdIns (3,4,5)P3 Binding-protein
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PPBM	Putatives Phosphatidylinositol-bindendes Motiv
PTB	Phosphotyrosin-Binding-Domain



## 8 Abkürzungsverzeichnis

---

PtdIns	Phosphatidylinositol
QCM	QuikChange Mutagenese
RNA	Ribonuclein-Acid
Rpm	rounds per minute
SOS	son of sevenless
TAPP	Tandem PH-Domain-containing Protein
TIA-1	T-cell internal antigen-1
Tiam 1	T-Lymphom Invasions- und Metastasen-Protein 1
TIAR	TIA-1-related protein
tRNA	transfer-RNA

## 9 Literaturverzeichnis

- Abel**, K et al., Phosphatidyl and Inositol Phosphate Metabolism, in : J. Cell. Sci., 2001, 114: 2207 – 2208
- Aggensteiner**, M et al., Identification of rat brain p42(IP4), a high-affinity inositol(1,3,4,5)tetrakisphosphate/phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphate binding protein, in: Biochim. Biophys. Acta, 1998, 1387: 117 – 128
- Aggensteiner**, M/ Reiser, G, Expression of the brain-specific membrane adapter protein p42<sup>IP4</sup>/centaurin  $\alpha$ , a Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>/PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> binding protein, in developing rat brain, in: Dev. Brain Res., 2003, 142: 77 – 87
- Altschul**, SF et al., Basic local alignment search tool, in: J. Mol. Biol., 1990, 295: 403 – 410
- Andreev**, J et al., Identification of a new Pyk2 target protein with Arf-Gap activity, in : Mol. Cell. Biol., 1999, 19: 2338 – 2350
- Baraldi**, E et al., Structure of the PH domain from Bruton`s tyrosine kinase in complex with inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate, in: Structure Fold Des., 1999, 7: 449 – 460
- Berridge**, MJ, Inositol triphosphate and calcium signalling, in: Nature, 1993, 361: 315 – 325
- Bork**, P, Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally?, in: Proteins, 1993, 17: 363 – 374
- Brocca**, S et al., A macromolecular structure favouring microtubule assembly in NGF – differentiated pheochromocytome cells (PC12), in: EMBO J., 1983, 2: 634 – 648
- Brown**, MT et al., ASAP-1, a phospholipid-dependent Arf GTPase-activating protein that associates with and is phosphorylated by src, in : Mol. Cell. Biol., 1998, 18: 7038 – 7051
- Bullock**, WO et al., XL-1 blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with  $\beta$  – Galactosidase selection, in: Bio Techniques, 1987, 5: 376 – 379
- Burridge**, K/ Chrzanowska-Wodnicka, M, Focal adhesions, contractility, and signalling, in: Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 1996, 12: 463 – 519

- Byrum**, J et al., Visualization of inositol phosphate-dependent mobility of Ku : depletion of the DNA-PK cofactor InsP<sub>6</sub> inhibits Ku mobility, in: *Nucleic Acids Research*, 2004, 32: 2776 - 2784
- Carter**, AN/ Downes, CP, Phosphatidylinositol 3-kinase is activated by nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells, in : *J. Biol. Chem.*, 1992, 267: 14563 – 14567
- Carpenter**, CL/ Cantley, LC, Phosphoinositide kinases, in: *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1996, 8: 153 – 158
- Chardin**, P et al., A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains, in : *Nature*, 1996, 348 : 481 – 484
- Chong**, LD, et al., The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells, in : *Cell.*, 1994, 79: 507 – 513
- Cohen**, GB et al., Modular binding domains in signal transduction proteins, in : *Cell*, 1995, 80 : 237 – 248
- Cooke**, FT et al., The stress-activated phosphoinositol 3-phosphate 5-kinase Fab1p is essential for vacuol function in *S. cerevisiae*, in: *Curr. Biol.*, 1998, 8: 1219 – 1222
- Cukierman**, E et al., The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization, in : *Science*, 1995, 270 : 1999 - 2002
- Cullen**, PJ et al., Synergistic control of Ca<sup>2+</sup> mobilization in permeabilized mouse L1210 lymphoma cells by inositol 2,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate, in: *Biochem. J.*, 1990, 271: 549 – 553
- Cullen**, PJ et al., Identification of a specific Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-binding protein as a member of the GAP1 family, in : *Nature*, 1995, 376 : 527 – 530
- De Larco**, JE; Todaro, GJ, Epitheloid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation, in: *J. Cell. Physiol.*, 1978, 94: 335 – 342
- Donaldson**, J, Filling in the GAPs in the ADP-ribosylation factor story, in: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97: 3792 – 3794
- Dove**, SK et al., Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis, in: *Nature*, 1997, 390: 187 – 192
- Dowler**, S et al., Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities, in: *Biochem. J.*, 2000, 351: 19 – 31

- Dubois**, T et al., Casein Kinase I Associates with Members of the Centaurin- $\alpha$  Family of Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate-binding Proteins, in: J. Biol. Chem., 2001, 276: 18757 – 18764
- Eberhard**, DA et al., Evidence that the inositol phospholipids are necessary for exocytosis. Loss of inositol phospholipids and inhibition of secretion in permeabilized cells caused by a bacterial phospholipase C and removal of ATP, in: Biochem. J., 1990, 268: 15 – 25
- Essen**, L et al., Crystal structure of mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta, in : Nature, 1996, 380 : 595 – 602
- Faundez**, VV/ Kelly, RB, The AP-3 complex required for endosomal synaptic vesicle biogenesis is associates with a casein kinase I alpha-like isoform, in: Mol. Biol. Cell, 2000, 11: 2591 – 2604
- Ferguson**, KM et al., Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain, in : Cell, 1995, 83: 1037 – 1046
- Fukami**, K et al., Identification of a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-binding site in chicken skeletal muscle  $\alpha$ -actinin, in: J. Biol. Chem., 1996, 271: 2646 – 2650
- Fukuda**, M et al., Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate binding to C2B domain of IP4BP/synaptotagmin II, in : J. Biol. Chem., 1994, 269: 29206 – 29211
- Furuichi**, T/ Mikoshiba, K, Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in the brain, in: J. Neurochem., 1995, 64: 953 – 960
- Frank**, SR et al., Remodeling of the actin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase C and the ADP-ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO, in: Mol. Biol. Cell, 1998, 9: 3133 – 3146
- Fruman**, DA et al., Phosphoinositide binding domains: embracing 3-phosphate, in: Cell, 1999, 97: 817 – 820
- Gilmore**, AP/ Burrige, K, Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, in: Nature, 1996, 381: 531 – 535
- Goffeau**, A et al., Life with 6000 genes, in : Science, 1996, 274 : 563 – 567
- Gross**, SD et al., A phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-sensitive casein kinase I alpha associates with synaptic vesicles and phosphorylates a subset of vesicle proteins, in: J. Cell Biol., 1995, 130: 711 – 724

- Hall**, LL et al., Molecular anatomy of a speckle, in: *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell Evol. Biol.*, 2006: 288 (7): 664 - 675
- Hall**, TA, BioEdit: a user – friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, in: *Nucl. Acids. Symp.*, ; 1999, Ser. 41: 95 – 98
- Hammonds – Odie**, LP et al., Identification and Cloning of Centaurin- $\alpha$ , in: *J. of Biological Chemistry*, 1996, 271:18859 –18868
- Han**, J et al., Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav, in : *Science*, 1998, 279 : 558 – 560
- Hanck**, T et al., Identification of gene structure and subcellular localization of human centaurin  $\alpha$ 2, ans p42<sup>IP4</sup>, a family of two highly homologous, Ins 1,3,4,5-P<sub>4</sub>-/PtdIns 3,4,5-P<sub>3</sub>-binding, adapter proteins, in : *Journal of Neurochemistry*, 2004, 88, 326-336
- Harlan**, JE et al., Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, in : *Nature*, 1994, 371 : 168 – 170
- Hashii**, M et al., Bradykinin B2 receptor-induced and inositol tetrakisphosphate-evoked Ca<sup>2+</sup> entry is sensitive to a protein tyrosine phosphorylation inhibitor in ras-transformed NIH/3T3 fibroblasts, in: *Biochem. J.*, 1996, 319: 649 – 656
- Hay**, JC et al., ATP-dependent inositide phosphorylation required for Ca(2+)-activated secretion, in : *Nature*, 1995, 374: 173 – 177
- Illies**, C., *In vivo* Lokalisation der humanen Phosphatidyl 3,4,5 – Trisphosphat bindenden Proteine Centaurin alpha 1 und 2, in *Dissertation*, 2002, 39, 105
- Isakoff**, SJ et al., Identification and analysis of PH domain-containing targets of phosphatidylinositol 3-kinase using a novel *in vivo* assay in yeast, in: *EMBO J.*, 1998, 17: 5374 – 5387
- Jackson**, TR et al., Cytohesin and centaurins : mediators of PI 3-kinase-regulated Arf signaling, in : *TIBS*, 2000, 25: 489 – 495
- Johnson**, D/ Pringle, J, Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity, in : *J. Cell Biol.*, 1990, 111: 143 – 152
- Kadersha**, N, Anderson P, Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability, in: *Biochemical Society Transactions*, 2002, 30: 963 - 969

- Karlund**, JK et al., Signaling by phosphoinositide 3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and sec7 homology domains, in : Science, 1997, 275 : 1927 – 1930
- Kolanus**, W et al., Alpha-1-beta-2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmatic regulatory molecule, in: Cell., 1996, 86: 233 – 242
- Kreutz**, MR et al., Expression and subcellular localization of p42<sup>IP4</sup>/centaurin- $\alpha$ , a brain-specific, high-affinity receptor for inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphat and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in rat brain, in: Eur. J. Neurosci., 1997, 9: 2110 – 2124
- Lee**, SB/ Rhee, SG, Significance of PIP2 hydrolysis and regulation of phospholipase C isozymes, in: Curr. Opin. Cell Biol., 1995, 7: 183 – 189
- Lemmon**, MA/ Ferguson, KM, Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains, in: Biochem. J., 2000, 350: 1 – 18
- Lemmon**, MA et al., Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton, in: FEBS Letters, 2002, 513: 71 – 76
- Littleton**, JT/ Bellen, HJ, Synaptotagmin controls and modulates synaptic-vesicle fusion in a Ca(2+)-dependent manner, in: Trends Neurosci., 1995, 18: 177 – 183
- Llinás**, R et al., The inositol high – polyphosphate series blocks synaptic transmission by preventing vesicular fusion : A squid giant synapse study, in: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91: 12990 – 12993
- Lu**, YJ et al., Inositol hexakisphosphate (InsP6) can weaken the Ca<sup>2+</sup> - dependent membrane binding of C2AB domain of synaptotagmin I, in: FEBS Letters, 2002, 527: 22 – 26
- Lückhoff**, A/ Clapham, DE, Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca<sup>2+</sup> -permeable channel, in: Nature, 1992, 355: 356 – 358
- Ma**, AD/ Abrams, CS, Pleckstrin homology domains and phospholipid-induced cytoskeletal reorganization, in: Thromb. Haemost., 1999, 82: 399 – 406
- Max**, KM, Einsatz von 3D-Strukturmodellen zur funktionalen Mutagenese der Phosphoinositid-Bindungsstellen in den Pleckstrin-homologen Domänen des humanen Centaurin alpha 1 und 2, 2000, S. 158, 159, 160, 162
- Macbeth**, MR et al., Inositol Hexakisphosphate is bound in the ADAR2 Core and required for RNA editing, in: Science, 2005, 309: 1534 - 1539

- Machesky**, LM/ Hall, A, Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization, in: J. Cell Biol., 1997, 138: 913 – 926
- Macias**, MJ et al., Structure of pleckstrin homology domain from beta-spectrin, in : Nature, 1994, 369 : 675 – 677
- Menniti**, FS et al., Inositol phosphates and cell signaling: new views of InsP5 and InsP6, in: Trends Biochem. Sci., 1993, 18: 53 – 56
- Michell**, RH, Inositol lipids in cellular signalling mechanismus, in: Trends Biochem. Sci., 1992, 17: 274 – 276
- Musacchio**, A et al., The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins, in: Trends Biochem. Sci., 1993, 18: 343 – 348
- Nimnual**, AS et al., Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos, in : Science, 1998, 279 : 560 – 563
- Nobes**, CD/ Hall, A, Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibres, lamellipodia and filopodia, in: Cell., 1995, 81: 53 – 62
- Norman**, JC et al., ARF1 Mediates Paxillin Recruitment to Focal Adhesions and Potentiates Rho-stimulated Stress Fiber Formation in Intact and Permeabilized Swiss 3T3 Fibroblasts, in: J. Cell Biol., 1998, 143: 1981 – 1195
- Odorizzi**, G et al., Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in multivesicular body, in: Cell, 1998, 95: 847 – 858
- Patel**, S et al., Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, in: Cell Calcium, 1999, 25: 247 – 264
- Pawson**, T, Protein modules and signalling networks, in : Nature, 1995, 373: 573 – 580
- Pitcher**, JA et al., Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors, in : Science, 1992, 257: 1264 – 1267
- Pitcher**, JA et al., Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid, in : J. Biol. Chem., 1995, 270: 11707 – 11710

- Poon**, PP et al., Saccharomyces cerevisiae Gcs1 is an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein, in: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93: 10074 – 10077
- Premont**, RT, beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein, in: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 14082 – 14087
- Provost**, JJ et al., Tissue-specific distribution and subcellular distribution of phospholipase D in rat: evidence for distinct RhoA and ADP-ribosylation factor (ARF)-regulated isoenzymes, in: Biochem. J., 1996, 319: 285 – 291
- Putney**, JW, A model for receptor-regulated calcium entry, in : Cell Calcium, 1986, 7 : 1 – 12
- Radhakrishna**, H et al., ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements, in: J. Cell Sci., 1999, 112: 855 – 866
- Rameh**, LE et al., A Comparative Analysis of the Phosphoinositide Binding Specificity of Pleckstrin Homology Domains, in : J. Biol. Chem., 1997, 272: 22059 – 22066
- Rameh**, LE/ Cantley, LC, The role of phosphoinositide 4-kinase lipid products in cell function, in : J. Biol. Chem., 1999, 274: 8347 – 8350
- Randazzo**, PA et al., The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton, in: PNAS, 2000, 97: 4011 – 4016
- Raucher**, D et al., Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion, in: Cell, 2000, 100: 221 – 228
- Rebecchi**, MJ/ Scarlata, S, Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions, in: Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 1998, 27: 503 – 528
- Reiser**, G/ Bernstein, HG, Neurons and plaques of Alzheimer`s disease patients highly express the neuronal membrane docking protein p42<sup>IP4</sup>/centaurin  $\alpha$ , in: Clinical Neurosci. Neuropath., 2002, 13: 2417 – 2419
- Ridley**, AJ/ Hall, A, The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibres in response to growth factors, in: Cell., 1992, 70: 389 – 399
- Roth**, M, Lipid regulators of membrane traffic through the Golgi complex, in: Trends Cell Biol., 1999, 9: 174 – 179



- Sanger**, F et al., DNA sequencing with chain terminating inhibitors, in: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74: 5463 – 5467
- Schaller**, MD et al., Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking  $\beta$ -integrin cytoplasmatic domains, in: J. Cell Biol., 1995, 130: 1181 – 1187
- Schiavo**, G et al., Calcium-dependent switching of the specificity of phosphoinositide binding to synaptotagmin, in: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93: 13327 – 13332
- Sedehizade**, F et al., Cellular expression and subcellular localization of the human Ins(1,3,4,5) $P_4$ -binding protein, p42<sup>IP4</sup>, in human brain and in neuronal cells, in: Brain Res. Mol. Brain Res., 2002, 99: 1 – 11
- Shen**, X et al., Modulation of ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Complexes by Inositol Polyphosphates, in: Science, 2003, 299: 112 – 114
- Siddhanta**, U et al., Distinct roles for the p110alpha and hVPS34 phosphatidylinositol 3`-kinases in vesicular trafficking, regulation of the actin cytoskeleton, and mitogenesis, in : J. Cell Biol., 1998, 143: 1647 – 1659
- Snyder**, JT et al., Quantitative analysis of the effect of phosphoinositide interactions on the function of Dbl family proteins, in : J. Biol. Chem., 2001, 276: 45868 – 45875
- Stam**, JC et al., Targeting of Tiam1 to the plasma membrane requires the cooperative function of the N-terminal pleckstrin homology domain and an adjacent protein interaction domain, in : J. Biol. Chem., 1997, 272: 28447 – 28454
- Stephens**, LR et al., Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphate: a new intracellular signalling system?, in: Biochem. Biophys. Acta, 1993, 1179: 27 – 75
- Stoffel**, RH et al., Targeting G protein-coupled receptor kinases to their receptor substrates, in : J. Membr. Biol., 1997, 157: 1 – 8
- Streyer**, Biochemie. Degenerierter genetischer Code. 109
- Streyer**, Biochemie. Phosphatidylinositol Biosynthese
- Stricker**, R et al., cDNA cloning of porcine p42IP4, a membrane-associated and cytosolic 42 kDa inositol(1,3,4,5)tetrakisphosphate receptor from pig brain with similarly high affinity for phosphatidylinositol (3,4,5)P3, in: FEBS Lett., 1997, 405: 229 – 236

- Stricker**, R et al., Translocation between membranes and cytosol of p42<sup>IP4</sup>, a specific inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate/phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-receptor protein from brain, is induced by inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and regulated by a membrane-associated 5-phosphatase, in: *Eur. J. Biochem.*, 1999, 261: 577 – 584
- Takeuchi**, H et al., Distinct specificity in the binding of inositol phosphates by pleckstrin homology domains of pleckstrin, RAC-protein kinase, diacylglycerol kinase and a new 130 kDa protein, in: *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, 1359: 275 – 285
- Tanaka**, K et al., A target of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate with a zinc-finger motif similar to that of the ADP-ribosylation-factor GTPase-activating protein and two pleckstrin homology domains, in: *Eur. J. Biochem.*, 1997, 245: 512 – 519
- Tanaka**, K et al., Evidence That a Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate-binding Protein Can Function in Nucleus, in: *J. Biol. Chem.*, 1999, 274: 3919 – 3922
- Toker**, A, The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, in: *Opin. Cell Biol.*, 1998, 10: 254 - 261
- Toker**, A, Signaling through protein kinase C, in: *Front. Biosci.*, 1998, 3: D1134 – D1147
- Toker**, A/ Cantley, LC, Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase, in: *Nature (London)*, 1997, 387: 673 – 676
- Tsubokawa**, H et al., Intracellular inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate enhances the calcium current in hippocampal CA1 neurones of the gerbil after ischaemia, in: *J. Physiol.*, 1996, 497: 67 – 78
- Turner**, CE et al., Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling, in: *J. Cell Biol.*, 1999, 145 : 851 – 863
- Turner**, CE, Paxillin interactions, in: *J. Cell. Biol.*, 2000, 113: 4139 – 4140
- Tyers**, M et al., Molecular cloning and expression of the major protein kinase C substrate of platelets, in: *Nature*, 1988, 333 : 470 – 473
- Vanhaesebroeck**, B et al., Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids, in: *Annu Rev. Biochem.*, 2001, 70: 535 – 602

- Venkateswarlu**, K/ Culklen, PJ, Molecular Cloning and Function Characterization of a Human Homologue of Centaurin- $\alpha$ 1, in: Biochem. Biophys. Res. Comm., 1999, 262: 237 – 244
- Venkateswarlu**, K et al., Identification of centaurin- $\alpha$ 1 as a potential *in vivo* phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding protein that is functionally homologous to the yeast ADP-ribosylation factor (ARF) GTPase-activating protein, Gcs1, in: Biochem., 1999, 340: 359 – 363
- Venkateswarlu**, L et al., PI-3-Kinase dependent membrane recruitment of centaurin- $\alpha$ 2 is essential for its effect on ARF6-mediated actin cytoskeleton reorganisation, in: Journal of Cell Science 120, 2007, 792-801
- Walter**, J et al., Phosphorylation of beta-amyloid precursor protein at the cell surface by ectocasein kinases 1 and 2, in: J. Biol. Chem., 2000, 275: 23523 – 23529
- Wang**, W/ Malcolm, BA, Two – stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutation, deletions and insertion using QuikChange site – directed Mutagenesis, in: Biotechniques, 1999, 680 – 682
- Wang**, T et al., Differential Association of the Pleckstrin Homology Domains of Phospholipases C- $\beta$ 1, C-2 $\beta$ , and C- $\delta$ 1 with Lipid Bilayers and the  $\beta\gamma$  Subunit of Heterotrimeric G Proteins, in: Biochem., 1999, 38: 1517 – 1524
- Weekes**, J et al., Acidic phospholipids inhibit the intramolecular association between the N- and C-terminal regions of vinculin, exposing actin-binding and protein kinase C phosphorylation sites, in: Biochem. J., 1996, 314: 827 – 832
- Whitehead**, IP et al., Dbl family proteins, in: Biochim. Biophys. Acta, 1997, 1332: F1 – F23
- Whitley**, P et al., Identification of centaurin- $\alpha$ 2: a phosphatidylinositide-binding protein present in fat, heart and skeletal muscle, in: Eur. J. Cell Biol., 2002, 81: 222 – 230
- Whitney**, JA et al., Cytoplasmic coat proteins involved in endosome function, in : Cell, 1995, 83 : 703 – 713
- Wood**, CK et al., Characterisation of the paxillin-binding site and the C-terminal focal adhesion targeting sequence in vinculin, in: J. Cell Sci., 1994, 107: 709 – 717
- Wurmser**, AE et al., Phosphoinositide 3-kinases and their FYVE domain-containing effectors as regulators of vacuolar/lysosomal membrane trafficking pathways, in: J. Biol. Chem., 1999, 274: 9129 – 9132

- Yasojima**, K et al., Casein kinase 1 delta mRNA is upregulated in Alzheimer disease brain, in: Brain Research, 2000, 865: 116 – 120
- Yoon**, HS et al., Solution structure of pleckstrin-homology domain, in : Nature, 1994, 369 : 672 – 675
- York**, JD et al., A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export, in: Science, 1999, 285: 96
- Yu**, FX et al., Identification of a polyphosphoinositide-binding sequence in an actin monomer-binding domain of gelsolin, in: J. Biol. Chem., 1992, 267: 14616 – 14621
- Zemlickova**, E et al., Centaurin- $\alpha_1$  associates with and is phosphorylated by isoforms of protein kinase C, in: Biochem. Biophys. Res. Comm., 2003, 307: 459 – 465
- Zhang**, G et al., Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester, in : Cell, 1995, 81 : 917 – 924

## 10 Danksagung

Am Zustandekommen dieser Dissertation sind eine Vielzahl von Menschen massgeblich beteiligt gewesen, die mir eine kompetente Stütze bei allen meinen technischen und inhaltlichen Fragen waren und mir stets motivierend zur Seite gestanden haben.

Bei Prof. Dr. G.W. Mayr war immer Raum für klärende, diskussionsträchtige und weiterführende wissenschaftliche Gespräche, die sich in der Vielseitigkeit der Arbeit widerspiegeln.

Ganz besonderen Dank gebührt Dr. M. Nalaskowski, Dr. C. Deschermeier und Herrn W. Fanick, die mich v.a. zu Beginn meiner Labor-Arbeit in der technischen Durchführung unterstützten. Dr. M. Brehm bereicherte meine Arbeit im letzten Abschnitt der Dissertation v.a. mit ihren Software-Kenntnissen und stets kritischen Hinterfragungen, die sehr zur Reflexion der i.R. der Durchführung gemachten Erkenntnisse beitrugen und für ihre stets freundliche und fröhliche Art zur richtigen Zeit danke ich ihr sehr.

Frau Beynio sei Dank für die verlässlichen Terminvereinbarungen und nicht zuletzt für die Regulation meines Blutzuckerhaushaltes in Form von wohlschmeckenden süßen Köstlichkeiten jeder Art.

Meinem Bruder Sicco Rathke danke ich sehr für die formelle Korrektur meiner Dissertation, die er trotz eigener hoher Arbeitsbelastung in gemeinsamer Arbeit kompetent und zügig durchführte.

Diese Arbeit hätte jedoch weder begonnen, noch durchgeführt oder abgeschlossen werden können ohne die emotionale und bedingungslose Unterstützung meiner Mutter Susanne Rathke, derer ich mir immer sicher sein konnte und die mir so die Kraft gegeben hat diese Arbeit i.R. des Studiums und schließlich in der weiterführenden beruflichen Ausbildung anzufertigen.

## **11 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Thurid Rathke

Hamburg, 30. Oktober 2008