Universität Ulm

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Leiter: Prof. Dr. Peter Gierschik

Strukturelle Voraussetzungen der Rac2-vermittelten Aktivierung der Phospholipase C-γ_2

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Carolin Christow

geb. in Stuttgart

2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Gierschik

2. Berichterstatter: PD Dr. Petra Pandur

Tag der Promotion: 14.01.2011

Für meine Eltern, meinen Bruder Hannes und meine Großmutter Charlotte Lude

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III
1 Einleitung 1
1.1 Allgemeine Einführung 1
1.2 Signaltransduktion über Transmembranrezeptoren 1
1.3 Rho-GTPasen 3
1.4 Phospholipase-C-Enzyme 11
1.5 Ziele der Arbeit 18
2 Material und Methoden 20
2.1 Material 20
2.1.1 Chemikalien und biochemische Reagenzien 20
2.1.2 Radioaktiv-markierte Chemikalien 22
2.1.3 Enzyme, Kits und molekularbiologische Materialien 22
2.1.4 Verbrauchsmaterial 23
2.1.5 Pro- und eukaryotische Zellstämme 23
2.1.6 Oligonukleotide für die Sequenzierung von Plasmidvektoren 24
2.1.7 Oligonukleotide für *in vitro* DNA-Mutagenese 24
2.1.8 Plasmide 26
2.1.9 Vorhandene Plasmid-DNA-Konstrukte 26
2.1.10 Rekombinante Baculoviren 26
2.1.11 Rekombinante Proteine 27
2.1.12 Klonierung von DNA-Fragmenten 27
2.1.13 Antikörper 27
2.1.14 Geräte 28
2.1.15 Elektronische Datenverarbeitungsprogramme 29
2.2 Methoden 31
2.2.1 Mikrobiologische Methoden 31
2.2.2 Molekularbiologische Methoden 34
2.2.3 Eukaryotische Zellkultur 42
2.2.4 Proteinexpression 45
2.2.5 Proteinpräparation 48
2.2.6 Methoden der Proteinbiochemie 50
2.2.7 Bestimmung der Phospholipase C-Aktivität in COS-7-Zellen 55
2.2.8 Bestimmung von Proteinfunktionen *in vitro* 57

2.2.9 Auswertung und Darstellung von Messergebnissen 61
3 Ergebnisse 62
3.1 Herstellung der Plasmidvektoren für Mutanten von Rac2, Rac1 und Cdc42 62
3.2 Expression der Mutanten von Rac2 in *Sf*9-Zellen 64
3.3 Bestimmung der Guaninnukleotid-Bindungsstellen der mutierten Rho-GTPasen 65
3.4 Messung der Aktivität der PLCγ_2 in Anwesenheit von Rac2-Mutanten 68
4. Diskussion 91
5. Zusammenfassung 101
6. Literaturverzeichnis 114
Danksagung 114
Lebenslauf 114

Abkürzungsverzeichnis

λ	Wellenlänge
[^{35}S]GTPγS	[^{35}S]Guanosin-5´-*O*-(3-thiotriphosphat)
APS	Ammoniumpersulfat
BCR	*B-cell receptor* (B-Zell-Rezeptor)
BLNK	*B-cell linker*
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
Btk	*Bruton´s tyrosine kinase*
Cdc	*cell-division cycle protein*
cDNA	*complementary DNA*
CLIP-170	*cytoplasmic linker protein*-170
COS-7-Zellen	*african green monkey kidney cell* (Zelllinie)
cpm	*counts per minute* (Zählimpulse je Minute)
C-terminal	carboxylterminal
Da	Dalton
DAG	1,2-Diacyl-*sn*-glycerin
ddH_2O	bidestilliertes Wasser
ddNTP	2´-, 3´-Didesoxynukleosid-5'-trisphosphat
DH	*Dbl-homology* (Dbl-Homologie)
DMEM	*dulbecco's modified eagle medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Desoxynukleosid-5´-triphosphat
DOC	Deoxycholat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
ECL	*enhanced chemiluminescence*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	*epidermal growth factor*
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethyl)-N,N,N´,N´-tetraessigsäure
FCS	*fetal calf serum* (fötales Kälberserum)

FGF	*fibroblast growth factor*
FMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FRG	*FGD1-related Cdc42-GEF*
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
GABA	Gammaaminobuttersäure
Gads	*Grb2-related adapter downstream of Shc*
GAP	*GTPase-activating protein*
GDI	*GDP dissociation inhibitor*
GDP	Guanosin-5´-diphosphat
GEF	*guanine nucleotide exchange factor*
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
Grb2	*growth-factor-receptor-bound protein 2*
GTP	Guanosin-5´-triphosphat
GTPγS	Guanosin-5´-*O*-(3-thiotriphosphat)
Gα	α-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
Gβγ	βγ-Dimer eines heterotrimeren G-Proteins
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure
HMW	*high molecular weight*
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP_3	D-*myo*-Inosit-1,4,5-trisphosphat
IQGAP	*IQ motif containing GTPase activating protein homologue*
ITAM	*immune receptor tyrosine-based activation motif*
Itk	*IL2-inducible T-cell kinase*
JNK	*c-jun N-terminal kinase*
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
LAT	*linker for activation of T-cells*
LB^{Amp+}	Luria-Bertani-Medium mit Ampicillin
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium

M	Mol pro Liter
m/V	Masse pro Volumen
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFκB	*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*
NGF	*nerve growth factor*
NRPTK	Nichtrezeptor-Proteintyrosinkinase
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
OD_{600}	optische Dichte bei 600 nm
p.a.	*pro analysis*
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBR	polybasische Region
PBS	*phosphate-buffered saline*
pcDNA	pcDNA-Vektor
PCR	*polymerase chain reaction* (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	*platelet-derived growth factor*
PE	Phosphatidylethanolamin
pH	pH-Wert
PH	*pleckstrin homology* (Pleckstrin-Homologie)
P_i	anorganisches Phosphat
PI3K	Phosphatidylinosit-3-Kinase
PIP	Phosphatidylinosit-3-Phosphat
PIP_2	Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat
PIP_3	Phosphatidylinosit-3,4,5-trisphosphat
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
P-loop	*phosphate-binding loop*
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTB	*phosphotyrosine binding*
RA	*Ras-associating*

Rac	*ras-related C_3 botulinum toxin substrate*
Ras	*rat sarcoma*
Rho	*ras-homologous protein*
RhoGAPs	*Rho-GTPase-activating proteins*
RhoGDIs	*Rho protein guanine nucleotide dissociation inhibitors*
RhoGEFs	*guanine nucleotide exchange factor for Rho/Rac/Cdc42-like GTPases*
Rnd	*Rho family GTPase*
ROCK	*Rho-associated kinase*
RPTK	Rezeptor-Proteintyrosinkinase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
*Sf*9-Zellen	Ovarialzellen von *Spodoptera frugiperda*
SH	*Src homology* (Src-Homologie)
SLP-76	*SH2-domain containing leukocyte protein of 76 kDa*
SOB-Medium	s*uper optimal broth*-Medium
SOC-Medium	*Super Optimal broth with Catabolite repression*-Medium
Sos	s*on of sevenless*
STI	*soybean trypsin inhibitor*
Syk	*spleen tyrosine kinase*
T	Temperatur
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TCR	*T-cell receptor* (T-Zell-Rezeptor)
TEA	Triethanolamin
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
TFII-I	*transcription factor II-I*
Tiam	*T-lymphoma invasion- and metastasis-inducing protein*
T_m	*melting temperature* (Schmelztemperatur)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPC3	*transient receptor potential channel 3*
Tween	Polyoxyethylensorbitan-monolaurat
U	*unit*

UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V/V	Volumen pro Volumen
VT	Volumenteil
WASP	*Wiskott-Aldrich syndrome protein*

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Um die vielfältigen Vorgänge, die einen menschlichen Organismus zum Leben befähigen, zu gewährleisten, ist der Austausch von Informationen zwischen Zellen unabdingbar. Diese Kommunikation wird zum einen, z.B. im Nervensystem, durch physikalische Reizübertragung vollzogen. Die andere Möglichkeit ist chemischer Natur. Hierbei werden Informationen mithilfe von Hormonen, Zytokinen und ähnlicher Botenstoffe ausgetauscht. Diese Moleküle interagieren als Liganden mit Rezeptormolekülen, wodurch eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird, die zur gewünschten Zellantwort führt. Die Liganden greifen je nach chemischer Eigenschaft an der Zellmembran oder im Zellinneren an. So finden hydrophile Liganden ihre Rezeptoren außen an der Zellmembran, während lipophile Liganden in das Zellinnere vorzudringen vermögen und hier im Zytoplasma oder im Zellkern an ihre Rezeptoren binden (Löffler-Petrides 2003).

1.2 Signaltransduktion über Transmembranrezeptoren

Transmembranrezeptoren leiten Information, die von außen an die Zelle gelangt, in deren Inneres weiter und lassen sich in drei Gruppen einteilen: Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Proteintyrosinkinasen (Löffler-Petrides 2003).

1.2.1 Liganden-gesteuerte Ionenkanäle

Liganden-gesteuerte Ionenkanäle besitzen die Fähigkeit, Poren in der Zellmembran zu bilden und dadurch den Austausch von Ionen zwischen intra- und extrazellulärem Raum zu ermöglichen. Sie bestehen aus verschiedenen Proteinuntereinheiten, die nach Ligandenbindung ihre Konformation ändern und dadurch eine Öffnung in der Zellmembran bilden, durch die nun selektiv Ionen, z.B. Na^+, K^+, Cl^- oder Ca^{2+} fließen können. Durch die hervorgerufene Änderung der Ionenverteilung kommt es zu Potentialänderungen an der Zellmembran, was wiederum zelluläre Reaktionen zur Folge hat. Ein Beispiel für Liganden-gesteuerte Ionenkanäle sind nikotinische Cholinorezeptoren

für Acetylcholin, $GABA_A$-Rezeptoren für γ-Aminobuttersäure oder auch ionotrope Glutamatrezeptoren (Barnard 1992, Karpen und Ruiz 2002).

1.2.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Diese Gruppe stellt mit mehr als 1000 Varianten die größte Entität der Transmembranrezeptoren dar. Zudem ist sie pharmakologisch von großer Bedeutung, so greifen mehr als 30 % der zurzeit auf dem Markt befindlichen Pharmaka an diesen Rezeptoren an (Hill 2006). Liganden sind unter anderem Hormone, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter und Licht (Marinissen und Gutkind 2001, Offermanns 2003, Ritter und Hall 2009). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) bestehen aus einem Polypeptid, das in sieben Schleifen durch die Zellmembran gewunden vorliegt. Die extrazellulären Anteile bilden hierbei eine ringförmige Tasche, die als Angriffspunkt für die Liganden dient. Kommt es zur Aktivierung des Rezeptors, so erfolgt eine Lageänderung einzelner Transmembrandomänen, was wiederum eine Konformationsänderung der intrazellulär gelegenen Teile des Rezeptors nach sich zieht. Dadurch kann der Rezeptor mit heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden Proteinen (G-Proteinen) interagieren. G-Proteine bestehen aus je einer α-, β- und γ-Untereinheit, wobei die β- und γ-Untereinheit wiederum ein Dimer bilden, das Gβγ-Dimer. Die α-Untereinheit ist in der Lage, GTP zu binden und es zu GDP zu hydrolysieren. Bindet ein Ligand an einen GPCR, so führt dies zur Freisetzung des an die α-Untereinheit gebundenen GDPs und zur erneuten Bindung eines GTPs. Daraufhin dissoziiert das heterotrimere Protein in seine Untereinheiten, die Effektoren beeinflussen und eine zelluläre Antwort hervorrufen können (Marinissen und Gutkind 2001). Zur Gruppe der GPCRs zählen unter anderem $GABA_B$-Rezeptoren für γ-Aminobuttersäure, Adrenorezeptoren für Adrenalin und Noradrenalin, muskarinische Cholinorezeptoren für Acetylcholin, Rezeptoren für Adenosin, Dopamin, Histamin, Melatonin und viele mehr (Offermanns 2003, Ritter und Hall 2009).

1.2.3 Proteintyrosinkinasen

Die Gruppe der Proteintyrosinkinasen wird unterteilt in membranständige Rezeptor-Proteintyrosinkinasen (RPTKs), und in Nichtrezeptor-Proteintyrosinkinasen (NRPTKs), die im Zytosol lokalisiert sind. Bindet ein Ligand an den extrazellulär liegenden Teil einer RPTK, so erfolgt eine Homo- bzw. Heterodimerisierung des davor als Monomer vorliegenden Rezeptors. Hierdurch kommt es zur Auto- und/oder Transphosphorylierung

von Tyrosinresten in der zytosolischen Region der RPTK. Nun binden Enzyme, wie Src-, Syk- oder Tec-Kinasen, Phospholipase-C-γ-Isoformen, Phosphatidylinosit-3-Kinase (PI3K), Ras-GTPase-aktivierende Proteine, Rho-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (RhoGEFs) oder auch Adapterproteine wie Grb2 und Nck mithilfe von Src-homology-2 (SH2)- oder *phosphotyrosine binding* (PTB)-Domänen an diese Tyrosinreste und werden dadurch aktiviert (Schlessinger 2000, Rhee 2001). Zu den Liganden der Rezeptor-Proteintyrosinkinasen zählen Hormone wie Insulin und Polypeptid-Wachstumsfaktoren, wie der *epidermal growth factor* (EGF), der *nerve growth factor* (NGF) und der *platelet derived growth factor* (PDGF) (Rhee 2001).

Nicht-Rezeptor-Proteintyrosinkinasen wie die Src-, Csk-, Syk-, Tec-, Jak-, Fak-, Abl-, Fes, Frk- und Ack-Familien (Tsygankov 2003) binden an die ins Zytosol ragenden Domänen von Integrinen, Rezeptoren für Zytokine (z.B. IL-1 und IL-4), von Antigen-Rezeptoren wie T- und B-Zell-Antigen-Rezeptoren (TCR, BCR) oder von IgM-, IgE-, IgA- und IgG-Rezeptoren und werden dadurch aktiviert (Rhee und Bae 1997, Uings und Farrow 2000, Rhee 2001, Baker *et al.* 2007). Nun phosphorylieren und aktivieren die NRPTKs Effektoren wie die Phospholipase-C-γ (PLCγ), die PI3K (Malarkey *et al*. 1995, Rhee und Bae 1997, Kurosaki 2002), RhoGEFs wie FRG (Miyamoto *et al*. 2003), Vav1 (Crespo *et al*. 1997), Vav2 oder Tiam1 (Servitja *et al*. 2003), Adapterproteine wie LAT (*linker for activation of T-cells*), BLNK (*B-cell-linker-protein*), SLP-76, Gads oder Grb2 (Wilde und Watson 2001), und auch andere Proteintyrosinkinasen wie z.B. Btk und Itk (Rhee 2001, Kurosaki *et al*. 2001, Humphries *et al*. 2004).

1.3 Rho-GTPasen

1.3.1 Gliederung und Struktur

Die Gruppe der Rho-GTPasen gehört zu den monomeren GTPasen und zur Superfamilie der Ras-GTPasen. Ras steht hierbei für *rat sarcoma*, da Ras als erstes Mitglied der Familie in Tumorzellen der Ratte identifiziert werden konnte. Die Ras-Superfamilie kann eingeteilt werden in die Ras-, die Rho-, die Rab-, die Sar1/Arf- und die Ran-Proteine (Takai *et al.* 2001, Harden und Sondek 2006). Allen Rho-GTPasen ist ihre Fähigkeit zur Bindung von GTP gemein, das von diesen Enzymen zu GDP hydrolysiert wird. Im menschlichen

Genom wurden bis heute 23 verschiedene Gene gefunden, die für Rho-GTPasen kodieren. Durch unterschiedliches Spleißen können so mindestens 26 verschiedene Proteine generiert werden. Diese Rho-GTPasen können anhand der Homologie ihrer Aminosäuresequenz, ihrer Funktion und bestimmter struktureller Eigenschaften in sechs Subfamilien eingeteilt werden: Rho (RhoA, RhoB, RhoC), Rac (*ras-related C_3 botulinum toxin substrate*, Rac1, Rac2, Rac3, RhoG/AhrG), Cdc42 (*cell division cycle protein*, Cdc42, RhoJ/TCL, RhoQ/TC10, RhoU/Wrch1, RhoV/Wrch2), Rnd (Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE, RhoD/AhrD, RhoF/Rif), RhoBTB (RhoBTB1, RhoBTB2, RhoH/TTF, RhoBTB3) und RhoT (RhoT1/Miro1, RhoT2/Miro2) (Bustelo *et al*. 2007).

Es konnte gezeigt werden, dass an der Interaktion von Rho-GTPasen mit Effektoren, Regulatoren und Nukleotiden zwei Regionen beteiligt sind, die sogenannten *switch-I*- und *switch-II*-Regionen. Bei Rac umfasst die *switch-I*-Region die Aminosäuren 30 bis 40, während die *switch-II*-Region den Aminosäuren 57 bis 71 entspricht (Scheffzek *et al*. 2000). Bei Bindung von GTP kommt es zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen den beiden *switch*-Regionen, also zu einer Konformationsänderung des Moleküls. Im GTP-gebundenen Zustand kann das Protein nun mit seinen Effektoren interagieren, da es in dieser Form eine höhere Affinität zu ihnen aufweist (Wennerberg und Der 2004). Zudem wird die β-Phosphatgruppe des GTP von der *P-loop* (*phosphate-binding loop*)-Region gebunden. Ein essentieller Kofaktor für die Aktivität GTP-bindender Proteine sind Magnesium-Ionen, die die Bindung der Nukleotide GTP und GDP stabilisieren. Das Mg^{2+}-Ion bindet an einen konservierten Serin- oder Threoninrest der *switch-I*-Region und an einen konservierten Aspartatrest der *switch-II*-Region. Auch der *P-loop* ist mit einem Serin- oder Threoninrest an der Bindung beteiligt (Zhang *et al*. 2000).

1.3.2 Posttranslationale Modifikation und subzelluläre Lokalisation

Um ihre biologische Funktion erfüllen zu können, ist es für viele Rho-GTPasen notwendig, an die Zellmembran zu translozieren. Dafür sind mehrere Schritte nötig: Zunächst wird an die carboxylterminal gelegene, sogenannte CAAX-Box (C = Cystein, A = aliphatische Aminosäure, X = beliebige Aminosäure) der GTPase ein Isoprenylrest, bei dem es sich entweder um einen Geranylgeranyl-Rest oder um einen Farnesyl-Rest handelt, gebunden. Dies hat wiederum die Translokation zum endoplasmatischen Retikulum zur Folge. Hier kommt es zur Abspaltung des AAX-Motivs durch eine Protease und zur Veresterung der so freigelegten α-Carboxylgruppe des Cysteins durch eine Methyltransferase. Ohne die

Isoprenylierung wäre es für die Mehrheit der Mitglieder der Ras-Superfamilie nicht möglich, an die Zellmembran zu translozieren, wohingegen die Abspaltung des AAX-Motives und die Methylierung nur für farnesylierte GTPasen essentiell ist. Die endgültige Lokalisation und auch die Funktion der GTPasen sind von zusätzlichen Signalmotiven im weiter aminoterminal gelegenen Teil der Proteine, einer hypervariablen Region, abhängig (Bishop und Hall 2000, Bustelo *et al.* 2007). Rac1 zeigt hier eine polybasische Aminosäuresequenz (PBR, für polybasische Region), Rac2 hingegen besitzt an dieser Stelle keine polybasische Region, sondern mehrere nicht-basische Reste. Die PBR von Rac1 setzt sich vor allem aus Lysinresten zusammen und führt zu einer Lokalisation an die Plasmamembran (Michaely *et al.* 1999, Michaelson *et al.* 2001, Williams 2003). Rac2 hingegen ist vor allem an internen Membranen zu finden (Michaelson *et al.* 2001). Die hypervariable Region spielt für diese GTPase zudem eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der NADPH-Oxidase (Tao *et al.* 2002). Cdc42, welches keine PBR besitzt, ist hauptsächlich an der Kernmembran, den Membranen des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates lokalisiert (Michaely *et al*. 1999, Michaelson *et al.* 2001, Bustelo *et al.* 2007).

1.3.3 Regulation von Rho-GTPasen

Es sind hauptsächlich drei verschiedene Mechanismen für die Regulation von Rho-GTPasen verantwortlich: Die Interaktion mit RhoGEFs (*guanine nucleotide exchange factors*), RhoGAPs (*GTPase-activating proteins*) und RhoGDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*).

Bis heute konnten mindestens 69 verschiedene RhoGEFs identifiziert werden, als Beispiel können Tiam1, Vav1 oder P-Rex1 genannt werden (Wennerberg und Der 2004, Rossman *et al.* 2005, Aittaleb *et al.* 2010). Sie führen bei Interaktion mit Rho-GTPasen zu einem Austausch von GDP gegen GTP und versetzen die GTPase somit in einen aktiven Zustand. Dabei agieren einige GEFs sehr spezifisch nur mit bestimmten GTPasen, Asef z.B. aktiviert Cdc42 (Gotthardt und Ahmadian 2007) oder Tiam1 Rac-GTPasen (Rac1, Rac2 und Rac3) (Rossman *et al*. 2005). Andere RhoGEFs hingegen können mehrere GTPasen aktivieren, z.B. interagiert Vav1 mit Rac1, RhoG, RhoA und Cdc42 (Rossman *et al.* 2005). Vielen RhoGEFs ist eine DH (für *Dbl-homology*)-Domäne und eine PH (für *pleckstrin-homology*)-Domäne gemeinsam. Die DH-Domäne ist für die katalytische Funktion des RhoGEFs verantwortlich, während die PH-Domäne durch Bindung von Lipiden für die

Lokalisation an der Zellmembran sorgt. Zudem wird vermutet, dass sie die Aktivität der DH-Domäne beeinflusst. Interessanterweise konnte in NMR- und Röntgenstrukturanalysen gezeigt werden, dass die DH-Domänen von β-PIX, Sos1, Trio und Tiam hinsichtlich ihrer dreidimensionalen Struktur große Übereinstimmungen zeigen, obwohl sich diese GEFs in ihrer Sequenz z.T. stark unterscheiden. Weitere Domänen im Molekül von RhoGEFs regulieren vermutlich die subzelluläre Lokalisation und die Aktivierungsmechanismen der RhoGEFs.

Im Gegensatz zu RhoGEFs führen RhoGAPs zu einer Inaktivierung von Rho-GTPasen, indem sie die intrinsische GTPase-Aktivität ihrer Effektoren steigern und somit zur Hydrolyse von GTP führen, was die Rho-GTPasen in ihren inaktiven, GDP-gebundenen Zustand überführt. Dieser Mechanismus kann durch Mutation außer Kraft gesetzt werden: So ist die Rac2-Mutante $Rac2^{G12V}$ konstitutiv aktiv, da ihre intrinsische und durch RhoGAPs induzierte Hydrolysefähigkeit aufgehoben ist (Scheffzek *et al.* 1997, Bishop und Hall 2000)

Auch RhoGDIs führen Rho-GTPasen in einen inaktiven Zustand, indem sie die GDP-Freisetzung verhindern (Van Aelst und D'Souza-Schorey 1997). Zudem sind sie mithilfe einer hydrophoben Tasche in der Lage, den Isoprenylrest der Rho-GTPasen zu inkorporieren. Dies führt dazu, dass die Rho-GTPase nicht mehr in der Lage ist, sich mittels des Isoprenylrestes in die Plasmamembran einzulagern und hier katalytisch aktiv zu sein, sodass die Rho-GTPase ins Zytosol transloziert und sich in einem stabilisierten Zustand befindet. Die Komplexierung mit RhoGDIs ermöglicht zudem eine Translokation der Rho-GTPase zwischen verschiedenen Membranen (Buchsbaum 2007).

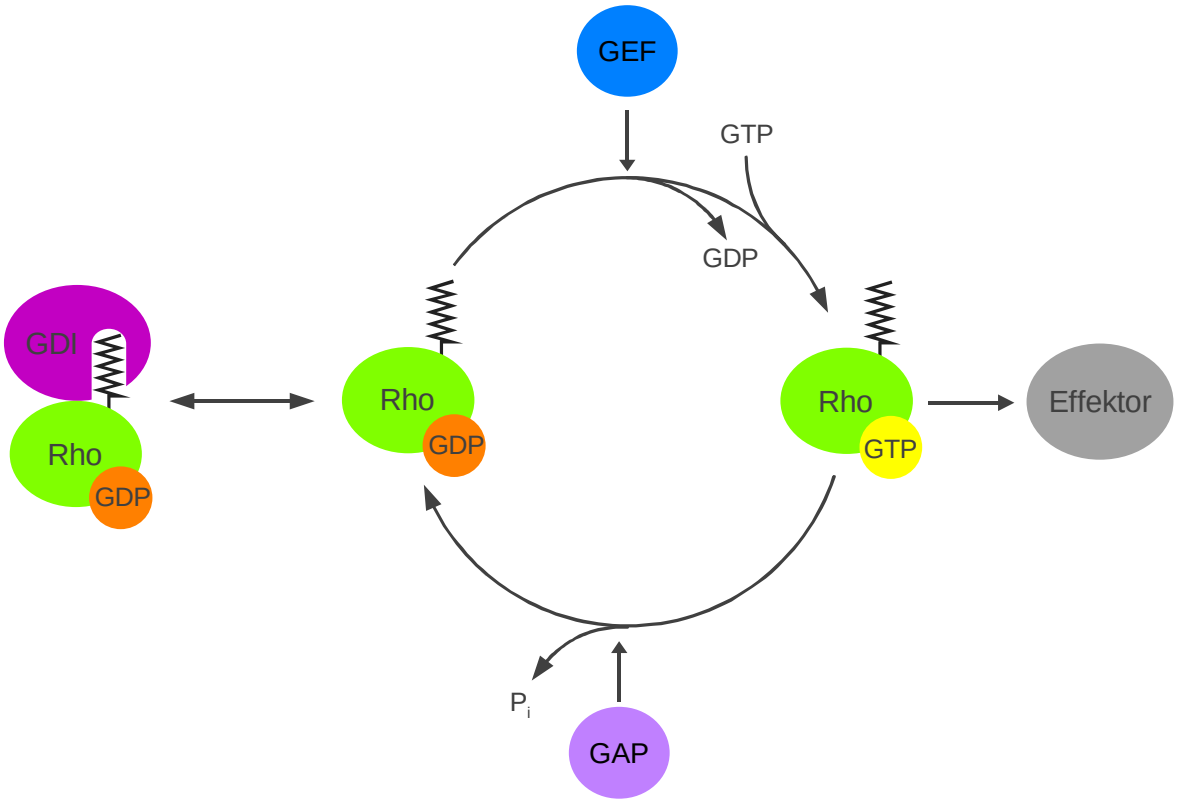


Abb. 1: Der funktionelle Zyklus von *ras-homologous protein*-GTPasen (Rho-GTPasen). Rho-GTPasen (*Rho*) wirken als molekulare Schalter und wechseln zwischen einem inaktiven, Guanosin-5´-diphosphat (GDP)-gebundenem (*GDP*) Zustand und einem aktiven, Guanosin-5´-triphosphat (GTP)-gebundenem (*GTP*) Zustand, in dem sie dazu in der Lage sind, mit ihren Effektoren (*Effektor*) zu interagieren. In diesem Kreislauf werden die Rho-GTPasen von RhoGEFs (*GEF*) aktiviert bzw. von RhoGAPs (*GAP*) und RhoGDIs (*GDI*) inaktiviert (P_i: anorganisches Phosphat, RhoGEF: *guanine nucleotide exchange factor for Rho/Rac/Cdc42-like GTPases*, RhoGAP: *Rho-GTPase-activating proteins*, RhoGDI: *Rho protein guanine nucleotide dissociation inhibitors*).

1.3.4 Funktionen und Effektoren von Rho-GTPasen

Rho-GTPasen sind in der Zelle an der Steuerung einer Vielzahl biochemischer und biologischer Prozesse beteiligt, die unter anderem wichtige Modalitäten wie die Zellmorphologie, die Zellmotilität und vieles mehr beeinflussen.

Das Aktin-Zytoskelett spielt eine entscheidende Rolle für die Morphologie jeder Zelle. Es konnte gezeigt werden, dass Rho-GTPasen in diesem Kontext eine wichtige Funktion innehaben, da sie die Aktin-Polymerisation regulieren. So aktivieren z.B. Cdc42 und Rac den sogenannten Arp2/3-Komplex indirekt über Mitglieder der WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*)-Familie. Der Arp2/3-Komplex initiiert die Bildung neuer Aktin-Filamente bzw. die Aufzweigung bereits bestehender Filamente. Die Bildung von Aktin-

Filamenten kann weiterhin durch Proteine der Formin-Familie katalysiert werden. In diesem Fall ist Rho für die Regulation wichtig: Es stimuliert die Aktin-Polymerisation indirekt über das Formin mDia, welches bei Bindung von Rho nicht länger autoinhibiert ist und dadurch an Aktin-Filamente binden kann, was wiederum zur Anlagerung von Aktin-Monomeren führt. Auch die Bildung von Mikrotubuli wird durch Rho-GTPasen beeinflusst. Mikrotubuli interagieren mit ihrem plus-Ende mit Proteinen der Zellmembran und benötigen hierzu weitere Proteine, die an das plus-Ende des Mikrotubulus binden und die Interaktion mit der Zellmembran vermitteln. Diese Proteine werden wiederum durch Rho-GTPasen reguliert. Ein Beispiel hierfür ist IQGAP, ein Effektor von Cdc42 und Rac, das bei Aktivierung an CLIP-170 binden kann, welches dann an Mikrotubuli bindet und mit der Zellmembran interagiert (Bishop und Hall 2000, Etienne-Manneville und Hall 2002, Jaffe und Hall 2005, Tybulewicz und Henderson 2009, Chesarone *et al.* 2010). Auch weitere biochemische Funktionen werden von Rho-GTPasen reguliert. So konnte gezeigt werden, dass Rho, Rac und Cdc42 für die Gentranskription wichtig sind, indem sie z.B. Effektoren wie NFκB aktivieren oder den JNK- und p38-MAP-Kinase-Weg stimulieren. Des Weiteren gehört die Regulation von Enzymen zu den Aufgaben der Rho-GTPasen. Ein bereits früh untersuchter Mechanismus ist hierbei z.B. die Aktivierung des NADPH-Oxidase-Komplexes, der in neutrophilen Granulozyten die Bildung freier Sauerstoffradikale katalysiert (Van Aelst und D´Souza-Schorey 1997, Bishop und Hall 2000, Hall 2005, Jaffe und Hall 2005). Die in neutrophilen Granulozyten hauptsächlich exprimierte Rho-GTPase ist Rac2 (Diebold und Bokoch 2005). Für eine Aktivierung bindet diese an ihren Effektor $p67^{phox}$, einen Baustein des Oxidase-Komplexes. Durch Versuche mit Gen-defizienten Mäusen konnten weitere Funktionen kleiner Rho-GTPasen in Zellen hämatopoetischen Ursprungs geklärt werden. So spielt z.B. Rac1 im Knochenmark eine wichtige Rolle bei der Reifung und dem Verbleib hämatopoetischer Stammzellen, wohingegen Rac2 hierauf keinen Einfluss hat. Rac1 ist in Stammzellen zudem für einen Eintritt in den Zellzyklus essentiell, Rac2 vermittelt Antworten des Zytoskeletts auf Signale oder auch die Bildung von Zelladhäsionen (Yu *et al.* 2001, Li *et al.* 2002, Walmsley *et al.* 2003, Zhao *et al.* 2003). In T-Zellen konnten für $Rac2^{-/-}$-Mäuse Defekte des T-Zell-Rezeptors (Yu *et al.* 2001), der Aktin-Polymerisation und von Ca^{2+}-Strömen nachgewiesen werden (Bustelo *et al.* 2007). Zudem spielt Rac2 eine Rolle bei der Differenzierung von T-Helfer-Zellen zum T_H1-Subtyp, dies geschieht durch die Regulation der p38- und NFκB-abhängigen Induktion von Interferon-γ, welches für diesen Reifungsschritt wichtig ist (Bustelo *et al.* 2007). Rac2-defiziente Mäuse zeigen eine

reduzierte Zahl an peripheren B-Zellen, peritonealen B1-Zellen und IgM- sezernierenden Plasmazellen. Zudem zeigen die B-Zellen dieser Mäuse nach einer Stimulation des B-Zell-Rezeptors eine geringere Freisetzung von Ca^{2+}-Ionen und eine reduzierte chemotaktische Aktivität. (Croker *et al*. 2002, Walmsley *et al*. 2003, Bustelo *et al.* 2007). In Thrombozyten liegt vor allen Dingen Rac1 vor. Es spielt in diesem Zelltyp eine Rolle bei der Bildung von Lamellipodien nach Stimulation mit ADP, zudem ist es wichtig für die Aggregation von Thrombozyten und für die Bildung von Thromben (Bustelo *et al.* 2007). Zudem ist bekannt, dass viele Rho-GTPasen in den Lipidmetabolismus involviert sind. So stellt z.B. die $PLC\beta_2$ einen Effektor von Rac und Cdc42 dar, die $PLC\gamma_2$ wird von Rac1, Rac2 und Rac3 stimuliert (Illenberger *et al.* 2003, Piechulek *et al.* 2005). Zudem regulieren Rho-GTPasen auch die Bildung von Adhärens-Kontakten und *tight junctions*, das Längenwachstum epithelialer Zellen, das Wachstum von Neuriten und vieles mehr. Bei der Steuerung des Zellzyklus kommen Rho-GTPasen ebenfalls wichtige Funktionen zu. So beeinflussen sie die Aktivität Zyklin-abhängiger Kinasen in der G1-Phase und organisieren das Aktin- und Mikrotubuli-Skelett in der M-Phase des Zellzyklus. In der Mitose spielen die GTPasen unter anderem eine Rolle bei der Bildung des Spindelapparates oder auch der Positionierung der Zentrosomen. Für die Zellteilung schließlich ist die Bildung eines kontraktilen Ringes aus Aktin- und Myosin-Filamenten unerlässlich, hierbei spielt vor allem Rho mit seinen Effektoren ROCK, Citron-Kinase und mDia eine Rolle. Des Weiteren konnte für Rho-GTPasen eine Beteiligung an der Migration von Zellen nachgewiesen werden. Wie bereits beschrieben, organisieren Rho-GTPasen das Zytoskelett. So kommt es bei Aktivierung von Rac1 zur Ausbildung von Lamellipodien, während die Aktivierung von Cdc42 zur Bildung von Filopodien führt. Schlussendlich sei noch erwähnt, dass die vielfältigen Funktionen der Rho-GTPasen entscheidend vom Zelltyp und den Einflüssen aus der Umgebung der Zelle abhängig sind und so teilweise für dasselbe Protein sogar gegensätzlich sein können (Bishop und Hall 2000, Etienne-Manneville und Hall 2002, Jaffe und Hall 2005, Tybulewicz und Henderson 2009).

Auch bei pathologischen Prozessen in der Zelle spielen Rho-GTPasen eine bedeutende Rolle. Sie wirken z.B. mit bei Entzündung und Wundheilung, aber auch bei der Bildung, Migration, Invasion und Metastasierung entarteter Zellen. So können in 15 % aller Tumoren aktivierende Mutationen der drei Ras-Isoformen gefunden werden. Im Gegensatz dazu sind Rho-Proteine wie RhoA, RhoC, Rac1, Rac2, Rac3 und Cdc42 in malignen Zellen selten mutiert, jedoch oft in ihrer Expression oder Aktivität verändert. Der Effekt

der Rho-GTPasen auf die Bildung von Tumorzellen und deren Wachstum lässt sich dadurch erklären, dass manche Rho-GTPasen den Zellzyklus stimulieren und die Gentranskription regulieren, sodass z.B. weniger entartete Zellen apoptotisch werden. Als Beispiel sei Rac1 genannt, welches in vielen Tumoren überexprimiert vorliegt. Es konnte gezeigt werden, dass die Rac1-abhängige Signalweiterleitung für die maligne Transformation von Zellen wichtig zu sein scheint. Rac1 ist eine der wenigen Rho-GTPasen, die in Tumorzellen mutiert ist. Ihre Mutationen betreffen vor allen Dingen die Effektordomäne des Moleküls, die mit *downstream-targets* interagiert, wodurch es zu einer Steigerung des Tumorüberlebens kommt. Ein weiteres Beispiel ist Rac3, welches spezifisch zur Bildung von Brc-Abl-induzierten Lymphomen beiträgt, wie *in vivo* mit Rac3-*knockout*-Mäusen gezeigt werden konnte. Weiterhin können z.B. Cdc42 und RhoQ/TC10 die Transformation von Zellen stimulieren, für Cdc42 wird dies durch seine Effekte auf Degradation und Regulation des Umsatzes von Rezeptoren vermutet. Auch Tumorvaskularisierung und Angiogenese werden durch manche Rho-GTPasen wie RhoC beeinflusst: Sie scheinen die Freisetzung pro-angiogenetischer Faktoren zu regulieren, sodass es zur Neovaskularisierung kommt (Vega und Ridley 2008). Invasives Wachstum wird durch den Verlust von Zell-Zell-Kontakten und der Veränderung hin zu einem „mobileren“ Phänotyp (die sogenannte *epithelial to mesenchymal transition*) erreicht. Abhängig vom Zelltyp könnte Rac eine Invasion über den Verlust von Adhärens-Kontakten vermitteln, außerdem über die Regulation der Produktion von Matrix-Metalloproteasen und ihrer Inhibitoren. Cdc42 scheint die Fähigkeit maligner Zellen zur Invasion durch die Ausbildung von Polarität zu verhindern, andererseits stimuliert es aber wohl auch die Migration maligner Zellen. Bei der Metastasierung entarteter Zellen spielen Rho-GTPasen ebenfalls eine wichtige Rolle, da sie an der Regulation des Zytoskeletts, von Zelladhäsionen und der Migration von Zellen beteiligt sind. Die räumlich und zeitlich abhängige Aktivierung von Rho-GTPasen wird durch RhoGEFs und RhoGAPs bestimmt, diese können zudem für Kontakte mit *downstream*-Effektoren sorgen. Dies könnte die verschiedenen und zum Teil widersprüchlichen Funktionen eng verwandter Rho-GTPasen bei der Karzinom-Progression erklären. So wurde eine Deregulation der Expression oder Aktivität mancher RhoGEFs, RhoGAPs und Effektorproteine von Rho-GTPasen in malignen Zellen beobachtet. Für Vav z.B., ein GEF für Rac, konnten onkogene Effekte in Neuroblastomen, Melanomen, Pankreaskarzinomen und leukämischen Zellen nachgewiesen werden. Weitere Beispiele sind das RhoGAP ARHGAP8, das in Kolon- und

Zervix-Karzinomen überreguliert ist. Zudem liegen z.B. Effektoren wie PAK und ROCK in manchen Karzinomen höher reguliert vor (Vega und Ridley 2008).

1.4 Phospholipase-C-Enzyme

Die Gruppe der PLC-Isoenzyme kann einem sehr großen Anteil der Zelloberflächenrezeptoren aktiviert werden und übt in der Signaltransduktion in Zellen eine wichtige Rolle aus. PLC-Isoenzyme katalysieren die Bildung der *second messenger* D-*myo*-Inosit-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und 1,2-Diacyl-*sn*-glycerin (DAG) aus dem Membranphospholipid Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PIP_2). IP_3 führt zur Freisetzung von Ca^{2+}-Ionen aus intrazellulären Speichern, während DAG die Proteinkinase C (PKC)-Familie zu aktivieren vermag (Rebecchi und Pentyala 2000). Wie sich erst in den letzten Jahren herausgestellt hat, wirkt PIP_2 nicht nur als Substrat dieser Enzyme, sondern stellt selbst ein intrazelluläres Signalmolekül dar: So beeinflusst es die Aktivität von Ionenkanälen und –transportern (Huang 2007), der PKC (Shirai *et al.* 2007), von *scaffolding*-Proteinen (Gorbatyuk *et al.* 2006) und von Proteinen, die an der Endocytose (Itoh *et al.* 2001), der Exocytose (Liu *et al.* 2007) und am intrazellulären Membrantransport (Brown *et al.* 2001) mitwirken.

1.4.1 Gliederung und Struktur der PLC-Enzyme

Die Familie der PLC-Isoenzyme umfasst bis heute 13 bekannte Mitglieder, deren Größe von 75 bis zu 260 kDa variiert. Sie können aufgrund ihrer Struktur in sechs Klassen eingeteilt werden: β (PLC$\beta_{1\text{-}4}$), γ (PLC$\gamma_{1\text{-}2}$), δ (PLC$\delta_{1,\ 3\text{-}4}$), ε (PLCε), ζ (PLCζ) und η (PLC $\eta_{1\text{-}2}$) (Rebecchi und Pentyala 2000, Rhee 2001, Saunders *et al*. 2002, Hwang *et al*. 2005, Katan 2005, Nakahara *et al*. 2005, Harden und Sondek 2006). Es wird vermutet, dass die PLCδ als erstes Mitglied der Familie entstand und die PLCβ und PLCγ erst später nach der Auftrennung von Pilzen oder Pflanzen und Tieren entstanden (Rebecchi und Pentyala 2000).

Am Aminoterminus aller PLC-Enzyme (mit Ausnahme der PLCζ) findet man eine PH-Domäne, die etwa 100 Aminosäurereste umfasst und auch in vielen anderen Proteinen identifiziert werden konnte. Sie dient der Bindung von Inositphosphaten und somit der Membranverankerung der PLC-Enzyme. Jedoch ist diese Domäne innerhalb der

verschiedenen Klassen nicht sehr hoch konserviert und so vermutlich für die Typ-spezifische Regulation der PLC-Enzyme verantwortlich (Rebecchi und Pentyala 2000, Harden und Sondek 2006). Die PH-Domäne der PLCβ bindet z.B. mit eher geringer Spezifität an das Inositphosphat Phosphatidylinosit-3-Phosphat (PIP), dafür aber an die βγ-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine, durch die sie auch reguliert wird. Die PLCγ bindet mithilfe ihrer PH-Domäne mit hoher Spezifität an Phosphatidylinosit-3,4,5-trisphosphat (PIP_3), wohingegen die PH-Domäne der PLCδ PIP_2 und IP_3 als Bindungspartner bevorzugt (Rebecchi und Pentyala 2000, Rhee 2001, Harden und Sondek 2006). Außerdem können die PH-Domänen der PLCβ_2 eine Bindung an Rac- und Cdc42-GTPasen vermitteln. Hierbei handelt es sich um eine Isotyp-spezifische Aktivierung., so interagiert z.B. die PH-Domäne der PLCβ_2 mit der *switch-I*- und der *switch-II*-Domäne von Rac1 (Jezyk *et al.* 2006). Nach der PH-Domäne folgt bei allen PLC-Isoenzymen die *EF-hand*-Domäne, die aus je 4 *EF-hand* Motiven besteht, eine Ausnahme bildet hierbei die PLCε, die nur zwei *EF-hand*-Motive aufweist. Ihre Funktion ist noch unklar, jedoch scheint sie für die Bindung von Ca^{2+}-Ionen verantwortlich zu sein (Kouchi *et al.* 2005). Allen PLC-Enzymen gemeinsam ist die nun folgende XY-Domäne, die die katalytische Funktion des Enzyms ausübt und abwechselnd aus α-Helices und β-Faltblättern besteht (Rebecchi und Pentyala 2000). Für die PLCδ konnten in der XY-Domäne 4 Aminosäurereste nachgewiesen werden, die Ca^{2+}-Ionen binden. Diese Regionen sind auch in der PLCβ und der PLCγ konserviert. Ca^{2+}-Ionen stellen einen essentiellen Kofaktor für die katalytische Funktion von PLC-Isoenzyme dar, zudem dienen sie zur Substraterkennung. Dabei bindet ein Ca^{2+}-Ion an konservierte Aminosäurereste der katalytischen Domäne (Rhee 2001). Die PLCγ weist noch eine Besonderheit auf: Ihre XY-Domäne ist durch eine lange Region getrennt, die eine zweite PH-Domäne enthält. Diese PH-Domäne ist wiederum durch zwei SH2-Domänen und eine SH3-Domäne unterbrochen (Rhee 2001). SH2-Domänen binden an phosphorylierte Tyrosinreste, während SH3-Domänen Interaktionen mit Prolin-reichen Sequenzen vermitteln (Rhee und Bae 1997). Die PLCγ_1 kann über die carboxylterminale Hälfte der zweigeteilten PH-Domäne an die aminoterminale Hälfte einer PH-ähnlichen Domäne des Ca^{2+}-Ionenkanals TRPC3 *(transient receptor potential channel* 3) binden. Durch diese Interaktion entsteht eine intermolekulare PH-Domäne, die an PIP_2 bindet, sodass die PLCγ_1 die Lokalisation von TRPC3 in Zellen beeinflusst und somit den Ca^{2+}-Einstrom regulieren kann (van Rossum *et al.* 2005). TFII-I (*transcription factor II-I),* ein Inhibitor des Agonist-induzierten Ca^{2+}-

Einstroms, nutzt denselben Mechanismus, um mit der PLCγ zu interagieren (Caraveo *et al.* 2006). Mittels Kristallstruktur-Analysen konnte jüngst gezeigt werden, dass die PLCγ_2 über die spPH-Domäne direkt an Rac2 binden kann, wodurch es zur Aktivierung der PLC kommt (Bunney *et al.* 2009). Rac2 interagiert hierbei mit der carboxylterminalen Hälfte der spPH-Domäne der PLCγ_2 (Walliser *et al.* 2008). Am carboxylterminalen Ende der PLC-Isoenzyme liegt die C2-Domäne. Bei der PLCδ dient diese der Ca^{2+}-Ionen-Bindung. Für die PLCβ konnte für diese Domäne eine Interaktion mit α-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine nachgewiesen werden (Rhee 2001). Zudem vermittelt die C2-Domäne die Ca^{2+}-abhängige Translokation der PLCγ_2 an die Plasmamembran, wodurch eine Amplifizierung des Ca^{2+}-Signals möglich wird (Nishida *et al.* 2003) Die PLCβ weist carboxyterminal der C2-Domäne noch eine *ca.* 400 Aminosäuren umfassende Sequenz auf, die der Bindung an Membranen, der Lokalisation im Zellkern und der Aktivierung durch Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine dient (Rebecchi und Pentyala 2000). Die PLCη enthält carboxylterminal noch eine lange, Serin- und Prolin-reiche Sequenz (Hwang *et al.* 2005, Nakahara *et al.* 2005), wohingegen die PLCε hier die *Ras-associating*-Domänen RA1 und RA2 aufweist (Katan 2005). Zudem findet man bei dieser Klasse der PLC-Enzyme aminoterminal eine Ras-GEF-ähnliche CDC25-Domäne (Katan 2005).

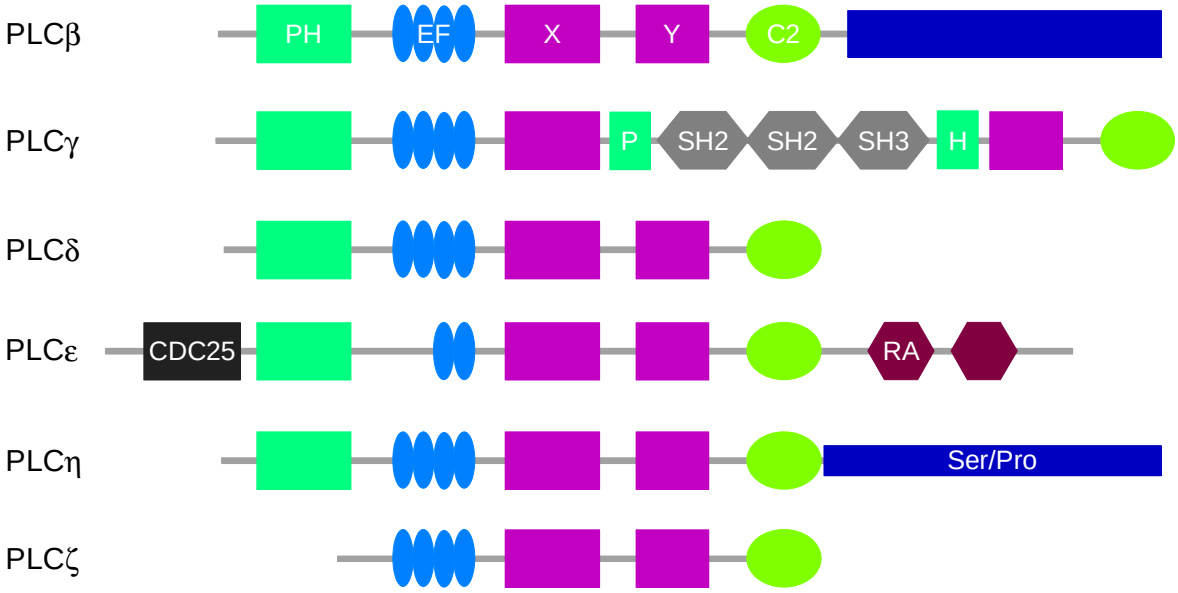


Abb. 2: Schematische Darstellung der einzelnen Domänen der verschiedenen Phospholipase C (PLC)-Isoenzyme. Dargestellt ist die Abfolge der verschiedenen Domänen der PLC-Enzyme (*PH*: Pleckstrinhomologie-Domäne; *EF*: *EF-hand*-Domäne; *X*: katalytische X-Domäne; *Y*: katalytische Y-Domäne; *SH2*: Src-Homologie-Domäne 2; *SH3*: Src-Homologie-Domäne 3; *C2*: C2-Domäne; *CDC25*: *CDC25*-Homologie-Domäne, *RA*: *rat sarcoma (Ras) associating*-Domäne; *Ser/Pro*: Serin-/Prolin-reiche Domäne) (nach Katan 2005).

1.4.2 Aktivierungs- und Regulationsmechanismen der PLCβ-Isoenzyme

PLCβ-Isoenzyme können sowohl durch $G\alpha_q$- als auch durch Gβγ-Untereinheiten der G_i-Familie stimuliert werden (Rebecchi und Pentyala 2000). Rezeptoren für Thromboxan A2-, Bradykinin-, Bombesin-, Angiotensin II-, Histamin-, Vasopressin- und Acetycholin (M1 und M3) aktivieren den $G\alpha_q$-Weg (Noh *et al.* 1995, Rhee und Bae 1997). Hierbei können alle Isoenzyme der PLCβ-Subfamilie durch $G\alpha_q$ stimuliert werden (Lee *et al.* 1994), wenn auch mit unterschiedlicher Sensitivität (Smrcka und Sternweis 1993). Für die Interaktion zwischen $G\alpha_q$ und der $PLC\beta_1$ wird die carboxylterminale Region der $PLC\beta_1$ benötigt, die die C2-Domäne sowie eine Region, die nur die PLCβ-Subfamilie besitzt, enthält (Park *et al.* 1993). Im Gegensatz zur Aktivierung durch $G\alpha_q$ lassen sich nur die $PLC\beta_{1\text{-}3}$ durch Gβγ-Dimere stimulieren, für die $PLC\beta_4$ konnte keine Stimulation nachgewiesen werden (Lee *et al.* 1994). Rezeptoren, die den Gβγ-Weg aktivieren, sind z.B. der muskarinische Cholinozeptor (M2) oder der Rezeptor für chemotaktische Liganden wie FMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin), IL-8 (Interleukin-8) oder C5a (Rhee und Bae 1997).

Auch die Stimulation von Chemokinrezeptoren führt zu einer Aktivierung der PLCβ (Kuang *et al*. 1996a). Im Zuge der Aktivierung der PLCβ$_2$ bindet das Gβγ-Dimer an die katalytische Y-Domäne der PLCβ$_2$ (Kuang *et al*. 1996b, Sankaran *et al*. 1998). Zudem konnte gezeigt werden, dass das Gβγ-Dimer auch an die PH-Domäne der PLCβ$_2$ bindet. Somit spielt die PH-Domäne der PLCβ$_2$ ebenfalls eine Rolle bei der Gβγ-vermittelten Aktivierung der PLCβ$_2$ (Wang *et al*. 1999b). Weiterhin konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass PLCβ-Isoenzyme Effektoren von Rho-GTPasen darstellen. So vermögen z.B. Cdc42, Rac1, Rac2 und Rac3 die PLCβ$_2$ zu stimulieren (Illenberger *et al.* 1998, Illenberger *et al.* 2003, Piechulek *et al.* 2005). Die PLCβ$_2$ zeigt hier ebenfalls eine unterschiedliche Sensitivität und verschiedene Aktivierungspotentiale: So können Rac1 und Rac2 die PLCβ$_2$ besser stimulieren als Cdc42 (Illenberger *et al.* 2003). Rac1 interagiert ausschließlich mit seiner *switch-I*- und *switch-II*-Region mit der PH-Domäne der PLCβ$_2$. Durch diese Interaktion kommt es zu einer Translokation der PLCβ$_2$ an Membranen, wo sich das Substrat des Enzyms befindet. Die Aminosäuren, die für diese Interaktion von entscheidender Rolle sind, konnten in Kristallstrukturanalysen identifiziert werden: So sind auf Seiten von Rac1 die Aminosäuren Val36 und Phe37 der *switch-I*-Region sowie die Aminosäuren Trp56 und Tyr64 der *switch-II*-Region, auf Seiten der PLCβ$_2$ die Aminosäuren Arg22, Gln52 und Tyr118 an der Interaktion zwischen Rac1 und PLCβ$_2$ beteiligt. Zudem konnte gezeigt werden, dass elektrostatische Kräfte die Spezifität von GTPasen für die PLCβ$_2$ bestimmen (Jezyk *et al.* 2006).

1.4.3 Funktionen der PLCβ$_2$-Enzyme

Die PLCβ$_2$ wie auch die PLCβ$_3$ werden unter anderem in neutrophilen Granulozyten exprimiert. Versuche mit gendefizienten Mäusen trugen zur Identifizierung ihrer Funktionen bei. So scheint im Wesentlichen die PLCβ$_2$ für die FMLP-induzierte IP_3-Bildung als auch für die FMLP-induzierte Freisetzung von Ca^{2+} verantwortlich zu sein (Li *et al*. 2000). Außerdem ist die PLCβ$_2$ zusammen mit Rac2 für die Aktivität der NADPH-Oxidase in diesen Zellen notwendig. Zudem sind sowohl die PLCβ$_2$ als auch die PLCβ$_3$ für die FMLP-induzierte Aktivierung der JNK und der MAP-Kinase wichtig (Li *et al.* 2000). Die PLCβ$_2$ wird auch in Thrombozyten exprimiert und ist hier für deren Funktion bedeutend. So führt eine verminderte Expression zu einer gestörten Aggregation und Sekretion der Blutplättchen (Lee *et al*. 1996, Mao *et al*. 2002). Des Weiteren wird die

PLCβ_2 in Geschmackssinneszellen selektiv exprimiert und befähigt diese Zellen, auf süße und bittere Substanzen sowie auf die Aminosäure Glutamat reagieren zu können (Zhang *et al*. 2003).

1.4.4 Aktivierungs- und Regulationsmechanismen der PLCγ-Isoenzyme

Für die PLC-Isoenzyme sind viele verschiedene Aktivierungswege bekannt. Sie lassen sich in diejenigen Wege einteilen, die die Phosphorylierung des Enzyms zur Signaltransduktion nutzen, und solche, die durch GPCRs aktiviert werden.

Die PLCγ_1 wird vor allen Dingen durch RPTKs aktiviert. Dieser Mechanismus wird z.B. von Wachstumsfaktoren wie PDGF, EGF, FGF (*fibroblast growth factor*), NGF, dem *vascular endothelial growth factor* oder auch dem *hepatocyte growth factor* genutzt (Rhee 2001). Die Rezeptoren dieser Polypeptide besitzen als RPTKs eine intrinsische Kinaseaktivität. Es bindet z.B. die carboxylterminale SH2-Domäne der PLCγ_1 an den aktivierten PDGF-Rezeptor. Hierbei ist sowohl die Bindung als auch die folgende Phosphorylierung für eine Aktivierung des PLC-Enzyms nötig, zudem ist es durch Bindung an den Rezeptor in die Nähe seines Substrates PIP_2 gelangt. PDGF sorgt außerdem für die Bildung von PIP_3, welches wiederum eine Rolle bei der Translokation der PLCγ_1 an die Plasmamembran spielt und sie so ebenfalls dem Substrat PIP_2 näher bringt (Rhee 2001).

Auch Antigen-Rezeptoren und Immunglobulin-Rezeptoren sind in der Lage, PLCγ-Enzyme zu aktivieren. So können der BCR, der TCR, der IgE-Rezeptor (FcεRI) und auch IgG-Rezeptoren (FcγRs) die PLCγ_1 und die PLCγ_2 über Phosphorylierung durch NRPTKs aktivieren. Es kommt hierbei nach Bindung eines Antigens oder eines Immunglobulins an einen der oben genannten Rezeptoren zur Aktivierung von Mitgliedern der Src-, Syk- und Tec-Familien, welche Tyrosinreste des ITAM-Motivs (*immune receptor tyrosine-based activation motif*) im intrazellulär gelegenen Teil des Rezeptors phosphorylieren und dadurch eine Bindungsstelle für SH2-Domänen-enthaltende Proteine schaffen (Rebecchi und Pentyala 2000). Die PLCγ_2 wird vor allem in hämatopoetischen Zellen exprimiert und wird unter anderem durch den BCR aktiviert. Bindet ein Antigen an diesen Rezeptor, so kommt es zur Aktivierung der NRPTK Lyn, die zur Src-Familie gehört. Lyn

phosphoryliert nun Tyrosinreste in der ITAM-Sequenz des BCR, was zur Rekrutierung und Phosphorylierung von Syk führt. Dadurch kommt es zur Rekrutierung und Phosphorylierung des Adapterproteins BLNK an die Membran (Fu *et al.*1998), welches wiederum für die Translokation der PLCγ_2 an die Membran wichtig ist (Isihai *et al.* 1999a und b). Zudem aktiviert der BCR die PI3K, sodass PIP_3 gebildet wird, welches nun mit der PH-Domäne von Btk, einem Mitglied der Tec-Familie, interagiert und es somit an die Membran transloziert und aktiviert. Aktiviertes Btk führt nun durch Phosphorylierung der PLCγ_2 an spezifischen Tyrosinresten zur Aktivierung der PLCγ_2 (Kurosaki *et al.* 2000, Rhee 2001).

Ein anderer Mechanismus, von dem bekannt ist, dass er für die Aktivierung der PLCβ-Enzyme die Hauptrolle spielt, konnte auch für die PLCγ-Enzyme nachgewiesen werden: Die Aktivierung durch GPCRs. So vermögen Acetylcholin-, Angiotensin II-, Thrombin- oder auch ATP-Rezeptoren die Enzyme dieser Familie durch die sogenannte *trans*-Aktivierung zu beeinflussen. Hierbei interagieren GPCRs mit NRTKs (Rhee 2001). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die PLCγ_2 im Gegensatz zur PLCγ_1 im zellfreien System und in intakten Zellen spezifisch durch Rac-GTPasen (Rac1, Rac2 und Rac3), jedoch nicht durch Cdc42 und RhoA aktiviert wird. Diese Aktivierung ist von einer Phosphorylierung des Enzyms unabhängig (Piechulek *et al.* 2005, Walliser *et al.* 2008). Durch die Interaktion zwischen Rac2 und der PLCγ_2 kommt es zu einer Translokation der PLCγ_2 an zelluläre Membranen, dem Ort also, an dem sich das Substrat des Enzyms befindet. In unserer Arbeitsgruppe wurden die Interaktionsstellen zwischen Rac2 und der PLCγ_2 untersucht. Es zeigte sich, dass die aminoterminale PH-Domäne der PLCγ_2 bei der Aktivierung durch Rac2 keine Rolle spielt. Die Interaktion wird vielmehr von der zweigeteilten PH-Domäne der PLCγ_2 vermittelt. Rac2 interagiert hierbei mit der carboxylterminalen Hälfte der zweigeteilten PH-Domäne der PLCγ_2 (Walliser *et al.* 2008). Außerdem konnte z.B. nachgewiesen werden, dass die PLCγ_1 durch phosphatidische Säure aktiviert werden kann (Rhee 2001).

1.4.5 Funktionen der PLCγ-Enzyme

Für die PLCγ_1, die ubiquitär exprimiert wird, konnten vor allem Aufgaben in Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen von Zellen nachgewiesen werden. So ist die PLCγ_1 für eine Kontrolle des Zellzyklus und der Zellproliferation wichtig, indem sie

z.B. durch eine Steigerung der DNA-Synthese zu einem Eintritt in den Zellzyklus führt (Smith *et al.* 1989). Bei PLCγ_1-defizienten Maus-Embryonen kommt es zu einem intrauterinen Absterben. Fibroblasten solch defizienter Mäuse weisen eine gestörte Ca^{2+}-Ionen-Freisetzung nach Stimulation mit EGF auf (Ji *et al.* 1997). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die PLCγ_1 eine Rolle bei der Entwicklung der Niere und der Hämatopoese (Shirane *et al.* 2001), bei der Regulation des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalweges (Rong *et al.* 2003) und bei der Differenzierung neuronaler Zellen (Nguyen und Ahn 2007) spielt. In Brustkrebszellen und Polypen von Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis konnten zudem stark erhöhte Werte der PLCγ_1 nachgewiesen werden, was auf einen Zusammenhang zwischen PLCγ_1-Expression und der Entwicklung von malignen Zellen hindeutet (Rebecchi und Pentyala 2000).

Die PLCγ_2 wird im Gegensatz zur PLCγ_1 hauptsächlich in Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert. Auch führt der Mangel an PLCγ_2 im defizienten Mausmodell nicht zum intrauterinen Absterben des Embryos, sondern lediglich zu einem geringeren Gewicht und zu subkutanen Blutungen (Wang *et al.* 2000). Auffällig ist, dass in diesen PLCγ_2-defizienten Mäusen die Zahl an reifen B-Zellen im Knochenmark und in der Peripherie vermindert, der IgM-Spiegel im Serum erniedrigt und die Immunantwort auf T-Zell-unabhängige Antigene kompromittiert ist (Wang *et al.* 2000). Zudem sind die B-Zellen dieser Mäuse nach Stimulation des B-Zell-Rezeptors nicht mehr in der Lage, Ca^{2+}-Ionen aus intrazellulären Speichern freizusetzen (Wang *et al.* 2000). Ihre Mastzellen zeigen nach Stimulation des IgE-Rezeptors eine verminderte Freisetzung von Ca^{2+}-Ionen, eine verminderte Bildung von IP_3 und eine geringere Sekretion von Histamin, Serotonin und Arachidonsäure (Wang *et al.* 2000, Wen *et al.* 2002).

1.5 Ziele der Arbeit

Bereits seit längerem ist bekannt, dass die kleine GTPase Rac2 dazu fähig ist, die PLCγ_2 zu aktivieren. Betrachtet man die vielfältigen zellulären Funktionen dieser beiden Proteine und vor allem auch die Rolle, die sie im Immunsystem oder aber in Tumorzellen spielen, so erkennt man den Stellenwert ihrer Interaktion. Da über die genauen molekularen Bindungsstellen der beiden Enzyme bisher nichts bekannt war, war die Zielsetzung dieser

Arbeit, in Rac2 Aminosäurereste zu identifizieren, die für eine Interaktion mit der PLCγ_2 essentiell sind. Ein weiterer bekannter Effektor von Rac2 ist die PLCβ_2. Während Rac2 mit der C-terminalen Hälfte der zweigeteilten PH-Domäne der PLCγ_2 interagiert, ist für die Interaktion mit der PLCβ_2 deren N-terminale PH-Domäne entscheidend. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war deshalb zu klären, wo Unterschiede beziehungsweise Gemeinsamkeiten zwischen der Interaktion Rac2/PLCγ_2 und Rac2/PLCβ_2 bestehen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und biochemische Reagenzien

Acrylamid 4K-Lösung (Mix 37,5:1)	AppliChem, Darmstadt
Agar Agar, Serva *high gel-strength*	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumformiat	Fluka, Neu-Ulm
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin (Trasylol®)	Bayer, Leverkusen
Bactotrypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Benzamidin	Sigma, Deisenhofen
Boviner IgG Proteinstandard	BioRad, München
Bovines Serumalbumin, Fraktion V	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
DMEM-Medium	Gibco, Karlsruhe
dNTP-Mix (100 mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
ECL™ Western Blotting Detektionsreagenz	GE Healthcare, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Dinatriumsalz	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(β-aminoethyl)-N,N,N´N´-tetraessigsäure (EGTA), freie Säure	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma, Deisenhofen
Fungizone®	Gibco, Karlsruhe
GENAPOL C100®	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Genetic Analysis Buffer	Abi, Darmstadt
Gentamicin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
D(+)-Glucose	Merck, Darmstadt

L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Guanosin-5´-diphosphat (GDP)	Roche Diagnostics, Mannheim
Guanosin-5´-triphosphat (GTP)	Fluka, Neu-Ulm
Guanosin-5´-*O*-(3-thiotriphosphat) (GTPγS)	Roche Diagnostics, Mannheim
Hefeextrakt	Serva Electrophoresis, Heidelberg
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Deisenhofen
HMW-Marker	Sigma, Deisenhofen
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Kristallviolett	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Serva, Heidelberg
Lipofectamine™ 2000, Transfektionsreagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Marker III (Lambda DNA/*Eco*RI + *Hin*d III Marker)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Magermilchpulver (für Mikrobiologie)	Fluka, Neu-Ulm
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver (*blotting grade*)	Roth, Karlsruhe
Natriumcholat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdesoxycholat (DOC)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumformiat	Fluka, Neu-Ulm
Natriumtetraborat (Decahydrat)	Sigma, Deisenhofen
N-Z-Amin (Casein-Hydrolysat, Trypton)	Sigma, Deisenhofen
OptiMEM I-Medium	Gibco, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Pepstatin A	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Phosphatidylethanolamin (PE)	Sigma, Deisenhofen
Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PIP_2)	Sigma, Deisenhofen
Pluronic F-68®	Gibco, Karlsruhe
RTU 60 Entwickler/Fixierer	Adefo, Dietzenbach
Szintillationsflüssigkeit Ultima Gold®	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim

Szintillationsflüssigkeit Quicksafe A®	Zinsser Analytic, Frankfurt
SOC-Medium	Invitrogen, Heidelberg
Template Suppression Reagent	Abi, Darmstadt
N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Thimerosal	Sigma, Deisenhofen
Tinte	Pelikan, Hannover
TNM-FH-Medium	PAN, Aidenbach
TNM-FH-Insect-Medium	Sigma, Deisenhofen
Triethanolamin (TEA)	Sigma, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsininhibitor aus Sojabohnen (STI)	Fluka, Neu-Ulm
Tween® 20	Sigma, Deisenhofen

Alle verwendeten und hier nicht aufgeführten Chemikalien, biochemischen Reagenzien und Lösungsmittel wurden in *p.a.*-Qualität von Merck (Darmstadt), Riedel-de Haen (Seelze), AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen) oder J. T. Baker (Deventer, Holland) bezogen.

2.1.2 Radioaktiv-markierte Chemikalien

D-*myo*-[2-^{3}H(N)]-Inosit	Amersham Biosciences, Freiburg
[^{3}H]Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
[^{35}S]GTPγS (46,2 TBq/mmol)	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim

2.1.3 Enzyme, Kits und molekularbiologische Materialien

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Baculo Gold™ Baculovirus DNA	Pharmingen, Hamburg
Big Dye™ Terminator Ready Reaction Mix	PE Biosystems, Wertigheim
DNA-Marker III	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
HMW-Marker	Sigma, Deisenhofen
Nucleobond®-PC 100 Kit	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin®-Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren

QIAquick®-Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
PfuUltra-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Restriktionsenzyme	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt

2.1.4 Verbrauchsmaterial

AGFA Cronex 5, Medical X-Ray Film	AGFA, Mortsel, Belgien
Einfriergefäße CryoPure Tube, 1,8 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Gel-Blotting-Papier	Whatman, Dassel
Kanülen 0,45 x 25 mm (26 *gauge*)	Braun, Melsungen
Nitrocelluloserundfilter (∅ 32 mm)	Advanced Microdevices, Ambala, Indien
Protran® Nitrocellulosemembran (0,45 µm)	Whatman, Dassel
Reagiergefäße (1,5 ml, 39 x 10,8 mm ∅, farblos)	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpell	Aescula, Tuttlingen
Spritzen (1 ml, 10ml, 20 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzenfilter Millex®-GS (0,22 µm)	Millipore Corporation Bedford, USA
Spritzenfilter Millex-HA (0,45 µm)	Millipore Corporation Bedford, USA
Szintillationsröhrchen (6 ml)	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
Szintillationsröhrchen (20 ml)	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
Wheaton-Kultur-Röhrchen	neoLab, Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Zellkulturflaschen (25 cm^2, 75 cm^2, 150 cm^2)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen (Ø 60 mm, Ø 100 mm)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhren (mit konischem Boden, 15 ml und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber (25 cm mit einer Klingenbreite von 15 mm)	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.5 Pro- und eukaryotische Zellstämme

Escherichia coli DH5α	Clontech / ITC Biotechnology, Heidelberg

COS-7 (*African green monkey kidney cells-7*; ATCC: CLR-1651)	American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA. Freundlicherweise von der Abteilung Virologie, Universität Ulm zur Verfügung gestellt.
Spodoptera frugiperdia (*Sf*9) Zellen	Invitrogen, Heidelberg

2.1.6 Oligonukleotide für die Sequenzierung von Plasmidvektoren

Sequenzierung von pVL1393

pVL- sense	5´-CTG TTT TCG TAA CAG T-3´
pVL- antisense	5´-TGA GTT TTT GGT TCT TGC CG-3´

Sequenzierung von pcDNA3.1(+)

T7-Promotor (5´- *primer*)	5´- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA -3´
BGH Reverse *primer* (3´- *primer*)	5´- TAG AAG GCA CAG TCG AGG - 3´

2.1.7 Oligonukleotide für *in vitro* DNA-Mutagenese

Rac2^{D38A} und Rac2^{N43A} in pVL1393, Matrize: pcDNA3.1(+)-Rac2

primer: Rac2D38A_1/Rac2D38A_2 bzw. Rac2N43A_1/Rac2N43A_2

Rac2^{W56A} und Rac2^{L67A} in pVL1393 bzw. pcDNA3.1(+), Matrize: pcDNA3.1(+)-Rac2

primer: Rac2W56A_1/Rac2W56A_2 bzw. Rac2L67A_1/Rac2L67A_2

Rac2$^{G12V/W56A}$ und Rac2$^{G12V/L67A}$ in pcDNA3.1(+), Matrize: pcDNA3.1(+)-Rac2^{G12V}

primer: Rac2W56A_1/Rac2W56A_2 bzw. Rac2L67A_1/Rac2L67A_2

HA-Rac2^{W56F} und HA-Rac2$^{G12V/W56F}$ in pcDNA3.1(+), Matrize: pcDNA3.1(+)-HA-Rac2 bzw. pcDNA3.1(+)-HA-Rac2^{G12V}

primer: Rac2W56F_1 und Rac2W56F_2

HA-Cdc42^{F56W} und HA-Cdc42$^{G12V/F56W}$ in pcDNA3.1(+), Matrize: pcDNA3.1(+)-HA-Cdc42 bzw. pcDNA3.1(+)-HA-Cdc42^{G12V}

primer: Cdc42F56W_1 und Cdc42F56W_2

Rac1^{W56A} und Rac1$^{G12V/W56A}$ in pcDNA3.1(+), Matrize: pcDNA3.1(+)-Rac1 bzw. pcDNA3.1(+)-Rac1^{G12V}

primer: Rac1W56A_*sense* bzw. Rac1W56A_*antisense*

Sequenzen der *primer*:

Rac2D38A_1

5´-CCCCACCGTGTTTGCCAACTATTCAGCC-3´

Rac2D38A_2

5´-GGCTGAATAGTTGGCAAACACGGTGGGG-3´

Rac2N43A_1

5´-GACAACTATTCAGCCGCTGTGATGGTGGACAGC-3´

Rac2N43A_2

5´-GCTGTCCACCATCACAGCGGCTGAATAGTTGTC-3´

Rac2W56A_1

5´-GTGAACCTGGGGCTGGCGGACACTGCTGGGCAG-3´

Rac2W56A_2

5´- CTGCCCAGCAGTGTCCGCCAGCCCCAGGTTCAC-3´

Rac2L67A_1

5´-GGAGGACTACGACCGTGCCCGGCCGCTCTCCTATC-3´

Rac2L67A_2

5´-GATAGGAGAGCGGCCGGGCACGGTCGTAGTCCTCC-3´

Rac2W56F_1

5´-GTGAACCTGGGGCTGTTCGACACTGCTGGGCAG-3´

Rac2W56F_2

5´-CTGCCCAGCAGTGTCGAACAGCCCCAGGTTCAC-3´

Cdc42F56W_1

5´-CATATACTCTTGGACTTTGGGATACTGCAGGGCAAGAG-3´

Cdc42F56W_2

5´-CTCTTGCCCTGCAGTATCCCAAAGTCCAAGAGTATATG-3´

Rac1W56A_*sense*

5´-GGTGAATCTGGGCTTAGCGGATACAGCTGGACAAG-3´

Rac1W56A_*antisense*

5´-CTTGTCCAGCTGTATCCGCTAAGCCCAGATTCACC-3´

2.1.8 Plasmide

pcDNA3.1(+)-HA	M. Meister, Ulm
pcDNA3.1(+)	Invitrogen, Karlsruhe
pVL1393	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.9 Vorhandene Plasmid-DNA-Konstrukte

Folgende DNA-Konstrukte waren in der Arbeitsgruppe vorhanden und wurden in dieser Arbeit verwendet:

pcDNA3.1(+)-hPLCγ_2	T. Piechulek, Ulm
pcDNA3.1(-)-hPLCβ_2	B. Möpps, Ulm
pcDNA3.1(+)-Rac2	C. Walliser, Ulm
pcDNA3.1(+)-Rac2^{G12V}	C. Walliser, Ulm
pcDNA3.1(+)-HA-hRac2	C. Walliser, Ulm
pcDNA3.1(+)-HA-hRac2^{G12V}	C. Walliser, Ulm
pcDNA3.1(+)-HA-Cdc42	C. Walliser, Ulm
pcDNA3.1(+)-HA-Cdc42^{G12V}	C. Walliser, Ulm

2.1.10 Rekombinante Baculoviren

Folgende rekombinante Baculoviren waren in der Arbeitsgruppe vorhanden und wurden in dieser Arbeit verwendet:

Rac2	(Mensch)	Ilona Stephan
Rac2^{F37A}	(Mensch)	Sylvia Kerndl
Rac2^{Y40C}	(Mensch)	Sylvia Kerndl
Rac2^{V36A}	(Mensch)	Nikola Adam
Rac2^{R66A}	(Mensch)	Nikola Adam
Rac2$^{V36A/R66A}$	(Mensch)	Nikola Adam
β-Galaktosidase	(*E. coli*)	M. Ruffing, Frankfurt

2.1.11 Rekombinante Proteine

Die lösliche Fraktion Baculovirus-infizierter Insektenzellen, die die PLC$\beta_2\Delta$ (Mensch) exprimierten, war in der Arbeitsgruppe vorhanden und wurde für diese Arbeit verwendet. Die PLC$\beta_2\Delta$ ist eine Deletionsmutante der PLCβ_2 mit einem Austausch von Serin zu Alanin an Position 2 und ohne die C-terminale Region, die für die Aktivierung durch α_q-Untereinheiten (F118-E1166) von G-Proteinen, nicht aber für die Regulation durch Rho-GTPasen notwendig ist (Illenberger *et al*., 1998). Zudem wurden gereinigte Proteine verwendet. Diese wurden von Petra Vatter aus der löslichen Fraktion Baculovirus-infizierter Insektenzellen, die die PLCγ_2 bzw. die PLC$\beta_2\Delta$ exprimierten, gewonnen und waren ebenfalls schon in der Arbeitsgruppe vorhanden.

2.1.12 Klonierung von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung der entsprechenden Baculoviren wurden die jeweiligen cDNAs, die für Rac2 und die Mutanten von Rac2 kodieren, aus den oben genannten Ursprungsvektoren mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI ausgeschnitten und in linearisiertes pVL1393-Plasmid ligiert. Für die Expression von Proteinen in Säugetierzellen wurden die cDNAs, welche für Rac2, Rac1 und Cdc42 bzw. für deren Mutanten kodieren, in mit BamHI und EcoRI linearisierte Vektoren pcDNA3.1(+) und pcDNA3.1(+)-HA ligiert. Die Orientierung der *inserts* im Zielvektor und ihre richtige Nukleotidabfolge wurden durch vollständige Sequenzierung überprüft.

2.1.13 Antikörper

2.1.13.1 Primäre Antikörper

Anti-HA (monoklonales Maus-IgG aus der Hybridomazelllinie 12CA5)	AG Giehl, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm
Anti-PLCβ_2 (404) (polyklonaler Antikörper vom Kaninchen)	Peter J. Parker, London, UK
Anti-PLCγ_2 (# sc-407, Q 20, polyklonales Kaninchen-IgG)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Rac2 (# sc-96, C-11, polyklonales Kaninchen-IgG)	Santa Cruz, Heidelberg

2.1.13.2 Sekundäre, Peroxidase-gekoppelte Antikörper

Anti-Kaninchen-IgG	Sigma, Deisenhofen
Anti-Maus-IgG	Sigma, Deisenhofen

2.1.13.3 Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die molekularen Massen verschiedener Proteine bestimmen zu können, wurde eine Markerproteinlösung verwendet, die aus 10 µl Marker für hohe Molekulargewichte (*high molecular weight*, Sigma, Deisenhofen) mit einer Konzentration von 1,5 µg/µl und 5 µl Trypsininhibitor (1 µg/µl) aus Sojabohnen (Fluka, Neu-Ulm) bestand. Die Molekulargewichte der einzelnen Proteine sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Proteine, die im *high-molecular-weight*-Marker enthalten sind.

Protein	Molekulare Masse (kDa)
Myosin, Kaninchenmuskel	205
β-Galaktosidase, *Escherichia coli*	116
Phosphorylase b, Kaninchenmuskel	97,4
Rinderserumalbumin	66
Ovalbumin, Hühnerei	45
Carboanhydrase, Rindererythrozyten	29
Trypsininhibitor, Sojabohne	20,1

2.1.14 Geräte

ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer	Perkin-Elmer, Weiterstadt
Brutschrank Kelvitron®T	Heraeus Instruments, Fellbach
Certomat HK (Temperaturregeleinheit)	Braun, Melsungen
Certomat R (Schüttlereinheit)	Braun, Melsungen
Flüssigszintillationszähler LSC 2200 CA	Canberra Packard, Dreieich
Gelelektrophoresekammer (DNA)	MBT, Giessen
Gelelektrophoresekammer (SDS-PAGE)	Hoefer-Amersham Pharmacia, Freiburg
Hamilton Microliter-Spritze, 100 µl	Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Schweiz
Heizrührer MR 3001	Heidolph, Kehlheim
Immunoblot-Transferkammer	Renner GmbH, Darmstadt
Inkubator CB 210	Binder, Tuttlingen
J2-HS Zentrifuge	Beckman Instruments, München

Kleinschüttler Reax 2000	Heidolph, Kehlheim
Kleinschüttler Reax control	Heidolph, Kehlheim
Magnetrührer IkaCombimag RET	Janke & Kunkel, Staufen
Megafuge 1.0	Heraeus Christ, Osterode
Mikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg
Milli-Q^{UF}PLUS	Millipore, Eschborn
Minifuge GL	Heraeus Christ, Osterode
Minifuge T	Heraeus Sepatech, Osterode
Netzgerät EPS 600 (SDS-PAGE)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Netzgerät EPS 301 (DNA)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Optima™ TLX Ultrazentrifuge	Beckman Instruments, München
pH-Meter 765 calimatic	Knick Meßgeräte, Berlin
Photometer Gene Quant *pro*	Amersham Biosciences, Freiburg
PTC 200 Peltier Thermal Cycler (PCR)	MJ Research, Oldendorf
Rundschüttler Unimax 2010	Heidolph, Kehlheim
Schüttler Titramax 100	Heidolph, Kehlheim
SHARP JX-330 Scanner	Sharp Electronics GmbH, Hamburg
Sicherheitswerkbank HERA Safe	Heraeus Instruments, Fellbach
Sicherheitswerkbank Uniflow UVUB 1200	Uni Equip, Martinsried
Speedvac (Concentrator 5301)	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator IL 200M	Bachofer, Reutlingen
Ultraschallbad Sonorex Super 10P	Bandelin, Berlin
Videodokumentationsystem CF8/1 DX	Kappa Meßtechnik GmbH, Gleichen

2.1.15 Elektronische Datenverarbeitungsprogramme

Chromas	Version 2.22, Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Australien
EqCalWin™ 1.1.2	BIOSOFT, Ferguson, MO, USA
GraphPad Prism™, Version 3.03	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Micrografx Designer® 9	Micrografx Inc., München
Micrografx Picture Publisher® 9	Micrografx Inc., München

Microsoft Word™ 2002	Microsoft Corp., Washington, USA
OMIGA™ 2.0	Oxford Molecular Ltd.,Oxford, Großbritannien
PGProt	Prof. Dr. P. Gierschik, Abt. Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm
SHARP™-Scanner Scan JX/WIN V4.0	Krystek EDV, Hamburg

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung von Luria-Bertani (LB)- Medium

Die zur Gewinnung von DNA verwendeten *E. coli*-Stämme wurden als Suspensionskultur in Luria-Bertani (LB)-Medium oder auf entsprechenden LB-Agar-Platten kultiviert. Nach dem Ansetzen der Lösung wurde diese autoklaviert. Zur Herstellung von Platten wurde dem Flüssigmedium vor dem Autoklavieren der Agar zugegeben, danach wurde die Lösung auf Handwärme abgekühlt, mit dem gewünschten Antibiotikum versetzt und in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren wurden diese bei 4 °C gelagert.

LB-Medium:	1,0 % (m/V)	Bactotrypton
	0,5 % (m/V)	Hefeextrakt
	1,0 % (m/V)	NaCl
	in ddH_2O	
LB-Agar:	1,5 % (m/V)	Agar in LB-Medium

2.2.1.2 Antibiotika zur Selektion transformierter Bakterien

Aus dem Natriumsalz von Ampicillin wurde durch Auflösen in ddH_2O eine Stocklösung mit einer Konzentration von 50 mg/ml hergestellt. Diese wurde durch Filtration (Nitrozellulosefilter, Porengröße 0,22 µm) sterilisiert und bei –20 °C gelagert. Im Medium wurde diese Lösung auf eine Konzentration von 50 µg/ml verdünnt.

2.2.1.3 Herstellung kompetenter Zellen

Mittels einer Impföse wurden die in einer Einfrierlösung gelagerten Bakterien auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze wurden sechs Einzelkolonien von der Agarplatte gepickt und zur Vermehrung in 25 ml flüssiges LB-Medium überführt. Die Inkubation dieser Vorkultur erfolgte bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 200 Umdrehungen pro Minute (UpM). Nach 6 bis 8 h wurden mit 2 ml, 4 ml und 10 ml der Vorkultur je 250 ml SOB-Medium angeimpft und über Nacht bei 200 UpM und 20 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die OD_{600} aller drei Kulturen beobachtet. Die Kultur, die als erstes eine OD_{600} von 0,55 erreichte, wurde für 10 min in ein eiskaltes Wasserbad überführt. Anschließend wurden die

Bakterien abzentrifugiert (2500 x *g*, 10 min, 4 °C) und in 80 ml eiskalten Inoue-Puffer aufgenommen. Die Bakterien wurden erneut zentrifugiert (2500 x *g*, 10 min, 4°C) und das Pellet in 20 ml eiskaltem Inoue-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1,5 ml DMSO und Inkubation für 10 min auf Eis wurden die kompetenten, zur Aufnahme von fremder DNA bereiten Zellen in 50 µl Aliquots portioniert, in flüssigem Stickstoff (N_2) schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

Einfriermedium:	3,6 mM	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$
	1,3 mM	KH_2PO_4
	2 mM	NaCitrat
	1 mM	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
	1,4 % (m/V)	Glycerin
	in ddH_2O	
SOB-Medium:	2 % (m/V)	Bactotrypton
	0,5 % (m/V)	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	$MgCl_2$
	10 mM	$MgSO_4$
	in ddH_2O, pH 7,0	

SOB-Medium wurde hergestellt, indem alle Komponenten außer $MgCl_2$ und $MgSO_4$ in ddH_2O gelöst wurden. Nach Autoklavieren und anschließender Abkühlung auf 60 °C wurden die fehlenden Salze hinzugefügt.

Inoue-Puffer:	55 mM	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$
	15 mM	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$
	250 mM	KCl
	10 mM	PIPES/KOH (0,5 M, pH 6,7)
	in ddH_2O	

2.2.1.4 Transformation kompetenter Bakterien

Durch Transformation wurde Plasmid-DNA in kompetente Bakterien eingeschleust. Hierfür wurden 50 µl der Bakteriensuspension (DH5α-Zellen) auf Eis getaut, mit 2 µl des

entsprechenden plasmidhaltigen Ansatzes aus der vorangegangenen Ligation (siehe 2.2.2.6) vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Durch die folgende Hitzeschockbehandlung für 90 s bei 42 °C im Wasserbad gelangte die Plasmid-DNA in die Bakterien. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min auf Eis überführt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium, das auf 37 °C aufgewärmt worden war, wurde der Ansatz für 45 min bei 37 °C und 200 UpM im Schüttelinkubator belassen. Mit einem Drygalsky-Spatel wurden ein Aliquot oder der gesamte Transformationsansatz auf zuvor getrockneten LB-Platten ausplattiert.

SOC-Medium:		
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	$MgCl_2$
	10 mM	$MgSO_4$
	20 mM	Glucose
	2 % (m/V)	Bactotrypton
	0,5 % (m/V)	Hefeextrakt
	in ddH_2O	

Die Transformation der *Epicurian Coli XL1-Blue Supercompetent Cells* erfolgte nach Angaben des Herstellers (Stratagene). Die Bakterien wurden in NZY^+-Nährmedium, pH 7,5, inkubiert, das folgendermaßen hergestellt wird: Pro Liter werden 10 g NZ-Amin A (Casein-Hydrolysat), 5 g Hefeextrakt und 5 g NaCl gemischt und autoklaviert. Anschließend werden 12,5 ml einer sterilfiltrierten 1 M $MgCl_2$-Lösung, 12,5 ml einer sterilfiltrierten 1 M $MgSO_4$-Lösung und 20 ml einer 20 %igen (m/V) sterilen Glucose-Lösung zugegeben.

2.2.1.5 Selektion transformierter Bakterien

Die Suspension der transformierten Bakterien wurde auf LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Bei erfolgreicher Aufnahme und Amplifikation der Plasmide besaßen die Bakterien eine für den verwendeten Vektor charakteristische Resistenz gegenüber Antibiotika. Sequenzen der verwendeten pVL-Vektoren kodieren für eine Ampicillin-Resistenz. Daher konnten nur plasmidtragende Bakterien auf den LB^{Amp+}-Platten überleben und optisch sichtbare Einzelkolonien bilden. Diese wurde mittels einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und

je nach benötigter Menge an DNA in 4 ml (Minipräparation) oder 50 ml (Midipräparation) LB^{Amp+}-Medium überführt. Hier erfolgte die weitere Kultur der Zellen wiederum über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Je nach Volumen der Suspensionskultur der plasmidtragenden Bakterien wurde zur Präparation der Plasmid-DNA für Minipräparationen ein NucleoSpin®- und für Midipräparationen ein Nucleobond®-PC100 Kit (jeweils Macherey-Nagel, Düren) entsprechend Herstellerangaben verwendet. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei –20 °C gelagert.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte spektralphotometrisch durch die Messung der Extinktion der Probelösung bei 260 nm in einer Quarzküvette. Eine optische Dichte (1 OD) entspricht dabei 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger *primer*-DNA oder 40 µg/ml RNA. Anhand der $OD_{260/280}$, die das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Proteine) darstellt, konnte die Reinheit der DNA bestimmt werden. Für reine DNA liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0, niedrigere Werte weisen auf eine Verunreinigung durch Proteine hin.

2.2.2.3 Agarose-Gelelelektrophorese

Zur Analyse von Fragmentgrößen und zur Präparation von Fragmenten aus Plasmid-DNA erfolgte deren Auftrennung nach Molekülgröße durch Elektrophorese in 1 %igem Agarosegel. Nach dem Auflösen von 0,4 g Agarose in 40 ml 1 x TAE-Puffer, Aufkochen und Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C wurde die Lösung in einen Gelschlitten gegossen, um dort zu polymerisieren. Analytische Ansätze, die 1 µg DNA in 15 µl Lösung enthielten, und präparative Ansätze mit 10 µg DNA in 50 µl Lösung wurden mit DNA-Probenpuffer im Verhältnis 1/5 (V/V) versehen und in die Taschen des Gels geladen. Die DNA-Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V für *ca*. 60 min in 1 x TAE-Puffer durchgeführt. Danach wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung mit einer finalen Konzentration von 1 µg/ml gebadet und das überschüssige Ethidiumbromid anschließend durch Waschen mit Wasser entfernt. Die Auswertung fand unter Beleuchtung

mit UV-Licht (λ=312 nm) auf dem Transilluminator statt, wobei das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid rot-orange emittierte (λ=560 nm). Bei Bedarf wurde das erhaltene Bild videodokumentiert und gedruckt.

1 x TAE-Puffer:	40 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	1,0 mM	EDTA
	0,1 % (V/V)	Essigsäure
6 x DNA-Probenpuffer:	60 % (V/V)	Glycerin
	0,25 % (m/V)	Bromphenolblau
	60 mM	EDTA/NaOH, pH 8,0

Ethidiumbromidlösung: 10 mg Ethidiumbromid in 1 ml dd H_2O, dunkel gelagert

Alternativ wurde die Färbung mit Kristallviolett angewendet, um die DNA, die ligiert werden sollte, schonend zu präparieren. 30 µl einer Kristallviolettlösung (10 mg/ml (m/V)) wurden zu 30 ml gelöster und abgekühlter Agaroselösung hinzugefügt, bevor das Gel gegossen wurde. Kristallviolett führt zu einer DNA-Färbung, die direkt unter Durchlicht sichtbar ist, sodass eine Analyse unter UV-Licht, die zu DNA-Schäden führt, nicht notwendig ist. Eine nachfolgende DNA-Färbung mit Ethidiumbromid ist möglich. Die DNA-Proben wurden mit Kristallviolett-Ladepuffer anstatt mit DNA-Probenpuffer gemischt, wenn sie mit Kristallviolett gefärbt wurden.

Kristallviolettlösung	10 mg/ml	in H_2O
6 x Ladepuffer	30 % (V/V)	Glycerin
	300 µg/ml	Kristallviolett

Zum Größenvergleich und damit zur Identifikation der erhaltenen Fragmente auf analytischen Gelen wurde parallel ein Marker mit Fragmenten bekannter Größe und bekannten Einzel- und Gesamtkonzentrationen an DNA aufgetragen.

Marker III: λ-DNA/EcoRI/HindIII (0,1 µg/µl) in 1 x DNA-Probenpuffer

Der Marker enthält DNA-Fragmente folgender Größen: 21226 bp, 5148 bp, 4973 bp, 4628 bp, 3530 bp, 2027 bp, 1904 bp, 1584 bp, 1375 bp, 947 bp, 831 bp, 564 bp.

2.2.2.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur gezielten Isolation von DNA-Abschnitten definierter Größe nach Spaltung mit Restriktionsenzymen und Auftrennung im Agarosegel wurde die gewünschte Bande unter UV-Beleuchtung (bei Ethidiumbromidfärbung) bzw. unter Durchlicht (bei Kristallviolettfärbung) identifiziert, mit einem sterilen Skalpell herausgetrennt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Auf der Feinwaage konnte so die Nettomasse des Gelstücks ermittelt werden und die DNA mithilfe des QIAquick ® Gel Extraction Kit gemäß Herstellerangaben aus dem Gel eluiert werden.

2.2.2.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA-Spaltungen wurden mittels Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben durchgeführt. Je nach Verwendungszweck (Analyse oder Präparation), wurden verschiedene Größenordnungen des Reaktionsansatzes gewählt:

	Präparative Restriktion	**Analytische Restriktion**
Plasmid DNA	5 µg	0,5-1 µg
10 x Restriktionspuffer	5 µl	1,5 µl
Restriktionsenzym je	25 U	5 U
Mit ddH_2O *ad*	50 µl	15 µl

Gemäß Herstellerangaben erfolgte die Inkubation bei präparativer Restriktion für 1,5 h bei 37 °C, bei analytischer Restriktion für 1 h bei 37 °C. Anschließend wurden die DNA-Proben mit DNA-Probenpuffer versetzt und mit dem Marker III (siehe 2.2.2.3) durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Spaltprodukte konnten danach mittels UV-Beleuchtung ausgewertet werden.

2.2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Um rekombinante Plasmide zu erhalten, die anschließend in Zellen eingeschleust werden können, müssen das DNA-Fragment (*insert*) und der geeignete linearisierte Vektor ligiert werden. Hierfür wird T4-DNA-Ligase verwendet, die die Bildung von

Phosphodiesterbrücken zwischen dem 5'-Phosphat-Ende und dem 3'-Hydroxyl-Ende doppelsträngiger DNA katalysiert. Das molare Verhältnis von Vektor zu *insert* betrug 1:5.

Ligationsansatz:	*ca*. 20 ng	linearisierter Vektor
	x ng	DNA-Fragment
	1,5 µl	10 x T4-DNA-Ligase-Puffer
	1,5 µl	T4-DNA-Ligase
	ad 15 µl	mit ddH_2O

Der Ligationsansatz wurde bei RT für eine Stunde bzw. im Kühlraum bei 16 °C für 16 h inkubiert und anschließend für eine Transformation (siehe 2.2.1.4) verwendet.

2.2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient sowohl der Amplifikation von DNA-Fragmenten als auch der Herstellung von modifizierter DNA. Durch Modifikation von DNA-Kopien können gezielt neue Restriktionsschnittstellen oder Mutationen in einer Nukleinsäuresequenz entstehen (Horton und Pease, 1991). Synthetisch hergestellte Oligonukleotide dienen als *primer* und besitzen eine Länge von ca. 25-45 Basen. Die *primer* binden sequenzspezifisch am 5´- bzw. 3´-Ende der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz und ermöglichen der DNA-Polymerase, die *primer* zu Komplementärsträngen entlang der Matrize in 5'-3'-Richtung zu verlängern. Die PCR verläuft in sich wiederholenden Zyklen: Auf die DNA-Synthese folgt die Denaturierung der entstandenen Doppelstränge, danach können sich wieder die *primer* an ihre entsprechende Matrize anlagern. Hierauf folgt ein erneuter Synthesezyklus usw.

PCR-Ansatz:	ca. 100 ng	Matrizen-DNA
	10 µl	5 x Phusion HF-Puffer
	1 µl	5´-*primer* (10 µM)
	1 µl	3´-*primer* (10 µM)
	1 µl	dNTP-Mix (10 mM)
	1 µl	Phusion high-fidelity-Polymerase (2 U/ µl)
	ad 50 µl	mit ddH_2O

In einem Thermocycler wurde die PCR nach einem Standard-Programm durchgeführt (siehe Tabelle 4). Nach der PCR wurde die amplifizierte DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert (siehe 2.2.2.4). Da die Phusion high-fidelity-Polymerase, z. B. im Gegensatz zur Taq-Polymerase, nicht die Eigenschaft besitzt, an ein entstehendes PCR-Produkt am 3´-Hydroxyl-Ende ein Deoxyadenosin anzuhängen, sondern glatte Enden erzeugt, konnte das PCR-Fragment in den Vektor pCR-Blunt mittels Ligation (siehe 2.2.2.11) einkloniert werden.

Tab. 2: Exemplarisches Protokoll einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In der Tabelle sind die verschiedenen Schritte einer PCR sowie Temperatur, Dauer und Anzahl der Zyklen dargestellt.

Schritt	**Temperatur**	**Dauer**	**Wiederholungen**
Start	94 °C	5 min	1 Zyklus
Denaturierung	94 °C	30 s	30 Zyklen
Anlagerung der *primer*	62 - 72 °C	30 s	
Extension	72 °C	1 min/kb	
Extension	72 °C	10 min	1 Zyklus
Lagerung	4°C	unbegrenzt	

2.2.2.8 Auswahl der *primer* für die Polymerase-Kettenreaktion

Die *primer* wurden in der Regel so gewählt, dass neue Restriktionsschnittstellen entstanden, um die Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren zu ermöglichen. Die *primer* besaßen im optimalen Fall eine Länge von 25-45 Basen, einen Mindestgehalt von 40 % an G/C-Basen und an den 3´-Enden zwei oder mehrere G/C-Basen. Somit konnte eine verbesserte Anlagerung der *primer* an den DNA-Strang erzielt werden. Die Schmelztemperaturen T_m der *primer* wurden mit der Formel 1 ermittelt (Horton und Pease, 1991).

Formel 1: **Ermittlung der Schmelztemperatur nach Horton und Pease.**

$$T_m = [4°C \times (G + C)] + [2°C \times (A + T)]$$

Parameter	**Einheit**	**Kommentar**
T_m	°C	Schmelztemperatur der *primer*
G	dimensionslos	Anzahl der Guanine
C	dimensionslos	Anzahl der Cytidine
A	dimensionslos	Anzahl der Adenine
T	dimensionslos	Anzahl der Tymidine

2.2.2.9 Einfügung von Mutationen in eine DNA-Sequenz

Mittels des QuikChange™ XL-Site-Directed Mutagenesis Kit können in eine DNA-Sequenz Punktmutationen eingefügt werden, sodass in dem kodierten Protein eine einzelne Aminosäure ausgetauscht wird. Hierbei lagern sich zwei zueinander komplementäre *primer*, die die gewünschte Mutation tragen, an eine rekombinante DNA. Mittels der PfuUltra-Polymerase werden die mutierten DNA-Stränge amplifiziert; durch Einbau der *primer* bilden sich Strangbrüche und es entstehen DNA-Stränge, die in ihrer Sequenz von der Matrizen-DNA abweichen.

Mutagenese-PCR-Ansatz:	*ca*. 100 ng	Matrizen-DNA
	5 µl	10 x PfuUltra-Puffer
	1,25 µl	*primer* (10 pmol/µl)
	1,25 µl	*primer* (10 pmol/µl)
	1 µl	dNTP-Mix (10mM)
	3 µl	Quik-Solution
	1 µl	PfuUltra-Polymerase
	ad 50 µl	mit ddH_2O

Die PfuUltra-Polymerase wurde erst dazugegeben, wenn der *thermocycler* auf 95 °C geheizt hatte (*hot start*), um unspezifische Amplifikationen zu minimieren.

Tab. 3: Protokoll einer Mutagenese-Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In der Tabelle sind die verschiedenen Schritte der PCR sowie Temperatur, Dauer und Anzahl der Zyklen dargestellt.

Schritt	**Temperatur**	**Dauer**	**Wiederholungen**
Start	95 °C	1 min	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C	50 s	18 Zyklen
Anlagerung der *primer*	60 °C	50 s	
Extension	68 °C	1 min/kb	
Extension	68 °C	7 min	1 Zyklus
Lagerung	4°C	unbegrenzt	

Nach der PCR wird die methylierte, nicht-mutierte DNA durch das Enzym DpnI (10 U) für 1 h bei 37 °C gespalten. Die anschließende Vermehrung der mutierten DNA und die Bildung ihrer *supercoiled* Form erfolgt in entsprechenden kompetenten Bakterien. Dazu wurden 2,0 µl des Ansatzes für die Transformation in kompetente Bakterien-Zellen

verwendet (siehe 2.2.1.4). Mittels Mini-Präparation (siehe 2.2.2.1) wurde die rekombinante DNA isoliert und mittels Sequenzierung (siehe 2.2.2.11) der Erfolg der Mutagenese überprüft.

2.2.2.10 Auswahl der *primer* für die Mutagenese-PCR

Zum Zweck der Einfügung von Mutationen in eine DNA-Sequenz sollte die Schmelztemperatur der *primer* etwa 78 °C betragen. Die gewünschte Mutation wurde in die Mitte der *primer* eingefügt, so dass auf beiden Seiten 10 bis 15 Basen der richtigen DNA-Sequenz lagen. Auch hier wurde darauf geachtet, dass sich am 3'-Ende der *primer* zwei oder mehr G/C-Basen befanden und der Mindestgehalt an G/C-Basen bei 40 % lag. Die Schmelztemperaturen T_m der *primer* wurden mit Formel 2 ermittelt.

Formel 2: Ermittlung der Schmelztemperatur nach Angaben des QuikChange site-directed mutagenesis Kit.

$$T_m = 81{,}5°C + [0{,}41(\%GC) - 675/N - \%M]°C$$

Parameter	Einheit	Kommentar
T_m	°C	Schmelztemperatur der *primer*
GC	dimensionslos	Anzahl der Guanine bzw. Cytidine
N	dimensionslos	Länge der *primer* in Basen
M	dimensionslos	Anzahl der Fehlpaarungen

2.2.2.11 Sequenzierung von DNA

Das automatisierte Sequenzierverfahren besteht aus einer Kombination von linearer (*single primer*) PCR und der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977). Die rekombinante DNA kann je nach Bedarf von beiden Seiten der *multiple cloning site* mit zwei vektorspezifischen Oligonukleotiden ansequenziert werden, wobei das eine Oligonukleotid komplementär zum *sense*-Strang, das andere zum *antisense*-Strang des Vektors bindet. Ausgehend von den damit erhaltenen Sequenzen der 5´- und 3´-Regionen der rekombinanten DNA können *insert*-spezifische Oligonukleotide synthetisiert werden, mit deren Hilfe Sequenzen weiter stromabwärts (*downstream*) vom Startkodon bzw. stromaufwärts (*upstream*) vom Stoppkodon ermittelt werden. Mit Hilfe dieser als *primer walking* bezeichneten Methode konnten die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten DNA-Konstrukte auf die Richtigkeit ihrer Sequenz hin überprüft werden. Damit eine

unidirektionale Strangsynthese mit einem definierten Startpunkt erfolgen kann, wird pro Sequenzieransatz ein Oligonukleotid eingesetzt. Vom 3´-Hydroxyl-Ende des gebundenen Oligonukleotids aus beginnend wird ein zur Matrize komplementärer Strang unter Verwendung der vier 2´-Desoxynukleosid-5'-trisphosphate (dNTPs) synthetisiert. Parallel dazu erfolgt der Einbau von fluoreszenzmarkierten 2´-, 3´-Didesoxynukleosid-5'-trisphosphate (ddNTPs) und damit der rein statistische Strangabbruch, da bei den ddNTPs die für die Elongation nötige 3´-Hydroxyl-Gruppe fehlt. Bei der *dye-terminator*-Methode sind die vier ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Somit entstehen unterschiedlich lange, fluoreszenzmarkierte DNA-Stücke, die auf einem automatischen Sequenzanalyse-Gerät untersucht werden können. Nach der Elongation der Oligonukleotide durch eine PCR mit der Taq-Polymerase (*cycle sequencing*) wird die DNA gefällt, in Ladepuffer gelöst und nach der Denaturierung auf die Gelmatrix aufgetragen. Durch Laserabtastung der mit Farbstoff markierten DNA-Fragmente während der Kapillar-Gelelektrophorese im Sequenzanalyse-Gerät wird die DNA-Sequenz ermittelt.

Sequenzieransatz:	4 µl	BigDye-Terminator-Ready-Reaction-Mix
	1 µl	dsDNA-Plasmid (200-300 ng)
	2,5 µl	Sequenzieroligonukleotide (2 pmol/µl)
	ad 10 µl	mit ddH_2O

Tab. 4: Protokoll einer Poymerase-Kettenreaktion (PCR) für die DNA-Sequenzierung. In der Tabelle sind die verschiedenen Schritte der PCR sowie Temperatur, Dauer und Anzahl der Zyklen dargestellt.

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Start	96 °C	2,5 min	1 Zyklus
Denaturierung	96 °C	1 min	25 Zyklen
Anlagerung der *primer*	51 °C	1 min	
Extension	60 °C	4 min	
Schlussextension	60 °C	5 min	1 Zyklus
Lagerung	4 °C	unbegrenzt	

Nach Beendigung der PCR wurden 90 µl ddH_2O zugegeben, die DNA für 10 min bei 4 °C mit 2,5 Volumen 100 %igem Ethanol gefällt und bei 15 800 x *g* für 20 min bei RT (Raumtemperatur) zentrifugiert. Das DNA-Pellet des Sequenzieransatzes wurde mit

70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA-Pellets wurden in 11 µl Template Suppression Reagent gelöst, für 2 min bei 90 °C denaturiert, kurz auf Eis inkubiert und in den Probenwechsler des Sequenzanalyse-Geräts gestellt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch Kapillar-Gelelektrophorese mit 1 x Genetic Analysis Buffer für 36 min bei 50 °C und 15 kV. Die Sequenzierungen wurden freundlicherweise von Frau S. Gierschik durchgeführt.

2.2.3 Eukaryotische Zellkultur

2.2.3.1 *Sf*9-Zellen

Insektenzellen aus dem Ovar der Hausmotte *Spodoptera frugiperdia* (*Sf*9 Zellen) wurden adhärent und in Suspension kultiviert. Die Inkubationsbedingungen für diese Zellen waren 27 °C bei normaler Atmosphäre.

2.2.3.1.1 Adhärente Kultur

Die Zellen wurden in 75 cm^2 Kulturflaschen mit je 15 ml Medium kultiviert. Zur Versorgung der Zellen mit frischem Medium wurde das alte Medium abgesaugt. Die Zellen wurden mit 15 ml neuem Medium vom Boden der Flasche abgespült, und die Suspension wurde auf 2 oder 3 neue Flaschen verteilt. Dort wurde das Volumen mit neuem Medium auf 15 ml ergänzt. Je nach Verdünnung wurden die Zellen für weitere 2 bzw. 3 Tage kultiviert, bevor diese erneut mit frischem Medium versorgt wurden. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Zellen eine ca. 90 %ige Konfluenz, die Zellzahl betrug *ca.* 15 Millionen Zellen pro Flasche.

Medium für adhärente Kultur:		
	500 ml	TNM-FH-Medium(Sigma)
	10 % (V/V)	FCS (Sigma)
	50 µg/ml (m/V)	Gentamicin

Die Zusätze wurden steril zugesetzt. Das FCS wurde zuvor für 30 min bei 56 °C im Wasserbad inaktiviert. Fertiges Medium wurde bei 4 °C gelagert.

2.2.3.1.2 Suspensionskultur

Für die Suspensionskultur wurden Zellen aus 8 Flaschen (*ca.* 160 x 10^6 Zellen) verwendet. Nach Abnehmen des Mediums und Resuspension in Medium für Suspensionskultur wurden die Zellen in einen sterilen Fernbachkolben überführt und das Volumen auf 250 ml aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen für 3 Tage auf dem Schüttelinkubator bei 80 UpM. Nach dieser Kultivierungsphase wurde die Zellzahl pro ml Volumen bestimmt. Erfahrungsgemäß lag die Konzentration bei *ca.* 4 x 10^6 Zellen pro ml Medium, was bei einem Volumen von 250 ml eine Gesamtzahl von 1 x 10^9 Zellen ergab. Nun wurde die Infektion mit rekombinanten Baculoviren durchgeführt (siehe 2.2.4.2.4).

Medium für		
Suspensionskultur:	TNM-FH-Medium (PAN Biotech)	
	50 µg/ml	Gentamicin
	0,2 % (V/V)	Pluronic® F-68
	2,5 µg/ml (m/V)	Fungizone

Die Zusätze wurden steril zugegeben. Fertiges Medium wurde bei 4 °C gelagert.

2.2.3.1.3 Ermittlung der Zellzahl

Um Zellen mit einer bestimmten Dichte in einer Zellkulturschale zu kultivieren, mussten die Zellen gezählt werden. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Suspension abgenommen, 1:4 mit Trypanblaulösung verdünnt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Das so erfasste Volumen betrug 0,1 µl, daher wurde das Ergebnis der Auszählung von vier Quadraten mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor 4 multipliziert, um die Zellzahl pro 1 ml Suspension zu erhalten.

Trypanblaulösung:	0,5 % (m/V)	Trypanblau
	0,85 % (m/V)	NaCl
	in ddH_2O	

2.2.3.2 COS-7-Zellen

Bei COS-7-Zellen handelt es sich um eine Fibroblasten-Zelllinie aus Nierengewebe der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*). Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre und 10 % CO_2.

2.2.3.2.1 Zellkultur von COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden in Zellkulturschalen (∅ 100 mm) in 10 ml Medium kultiviert. Nach drei bis vier Tagen wurden die noch nicht vollständig konfluenten Zellen umgesetzt. Die adhärenten Zellen wurden mit 4 ml PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen und mittels 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 10 min bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank vom Boden der Schale abgelöst. Zur Verdünnung des Trypsins wurden danach 7 ml Medium zugegeben. Die noch anhaftenden Zellen wurden mittels einer Glaspipette abgespült und die Suspension in eine 15 ml Zentrifugenröhre überführt, bei 300 x *g* für 5 min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in Medium 1:10 bzw. 1:12 verdünnt. Es wurden *ca.* 0,3 x 10^6 bzw. 0,5 x 10^6 Zellen pro Zellkulturschale ausgesät.

Kulturmedium von		
COS-7-Zellen:	DMEM-Medium mit	
	10 % (V/V)	FCS (GIBCO)
	2 mM	L-Glutamin
	100 U/ml	Penicillin
	100 µg/ml	Streptomycin
PBS-Puffer:	140 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	10 mM	Na_2HPO_4
	1,8 mM	KH_2PO_4, pH 7,4

2.2.3.2.2 Bestimmung von Zellzahlen

Zunächst wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 4 ml sterilfiltriertem PBS-Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen für 10 min mit Trypsin/EDTA bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank vom Boden der Schale abgelöst. Zur Verdünnung des Trypsins wurden danach 7 ml DMEM-Medium zugegeben. Die Zellen wurden mittels einer Glaspipette abgespült und die Suspension in eine 50 ml Zentrifugenröhre überführt, bei 300 x *g* für 5 min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und hiervon ein Aliquot 1:4 (V/V) mit Trypanblaulösung verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Das Volumen des Zählbereiches betrug 0,1 µl, weshalb die erhaltene Zellzahl mit 10^4 und zusätzlich mit dem

Verdünnungsfaktor 4 multipliziert werden musste, um die Zellzahl je 1 ml Suspension berechnen zu können.

2.2.4 Proteinexpression

Um Proteine in COS-7- und *Sf*9-Zellen exprimieren zu können, wurden diese mit Expressionsvektoren, die die cDNA des jeweiligen Proteins trugen, transfiziert.

2.2.4.1 Transiente Transfektion von COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden mit Hilfe des Tranfektionsreagenz Lipofectamine transfiziert. Dafür wurden 24 Stunden vor der Transfektion 0,13 x 10^6 Zellen in Vertiefungen von 12-Loch-Platten ausgesät. Die Konfluenz der COS-7-Zellen betrug vor der Transfektion *ca*. 90 bis 95 %. Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt. Pro Ansatz wurden 1 µg, 1,010 µg bzw. 1,5 µg DNA verwendet, gegebenenfalls wurde die Menge an Fremd-DNA mit der entsprechenden Menge an leerem Vektor ausgeglichen. Für die Transfektion wurden zwei Lösungen angesetzt: Lösung A enthielt die DNA und das OptiMEM I-Medium, Lösung B enthielt das Transfektionsreagenz Lipofectamine und das OptiMEM I-Medium. Das Verhältnis von Plasmid-DNA zu Transfektionsreagenz lag bei 1 µg zu 2 µl. Nach Zugabe des Transfektionsreagenz zum OptiMEM I-Medium (Lösung B) wurde dieses Gemisch für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die beiden Lösungen vereinigt. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT wurde die aus DNA-Lipofectamine-Komplexen bestehende Lösung tropfenweise auf die Zellen gegeben, wobei gleichzeitig die Zellkulturschalen kreuzweise geschwenkt wurden. Die Zellen wurden bei 37 °C und 10 % CO_2 für 24 Stunden inkubiert. Die in COS-7-Zellen heterolog exprimierten Proteine wurden funktionell untersucht (siehe 2.2.7) und immunchemisch nachgewiesen (siehe 2.2.6.3.2).

2.2.4.2 Proteinexpression in *Sf*9-Zellen

Die Expression von Proteinen in Insektenzellen erfolgte unter Verwendung des Baculovirus-Expressionssystems. Dieses Expressionssystem bietet die Ausführung der meisten posttranslationalen Modifizierungen (z.B. Isoprenylierung, Phosphorylierung und Methylierung) und eine hohe Expression korrekt gefalteter Proteine bei einfacher Handhabung (Dietrich et al., 1992; Cerione et al., 1995). Die Herstellung der rekombinanten Baculoviren basiert auf der Kompensation einer modifizierten Form der

DNA des *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* mit einer letalen Deletion durch homologe Rekombination mit entsprechenden Plasmiden (z.B. pVL1393).

2.2.4.2.1 Transfektion

Die Transfektion erfolgte nach der Calciumphosphat-Methode entsprechend den Herstellerangaben (BaculoGold Baculovirus DNA, Pharmingen). Die im Transfektionspuffer enthaltenen Calciumionen reagieren hierbei mit den Phosphationen im Medium zu Calciumphosphat. Dieses fällt aus und schließt dabei die gelöste DNA mit ein. Das Präzipitat sinkt auf die Zellen und wird dann per Endozytose von den Zellen aufgenommen.

Nach dem Umsetzen von halbkonfluenten Insektenzellen in eine 25 cm^2-Kulturflasche und dem Absetzen der Zellen für 20 min wurde das Medium abgesaugt und mit 750 µl Medium für adhärente Kulturen ersetzt. Parallel dazu wurde der Transfektionsansatz aus 0,4 µg BaculoGold-DNA und 10 µg des *insert*-tragenden Transfervektors angesetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Es wurden 750 µl Transfektionspuffer zugegeben, der Ansatz wurde gemischt und diese Lösung wurde tropfenweise auf die Zellen ausgebracht, wobei die komplette Oberfläche der Kulturflasche benetzt wurde. Nach Inkubation für 4 h bei 27 °C wurde der Überstand abgenommen und durch 3 ml frisches Medium ersetzt. Nun erfolgte die Kultivierung der Zellen für 4 Tage. Die replizierten Viren reichern sich während dieser Zeit im Medium an. Dieses wurde steril abgenommen und bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Transfektionspuffer:	25 mM	HEPES
	125 mM	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$
	125 mM	NaCl
	in ddH_2O, pH 7,1 mit konz. NaOH	

2.2.4.2.2 Amplifikation

Um ausreichende Mengen an repliziertem Virus zu erhalten, wurden jeweils mehrere Amplifikationszyklen vollzogen. Hierfür wurden halbkonfluente Zellen in eine 75 cm^2-Kulturflasche umgesetzt. Nach Absetzen der Zellen innerhalb von 20 min wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml des Virusüberstandes aus der Transfektion überschichtet. Es erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 27 °C. Danach wurde das Medium

mit 8 ml frischem Medium ergänzt und die Zellen für weitere 4 Tage kultiviert. Am Ende dieser Phase wurden die Zellen vom Boden der Kulturschale abgespült, in ein 15 ml-Zentrifugengefäß überführt und aus der Suspension durch Zentrifugation (5 min bei 300 x *g*) pelletiert. Der Überstand mit den darin enthaltenen Viren wurde abgenommen und bei 4 °C gelagert. Dieser Zyklus wurde mindestens einmal wiederholt, bis bei Zugabe des Überstands zu nicht infizierten Insektenzellen (2 ml zu ca. 8 Millionen Zellen) während der Kultivierungsphase deutliche Anzeichen der Infektion auftraten (Anschwellen der Zellen, sichtbare Granulation unter dem Lichtmikroskop, verminderte Haftung am Untergrund). In Einzelfällen war hierzu ein dritter Amplifikationsschritt notwendig.

2.2.4.2.3 Infektion bei adhärenter Kultur

Die adhärente Kultur zur Gewinnung der löslichen Fraktion Baculovirus-infizierter Insektenzellen erfolgte in 150 cm^2-Kulturflaschen. Zur Infektion wurden Zellen aus jeweils zwei 75 cm^2-Kulturflaschen in frischem Medium suspendiert und in eine 150 cm^2-Kulturflasche überführt. Nach *ca.* 20 min hatten sich die Zellen abgesetzt und hafteten am Boden der Kulturflasche. Das Medium wurde abgesaugt, durch 1 ml Virusüberstand aus der letzten Amplifikation ersetzt und mit 3 ml Medium ergänzt. Nach Inkubation für 1 h bei 27 °C wurden 20 ml Medium zugegeben und die Zellen für weitere 3 Tage kultiviert. Anschließend wurden die infizierten Zellen geerntet und die lösliche Fraktion dieser Zellen hergestellt (siehe 2.2.5).

2.2.4.2.4 Infektion von in Suspensionskultur kultivierten *Sf*9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren

Die Kultivierung der Insektenzellen für die Expression von Rho-GTPasen erfolgte in Suspension im Fernbachkolben, um ausreichend große Ausbeuten an Protein zu erreichen. Die in einem Fernbachkolben vorkultivierten Zellen (siehe 2.2.3.1.2) wurden nach Ermittlung der Zellzahl in 50 ml-Zentrifugengefäßen durch Zentrifugation bei 300 x *g* sedimentiert, die Zellpellets in Medium für Suspensionskultur resuspendiert und vereinigt. Entsprechend des zur Infektion von Zellen in adhärenter Kultur verwendeten Volumens an Virusüberstand (200-600 µl für *ca.* 15 Millionen Zellen) wurde die Zellsuspension mit dem Virusüberstand aus den Amplifikationen versetzt und mit Medium auf 50 ml aufgefüllt. Nach Resuspendierung wurde das Röhrchen unter gelegentlichem sanftem Mischen durch Kippen und Drehen für 1 h bei 27 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Suspension in einen sterilen Fernbachkolben überführt und mit

Medium auf ein Gesamtvolumen von 400 ml aufgefüllt. Es erfolgte die Kultivierung für 3 Tage im Schüttelinkubator bei 80 UpM.

2.2.5 Proteinpräparation

2.2.5.1 Proteinpräparation aus *Sf*9-Zellen

Zur Präparation von Proteinen wurden die Zellen aus adhärenter Kultur mit Medium vom Boden der Kulturflasche durch Abspülen gelöst. Aus dieser Suspension wurden die Zellen in einem Zentrifugengefäß durch Zentrifugation für 5 min bei 300 x *g* pelletiert. Zellsuspensionen aus dem Fernbachkolben wurden in mehrere 50 ml-Zentrifugengefäße überführt, sedimentiert und schrittweise in zwei 50 ml-Zentrifugengefäße vereinigt. Der Überstand wurde abgegossen. Nun erfolgte einmaliges Waschen in PBS-Puffer (*ca.* 8 ml für Zellen aus einer 150 cm^2-Flasche, *ca.* 100 ml für Zellen aus einem Fernbachkolben) durch Resuspendierung und erneute Zentrifugation. Das Zellpellet wurde je nach weiterem Verfahren (siehe unten) in geeignetem Puffer resuspendiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis.

2.2.5.2 Präparation der löslichen Fraktion aus Baculovirus-infizierten *Sf*9-Zellen

Von PLCγ_2-exprimierenden Zellen wurde die lösliche Fraktion gewonnen. Das Zellpellet aus dem oben erwähnten Waschschritt wurde in Erntepuffer A (300 µl pro 150 cm^2-Kulturflasche) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zehnmal durch eine Kanüle mit den Abmessungen 0,45 x 25 mm gezogen. Durch die Inkubation im hypotonischen Milieu und die mechanische Scherung erfolgte die Lyse der Zellen. Zur Trennung der partikulären von der löslichen Fraktion wurde das Lysat für 1 h bei 4 °C mit 100 000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand, der die lösliche Fraktion enthielt, wurde in neue Gefäße aliquotiert.

Erntepuffer A:	20 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	1 mM	EDTA
	2 µg/ml	STI
	3 mM	Benzamidin
	1 µM	Pepstatin A
	1 µM	Leupeptin
	1 µg/ml	Aprotinin
	0,1 mM	PMSF (vor Gebrauch frisch zugesetzt)

2.2.5.3 Gewinnung von Detergensextrakten aus der membranären Fraktion Baculovirus-infizierter *Sf*9-Zellen

Überexprimierte Rho-GTPasen sind aufgrund ihrer posttranslationalen Modifizierung vornehmlich an Membranen verankert. Zur Gewinnung wurde entsprechend einer Modifikation der von Cerione et al. (1995) beschriebenen Methode gearbeitet. Hierbei wurden nach dem oben erwähnten Waschschritt die Zellen in Erntepuffer B (200 µl pro 15 Millionen intakte Zellen zum Zeitpunkt der Ernte) resuspendiert, 30 min unter Mischen auf Eis inkubiert und danach in einem eisgekühlten Teflon-Glas-Potter-Homogenisator mit einem Volumen von 5 ml homogenisiert. Durch Zentrifugation bei 300 x *g* für 10 min wurden Zellkerne und nicht lysierte Zellen entfernt. Der Überstand wurde erneut bei 12 000 x *g* für 15 min zentrifugiert, um die partikuläre, mit Membranen angereicherte Fraktion von der zytosolischen Fraktion zu trennen. Nach Abnehmen und Verwerfen des Überstandes wurde das Membranpellet zweimal in Erntepuffer B durch Resuspendieren, Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes gewaschen. Nun wurde das Pellet in Solubilisierungspuffer mit Natriumcholat resuspendiert (*ca.* 30 µl pro 15 Millionen intakter Zellen zum Zeitpunkt der Ernte). Die Suspension wurde für 90 min bei häufigem heftigem Mischen auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit 12 000 x *g* für 15 min, um Membranreste zu sedimentieren. Im Überstand lagen nun die aus den Membranen solubilisierten Proteine vor.

Erntepuffer B:	20 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	3,75 mM	$MgCl_2$
	1 mM	DTT
	3 µM	GDP
	1 µg/ml	Leupeptin
	1 µg/ml	Aprotinin
	0,1 mM	PMSF (vor Gebrauch frisch zugesetzt)

Solubilisierungspuffer:	20 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	3,75 mM	$MgCl_2$
	1 mM	DTT
	3 µM	GDP
	1 µg/ml	Leupeptin
	1 µg/ml	Aprotinin
	23 mM	Natriumcholat
	0,1 mM	PMSF (vor Gebrauch frisch zugesetzt)

2.2.5.4 Herstellung von Ganzzelllysaten zur Kontrolle der Expression von Proteinen in COS-7-Zellen

Zum Nachweis der Expression rekombinanter und/oder endogener Proteine in den transient transfizierten COS-7-Zellen wurden Ganzzelllysate hergestellt. Die Zellen wurden in den 12-Loch-Zellkulturschalen mit 500 µl PBS, pH 7,4, gewaschen und in 200 µl ddH_2O und (+)-Probenpuffer mit einem Verhältnis von 1:1 auf einem Schüttler (Titramax 100, Heidolph) bei 1200 Upm für 15 Minuten inkubiert. Das Zelllysat wurde anschließend in Reagiergefäße (1,5 ml) überführt, für 5 min bei 95 °C inkubiert und wie unten beschrieben analysiert.

2.2.5.5 Konservierung und Lagerung von Proteinpräparationen

Proteinpräparationen wurden auf geeignete Volumina in Eppendorf-Reagiergefäße aliquotiert, in flüssigem N_2 schockgefroren und bei –80 °C gelagert. Vor Verwendung wurden die Proben langsam auf Eis getaut.

2.2.6 Methoden der Proteinbiochemie

2.2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Gesamtproteinkonzentration in Proteinpräparationen wurde entsprechend der Methode von Bradford *et al.* (1976) ermittelt. Das hierfür benötigte Reagenz wurde wie folgt hergestellt:

Bradfordreagenz:	0,04 % (m/V)	Coomassie Brilliantblau G 250
	21 % (V/V)	Ethanol
	42,5 % (V/V)	*ortho*-Phosphorsäure

Das verwendete Gefäß und der Magnetrührstab wurden mit 85 %iger H_3PO_4 gespült und mit ddH_2O gewaschen. Der Farbstoff Coomassie Brilliantblau wurde unter ständigem Rühren in Ethanol gelöst, anschließend wurde die Phosphorsäure zugegeben und die Lösung wurde für weitere 60 min gerührt. Dann wurde die Lösung mit ddH_2O auf das Endvolumen aufgefüllt, über einen Faltenfilter abfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Kalibrierung des Systems wurden verschiedene Verdünnungen einer Proteinstandardlösung vermessen. So wurden 0, 10, 20, 30, 40 und 50 µl der Standardlösung (enthält 0,34 mg/ml bovines Plasma-γ-Globulin-Lyophilisat) auf 800 µl mit ddH_2O verdünnt, mit 200 µl Bradfordreagenz versetzt und die Extinktion bei 595 nm photometrisch als Zweifachbestimmung gemessen. Aus den Werten wurde mittels linearer Regression unter Verwendung des Computerprogramms PG Prot die Kalibrierungsgerade für die bekannten Proteinkonzentrationen ermittelt. Analog hierzu wurden die Proben gemessen: Es wurde jeweils eine dem Messbereich des Systems entsprechende Verdünnung (1:10 bis 1:40) der Proteinpräparationen in ddH_2O hergestellt und diese als Mehrfachbestimmung gemessen. Durch Rückrechnung der Extinktionswerte berechnete die Software die Proteinkonzentration der Lösungen, durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor wurde die initiale Konzentration festgestellt.

2.2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Laemmli *et al.* (1970). Hierzu wurde ein Elektrophorese-System der Fa. Hoefer verwendet, die Glasplatten der Apparatur hatten eine Fläche von 16 x 18 cm, der Abstandshalter war 1,5 mm dick. Das SDS-Polyacrylamidgel enthielt im Sammelbereich 6 % (m/V), im Trennbereich für die Analyse kleiner Proteine wie der Rho-GTPasen 12,5 % (m/V), im Trennbereich für die Analyse größerer Proteine wie der PLCs 10 % Monomer. Die genaue Zusammensetzung zeigt folgende Tabelle:

Tab. 5: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel. Gezeigt sind jeweils die für die Herstellung der Gele verwendeten Reagenzien.

	10 % (m/V) Trenngel	**12,5 % (m/V) Trenngel**	**6 % (m/V) Sammelgel**
Monomerlösung	10 ml	12,5 ml	2 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml	7,5 ml	---
Sammelgelpuffer	---	---	2,5 ml
bidestilliertes Wasser	12 ml	9,5 ml	5,3 ml
10 % (m/V) Natriumdodecylsulfat	0,3 ml	0,3 ml	100 µl
10 % (m/V) Ammoniumpersulfat	150 µl	150 µl	50 µl
N,N,N´,N´-Tetramethyl-ethylendiamin	10 µl	10 µl	5 µl

Die Trenngellösung wurde bis *ca.* 4 cm unterhalb der Oberkante der Kammer eingefüllt und mit ddH_2O überschichtet. Nach dem Ende der Polymerisation wurde das Wasser abgegossen, ein Kamm mit der erforderlichen Anzahl an Taschen zwischen die Platten eingebracht und das Sammelgel oberhalb des Trenngeles aufgebracht. Nach Polymerisation des Sammelgels war das System einsatzbereit.

Monomerlösung: 30 % (m/V) Acrylamid-4K-Lösung (37,5:1)
(292,2 g/l Acrylamid 4K, 7,8 g/l Bisacrylamid 4K)

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

Zur Herstellung des Trenngelpuffers wurden 90,75 g Trisbase in 400 ml ddH_2O gelöst und der pH-Wert mit *ca*. 16 ml konz. HCl auf pH 8,8 eingestellt. Die Lösung wurde mit ddH_2O auf 500 ml aufgefüllt und durch einen 0,45- µm-Filter filtriert.

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

Zur Herstellung des Trenngelpuffers wurden 12 g Trisbase in 160 ml ddH_2O gelöst und der pH-Wert mit *ca*. 9 ml konz. HCl auf pH 6,8 eingestellt. Die Lösung wurde mit ddH_2O auf 200 ml aufgefüllt und durch einen 0,45-µm-Filter filtriert.

Geeignete Mengen Protein (*ca.* 80-100 µg pro Geltasche), sowie die Markerproteinlösung (siehe 2.1.13.3), wurden mit ddH_2O auf ein Volumen von 50 µl verdünnt. Nach Zugabe von 50 µl (+)-Probenpuffer wurden die Proben für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Vor dem Einbringen der Proben mittels einer 100 µl-Hamilton-Spritze wurden die Taschen mit 1 x Tankpuffer gespült. Freie Taschen wurden mit 100 µl eines 1:1 Gemisches aus (–)-Probenpuffer und ddH_2O versehen. Der Lauf erfolgte in 1 x Tankpuffer bei einer Stromstärke von 45 mA für *ca.* 3-4 h, bis die farblich markierte Front den Unterrand des Gels erreicht hatte.

1 x Tankpuffer:	25 mM	Tris
	190 mM	Glycin
	0,1 % (m/V)	SDS
	pH 8,6 mit konz. NaOH	

(+)-Probenpuffer:	125 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	4 % (m/V)	SDS
	20 % (V/V)	Glyzerin
	10 % (V/V)	β-Mercaptoethanol
	0,002 % (m/V)	Pyronin Y

(–)-Probenpuffer: 125 mM Tris/HCl, pH 6,8
4 % (m/V) SDS
20 % (V/V) Glyzerin
10 % (V/V) β-Mercaptoethanol

2.2.6.3 Immunoblotting von Proteinen (*Western blotting*)

2.2.6.3.1 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen

Zur immunchemische Analyse der mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden die Proteine im elektrischen Feld auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (*Western blotting*). Hierfür wurden das Gel und ein Stück Nitrozellulosemembran passender Größe mit Transferpuffer getränkt. Zunächst wurde das Gel auf ein Gel-Blotting-Papier gelegt. Die Nitrozellulosemembran wurde luftblasenfrei auf das Gel aufgebracht und auf der Membran ein zweites Gel-Blotting-

Papier platziert. Nun wurden die Membran und die Blotting-Papiere zwischen zwei Schaumstoffschwämmen und zwei Plastikhalterungen in die mit Transferpuffer gefüllte Immunblot-Transfer-Kammer eingehängt. Die Kammer wurde an ein Netzgerät mit einer konstanten Stromstärke von 125 mA bei einer Leistung von 2 W angeschlossen. Der Proteintransfer erfolgte im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Das Gel war der Kathode, die Membran der Anode zugewandt, so dass die negativ geladenen Proteine aus dem Gel zur Membran wanderten. Die Dauer des Proteintransfers war abhängig von der Größe des nachzuweisenden Proteins. Für Rho-GTPasen (*ca*. 22 kDa) war der Proteintransfer nach 12 Stunden und für Phospholipasen (*ca*. 148 kDa) nach 18 Stunden abgeschlossen. Nach dem Transfer wurde die Spur auf der Nitrozellulosemembran, die den Marker enthielt, abgetrennt, in ddH_2O gewaschen und die transferierten Markerproteine mit blauer Tinte (3,3 % (V/V) Tinte in 0,3 % (V/V) Tween-Lösung) gefärbt und anschließend markiert. Die Proteine auf der Nitrozellulosemembran wurden immunchemisch analysiert.

Transferpuffer:	25 mM	Tris
	190 mM	Glycin
	20 % (V/V)	Methanol
	pH 8,6 mit konz. NaOH	

2.2.6.3.2 Immunchemische Analyse transferierter Proteine

Zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran wurde diese nach dem Proteintransfer eine Stunde lang in PBS/Tween mit 5 % (m/V) Magermilchpulver vorbehandelt. Inkubationen der Membran in Flüssigkeiten wurden auf dem Rundschüttler vollzogen. Die Bindung des ersten, für das jeweilige Protein spezifischen, Antikörpers erfolgte für zwei Stunden bei RT unter ständigem Schütteln. Hierfür wurde die Antikörperlösung geeignet in PBS/Tween verdünnt und mit 0,05 % (m/V) Thimerosal versetzt. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen der Membran in PBS/Tween für je sieben Minuten. Die Bindung des zweiten, gegen den ersten Antikörper gerichteten Antikörpers (Peroxidase-gekoppeltes Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-IgG, siehe 2.1.13.2) erfolgte in einer mit PBS/Tween 1:1000 verdünnten Lösung bei RT für 45 min. Es folgten wieder drei Waschschritte für je fünf Minuten in PBS/Tween und einer in ddH_2O. Mittels ECL-*Western-Blot*-Detektionsreagenz erfolgte die Identifikation der Banden der jeweiligen Proteine: Hierfür wurde die Membran einer 1:1-

Mischung der Lösungen für eine Minute ausgesetzt. Die so behandelte Membran wurde ohne Zeitverzug mit Frischhaltefolie auf einer Glasplatte fixiert und durch direktes Auflegen wurde in dunkler Umgebung ein Röntgenfilm belichtet. Die Belichtungsdauer variierte zwischen 10 s und 60 min. Nachfolgend wurde der Film entwickelt und die Position der Banden der Markerproteine übertragen.

PBS-Puffer:	80 mM	Na_2HPO_4
	20 mM	NaH_2PO_4
	100 mM	NaCl
	pH 7,5 mit NaOH	

PBS/Tween: PBS-Puffer mit 0,05 % (V/V) Tween

2.2.7 Bestimmung der Phospholipase C-Aktivität in COS-7-Zellen

Durch Stimulation der PLC-Isoenzyme werden infolge hydrolytischer Spaltung des Substrats PIP_2 die beiden *second messenger* IP_3 und DAG gebildet. IP_3 wird anschließend mittels Phosphatasen zu IP_2, IP und weiter zu Inosit hydrolysiert. Die durch Aktivierung der PLC-Isoenzyme generierten Inositphosphate wurden mittels Anionenaustauschchromatographie analysiert. Zunächst wurden 0,13 x 10^6 COS-7-Zellen, die in Kultur 20 bis 31 Passagen durchlaufen hatten, in 12-Loch-Zellkulturschalen ausgesät, über 24 h bei 37 °C und 10 % CO_2 inkubiert und am folgenden Tag mit den entprechenden Plasmid-DNA-Konstrukten transfiziert (siehe 2.2.4.1). Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die COS-7-Zellen radioaktiv markiert (siehe 2.2.7.1) und am folgenden Tag die gebildeten Inositphosphate mittels Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt und ihre Menge im Szintillationszähler ermittelt.

2.2.7.1 Radioaktive Markierung

Die radioaktive Markierung der COS-7-Zellen wurde in Anlehnung an eine Arbeit von Offermanns und Simon (1995) durchgeführt. Hierzu wurde D-*myo*-[2-^{3}H(N)]-Inosit verwendet. Das ^{3}H-markierte Inosit wird in den Zellen zur Synthese von [^{3}H]PIP_2 verwendet, welches wiederum durch PLC-Isoenzyme zu ^{3}H-markierten Inositphosphaten hydrolysiert wird. Die COS-7-Zellen wurden mit 500 µl PBS-Puffer (siehe 2.2.3.2.1)

gewaschen und für 20 Stunden bei 37 °C und 10 % CO_2 in 400 µl DMEM-Medium (siehe 2.2.3.2.1) inkubiert, das D-*myo*-[2-^{3}H(N)]-Inosit mit einer Konzentration von 2,5 µCi/ml und 10 mM LiCl enthielt. Eine 24-stündige Inkubation mit LiCl wurde in einer Arbeit von Zhang und Neer (2001) beschrieben. Lithiumchlorid hemmt in den Zellen die Enzyme Inositpolyphosphat-1-phosphatase und Inositmonophosphatase, die den Abbau von IP_2 über IP zu Inosit katalysieren. Die dadurch akkumulierten Inositphosphate wurden mittels Säulenchromatographie analysiert.

2.2.7.2 Säulenchromatographie und Messung der Inositphosphate

Die Inositphosphate wurden 48 Stunden nach der Transfektion in Anlehnung an eine Arbeit von Offermanns und Simon (1995) gemessen. COS-7-Zellen wurden mittels 400 µl PBS gewaschen und zur Extraktion der Inositphosphate mit 200 µl eiskalter 10 mM Ameisensäure für 30 Minuten auf Eis in den Zellkulturschalen inkubiert. Danach wurde der Überstand in Reagiergefäße (1,5 ml) überführt, zur Neutralisation der Ameisensäure 300 µl einer 10 mM Ammoniumhydroxid-Lösung zugegeben und die Proben durchmischt. Zur Abtrennung von noch vorhandenen Zellresten wurden die Proben bei 15 000 x *g* für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf das Dowex-Harz der Chromatographiesäulen aufgetragen, das zuvor mit 3 ml ddH_2O gewaschen wurde. Die weiteren Schritte der Säulenchromatographie wurden in Anlehnung an eine Arbeit von Wu *et al.* (1992) durchgeführt. Zur Elution von Inosit und Glycerolphosphoinosit wurde das Dowex-Material einmal mit 3 ml ddH_2O und anschließend zweimal mit je 3,5 ml 5 mM Natriumtetraborat, 60 mM Natriumformiat gewaschen. Die Inositphosphate IP, IP_2 und IP_3, die durch elektrostatische Anziehungskräfte an das positiv geladene Harz gebunden waren, wurden mittels dreimaliger Zugabe von je 1 ml 1 M Ammoniumformiat/0,1 M Ameisensäure in Szintillationsröhrchen eluiert. Das Eluat wurde mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit (Zinsser Analytic) gemischt und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler gemessen.

2.2.7.3 Regeneration der Matrix

Um das Dowex-Harz zu regenerieren, wurden 8 ml 2 M Ammoniumformiat, 0,1 M Ameisensäure und anschließend 10 ml ddH_2O zur Neutralisation auf die Säulen gegeben. Zur Lagerung wurden die Säulen mit 3 ml ddH_2O befüllt und verschlossen.

2.2.7.4 Präparation der Matrix

Um eine Bindung von Inositphosphaten an die Säulenmatrix zu ermöglichen, wurde diese von der Chlorid-Form in die Formiat-Form überführt. Dazu wurden 50 ml Dowex-1 (Cl^--Form) für eine Stunde bei RT in 200 ml 1 N NaOH inkubiert, wobei die basische Lösung mit einem Glasstab alle 5 min gerührt wurde. Nach der Sedimentation der rötlich-orangen Matrix wurde der Überstand dekantiert und erneut 200 ml 1 N NaOH zugegeben. Nach Rühren und Sedimentation wurde der Überstand erneut dekantiert und die Matrix mit 200 ml 1 M Ameisensäure versetzt und gerührt, wobei die Farbe des Harzes in hell-gelb umschlug. Nach der Sedimentation wurde der Überstand dekantiert und das Harz zweimal mit ddH_2O gewaschen. Die präparierte Matrix wurde anschließend in 50 ml ddH_2O aufgenommen und entweder direkt zur Befüllung der Säulen verwendet oder bei 4 °C gelagert.

2.2.8 Bestimmung von Proteinfunktionen *in vitro*

2.2.8.1 Bestimmung der [^{35}S]GTPγS-Bindung von Rho-GTPasen

Die Konzentration an GTP-bindenden Molekülen in allen verwendeten Cholatextrakten aus der partikulären Fraktion von mit Baculoviren infizierten Insektenzellen wurde in Bindungsversuchen mit radioaktiv markiertem [^{35}S]GTPγS in Anlehnung an die Methode nach Sternweis und Robishaw (1984) ermittelt. Um die Proteinmengen in den verwendeten Detergensextrakten anzugleichen, erfolgte eine erste Verdünnung in GDP-haltigem Solubilisierungspuffer (siehe 2.2.5.3). Der zur Gewinnung der Detergensextrakte verwendete Solubilisierungspuffer enthielt GDP in einer Konzentration von 3 µM. Um zu verhindern, dass GDP mit dem verwendeten [^{35}S]GTPγS um die Bindungsstellen der Rho-GTPasen konkurriert, wurden die Detergensextrakte im Verhältnis 1:15 mit GDP-freiem Solubilisierungspuffer verdünnt. Die finale Konzentration an GDP betrug so schließlich 50 nM. Ansteigende Volumina (2,5/5,0/7,5/10,0 µl) dieser so verdünnten Extrakte wurden eingesetzt, die Volumendifferenz wurde jeweils mit Solubilisierungspuffer mit einer Konzentration von 200 nM GDP auf 10 µl ergänzt. Das Reaktionsgemisch lag 1,3-fach konzentriert vor. Jeweils 10 µl der Extraktverdünnungen wurden mit 30 µl des konzentrierten Reaktionsgemisches in einem 3 ml-Reaktionsröhrchen versetzt. Für die Bestimmung der unspezifischen Bindungsstellen wurde in Kontrollansätzen zusätzlich 1 mM unmarkiertes GTPγS zu den Proben gegeben. Nach kurzem Mischen und Verschließen der Reaktionsröhrchen erfolgte die Inkubation im Wasserbad bei 30 °C für

4,5 h. Die Reaktion wurde durch Verdünnung des Ansatzes in 2 ml eiskaltem Waschpuffer beendet und der Ansatz durch Nitrozelluloserundfilter abfiltriert. Es erfolgte viermaliges Waschen der Filter mit 2 ml Waschpuffer. Danach wurden die Filter luftgetrocknet, in Szintillationsröhrchen überführt und mit 4 ml Flüssigszintillator (Perkin Elmer) versetzt. Die gebundene Radioaktivität wurde durch Szintillationszählung ermittelt. Die eingesetzte Radioaktivität wurde als Mittelwert einiger Messungen von 30 µl des Reaktionsgemisches bestimmt.

Reaktionsgemisch

1,3-fach konzentriert:	33,3 mM	HEPES/NaOH, pH 8,0
	1,33 mM	EDTA
	1,33 mM	DTT
	26,67 mM	$MgCl_2$
	133,3 mM	NaCl
	0,133 % (m/V)	GENAPOL C100®
	1,3 µM	[^{35}S]GTP γS
	(46,25 GBq/mmol)	

Das Verhältnis von radioaktivem [^{35}S]GTPγS und nicht radioaktivem GTPγS wurde so eingestellt, dass sich die gemessene Radioaktivität im Reaktionsvolumen auf *ca.* 170 000 bis 200 000 cpm belief.

Die im Ansatz gesamt vorliegende Stoffmenge [^{35}S]GTP γS betrug 40 pmol. Somit konnte die gebundene Radioaktivität als Stoffmenge ausgedrückt werden:

Formel 3: Gebundene Radioaktivität

$$Y = \frac{X \cdot 40 \cdot 10^{-12}\,\text{mol}}{X_T}$$

Parameter	Einheit	Kommentar
Y	mol	gebundenes [^{35}S]Guanosin-5´-*O*-(3-thiotriphosphat)
X	cpm	gemessene Aktivität – unspezifische Bindung in cpm
X_T	cpm	eingesetzte Radioaktivität

Mittels des Programmes GraphPadPrism® erfolgte die Darstellung von gebundenem [^{35}S]GTPγS in Abhängigkeit vom eingesetzten Volumen der Extraktverdünnung. Durch lineare Regression wurden die Werte an Geraden angepasst; die Steigung der Geraden lieferte Werte für die Anzahl der Bindungsstellen pro µl Volumen. Unter Berücksichtigung der Verdünnung und der Proteinkonzentration der Extrakte wurde die Anzahl der [^{35}S]GTPγS-Bindungsstellen pro mg Protein berechnet.

2.2.8.2 Bestimmung der Phospholipase-C-Aktivität im zellfreien System

Die Bestimmung der PLC-Aktivität *in vitro* wurde nach einer Modifikation des Protokolls von Hepler *et al.* durchgeführt. Das Volumen des Gesamtansatzes betrug 60 µl. Der Reaktionsansatz enthielt 10 µl einer in 1,2-fach konzentriertem Reaktionspuffer (HEPES- oder Tris/Maleat-Puffer) verdünnten löslichen Fraktion von PLCγ$_2$- bzw. PLCβ$_2$-exprimierenden *Sf*9-Zellen, 10 µl einer in 1,2-fach konzentriertem Reaktionspuffer angesetzten 3,25 mM $CaCl_2$-Lösung und 10 µl einer 600 µM GDP- oder GTPγS-Lösung, welche ebenfalls in 1,2-fachem Reaktionspuffer angesetzt worden waren. Zu diesem Ansatz wurden 5 µl von unverdünnten oder verdünnten Detergensextrakten aus Membranen Rac2-exprimierender *Sf*9-Zellen gegeben. Als Detergens wurden 5 µl einer 12 mM Deoxycholat (DOC) -Lösung (in H_2O) hinzugefügt. In 60 µl betrug die finale Konzentration an freien Ca^{2+}-Ionen 30 nM bzw. in Versuchen mit der PLCβ$_2$ alternativ 150 nM, die Konzentration von GDP oder GTPγS 100 µM und die Konzentration von DOC 1 mM. Die verbleibenden 20 µl des Reaktionsansatzes enthielten die in 1,2-fach konzentriertem Reaktionspuffer gelösten Lipidvesikel, die folgendermaßen hergestellt wurden: Zunächst wurden die in Chloroform gelösten Phospholipide in einem 10 ml-Wheaton-Kultur-Röhrchen gemischt und unter Stickstoff-Atmosphäre eingedampft. Das Pellet wurde in 1,2-fach konzentrierten Reaktionspuffer aufgenommen (20 µl pro Ansatz). Zur Bildung der Phospholipidvesikel wurde die Suspension für 30 min bei RT gemischt und anschließend für 15 min bei 4 °C im Ultraschallbad inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde dann durch die Zugabe von 20 µl dieser Phospholipidvesikel-Suspension zu der Proteinlösung gestartet. Die finale Konzentration der Phospholipide betrug 33,4 µM [^{3}H]PIP_2 (185 GBq/mmol) bzw. 536 µM Phosphatidylethanolamin (PE). Nach einer Inkubation des Reaktionsgemisches bei 30 °C im Wasserbad für 45 min wurde die Reaktion mit 350 µl Stopplösung I beendet und die Lösung gut gemischt. Nach einer Inkubation von mindestens 10 min auf Eis wurden 100 µl Stopplösung II zugegeben, der

Ansatz gemischt und zur Verbesserung der Phasentrennung für 1 min bei 16 100 x *g* und RT zentrifugiert. Von der oberen, wässrigen Phase, welche die löslichen Inositphosphate enthielt, wurden 200 µl abgenommen, mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Perkin Elmer) versetzt und die Radioaktivität für 5 min in einem Szintillationszähler gemessen. Zur Messung der gesamten, in den Proben enthaltenen Menge an Radioaktivität (*totals*) wurden 20 µl Phospholipidvesikel-Suspension mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit vermischt. Mittels der für die Proben bestimmten Radioaktivität (cpm), der Gesamtmenge an PIP_2 (pmol), der Inkubationszeit (min) und unter Berücksichtigung eines Korrekturfaktors von 1,715 (da nicht die gesamte Menge der Probe gemessen wurde) und eines Korrekturfaktors von $0{,}972^{-1}$ (da der wässrige Puffer der Proben zu einer Verringerung des Messsignals führt) konnte die Bildung der Inositphosphate wie folgt berechnet werden:

Formel 4: Bildung der Inositphosphate pro Minute.

$$\text{Inositphosphate} = \frac{\text{Probe} \times 2000\ \text{pmol} \times 1{,}715}{\textit{totals} \times \text{Inkubationszeit} \times 0{,}972}$$

Parameter	Einheit	Kommentar
Inositphosphate	pmol/min	Menge der gebildeten Inositphosphate
Probe	cpm	gemessene Aktivität
totals	cpm	gesamte, eingesetzte Radioaktivität
Inkubationszeit	min	Inkubationszeit

Alternativ konnte die PLCγ_2 in der Gegenwart von *ca.* 10 µM freien Ca^{2+}-Ionen aktiviert werden. Dies diente für einen Aktivitätsvergleich der in der löslichen Fraktion von PLCγ_2-exprimierenden *Sf*9-Zellen vorhandenen Phospholipasen bzw. als Positivkontrolle. In diesem Fall kam es zu folgenden Änderungen im oben beschriebenen Versuchsablauf: GDP- oder GTPγS-Lösungen wurden durch 10 µl des 1,2-fach konzentrierten Reaktionspuffers ersetzt und anstelle von Detergensextrakten wurden 5 µl H_2O eingesetzt. Die finale Konzentration der freien Ca^{2+}-Ionen belief sich auf 10 µM. Die DOC-Lösung hatte eine finale Konzentration von 2,5 mM. Das Reaktionsgemisch wurde im Wasserbad bei 30 °C für 45 min inkubiert.

Phospholipide:

(pro 60 µl Reaktionsvol.)	2,2 µl	Phosphatidylethanolamin (10 mg/ml)
	2,2 µl	PIP_2 (1 mg/ml)
	1,0 µl	$[^3H]PIP_2$

Reaktionspuffer final (mit HEPES):

	50 mM	HEPES/NaOH, pH 7,2
	3 mM	EGTA
	70 mM	KCl

Reaktionspuffer final (mit Tris/Maleat):

	50 mM	Tris/Maleat, pH 7,3
	3 mM	EGTA
	70 mM	KCl

Stopplösung I:	500 VT	$CHCl_3$
	500 VT	MeOH
	3 VT	HCl konzentriert

Stopplösung II:	1 M	HCl
	5 mM	EGTA

2.2.9 Auswertung und Darstellung von Messergebnissen

Grundsätzlich wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und als Mittelwerte ± Standardabweichungen dargestellt. Messergebnisse wurden mithilfe des Programmes GraphPad Prism™, Version 3.03, ausgewertet und graphisch dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung der Plasmidvektoren für Mutanten von Rac2, Rac1 und Cdc42

Es ist bekannt, dass die kleine Rho-GTPase Rac2 direkt an ihren Effektor, die PLCγ_2, binden und ihn aktivieren kann. Welche strukturellen Elemente des Rac2-Moleküls hierbei eine Rolle spielen, blieb bisher allerdings weitgehend unklar. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, die für die Interaktion der beiden Proteine wichtigen Strukturen bzw. die dabei involvierten Aminosäuren des Rac2-Moleküls zu ermitteln. Um zu analysieren, welche Aminosäurereste von Rac2 für die Interaktion mit der PLCγ_2 essentiell sind, wurden Rac2-Mutanten hergestellt, die entweder in der *switch-I*- oder der *switch-II*-Region ausgetauschte Aminosäurereste trugen. Für die einzelnen Aminosäurereste dieser beiden Regionen, die mutiert wurden, war in der Vergangenheit gezeigt worden, dass sie für eine Interaktion von Rac-GTPasen mit verschiedenen Regulatoren und Effektoren wichtig sind.

Wie in Abb. 3 ersichtlich wird, befindet sich in der *switch-I*-Region von Rac2 an der Stelle 36 die Aminosäure Valin (V), an der Stelle 37 Phenylalanin (F), an der Stelle 38 Aspartat (D) und an der Stelle 43 Asparagin (N). Kurz vor der *switch-II*-Region findet sich in Position 56 die Aminosäure Tryptophan (W), innerhalb der *switch-II*-Region an der Stelle 66 Arginin (R) und an der Stelle 67 schließlich Leucin (L). Diese Positionen wurden ausgewählt und durch Alanin (A) ersetzt, da dieses nur über eine Methylgruppe als Seitenrest verfügt und dadurch kaum Bindungsfähigkeiten aufweist. Des Weiteren wurde noch eine Doppelmutante von Rac2 hergestellt, die an den Stellen 36 und 66 mutiert wurde. An der Aminosäureposition 40 der *switch-I*-Region wurde das dort wildtypisch vorkommende Tyrosin (Y) durch Cystein (C) ersetzt, da man bereits in anderen Arbeiten beobachtet hatte, dass durch diesen Austausch die Fähigkeit von Rac2 zur Interaktion mit wichtigen Regulatoren verloren ging. Zusätzlich wurde für weitere Versuche eine Rac2-Mutante erzeugt, die an Position 56 ein Phenylalanin aufwies, sowie eine Cdc42-Mutante, die statt des an dieser Position wildtypisch vorkommenden Phenylalanins nun ein Tryptophan trug. Außerdem wurde eine Mutante von Rac1 hergestellt, die an Position 56 statt des dort wildtypisch vorkommenden Tryptophans nun ein Alanin aufwies.

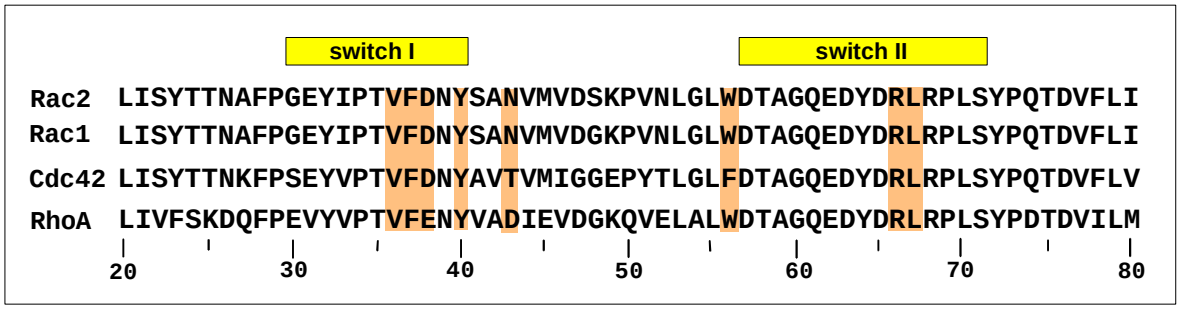


Abb. 3: Aminosäuresequenz von *ras-related C_3 botulinum toxin substrate 2* (Rac2) und verwandter kleiner *ras-homologous protein* (Rho)-GTPasen. Farblich hervorgehoben sind diejenigen Aminosäurepositionen der Regionen *switch-I* (von Aminosäure 30 bis 40) und *switch-II* (von Aminosäure 57 bis 71), die für die Mutationen ausgewählt wurden. Des Weiteren ist zu erkennen, dass diese Aminosäuren innerhalb der gezeigten Rho-GTPasen hochkonserviert sind. Eine Ausnahme zeigen nur die Positionen 38, 43 und 56.

Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Rac2-Mutanten ihre Fähigkeit zur Bindung von GTP, das für jegliche biochemische Reaktion des Enzyms als Energielieferant erforderlich ist, nicht verloren ging (siehe 3.3). Für die Expression von Fremdproteinen in eukaryotischen Zellen musste cDNA, die für die zu exprimierenden Proteine kodiert, in geeignete Expressionsvektoren ligiert werden. In dieser Arbeit wurde für die Expression in *Sf*9-Insektenzellen der Baculovirustransfervektor pVL1393 verwendet und für die Expression in COS-7-Zellen der Vektor pcDNA3.1(+). Nach der Mutagenese-PCR wurde die an je einem Nukleotid-Triplett veränderte Rac2-DNA entweder in einen pVL1393-Vektor oder in pcDNA3.1(+) ligiert, in kompetente *E.coli*-Bakterien transformiert, dort im Zuge der Bakterienvermehrung vervielfacht und schließlich präpariert. Gleiches geschah mit den zusätzlich untersuchten Rac2-Mutanten $Rac2^{G12V}$, $Rac2^{W56A}$, $Rac2^{G12V/W56A}$, $Rac2^{L67A}$, $Rac2^{G12V/L67A}$, $Rac2^{W56F}$, $Rac2^{G12V/W56F}$, der Rac1-Mutanten $Rac1^{W56A}$ und den Cdc42-Mutanten $Cdc42^{F56W}$ und $Cdc42^{G12V/F56W}$, die in pcDNA3.1(+) ligiert waren. Um zu ermitteln, ob die Plasmide das gewünschte *insert* enthielten, wurde eine Restriktionsanalyse mittels der Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI durchgeführt. Diejenigen DNA-Präparationen, die Rac- bzw. Cdc42-DNA enthielten, konnten jetzt mittels vollständiger Sequenzierung auf ihre Nukleotidabfolge untersucht werden, um festzustellen, ob die Mutagenese zur gewünschten Mutation geführt hatte. Abb. 4 zeigt einen exemplarischen Ausschnitt der Nukleinsäure- und Aminosäuren-Sequenz von wildtypischem Rac2 im Vergleich zur Mutante $Rac2^{D38A}$.

```
Rac2          TACATCCCCACCGTGTTTGACAACTATTCAGCCAATGTGATGGTGGACAGC
D38A          TACATCCCCACCGTGTTTGCCAACTATTCAGCCAATGTGATGGTGGACAGC
              ******************** ******************************
AS-Sequenz     Y  I  P  T  V  F  A  N  Y  S  A  N  V  M  V  D  S
```

Abb. 4: Ausschnitt der Nukleinsäuresequenzen von wildtypischem *ras-related C_3 botulinum toxin substrate 2* (*Rac2*), Rac2^{D38A} (*D38A*) und der mutierten Aminosäure-Sequenz (*AS-Sequenz*). Um die Mutation zu erzeugen, wurde ein *primer*-Paar konstruiert, dessen Sequenz ein Nukleotid-Triplett enthielt, das anstelle des wildtypischen Aspartats an der Position 38 für Alanin kodierte und zur komplementären Bindung an die ursprüngliche Rac2-Desoxyribonukleinsäure (Rac2-DNA) fähig war. Die *primer* wurden nach der humanen Rac2-*complementary*-DNA (cDNA)-Sequenz, die in der Datenbank (NM_002872) des *National Center for Biotechnology Information* enthalten ist, entwickelt Es ist zu sehen, dass das Triplett GAC, das für Aspartat kodiert, durch das Triplett GCC, das für Alanin kodiert, ausgetauscht wurde. Mittels Polymerase-Kettenreaktion konnte eine neue DNA, die die Mutation trug, generiert werden. Diese wurde präpariert und sequenziert.

3.2 Expression der Mutanten von Rac2 in *Sf*9-Zellen

Diejenigen DNA-Präparationen, die die gewünschte Mutation trugen, wurden nun für die Expression in Insektenzellen verwendet. Hierfür wurde die Rac2-DNA mit linearisierter Baculovirus-DNA rekombiniert und *Sf*9-Insektenzellen damit transfiziert. Nach der Amplifikation der Baculoviren wurde eine größere Anzahl an Zellen mit diesen infiziert und das gewünschte Protein danach mittels Präparation aus ihnen gewonnen. Dazu wurden die Zellen aufgeschlossen und durch Zentrifugation in Kerne, Zytosol und membranären Anteil aufgetrennt. Aus der membranären Fraktion wurden anschließend die posttranslational mit einem Isoprenylrest versehenen Rac2-Proteine gewonnen, indem sie durch 1 %iges Natriumcholat aus ihrer Membranverankerung gelöst und in ein Detergensextrakt überführt wurden. Somit konnte man die gewünschten carboxylterminal veränderten Rho-GTPasen von den nicht-modifizierten, nicht in der Membran verankerten Formen trennen. Um nun nachzuweisen, dass die Detergensextrakte die Rac2-Mutanten enthielten, wurden die im Detergenzextrakt enthaltenen Proteine im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, mittels *Western blotting* auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend eine immunchemische Analyse durchgeführt (siehe Abb. 5). In den Ansätzen konnten mittels eines gegen Rac2 gerichteten Antikörpers Proteine nachgewiesen werden, die im Vergleich mit Markerproteinen bekannter Größe eine molekulare Masse zeigten, die

der von Rac2 (22 kDa) entsprach. Somit waren die gewünschten Mutanten von Rac2 in den *Sf*9-Zellen exprimiert worden.

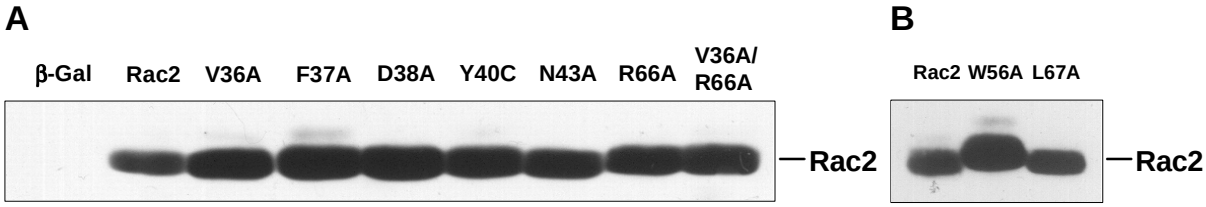


Abb. 5: Immunchemischer Nachweis der *ras-related C_3 botulinum toxin substrate* 2 (Rac2)-Mutanten in Detergensextrakten der membranären Fraktion von Baculovirus-infizierten Ovarialzellen von *Spodoptera frugiperda* (*Sf*9-Insektenzellen). *Sf*9-Zellen wurden mit Baculoviren, die für wildtypisches Rac2 (*Rac2*) oder Rac2-Mutanten (*$Rac2^{V36A}$*, *$Rac2^{F37A}$*, *$Rac2^{D38A}$*, *$Rac2^{Y40C}$*, *$Rac2^{N43A}$*, *$Rac2^{R66A}$*, *$Rac2^{V36A/R66A}$* (Abb. A); *$Rac2^{W56A}$* und *$Rac2^{L67A}$* (Abb. B)) kodierten, infiziert, nach 72 h geerntet, homogenisiert und von dem Homogenat mittels Zentrifugation bei 300 *g* Zellkerne und nicht aufgeschlossene Zellen abgetrennt. Der Überstand wurde durch Zentrifugation bei 12 000 *g* in eine lösliche und eine partikuläre, Membranen enthaltende Fraktion getrennt. Durch Zugabe von 1 % (m/V) Natriumcholatpuffer wurden aus der membranären Fraktion die membranverankerten Proteine herausgelöst und mittels Zentrifugation bei 12 000 *g* im Überstand angereichert. Aliquots dieser Detergensextrakte (je 60 µg Gesamtprotein bei Abb. A und je 50 µg bei Abb. B) wurden auf ein 12,5 %iges Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel aufgetragen, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit einem Anti-Rac2-Antikörper immunchemisch analysiert. Als Kontrolle wurden 60 µg Protein aus einem Detergensextrakt der membranären Fraktion von *Sf*9-Zellen, die mit β-Galaktosidase-kodierenden Baculoviren (*β-Gal*) infiziert worden waren, ebenfalls mit einem Anti-Rac2-Antikörper immunchemisch analysiert.

3.3 Bestimmung der Guaninnukleotid-Bindungsstellen der mutierten Rho-GTPasen

Die hier beschriebenen Rac2-Mutanten wurden in *Sf*9-Zellen, die mit rekombinanten Baculoviren infiziert worden waren, exprimiert und für Versuche im zellfreien System nach Zellaufschluss mittels Natriumcholat aus der membranären Fraktion der *Sf*9-Zellen extrahiert. Um die Menge an aktiven Rho-GTPasen in diesen Detergensextrakten zu quantifizieren, wurden Bindungsassays mit radioaktiv markiertem [^{35}S]GTPγS durchgeführt. Hierbei wurde in Abhängigkeit von einer aufsteigenden Menge an in Detergensextrakt gelöstem Protein die Bindung von radioaktiv markiertem [^{35}S]GTPγS bei einer konstanten Konzentration des [^{35}S]GTPγS von 1 µM gemessen. Da die Affinität von

Rac2 für GTP im nanomolaren Bereich liegt, war die Konzentration des [^{35}S]GTPγS im Versuch *ca.* 100-mal höher als die Dissoziationskonstante von Rac2 für GTP und die Messung somit quantitativ. Das in den Detergensextrakten enthaltene GDP lag zudem in etwa 20-fach niedrigerer Konzentration als das radioaktiv markierte [^{35}S]GTPγS vor und konnte dadurch bei der Betrachtung des Bindungsverhaltens vernachlässigt werden. Wie in Abb. 6 ersichtlich wird, nahm die Menge an gebundenem [^{35}S]GTPγS bei allen Rac2-Mutanten linear mit steigender Proteinmenge zu. Jedoch sind auch Unterschiede im Bindungsverhalten zu erkennen. Auch im Detergensextrakt β-Galaktosidase-exprimierender Zellen, das als Kontrolle verwendet wurde, konnten aufgrund der Anwesenheit endogener Rho-GTPasen Bindungen von [^{35}S]GTPγS nachgewiesen werden, ihre Anzahl lag bei 43,40 pmol/mg Gesamtprotein (Abb. 6A), 23,17 pmol/mg Gesamtprotein (Abb. 6B), 31,62 pmol/mg Gesamtprotein (Abb. 6C) und 54,31 pmol/mg Gesamtprotein (Abb. 6D). Für die Bestimmung der Guaninnukleotid-Bindungsstellen der im Cholatextrakt enthaltenen Rac2-GTPasen wurden die für endogene Rho-GTPasen erhaltenen Werte abgezogen. So konnten für Rac2^{F37A} und Rac2^{Y40C} (Abb. 6A) 80,82 pmol/mg Gesamtprotein bzw. 163,32 pmol/mg Gesamtprotein an GTP-Bindungsstellen berechnet werden. Für Rac2^{V36A}, Rac2^{R66A} und Rac2$^{V36A/R66A}$ (Abb. 6B) betrug die Anzahl an GTP-Bindungsstellen 108,88 pmol/mg Gesamtprotein, 188,75 pmol/mg Gesamtprotein und 272,34 pmol/mg Gesamtprotein bestimmt. Die Werte von Rac2^{D38A} und Rac2^{N43A} (Abb. 6C) lagen bei 246,16 pmol/mg Gesamtprotein und 116,25 pmol/mg Gesamtprotein, die von Rac2^{W56A} und Rac2^{L67A} (Abb. 4D) bei 34,65 pmol/mg Gesamtprotein bzw. bei 32,33 pmol/mg Gesamtprotein. Berechnete man die Anzahl der GTP-Bindungsstellen von Rac2, so ergaben sich Werte von 213,58 pmol/mg Gesamtprotein (Abb. 6A), 244,39 pmol/mg Gesamtprotein (Abb. 6B), 184,03 pmol/mg Gesamtprotein (Abb. 6C) und 123,25 pmol/mg Gesamtprotein (Abb. 6D). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sich für alle Rac2-Mutanten bei der Berechnung der GTP-Bindungsstellen Werte im zweistelligen Bereich ermitteln ließen. Für die Rac2-Mutanten Rac2^{F37A}, Rac2^{W56A} und Rac2^{L67A} wurde im Vergleich zu wildtypischem Rac2 und den anderen Rac2-Varianten eine geringere Anzahl von GTP-Bindungsstellen ermittelt, die aber dennoch über derjenigen endogener Rho-GTPasen lag. Dies deutet darauf hin, dass in diesen Cholatextrakten weniger aktive GTPasen enthalten waren.

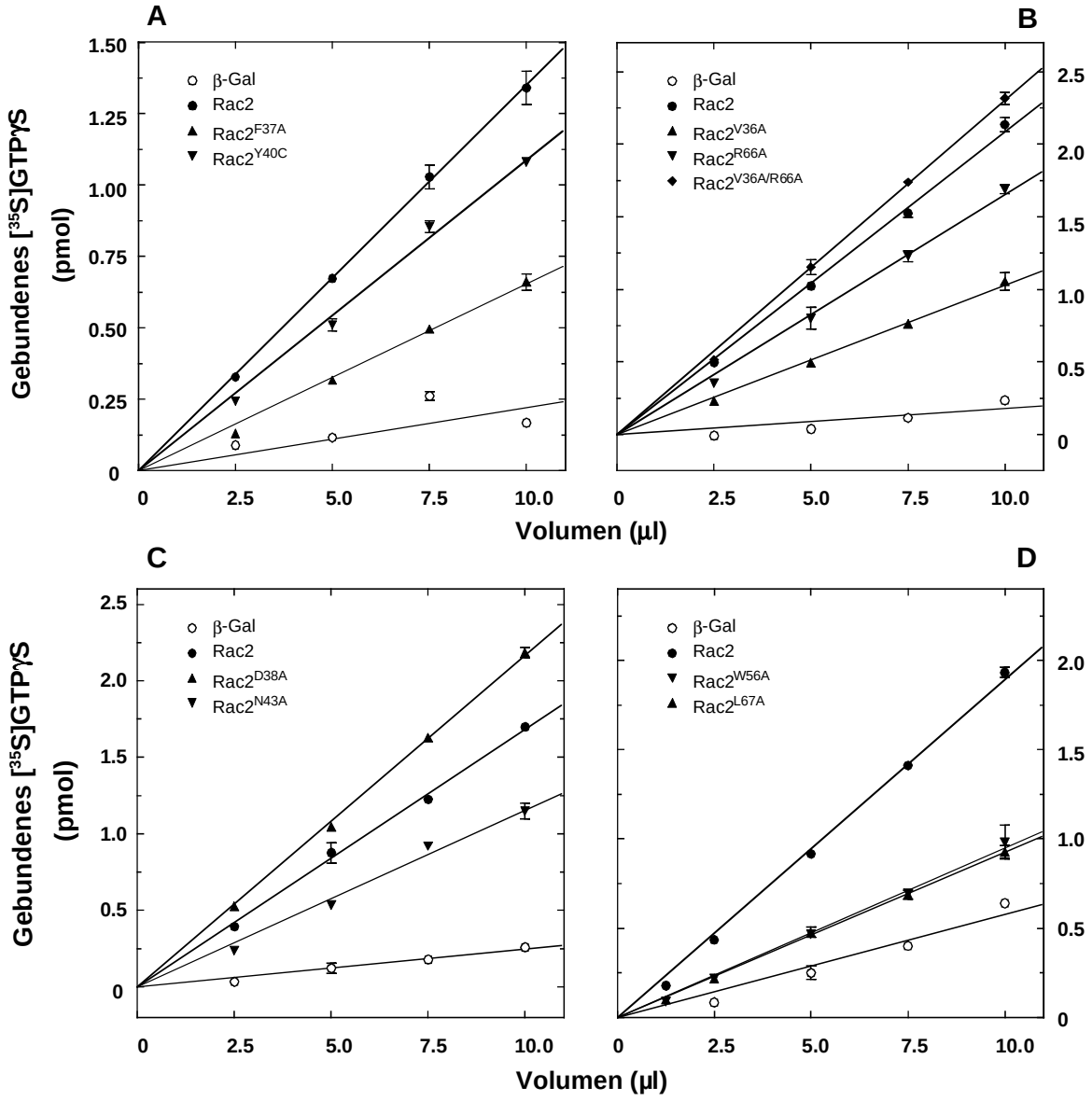


Abb. 6: Bindung von Guanosin-5´-*O*-(3-thiotriphosphat) (GTPγS) an Detergensextrakte von Membranen Baculovirus-infizierter Ovarialzellen von *Spodoptera frugiperda* (*Sf*9-Zellen). Detergensextrakte von Membranen Baculovirus-infizierter Zellen, die β-Galaktosidase (*β-Gal*), wildtypisches *ras-related C_3 botulinum toxin substrate 2* (*Rac2*) oder Rac2-Mutanten ($Rac2^{F37A}$, $Rac2^{Y40C}$ (Abb. A); $Rac2^{V36A}$, $Rac2^{R66A}$, $Rac2^{V36A/R66A}$ (Abb. B); $Rac2^{D38A}$, $Rac2^{N43A}$ (Abb. C); $Rac2^{W56A}$ und $Rac2^{L67A}$ (Abb. D)) exprimierten, wurden zunächst auf dieselbe Proteinkonzentration eingestellt (7,88 µg/ µl in Abb. A, 11,7 µg/µl in Abb. B, 11,7 µg/µl in Abb. C, 16 µg/µl in Abb. D), dann in Guanosin-5´-diphosphat **(**GDP)-freiem Solubilisierungspuffer im Verhältnis 1:15 verdünnt und anschließend mit geeigneten Volumina an Solubilisierungspuffer mit einer Konzentration von 200 nM GDP versetzt. Aliquots dieser Verdünnungen wurden für 4,5 Stunden bei 30 °C mit 1 µM [^{35}S]Guanosin-5´-*O*-(3-thiotriphosphat) (*[^{35}S]GTPγS*) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 2 ml eiskaltem Waschpuffer beendet. Anschließend wurden die Ansätze über Nitrozelluloserundfilter abfiltriert und die gebundene Radioaktivität mittels Szintillationszählung bestimmt. Die Stoffmenge an gebundenem [^{35}S]GTPγS wurde berechnet und als Mittelwert von Dreifachbestimmungen ± Standardabweichung dargestellt.

3.4 Messung der Aktivität der PLCγ_2 in Anwesenheit von Rac2-Mutanten

Um qualitativ zu untersuchen, ob die in 3.1 beschriebenen Aminosäurepositionen für eine Interaktion zwischen Rac2 und der PLCγ_2 wichtig sind, wurden Messungen der Aktivität der PLCγ_2 durchgeführt. Hierfür wurden die PLC-Enzyme, die entweder in der löslichen Fraktion von Zellen, die die PLCγ_2 exprimierten, oder gereinigt vorlagen, mit den jeweiligen Rac2-Mutanten, die in den unter 3.1 beschriebenen Detergensextrakten enthalten waren, und PtdIns*P*$_2$-enthaltenden Phospholipidvesikeln inkubiert. Dies geschah in Anwesenheit von freiem Ca^{2+} und GDP bzw. GTPγS. Freie Ca^{2+}-Ionen sind ein essentieller Kofaktor für die Aktivität der PLC-Enzyme. Die Ansätze mit GDP dienten zur Bestimmung der Basisaktivität der PLCγ_2, da Rac-GTPasen im GDP-gebundenen Zustand inaktiv sind. Die durch das schwer hydrolysierbare GTPγS behandelten Rac2-Protein zeigen im Gegensatz dazu deren Stimulierbarkeit an, da sie im GTPγS-gebundenen Zustand aktiv sind. Die Aktivität der PLCγ_2 wurde anhand der Bildung von radioaktiv markiertem IP_3 gemessen.

3.4.1 Einfluss von Rac2-Mutanten auf die Aktivität der PLCγ_2 im Vergleich zur PLC$\beta_2\Delta$

Mit den Ergebnissen aus den unter 3.2. beschriebenen Versuchen konnten nun die Mengen an aktiven GTPasen in den folgenden Untersuchungen angeglichen werden, sodass ein quantitativer Vergleich möglich war. Um zu untersuchen, ob die Rac2-Mutanten die PLCγ_2 noch aktivieren können, wurde der hier dargestellte Versuch durchgeführt. Hierbei wurden Rac2-Mutanten verwendet, die in der *switch-I*-Region und/oder in der *switch-II*-Region mutiert waren. Zusätzlich wurde ein weiterer bekannter Effektor von Rac2, die PLC$\beta_2\Delta$, mit den Rac2-Mutanten rekonstituiert, um zu untersuchen, ob hinsichtlich der Stimulation ihrer Aktivität durch diese Rac2-Varianten Gemeinsamkeiten oder Unterschiede zwischen PLCγ_2 und PLCβ_2 bestehen. Bei der PLC$\beta_2\Delta$ handelt es sich um eine Deletionsmutante der PLCβ_2, der der lange Carboxylterminus von Aminosäure 819 (Phenylalanin) bis Aminosäure 1166 (Glutamat) fehlt, welcher für die Interaktion von PLCβ-Enzymen mit der Gα_q-Untereinheit heterotrimerer G-Proteine notwendig ist. Allerdings ist bekannt, dass dieser für die Interaktion mit Rac-GTPasen nicht nötig ist. Es wurden die bereits

beschriebenen Detergensextrakte, die wildtypisches Rac2 oder Mutanten von Rac2 enthielten, mit der löslichen Fraktion von Zellen, die PLCγ_2 exprimierten, bzw. mit gereinigter PLC$\beta_2\Delta$ inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Aliquot eines Detergensextrakts aus der membranären Fraktion von β-Galactosidase-exprimierenden Zellen verwendet, um den Einfluss endogen vorhandener Rho-GTPasen untersuchen zu können. Wie in Abb. 7 ersichtlich wird, wurde zunächst die Aktivität der PLCγ_2 untersucht. Es ist zu erkennen, dass das Detergensextrakt aus β-Galactosidase-exprimierenden Zellen in Anwesenheit von GTPγS im Vergleich zum Ansatz mit GDP keine Erhöhung der Inositphosphatproduktion bewirkte. Rekonstituierte man die PLCγ_2 hingegen mit Rac2, so führte dies in Anwesenheit von GTPγS zu einem *ca*. 3,2-fachen Anstieg der Inositphosphatproduktion im Vergleich zum Ansatz mit GDP. Bei Rac2^{N43A} kam es sogar zu einem *ca*. 7-fachen Anstieg der Inositphosphatproduktion. Die Mutanten Rac2^{V36A} und Rac2^{R66A} bewirkten beide noch eine Steigerung der Inositphosphatproduktion um das *ca*. 2,3-fache, Rac2$^{V36A/R66A}$ steigerte sie um das Doppelte.Die Rac2-Varianten Rac2^{F37A}, Rac2^{D38A} und Rac2^{Y40C} führten dagegen bei Zugabe von GTPγS zu keiner vermehrten Inositphosphatproduktion im Vergleich zu den jeweiligen Ansätzen mit GDP.

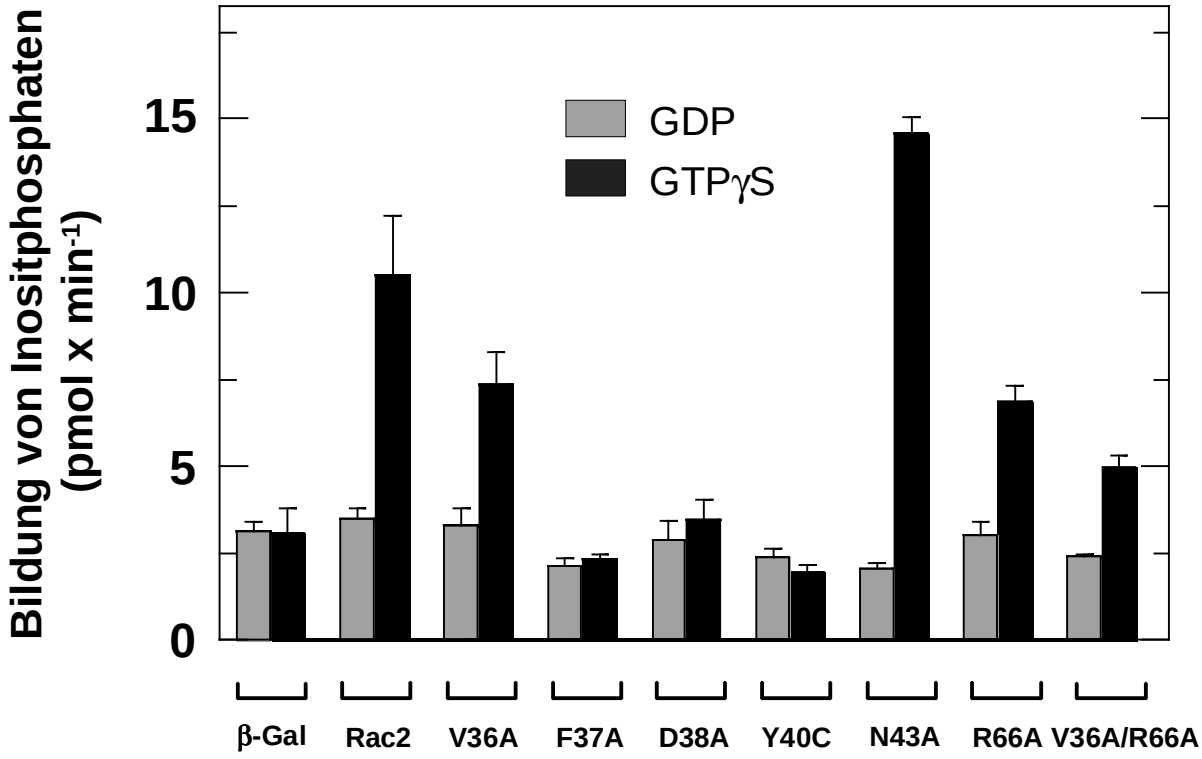


Abb. 7: Einfluss von *ras-related C_3 botulinum toxin substrate* 2 (Rac2)-Mutanten auf die Aktivität der Phospholipase C-γ_2 (PLCγ_2). Je 4,74 pmol Protein aus Detergensextrakten der membranären Fraktion von Ovarialzellen von *Spodoptera frugiperda*, die wildtypisches Rac2 (*Rac2*) oder Rac2-Mutanten (*$Rac2^{V36A}$*, *$Rac2^{F37A}$*, *$Rac2^{D38A}$*, *$Rac2^{Y40C}$*, *$Rac2^{N43A}$*, *$Rac2^{R66A}$ und $Rac2^{V36A/R66A}$*) exprimierten, wurden mit je 3,3 µg Protein aus der löslichen Fraktion von Zellen, die PLCγ_2 exprimierten, in Anwesenheit von 30 nM freiem Ca^{2+} ,1 mM Deoxycholat (DOC) und 100 µM Guanosin-5´-diphosphat (*GDP*) bzw. 100 µM Guanosin-5´-*O*-(3-thiotriphosphat) (*GTPγS*) mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-enthaltenden Phospholipidvesikeln bei 30 °C für 45 min inkubiert. Um die Gesamtmenge an Protein (58,5 µg pro Probe) konstant zu halten, wurden die Detergensextrakte mit Protein aus einem Detergensextrakt von β-Galaktosidase-exprimierenden Zellen verdünnt. Zur Kontrolle wurden 58,5 µg Protein aus einem Detergensextrakt von Zellen, die β-Galaktosidase (*β-Gal*) exprimierten, ebenfalls mit PLCγ_2 rekonstituiert. Die Reaktion wurde mit einem Chloroform/Methanol/Salzsäure-Gemisch beendet und die wässrige Phase der abgestoppten Lösungen mittels Szintillationszählung auf [^{3}H]Inositphosphate untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen ± Standardabweichung.

Abb. 8 zeigt den zu Abb. 7 analogen Versuch mit der PLC$\beta_2\Delta$. Es ist zu erkennen, dass das Detergensextrakt aus β-Galaktosidase-exprimierenden Zellen in Anwesenheit von GTPγS keine vermehrte Inositphosphatproduktion im Vergleich zum Ansatz mit GDP bewirkte. Inkubierte man die PLC$\beta_2\Delta$ jedoch mit Rac2 bzw. mit $Rac2^{N43A}$, so führte dies in den Ansätzen mit GTPγS zu einer *ca.* 2,9- bzw. 4,4-fachen Steigerung der Inositphosphatproduktion im Vergleich zu den Ansätzen mit GDP. $Rac2^{V36A}$, $Rac2^{R66A}$ und

$Rac2^{V36A/R66A}$ waren noch zu einer *ca*. 2,5-, 1,7- und 1,5-fachen Steigerung der Inositphosphatproduktion fähig. $Rac2^{Y40C}$ dagegen führte, wie für die PLCγ_2 gezeigt, zu keinem Anstieg in der Inositphosphatbildung. Jedoch zeigte sich bei $Rac2^{F37A}$ und $Rac2^{D38A}$ ein Anstieg der Inositphosphatproduktion um das *ca*. 1,9- bzw. 1,3-fache. Man konnte also in den beiden Versuchen erkennen, dass sich für die PLCγ_2 und die PLC$\beta_2\Delta$ Gemeinsamkeiten und Unterschiede hinsichtlich ihrer Stimulierbarkeit durch die Rac2-Mutanten ergeben. Rac2, $Rac2^{V36A}$, $Rac2^{N43A}$ und $Rac2^{R66A}$ führten zu einer Stimulation beider PLCs, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. So war die Aktivierung der PLC$\beta_2\Delta$ in Gegenwart von $Rac2^{V36A/R66A}$ stark reduziert, während sich $Rac2^{V36A}$, $Rac2^{R66A}$ und $Rac2^{V36A/R66A}$ in ihrer Auswirkung auf die Aktivität der PLCγ_2 nicht wesentlich voneinander unterschieden. $Rac2^{N43A}$ konnte sowohl die PLCγ_2 als auch die PLC$\beta_2\Delta$ stärker als wildtypisches Rac2 stimulieren. $Rac2^{F37A}$ und $Rac2^{D38A}$ vermochten nur noch die PLC$\beta_2\Delta$ zu stimulieren, allerdings zu einem verminderten Ausmaß im Vergleich zu wildtypischem Rac2. Keinerlei Stimulation zeigte sich für beide PLCs bei einer Rekonstitution mit $Rac2^{Y40C}$. Für die Interaktion von Rac2 und PLCγ_2 scheinen also die Aminosäurepositionen F37 und D38, für die Interaktion mit beiden PLC-Enzymen die Position Y40 in der *switch-I*-Domäne von Rac2 essentiell zu sein.

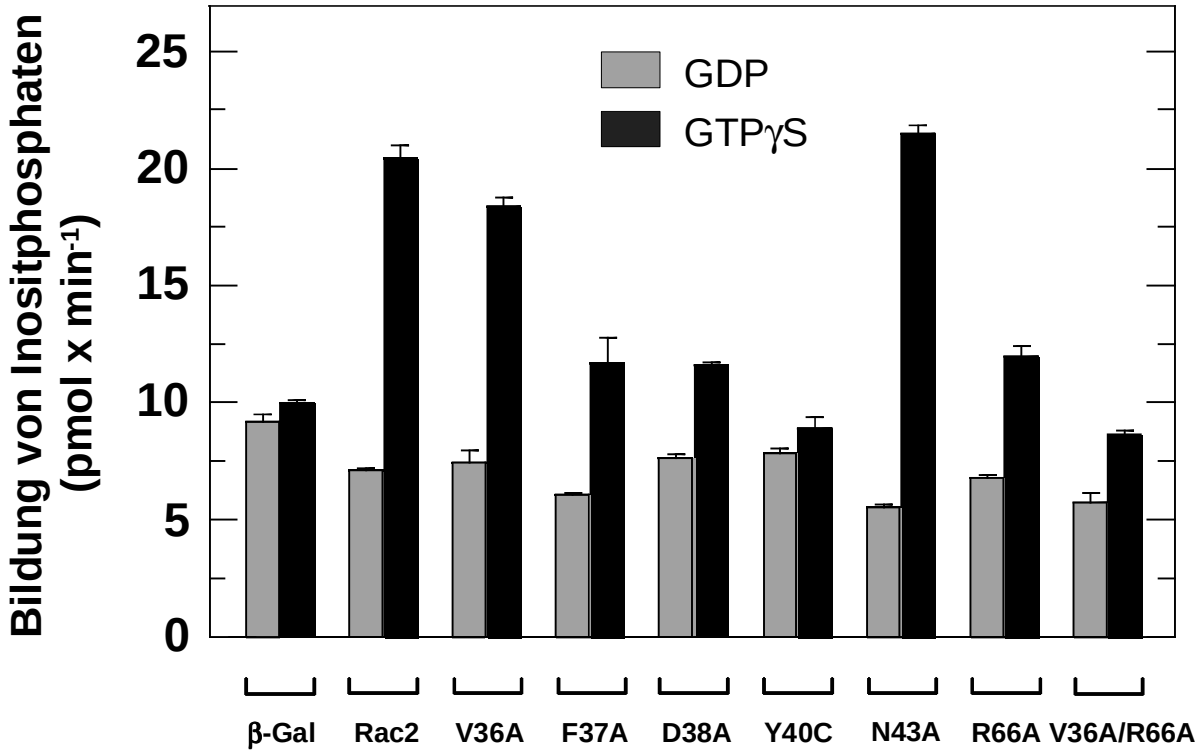


Abb. 8: Einfluss von *ras-related C_3 botulinum toxin substrate 2* (Rac2)-Mutanten auf die Aktivität der Phospholipase C-$\beta_2\Delta$ (PLC$\beta_2\Delta$). Je 4,74 pmol Protein aus Detergensextrakten der membranären Fraktion von Zellen, die wildtypisches Rac2 (*Rac2*) oder Rac2-Mutanten (*Rac2*^{V36A}, *Rac2*^{F37A}, *Rac2*^{D38A}, *Rac2*^{Y40C}, *Rac2*^{N43A}, *Rac2*^{R66A} und *Rac2*$^{V36A/R66A}$) exprimierten, wurden mit je 0,2 µg gereinigter PLC$\beta_2\Delta$ in Anwesenheit von 150 nM freiem Ca^{2+} und 100 µM Guanosin-5´-diphosphat (*GDP*) bzw. 100 µM Guanosin-5´-*O*-(3-thiotriphosphat) (*GTPγS*) mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-enthaltenden Phospholipidvesikeln bei 30 °C für 45 min rekonstituiert. Um die Gesamtmenge an Protein (58,5 µg pro Probe) konstant zu halten, wurden die Detergensextrakte mit Protein aus einem Detergensextrakt von Zellen, die β-Galaktosidase exprimierten, verdünnt. Zur Kontrolle wurden 58,5 µg Protein aus einem Detergensextrakt von β-Galaktosidase-exprimierenden Zellen (*β-Gal*) mit der PLC$\beta_2\Delta$ inkubiert. Die Reaktion wurde mit einem Chloroform/Methanol/Salzsäure-Gemisch beendet und die wässrige Phase der abgestoppten Lösungen mittels Szintillationszählung auf [^{3}H]Inositphosphate untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen ± Standardabweichung.

3.4.2 Einfluss der Proteinmenge der verwendeten PLC-Enzyme auf deren Aktivität

Für einen besseren Vergleich der Rac2-vermittelten Aktivierung der beiden verwendeten PLC-Enzyme galt es, ihre basalen Aktivitäten auf ein möglichst ähnliches Niveau zu bringen. Hierfür wurden ansteigende Mengen gereinigter PLCγ_2 bzw. gereinigter PLC$\beta_2\Delta$ mit Rac2 unter gleichen Bedingungen wie in 3.4.1 beschrieben inkubiert. In der Arbeitsgruppe war bekannt, dass unter diesen Versuchsbedingungen die PLCγ_2 in einer

höheren Menge als die PLC$\beta_2\Delta$ eingesetzt werden muss. Dementsprechend wurde die PLCγ_2 mit Mengen von 0,3, 1 und 3 µg pro Ansatz verwendet, während von der PLC$\beta_2\Delta$ 0,1, 0,3 und 1 µg eingesetzt wurde. Wie in Abb. 9 zu sehen ist, zeigte sich für die PLCγ_2 bei Zugabe von GTPγS im Vergleich zur Zugabe von GDP bei einer Menge von 3 µg pro Ansatz die höchste Steigerung der Inositphosphatproduktion, nämlich um das *ca*. 4,7-fache. PLC$\beta_2\Delta$ zeigte bei 1 µg in Anwesenheit von GTPγS den höchsten Absolutwert der Inositphosphatproduktion von *ca*. 33 pmol/min; allerdings stieg auch die basale Aktivität auf nahezu 20 pmol/min an. Das beste Verhältnis zwischen Stimulation und basaler Aktivität lag bei einer eingesetzten Menge von 0,1 µg, es betrug das *ca*. 5-fache des Basalwertes. Für alle weiteren Versuche mit gereinigten PLC-Enzymen wurden somit je 3 µg von gereinigter PLCγ_2 und 0,1 µg von gereinigter PLC$\beta_2\Delta$ pro Ansatz verwendet.

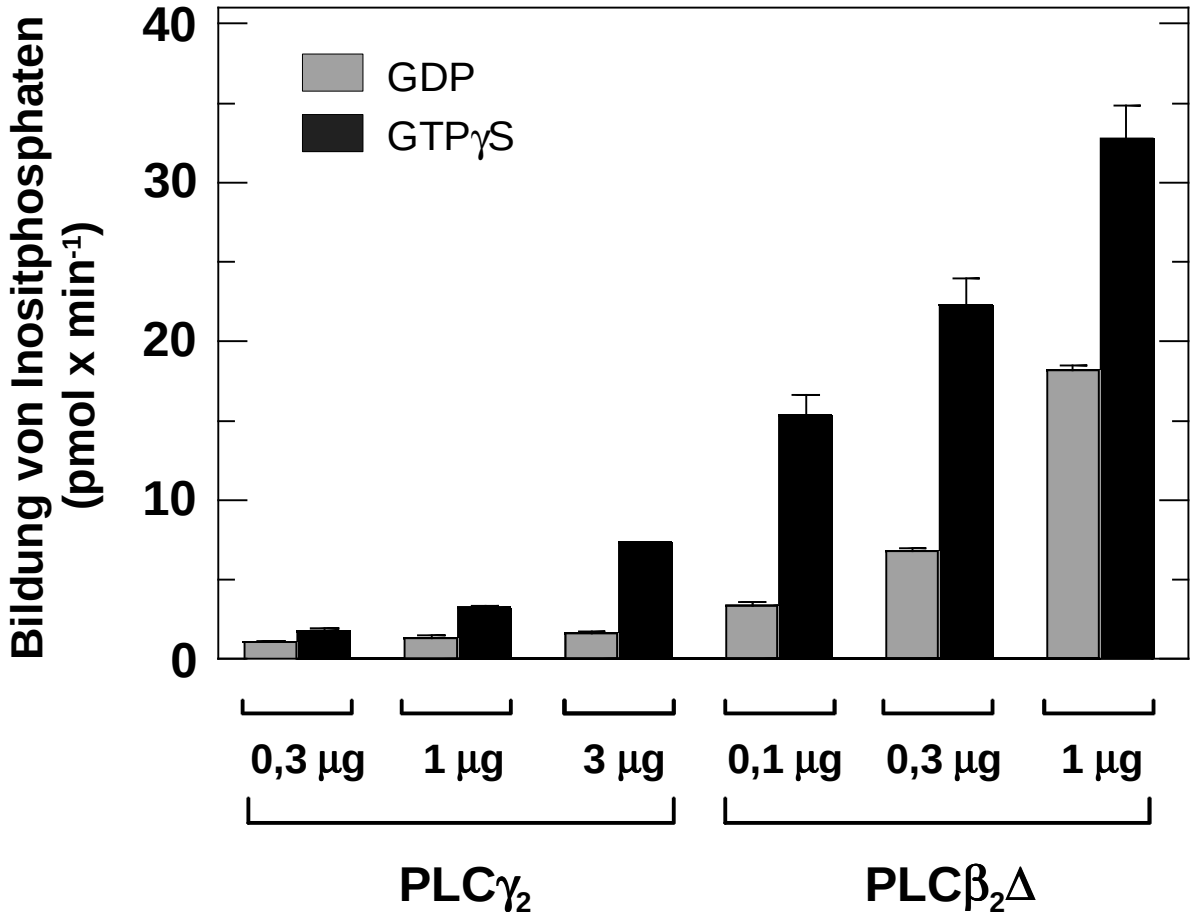


Abb. 9: Stimulation der Phospholipase C-γ_2 (*PLCγ_2*) und der Phospholipase C-$\beta_2\Delta$ (*PLC$\beta_2\Delta$*) durch *ras-related C_3 botulinum toxin substrate 2* (Rac2) in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge an PLCγ_2 und PLC$\beta_2\Delta$. Ansteigende Mengen von gereinigter PLCγ_2 (*0,3 µg*, *1 µg* und *3 µg*) bzw. PLC$\beta_2\Delta$ (*0,1 µg*, *0,3 µg* und *1 µg*) wurden mit je 5 µl Detergensextrakt aus der membranären Fraktion von Zellen, die Rac2 exprimierten, in Anwesenheit von 30 nM freiem Ca^{2+}, 1 mM Deoxycholat (DOC) und 100 µM Guanosin-5´-diphosphat (*GDP*) bzw. 100 µM Guanosin-5´-*O*-(3-thiotriphosphat) (*GTPγS*) mit Phospholipidvesikeln, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat enthielten, bei 30 °C für 45 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit einem Chloroform/Methanol/Salzsäure-Gemisch beendet, und die wässrige Phase der abgestoppten Lösungen mittels Szintillationszählung auf [^{3}H]Inositphosphate untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen ± Standardabweichungen.

3.4.3 Einfluss der Rac2-Mutanten Rac2^{W56A} und Rac2^{L67A} auf die Aktivität der PLCγ_2 im Vergleich zur PLC$\beta_2\Delta$

Von den Aminosäuren der *switch-II*-Region des Rac2-Moleküls ist bekannt, dass sie für die Interaktion mit Regulatoren und Effektoren kleiner Rho-GTPasen notwendig sind. Es gab jedoch bisher noch keine Erkenntnisse darüber, ob sie auch für die Interaktion von Rac2 mit der PLCγ_2 eine Rolle spielen. Im hier dargestellten Versuch sollte analysiert

werden, ob bzw. wie sich die beiden Mutanten Rac2^{W56A} und Rac2^{L67A} auf die Aktivität der PLCγ_2 und der PLCβ_2 auswirken. Die beiden untersuchten Rac2-Enzyme trugen ihre Mutation an einer Position kurz vor bzw. innerhalb der *switch-II*-Region. Von Position 56 ist zudem unter anderem bekannt, dass sie für die Interaktion mit Rac-spezifischen GEFs notwendig ist. Es erfolgte der Vergleich zwischen PLCγ_2 und PLCβ_2, um erkennen zu können, ob sich die beiden Isoenzyme in ihrem Interaktionsmuster mit Rac2 unterscheiden und welche Aminosäurereste sie für eine Aktivierung benötigen. Für das Experiment wurden beide PLC-Enzyme in gereinigter Form in den unter 3.4.2 beschriebenen Mengen verwendet und mit Rac2^{W56A} und Rac2^{L67A} inkubiert. Das Ergebnis ist in Abb. 10 zu sehen: Rac2 bewirkte sowohl bei Rekonstitution mit der PLCγ_2 als auch der PLC$\beta_2\Delta$ einen Anstieg in der Inositphosphatproduktion, wenn GTPγS zugegeben wurde. Bei der PLCγ_2 stieg die Inositphosphatbildung um das *ca*. 7,8-fache, bei der PLC$\beta_2\Delta$ um das *ca*. 8,7-fache im Vergleich zu den Werten bei Zugabe von GDP. Bei den Rac2-Mutanten zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede: So führte Rac2^{W56A} in Anwesenheit der PLCγ_2 nur noch zu einer *ca*. 1,9-fachen Steigerung der Inositphosphatproduktion, wohingegen Rac2^{L67A} die Aktivität der PLCγ_2 nicht mehr stimulieren konnte. Bei Rekonstitution der PLC$\beta_2\Delta$ mit den beiden Rac2-Mutanten konnte allerdings in Anwesenheit von GTPγS ein Anstieg der Inositphosphatproduktion um das *ca*. 4,5-fache beobachtet werden. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Mutationen an den Aminosäurepositionen 56 und 67 nahe der *switch-II*-Region bzw. in der *switch-II*-Region von Rac2 deutlich unterschiedliche Auswirkungen auf die Rac2-vermittelte Stimulation der PLCγ_2 und der PLC$\beta_2\Delta$ haben. Für die Interaktion von Rac2 und der PLCγ_2 scheinen sie essentiell zu sein, da es bei einer Mutation dieser Positionen zu einer verminderten bzw. aufgehobenen Stimulation der PLCγ_2 kommt. Für die PLCβ_2 hingegen sind sie wahrscheinlich sie eine untergeordnete Rolle bei der Interaktion mit Rac2 zu spielen.

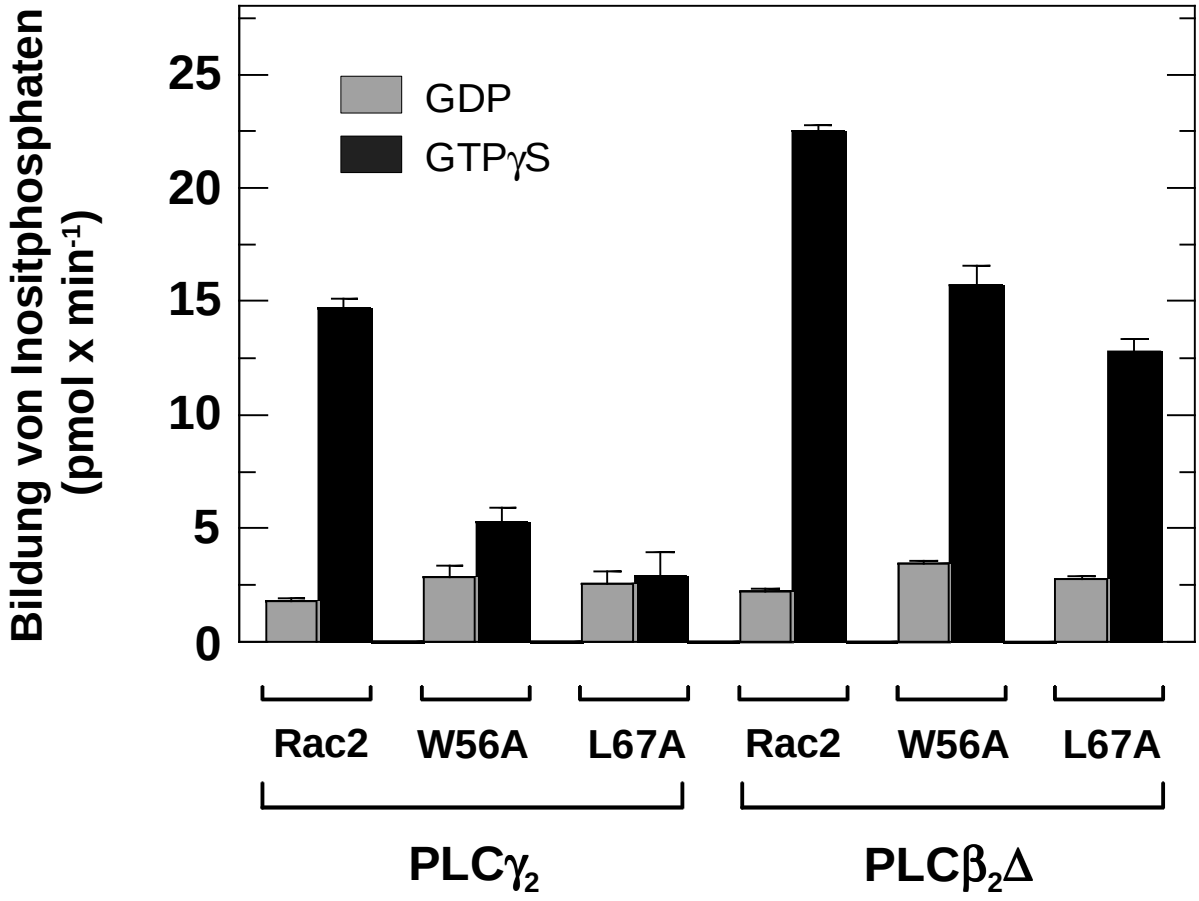


Abb. 10: Einfluss der *ras-related C_3 botulinum toxin substrate 2* (Rac2)-Mutanten auf die Aktivität der Phospholipase C-γ_2 (*PLCγ_2*) und der Phospholipase C-$\beta_2\Delta$ (*PLC$\beta_2\Delta$*). Je 5 µl Detergensextrakt aus der membranären Fraktion von Zellen, die wildtypisches Rac2 (*Rac2*) oder Rac2-Mutanten (*$Rac2^{W56A}$* und *$Rac2^{L67A}$*) exprimierten, wurden mit je 0,1 µg gereinigter PLC$\beta_2\Delta$ bzw. 3 µg gereinigter PLCγ_2 in Anwesenheit von 30 nM freiem Ca^{2+}, 1 mM Deoxycholat (DOC) und 100 µM Guanosin-5´-diphosphat (*GDP*) bzw. 100 µM Guanosin-5´-*O*-(3-thiotriphosphat) (*GTPγS*) mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-enthaltenden Phospholipidvesikeln bei 30 °C für 45 min inkubiert. Anstelle von N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure-Puffer (pH 7,2) wurde Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Maleat-Puffer (pH 7,3) im Reaktionsmix (siehe 2.2.8.2) verwendet. Die Reaktion wurde mit einem Chloroform/Methanol/Salzsäure-Gemisch beendet und die wässrige Phase der abgestoppten Lösungen mittels Szintillationszählung auf [^{3}H]Inositphosphate untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen ± Standardabweichung.

3.4.4 Expression der Mutanten in COS-7-Zellen

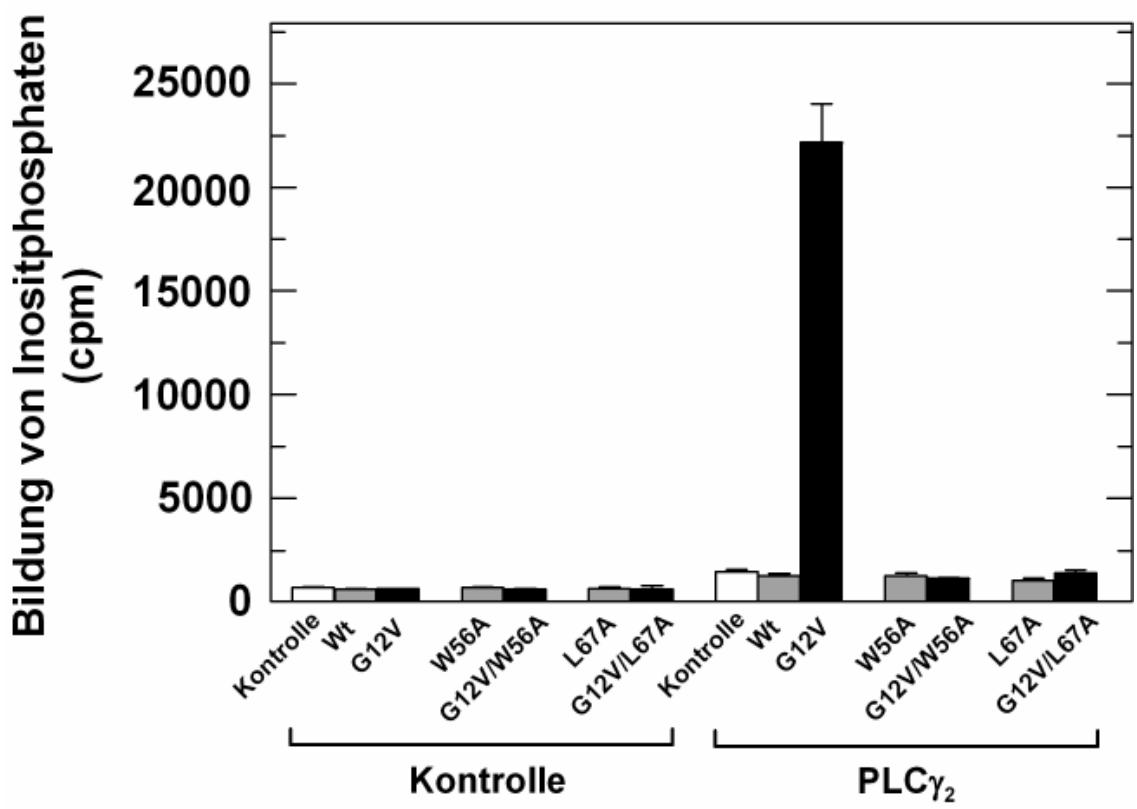
Es wurden diejenigen DNA-Präparationen ausgewählt, die die gewünschte Mutation trugen. Diese wurden zur Transfektion von COS-7-Zellen verwendet. Um nachzuweisen, dass die COS-7-Zellen die gewünschten Rac2-, Rac1- bzw. Cdc42-GTPasen exprimierten, wurden die Zellen homogenisiert, das Homogenat durch SDS-Gelelektrophorese

aufgetrennt, mittels *Western blotting* auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend immunchemisch auf vorhandene kleine Rho-GTPasen untersucht.

3.4.5 Regulation der PLCγ_2 durch Rac2-Mutanten in intakten Zellen

Um zu überprüfen, ob die bisher beschriebenen Ergebnisse im zellfreien System auch in Zellen reproduzierbar sind, wurden Versuche in COS-7-Zellen durchgeführt. Es wurden die W56A- sowie die L67A-Mutante von Rac2 untersucht, da diese beiden Aminosäurepositionen, wie bereits weiter oben beschrieben, von besonderem Interesse sind. Hierfür wurden in den Zellen PLCγ_2 und Rac2 bzw. die Rac2-Mutanten Rac2^{G12V}, Rac2^{W56A}, Rac2$^{G12V/W56A}$, Rac2^{L67A} und Rac2$^{G12V/L67A}$ exprimiert und die Aktivität der PLCγ_2 durch Messung der Bildung von Inositphosphaten bestimmt. Bei Rac2^{G12V} handelt es sich um eine GTPase-defiziente Mutante von Rac2, welche somit konstitutiv aktiv ist und die PLCγ_2 permanent stimulieren kann. Als Kontrolle wurden COS-7-Zellen allein mit Leervektor transfiziert. In Abb. 11A ist zu erkennen, dass in den COS-7-Zellen, die nicht mit einer PLCγ_2-DNA transfiziert worden waren, keine Zunahme der Inositphosphatbildung in Anwesenheit von Rac2^{G12V} gemessen werden konnte. Eine alleinige Expression der PLCγ_2 rief keine deutliche Steigerung der Inositphosphatproduktion in transfizierten COS-7-Zellen hervor. Bei einer gemeinsamen Expression von PLCγ_2 und Rac2^{G12V} zeigte sich jedoch eine *ca*. 17-fache Steigerung der Inositphosphatproduktion im Vergleich zu Zellen, die PLCγ_2 und wildtypisches Rac2 koexprimierten. Rac2$^{G12V/W56A}$ führte im Vergleich zu Rac2^{W56A} zu keiner vermehrten Inositphosphatproduktion. Auch Rac2$^{G12V/L67A}$ bewirkte im Vergleich zu Rac2^{L67A} keine gesteigerte Bildung von Inositphosphaten. Es war also zu sehen, dass Rac2$^{G12V/W56A}$ hier einen minimalen Unterschied zum *in vitro*-Experiment aufwies, da es in intakten Zellen die PLCγ_2 überhaupt nicht mehr stimulierte. Rac2^{L67A} konnte weder *in vitro* noch in intakten Zellen die PLCγ_2 stimulieren. Es zeigte sich also analog zum *in vitro*-Versuch, dass die beiden Aminosäuren an den Positionen 56 und 67 des Rac2-Moleküls für eine Interaktion zwischen der PLCγ_2 und Rac2 essentiell sind und somit auch für die Rac2-vermittelte Stimulation der PLCγ_2 unbedingt notwendig sind. Wie in der immunchemischen Analyse von Ganzzelllysaten der transfizierten Zellen mit einem Anti-PLCγ_2-Antikörper (Abb. 11B) zu sehen ist, wurde bei Verwendung gleicher Mengen an Plasmid-DNA zur Transfektion die PLCγ_2 ähnlich stark exprimiert. Waren die Zellen nur mit Leervektor transfiziert worden, ließ sich keine PLCγ_2 nachweisen.

A



B

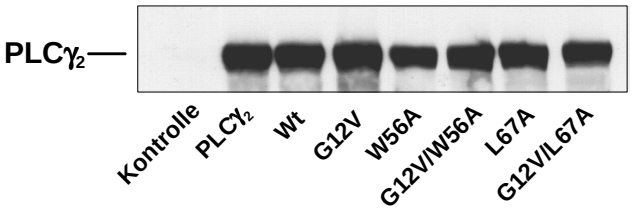


Abb. 11: Regulation der Phospholipase C-γ_2 (PLCγ_2) durch *ras-related C_3 botulinum toxin substrate 2* (Rac2)-Mutanten in intakten Zellen. *A,B,* COS-7-Zellen wurden wie an der Abszisse angegeben mit jeweils 1 µg der Vektoren pcDesoxyribonukleinsäure (DNA) 3.1(+) (*Kontrolle*), pcDNA3.1(+)-PLCγ_2 (*PLCγ_2*) und mit jeweils 0,01 µg der Vektoren pcDNA3.1(+) (*Kontrolle*), pcDNA3.1(+)-Rac2 (*Wt*), pcDNA3.1(+)-Rac2^{G12V} (*G12V*), pcDNA3.1(+)-Rac2^{W56A} (*W56A*), pcDNA3.1(+)-Rac2$^{G12V/W56A}$ (*G12V/W56A*), pcDNA3.1(+)-Rac2^{L67A} (*L67A*) oder pcDNA3.1(+)-Rac2$^{G12V/L67A}$ (*G12V/L67A*) kotransfiziert. Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1,010 µg konstant gehalten. *A,* Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 Stunden in *dulbecco's-modified-eagle*-Medium (DMEM-Medium) mit 10 µCi/ml D-*myo*-[2-^{3}H(N)]-Inosit und 10 mM Lithiumchlorid inkubiert und anschließend die Inositphosphatbildung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen ± Standardabweichung. *B,* Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 Stunden in DMEM-Medium mit 10 mM Lithiumchlorid inkubiert und anschließend homogenisiert. Das Homogenat wurde auf ein Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Anti-PLCγ_2-Antikörpern immunchemisch analysiert.

3.4.6 Regulation der PLCγ_2 durch Rac2-Mutanten in intakten Zellen im Vergleich zur PLCβ_2

Im hier dargestellten Versuch wurde der Einfluss der Mutationen an den Positionen W56 und L67 des Rac2-Moleküls auf die Aktivität der PLCγ_2 und der PLCβ_2 in intakten Zellen untersucht. Wie unter 3.4.5 beschrieben, wurden die Enzyme in COS-7-Zellen in Ab- oder in Anwesenheit von Rac2, Rac2^{G12V}, Rac2^{W56A}, Rac2$^{G12V/W56A}$, Rac2^{L67A} oder Rac2$^{G12V/L67A}$ exprimiert und ihre Aktivität anhand der Bildung von Inositphosphaten bestimmt. In Abb. 12A ist das Ergebnis des Versuchs zu sehen: Bei der PLCγ_2 führte die Koexpression von Rac2 zu keiner Zunahme der Inositphosphatproduktion im Vergleich zur alleinigen Expression der PLCγ_2, während bei der PLCβ_2 die Koexpression von Rac2 zu einer *ca.* zweifach gesteigerten Inositphosphatproduktion führte. Konstitutiv aktives Rac2^{G12V} hingegen führte bei der PLCγ_2 zu einem *ca*. 15-fachen Anstieg der Inositphosphatbildung im Vergleich zu wildtypischem Rac2, bei der PLCβ_2 führte es zu einem *ca*. 6,4-fachen Anstieg der Inositphosphatproduktion. Wie bereits im unter 3.4.5 beschriebenen Experiment gezeigt worden war, konnten weder Rac2$^{G12V/W56A}$ noch Rac2$^{G12V/L67A}$ die PLCγ_2 in intakten Zellen stimulieren. Anders verhielt es sich jedoch für die PLCβ_2: Rac2^{W56A} führte zu einer Reduktion der basalen Aktivität der PLCβ_2 um *ca.* 76% im Vergleich zu wildtypischem Rac2. Rac2$^{G12V/W56A}$ führte hingegen zu einem *ca*. 23-fachen Anstieg der Inositphosphatproduktion im Vergleich zu Rac2^{W56A}. Rac2^{L67A} führte ähnlich wie Rac2 zu einer *ca.* zweifachen Zunahme der Bildung von Inositphosphaten, Rac2$^{G12V/L67A}$ führte im Vergleich zu Rac2^{L67A} zu einem *ca*. 7,1-fachen Anstieg der Inositphosphatproduktion. Rac2^{W56A} konnte die PLCβ_2 also nicht mehr stimulieren, es führte sogar zu einer Verminderung der basalen Aktivität der PLCβ_2. Rac2^{L67A} hingegen vermochte die PLCβ_2 vergleichbar zu wildtypischem Rac2 zu stimulieren. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Rac2-Varianten mit Mutationen an den beiden Aminosäurepositionen, die nahe der *switch-II*-Region (W56) bzw. in der *switch-II*-Region (L67) von Rac2 liegen, auch in intakten Zellen die Aktivität der beiden PLC-Enzyme gänzlich unterschiedlich beeinflussen. So wird die PLCγ_2 durch die Rac2-Mutanten nicht mehr stimuliert, wohingegen die PLCβ_2 in ähnlichem Maße wie durch wildtypisches Rac2 stimuliert werden kann. Es zeigt sich also wiederum, dass die beiden Aminosäurepositionen W56 und L67 für eine Interaktion von Rac2 und PLCγ_2 essentiell sind. Um die Expression der Proteine zu analysieren, wurde eine immunchemische Analyse der Ganzzelllysate durchgeführt (Abb. 12B). Bei Verwendung von einem Anti-

PLCγ_2-Antikörper konnte gezeigt werden, dass die PLCγ_2 in ähnlichem Ausmaß exprimiert wurde, wobei sie in Anwesenheit von Rac2, Rac2^{W56A}, Rac2$^{G12V/W56A}$, Rac2^{L67A} und Rac2$^{G12V/L67A}$ etwas geringer exprimiert wurde als bei alleiniger Transfektion der COS-7-Zellen mit PLCγ_2-DNA bzw. in Anwesenheit von Rac2^{G12V}. Die Zellen, die nur mit Leervektor transfiziert worden waren, zeigten keine Expression der PLCγ_2. Wurde mit einem Anti-PLCβ_2-Antikörper analysiert, so konnte für alle Ansätze eine ähnliche Expression der PLCβ_2 beobachtet werden. Auch die GTPase Rac2 wurde in allen Ansätzen ähnlich exprimiert.

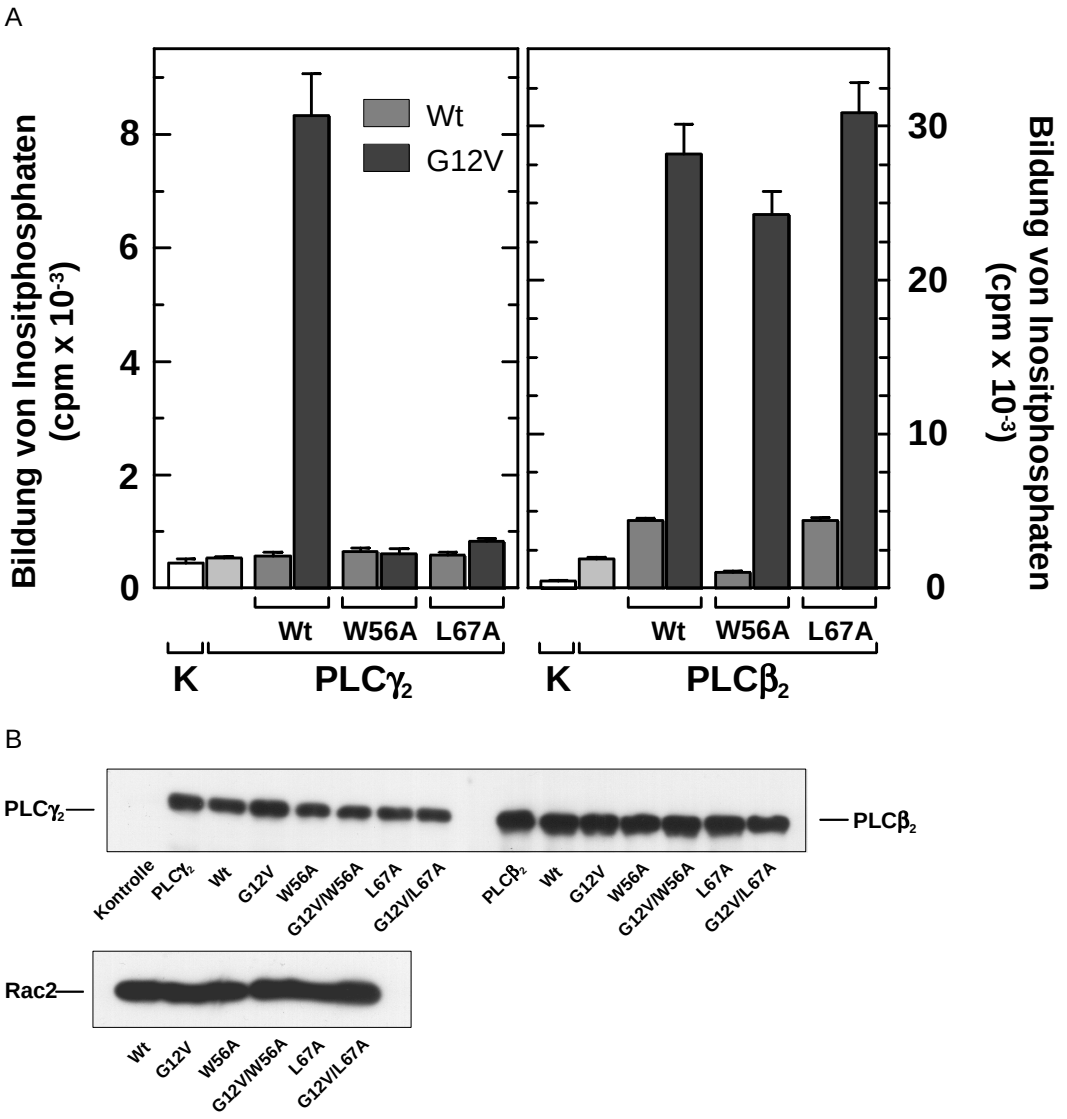


Abb. 12: Regulation der Phospholipase C-γ_2 (PLCγ_2) und der Phospholipase C-β_2 (PLCβ_2) durch *ras-related C_3 botulinum toxin substrate 2* (Rac2)-Mutanten in intakten Zellen. *A,B, african-green-monkey-kidney*-Zellen wurden wie an der Abszisse angegeben mit 1 µg des Vektors pcDesoxyribonukleinsäure (DNA) 3.1(+) (*A: K, B: Kontrolle*) bzw. mit jeweils 250 ng der Vektoren pcDNA3.1(+)-PLCγ_2 (*PLCγ_2*), pcDNA3.1(-)-PLCβ_2 (*PLCβ_2*) und mit jeweils 50 ng der Vektoren pcDNA3.1(+)-Rac2 (*Wt*), pcDNA3.1(+)-Rac2^{G12V} (*G12V*), pcDNA3.1(+)-Rac2^{W56A} (*W56A*), pcDNA3.1(+)-Rac2$^{G12V/W56A}$ (*G12V/W56A*), pcDNA3.1(+)-Rac2^{L67A} (*L67A*) oder pcDNA3.1(+)-Rac2$^{G12V/L67A}$ (*G12V/L67A*) kotransfiziert. Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1 µg konstant gehalten. *A,* Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 Stunden in *dulbecco's-modified-eagle*-Medium (DMEM-Medium) mit 2,5 µCi/ml D-*myo*-[2-^{3}H(N)]-Inosit und 10 mM Lithiumchlorid inkubiert und anschließend die Inositphosphatbildung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen ± Standardabweichung. *B,* Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 Stunden in DMEM-Medium mit 10 mM Lithiumchlorid inkubiert und homogenisiert. Das Homogenat wurde auf ein Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Anti-PLCγ_2-, Anti-PLCβ_2- bzw. Anti-Rac2-Antikörpern immunchemisch analysiert.

3.4.7 Regulation der PLCγ_2 durch Rac1- und Rac2-Mutanten in intakten Zellen im Vergleich zur PLCβ_2

Im unter 3.4.6 beschriebenen Versuch wurde eine Stimulation der PLCβ_2 durch Rac2$^{G12V/W56A}$ beobachtet, wohingegen diejenige der PLCγ_2 aufgehoben war. Von der Arbeitsgruppe um Jezyk *et al.* wurde jedoch beschrieben, dass die entsprechende Mutante der GTPase Rac1, Rac1$^{G12V/W56A}$, nicht dazu in der Lage ist, die PLCβ_2 zu stimulieren. In diesem Experiment fehlte jedoch die nicht-konstitutiv aktive Rac1-Variante Rac1^{W56A} als Kontrolle. Im hier dargestellten Versuch sollte geklärt werden, wie sich eine Rac1$^{G12V/W56A}$-Mutante auf die Aktivität der PLCβ_2 bzw. der PLCγ_2 auswirkt. Zudem sollte untersucht werden, wie die Rac1^{W56A}- bzw. die Rac2^{W56A}-Mutanten, die nicht konstitutiv aktiv sind, die die Aktivität der PLC-Enzyme beeinflussen. Dazu wurden COS-7-Zellen mit PLCγ_2 -DNA bzw. mit PLCβ_2 -DNA zusammen mit cDNAs, welche für Rac1, Rac1^{G12V}, Rac1^{W56A}, Rac1$^{G12V/W56A}$, Rac2, Rac2^{G12V}, Rac2^{W56A} oder Rac2$^{G12V/W56A}$ kodieren, transfiziert. Als Kontrollen wurden Zellen alleine mit Leervektor bzw. nur mit Rac1- oder Rac2-DNA transfiziert. Gemessen wurde die Inositphosphatbildung. Die in der Abb. links dargestellte Kontrolle zeigt die Aktivität der endogenen PLC-Enzyme, da hier COS-7-Zellen alleine mit Leervektor transfiziert worden waren. Ähnliche Werte wurden in den Kontrollen bei Transfektion der Zellen mit Rac1- bzw. Rac2-DNA erzielt. Bei Expression der PLCγ_2 bzw. der PLCβ_2 entsprachen die gemessenen Inositphosphate den basalen Aktivitäten der Enzyme. Für die PLCγ_2 waren die Werte ähnlich niedrig wie diejenigen endogener PLC-Enzyme. Für die PLCβ_2 ergaben sich basale Werte von *ca.* 5000 cpm. Wurde die PLCγ_2 mit Rac1^{G12V} koexprimiert, so kam es zu einem *ca.* 4,3-fachen Anstieg der Inositphosphatproduktion im Vergleich zu wildtypischem Rac1. Die PLCβ_2 zeigte bei Koexpression mit Rac1 eine Steigerung der Inositphosphatproduktion um das *ca.* 2,7-fache im Vergleich zu ihrer basalen Aktivität. Die konstitutiv aktive Rac1^{G12V}-Mutante vermochte die Inositphosphatbildung im Vergleich zur basalen Aktivität um das *ca.* 7,4-fache zu steigern, im Vergleich zu wildtypischem Rac1 um das *ca.* 2,7-fache. Wurden Rac1^{W56A} oder Rac1$^{G12V/W56A}$ zusammen mit der PLCγ_2 in COS-7-Zellen exprimiert, so konnte im Vergleich zur Kontrolle keine Steigerung der Inositphosphatproduktion beobachtet werden. Bei Koexpression der PLCβ_2 mit Rac1^{W56A} zeigte sich interessanterweise eine verminderte Bildung von Inositphosphaten, sie lag nur noch bei *ca.* einem Drittel der basalen Aktivität der PLCβ_2. Die konstitutiv aktive Rac1$^{G12V/W56A}$-Mutante zeigte im Vergleich zu Rac1^{W56A} jedoch eine *ca.* 6,5-fache

Steigerung der Inositphosphatbildung. Waren die Zellen mit $Rac2^{G12V}$-DNA transfiziert, so führte dies bei der PLCγ_2 zu einem *ca.* 28-fachen, bei der PLCβ_2 zu einem *ca.* 9,9-fachen Anstieg der Inositphosphatbildung im Vergleich zu wildtypischem Rac2. Die $Rac2^{G12V/W56A}$-Mutante war analog dem unter 3.4.6 beschriebenen Versuch nicht dazu in der Lage, die PLCγ_2 zu stimulieren. Bei der PLCβ_2 kam es jedoch in Gegenwart von $Rac2^{G12V/W56A}$ zu einer *ca.* 21-fachen Steigerung der Inositphosphatbildung im Vergleich zu $Rac2^{W56A}$. Die Ergebnisse zeigen also, dass die $Rac1^{G12V/W56A}$-Mutante analog zur Mutante von Rac2 nicht dazu in der Lage ist, die PLCγ_2 zu stimulieren. Es gelang uns jedoch zu zeigen, dass die konstitutiv aktive $Rac1^{G12V/W56A}$-Mutante sehr wohl noch dazu fähig ist, die PLCβ_2 zu stimulieren. Dieser Aspekt war bisher nicht bekannt und es stellte sich heraus, dass sich Rac1 und Rac2 hinsichtlich ihres Interaktionsmusters mit der PLCβ_2 wohl ähnlich sind.

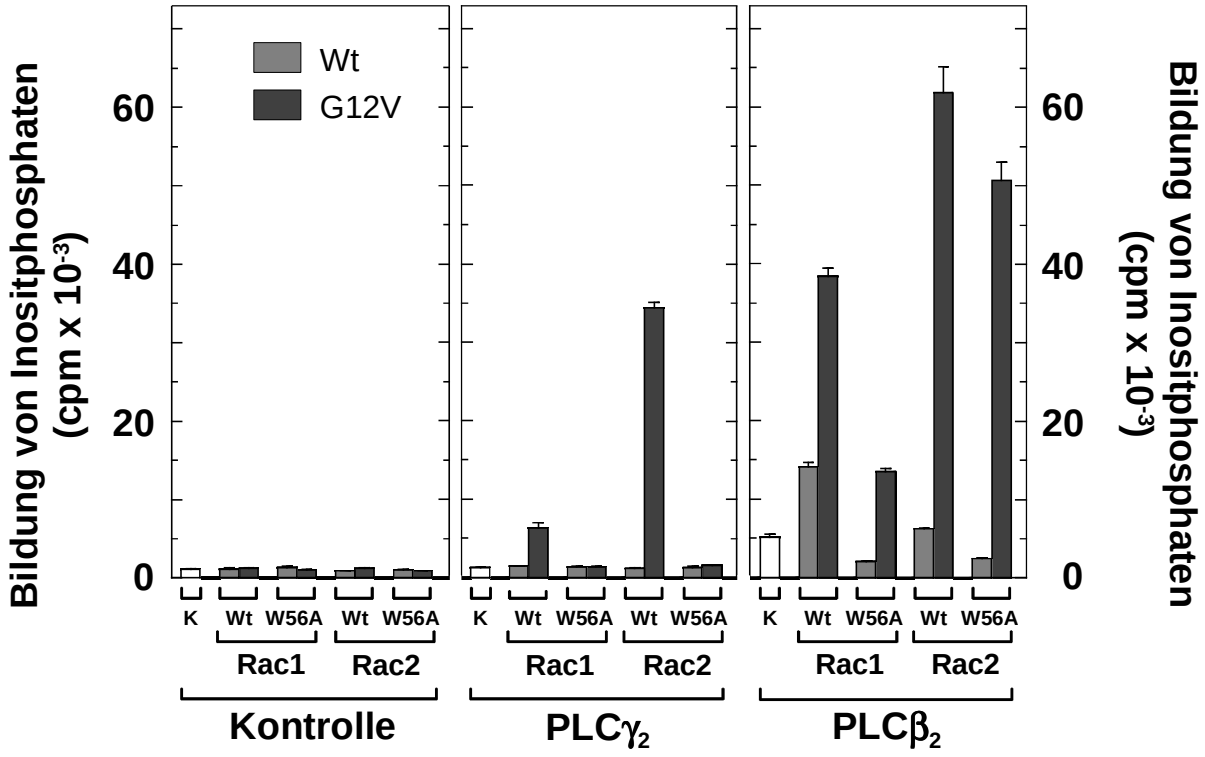


Abb. 13: Regulation der Phospholipase C-γ_2 (PLCγ_2) und der Phospholipase C-β_2 (PLCβ_2) durch *ras-related C_3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1) und Rac2-Mutanten in intakten Zellen. *African-green-monkey-kidney*-Zellen wurden wie an der Abszisse angegeben mit jeweils 250 ng der Vektoren pcDesoxyribonukleinsäure (DNA) 3.1(+) (*Kontrolle*), pcDNA3.1(-)-PLCβ_2 (*PLCβ_2*) bzw. mit 750 ng des Vektors pcDNA3.1(+)-PLCγ_2 (*PLCγ_2*) transfiziert und entweder mit jeweils 750 ng der Vektoren pcDNA3.1(+) (*K*), pcDNA3.1(+)-Rac1 (*Wt*), pcDNA3.1(+)-Rac1^{W56A} (*W56A*) oder mit jeweils 50 ng der Vektoren pcDNA3.1(+)-Rac2 (*Wt*), pcDNA3.1(+)-Rac2^{W56A} (*W56A*), kotransfiziert. Die Mutation an Position 56 lag entweder in einem wildtypischen (*Wt*; hellgraue Balken) oder in einem konstitutiv aktiven (*G12V*; dunkelgraue Balken) Hintergrund vor. Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1,5 µg konstant gehalten. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 Stunden in *dulbecco's-modified-eagle*-Medium mit 2,5 µCi/ml D-myo-[2-^{3}H(N)]-Inosit und 10 mM Lithiumchlorid inkubiert und anschließend die Inositphosphatbildung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen ± Standardabweichung.

3.4.8 Regulation der PLCγ_2 durch Rac2-Mutanten im Vergleich zu Cdc42-Mutanten in intakten Zellen

Vergleicht man die Aminosäuresequenz von Rac2 mit derjenigen von Cdc42, dann fällt auf, dass sie sich unter anderem in Position 56 unterscheiden (siehe Abb. 3). So trägt Rac2 an dieser Position ein Tryptophan, während es sich bei Cdc42 an dieser Stelle um ein Phenylalanin handelt. In den bisher beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Position 56 im Rac2-Molekül eine wichtige Rolle bei der Stimulation der PLCγ_2 zu

spielen scheint, da ihre Mutation zu einer aufgehobenen Stimulation der PLCγ_2 führt. Aus früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass Cdc42 die PLCγ_2 nicht zu stimulieren vermag. Um zu untersuchen, ob die Aminosäureposition 56 für den Unterschied zwischen Rac2 und Cdc42 hinsichtlich ihrer Interaktion mit der PLCγ_2 verantwortlich ist, wurde der hier dargestellte Versuch in intakten Zellen durchgeführt. Hierfür wurden COS-7-Zellen mit DNA von Rac2-Mutanten, die statt des wildtypisch vorkommenden Tryptophans an Stelle 56 die Aminosäure Phenylalanin trugen, transfiziert. Im Gegenzug wurden Zellen mit DNA von Cdc42-Mutanten transfiziert, die an Position 56 statt Phenylalanin ein Tryptophan trugen. Zur Kontrolle wurden COS-7-Zellen nur mit Leervektor bzw. nur mit PLCγ_2-DNA transfiziert. Gemessen wurde die Inositphosphatbildung. Die Rac2- und Cdc42-Moleküle lagen hierbei als HA-Fusionsproteine vor, um ihre Expression im *Western blotting* besser vergleichen zu können. Man erkennt in Abb. 14A, dass die Koexpression von Rac2 zu keiner Zunahme der Inositphosphatproduktion im Vergleich zur alleinigen Expression der PLCγ_2 führte. Auch die Koexpression von wildtypischem Cdc42 steigerte die Inositphosphatproduktion nicht. Wurde jedoch die PLCγ_2 zusammen mit konstitutiv aktivem Rac2^{G12V} exprimiert, führte dies zu einem *ca*. 3,8-fachen Anstieg der Inositphosphatproduktion im Vergleich zur gemeinsamen Expression von PLCγ_2 mit Rac2. Rac2$^{G12V/W56F}$ bewirkte im Vergleich zu Rac2^{W56F} einen *ca*. 1,7-fachen Anstieg der Inositphosphatproduktion. Bei Koexpression der PLCγ_2 mit Cdc42 bzw. Cdc42^{G12V} zeigte sich kein Anstieg der Inositphosphatbildung im Vergleich zur alleinigen Expression der PLCγ_2. Ähnlich verhielt es sich für Cdc42^{F56W} und Cdc42$^{G12V/F56W}$: Die konstitutiv aktive Mutante führte zu keiner Steigerung der Inositphosphatproduktion. So konnte man also analog zu den bisher beschriebenen Versuchen erkennen, dass ein Austausch von Tryptophan durch Phenylalanin an Position 56 im Rac2-Molekül zu einer deutlich verminderten Stimulationsfähigkeit der PLCγ_2 führt. Cdc42 kann die PLCγ_2 jedoch auch nach einem Austausch von Phenylalanin durch Tryptophan an Position 56 nicht stimulieren. Dies lässt darauf schließen, dass weitere strukturelle Unterschiede zwischen Rac2 und Cdc42 vorliegen müssen, die es ausschließlich Rac2 erlauben, mit der PLCγ_2 zu interagieren und diese zu stimulieren. In Abb. 14B ist die immunchemische Analyse der Ganzzelllysate dargestellt. Man erkennt, dass bei Verwendung von einem Anti-PLCγ_2-Antikörper in allen Proben eine Expression der PLCγ_2 nachgewiesen werden konnte. Allerdings ist sie bei Anwesenheit von Rac2^{W56F} und Cdc42 etwas schwächer und bei Anwesenheit von Rac2^{G12V} und Rac2$^{G12V/W56F}$ etwas

stärker als in den übrigen Ansätzen. Die Expression der PLCγ_2 ist in Anwesenheit von Rac2^{G12V} und Rac2$^{G12V/W56F}$ ähnlich stark, trotzdem konnte man in den oben beschriebenen Versuchen eine stark reduzierte Stimulation der PLCγ_2 beobachten, wenn sie mit Rac2$^{G12V/W56F}$ koexprimiert wurde. Diese reduzierte Stimulation lässt sich also nicht durch eine veränderte Expression der PLCγ_2 erklären. Bei Analyse mit einem Anti-HA-Antikörper konnte man HA-markiertes Rac2 und Cdc42 detektieren und die Expression dieser GTPasen vergleichen. Rac2 und Rac2^{W56F} wurden im Vergleich zu Rac2^{G12V} und Rac2$^{G12V/W56F}$ etwas geringer exprimiert. Im Vergleich zu Rac2 und den Mutanten von Rac2 waren die zellulären Konzentrationen von Cdc42 und seinen Mutanten jedoch wesentlich geringer. Somit können die Rac2- bzw. Cdc42-Mutanten im Versuch nur qualitativ verglichen werden. Die Kontrolle, für die Zellen nur mit Leervektor transfiziert worden waren, zeigte weder eine Expression der PLCγ_2 noch von Rac2 bzw. Cdc42.

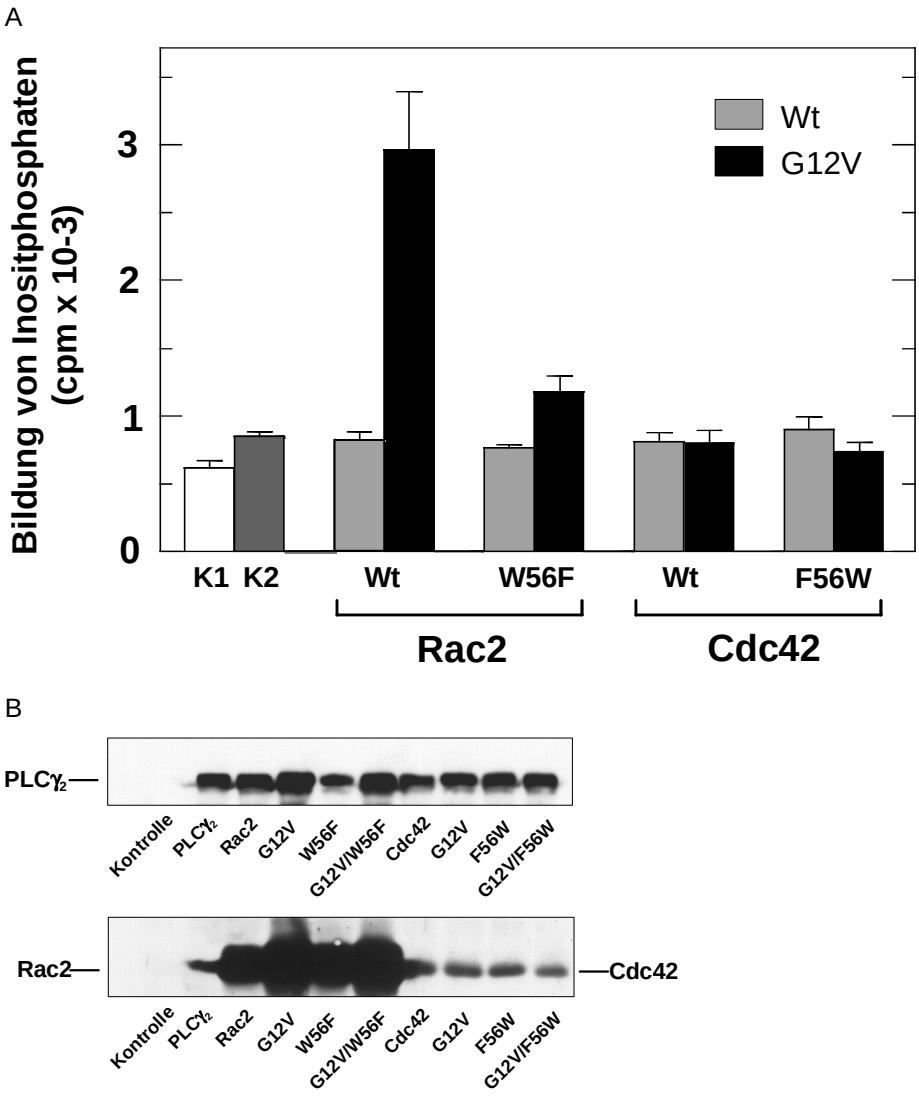


Abb. 14: Regulation der Phospholipase C-γ_2 (PLCγ_2) durch Hämagglutinin (HA)-markierte *ras-related C_3 botulinum toxin substrate 2* (Rac2)- bzw. HA-markierte *cell-division cycle protein 42* (Cdc42)-Mutanten in intakten Zellen. *A, B, african-green-monkey-kidney*-Zellen wurden wie an der Abszisse angegeben mit 1 µg des Vektors pcDesoxyribonukleinsäure (DNA) 3.1(+) (*A: K1*, *B: Kontrolle*) bzw. 250 ng pcDNA3.1(+)-PLCγ_2 (*K2*) und mit jeweils 750 ng der Vektoren pcDNA3.1(+)-HA-Rac2 (*Wt*), pcDNA3.1(+)-HA-Rac2^{G12V} (*G12V*), pcDNA3.1(+)-HA-Rac2^{W56F} (*W56F*), pcDNA3.1(+)-HA-Rac2$^{G12V/W56F}$ (*G12V/W56F*), pcDNA3.1(+)-HA-Cdc42 (*Wt*), pcDNA3.1(+)-HA-Cdc42^{F56W} (*F56W*) oder pcDNA3.1(+)-HA-Cdc42$^{G12V/F56W}$ (*G12V/F56W*) kotransfiziert. Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1 µg konstant gehalten. *A*, Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 Stunden in *dulbecco's-modified-eagle*-Medium (DMEM-Medium) mit 2,5 µCi/ml D-*myo*-[2-^{3}H(N)]-Inosit und 10 mM Lithiumchlorid inkubiert und anschließend die Inositphosphatbildung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen ± Standardabweichung. *B*, Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 Stunden in DMEM-Medium mit 10 mM Lithiumchlorid inkubiert und homogenisiert. Das Homogenat wurde auf ein Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Anti-PLCγ_2 bzw. Anti-HA-Antikörpern immunchemisch analysiert.

3.4.9 Regulation der PLCβ$_2$ durch Rac2-Mutanten im Vergleich zu Cdc42-Mutanten in intakten Zellen

Von Jezyk et al. wurde postuliert, dass die reduzierte Affinität von Cdc42 zur PLCβ$_2$ möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass Cdc42 im Unterschied zu Rac2 an Position 56 ein Phenylalanin trägt und dadurch die Stabilität der Interaktion zwischen Cdc42 und der PLCβ$_2$ vermindert sein könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Mutanten Rac2^{W56F}, Rac2$^{G12V/W56F}$, Cdc42^{F56W} und Cdc42$^{G12V/F56W}$ in COS-7-Zellen zusammen mit der PLCβ$_2$ exprimiert, um zu untersuchen, wie sich die GTPasen auf die Aktivität der PLCβ$_2$ auswirken. Abb. 15A zeigt, dass beide Kontrollen eine sehr geringe Inositphosphatproduktion aufweisen. Die Kontrolle 1 zeigt die Aktivität der endogenen PLC-Enzyme der COS-7-Zellen in Abwesenheit der PLCγ$_2$. Die Kontrolle 2 gibt die basale Aktivität der PLCγ$_2$ wieder, sie wurde in Abwesenheit von Rac2 und Cdc42 bestimmt. Wurde hingegen Rac2^{G12V} mit der PLCβ$_2$ koexprimiert, so steigerte sich die Inositphosphatproduktion um das *ca*. 9,8-fache im Vergleich zum Ansatz mit Rac2. Rac2^{W56F} führte im Vergleich zu wildtypischem Rac2 zu einer Reduktion der basalen Aktivität der PLCβ$_2$ um *ca.* die Hälfte. Im Vergleich zu Rac2^{W56F} bewirkte Rac2$^{G12V/W56F}$ nun eine *ca*. 19-fache Steigerung der Inositphosphatbildung. Dies zeigt, dass ein Austausch von Tryptophan gegen Phenylalanin an Position 56 die Rac2^{G12V}-vermittelte Stimulation der PLCβ$_2$ nicht beeinflusst. Interessanterweise führte konstitutiv aktives Cdc42^{G12V} ähnlich wie Rac2^{G12V} zu einer *ca.* 7,4-fachen Steigerung der Inositphosphatbildung im Vergleich zu Cdc42. Auch die Cdc42-Mutante Cdc42$^{G12V/F56W}$ steigerte die Inositphosphatproduktion um das *ca*. 8,2-fache im Vergleich zu Cdc42^{F56W}. Im Gegensatz zu Rac2^{W56F} führte Cdc42^{F56W} zu keiner Veränderung der basalen Aktivität der PLCβ$_2$. Eine immunchemische Analyse mit einem Anti-PLCβ$_2$-Antikörper (Abb. 15B) zeigte, dass in allen Lysaten von Zellen, die mit PLCβ$_2$-DNA transfiziert worden waren, die PLCβ$_2$ nachgewiesen werden konnte. Bei Anwesenheit von Rac2^{G12V}, Rac2$^{G12V/W56F}$ und Cdc42$^{G12V/F56W}$ war die Expression der PLCβ$_2$ etwas stärker im Vergleich zu derjenigen in Anwesenheit von Rac2, Rac2^{W56F}, Cdc42, Cdc42^{G12V} und Cdc42^{F56W}. Analysierte man die Ganzzelllysate mit einem Anti-HA-Antikörper, so konnte eine Expression von Rac2 und Cdc42 in den Proben nachgewiesen werden. Die Kontrolle zeigte keine Expression der PLCβ$_2$ bzw. von Rac2. Rac2^{G12V} und Rac2$^{G12V/W56F}$, welche die Aktivität der PLCβ$_2$ in ähnlichem Ausmaß stimulierten, waren ähnlich exprimiert, im Vergleich zu Rac2 und Rac2^{W56F} jedoch stärker. In den Zellen, die mit Cdc42-DNA bzw. mit der DNA der Cdc42-

Mutanten transfiziert worden waren, konnte wie schon unter 3.4.7 beschrieben eine sehr viel schwächere Expression von Cdc42 und den Cdc42-Mutanten beobachtet werden. Trotz der geringen Expression führten jedoch sowohl $Cdc42^{G12V}$ als auch $Cdc42^{G12V/F56W}$ zu einer deutlichen Stimulation der PLCβ_2. Zusammenfassend zeigen also diese Ergebnisse, dass sowohl aktives Rac2 als auch aktives Cdc42 die PLCβ_2 stimulieren können. Im Unterschied dazu kann die PLCγ_2 durch aktives Cdc42 nicht stimuliert werden. Cdc42 konnte die PLCβ_2 in ähnlichem Ausmaß wie Rac2 stimulieren, obwohl Cdc42 in den Zellen in wesentlich geringerer Menge vorlag. Die Veränderung der Aminosäure an Position 56 im Rac2- und Cdc42-Molekül hatte hierbei keinen Einfluss auf die Rac2- bzw. Cdc42-vermittelte Stimulation der PLCβ_2. Die Position 56 scheint also für die Interaktion von Rac2 bzw. Cdc42 mit der PLCβ_2 keine oder nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

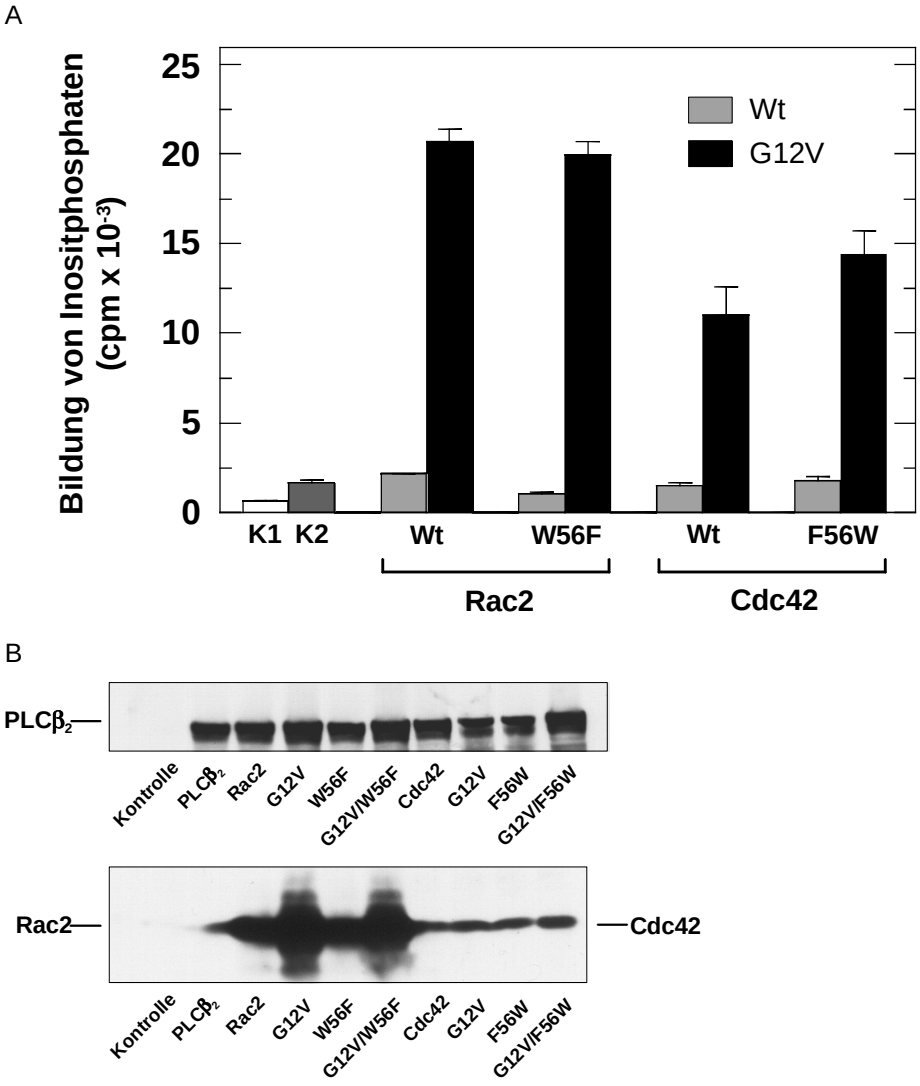


Abb. 15: Regulation der Phospholipase C-β_2 (PLCβ_2) durch Hämagglutinin (HA)-markierte *ras-related C_3 botulinum toxin substrate 2* (Rac2)- bzw. HA-markierte *cell-division cycle protein 42* (Cdc42)-Mutanten in intakten Zellen. *A, B,* a*frican-green-monkey-kidney*-Zellen wurden wie an der Abszisse angegeben mit 1 µg des Vektors pcDesoxyribonukleinsäure (DNA) 3.1(+) (*A: K1, B: Kontrolle*) bzw. 250 ng pcDNA3.1(–)-PLCβ_2 (*K2*) und mit jeweils 750 ng der Vektoren pcDNA3.1(+)-HA-Rac2 (*Wt*), pcDNA3.1(+)-HA-Rac2^{G12V} (*G12V*), pcDNA3.1(+)-HA-Rac2^{W56F} (*W56F*), pcDNA3.1(+)-HA-Rac2$^{G12V/W56F}$ (*G12V/W56F*), pcDNA3.1(+)-HA-Cdc42 (*Wt*), pcDNA3.1(+)-HA-Cdc42^{F56W} (*F56W*) oder pcDNA3.1(+)-HA-Cdc42$^{G12V/F56W}$ (*G12V/F56W*) kotransfiziert. Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1 µg konstant gehalten. *A,* Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 Stunden in *dulbecco's-modified-eagle*-Medium (DMEM-Medium) mit 2,5 µCi/ml D-*myo*-[2-^{3}H(N)]-Inosit und 10 mM Lithiumchlorid inkubiert und anschließend die Inositphosphatbildung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen ± Standardabweichung. *B,* Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 Stunden in DMEM-Medium mit 10 mM Lithiumchlorid inkubiert und homogenisiert. Das Homogenat wurde auf ein Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Anti-PLCβ_2 bzw. Anti-HA-Antikörpern immunchemisch analysiert.

4. Diskussion

Die Familie der PLC-Enzyme spielt in der Zelle bei der Weiterleitung verschiedenster Signale eine wichtige Rolle. So setzen diese Enzyme das Membranphospholipid PIP_2 zu IP_3 und DAG um. IP_3 wiederum vermittelt die intrazelluläre Freisetzung von Ca^{2+}-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum, DAG wirkt als Aktivator von Mitgliedern der PKC. Es ist bekannt, dass kleine Rho-GTPasen eine Rolle bei der Stimulation von PLCs spielen, so konnte in unserer Arbeitsgruppe unter anderem gezeigt werden, dass Rac2 und die PLCβ_2 miteinander interagieren (Illenberger *et al.* 2003). Auch die PLCγ_2 stellt einen Effektor von Rac2 dar. Erst kürzlich konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Rac2 eine Aktivierung der PLCγ_2 durch eine direkte Interaktion mit dem Enzym vermittelt. Hierbei konnte als strukturelles Element die zweigeteilte PH-Domäne der PLCγ_2 identifiziert werden, welche für die Interaktion zwischen PLCγ_2 und Rac2 notwendig und ausreichend ist. Die N-terminale PH-Domäne jedoch, welche für die Bindung der PLCβ_2 an Rac2 notwendig ist, spielt bei der Interaktion zwischen PLCγ_2 und Rac2 keine Rolle (Walliser *et al.* 2008). Durch Mutationsanalysen konnten in der C-terminalen Hälfte der zweigeteilten PH-Domäne der PLCγ_2 die für eine Bindung an Rac2 essentiellen Aminosäurereste ermittelt werden. So führte z.B. eine Mutation der Aminosäure an Position 897 zu einer aufgehobenen Bindung der PLCγ_2 an Rac2 (Walliser *et al.* 2008, Bunney *et al.* 2009).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, die strukturellen Elemente in Rac2 zu identifizieren, welche für eine Rac2-vermittelte Stimulation der PLCγ_2 notwendig sind. Hierfür wurden Rac2-Mutanten erzeugt, deren Mutationen in der *switch-I*- oder der *switch-II*-Region von Rac2 lagen und von denen aus der Literatur bekannt war, dass sie einen Einfluss auf die Bindung von Regulatoren oder Effektoren haben können. Solche Mutanten von Rac2 wurden beispielsweise genutzt, um Signalwege zu entschlüsseln, über die Rac2 die Motilität von neutrophilen Granulozyten und die Bildung von freien Sauerstoffradikalen in diesen Immunzellen reguliert. So ist z.B. bekannt, dass Rac2 die Motilität von neutrophilen Granulozyten über die Effektoren Pak1, Por1 und $p67^{phox}$ zu steuern vermag. Die Mutante $Rac2^{F37A}$ jedoch ist nicht mehr in der Lage, an Por1 zu binden oder Chemotaxis hervorzurufen. Auch $Rac2^{V36A}$ kann keine Chemotaxis vermitteln, obwohl es an Por1, Pak1 und $p67^{phox}$ binden kann, was den Schluss nahe legt, dass diese

Effektoren von Rac2 für eine Regulation der Chemotaxis zwar notwendig, aber nicht ausreichend sind (Carstanjen *et al.* 2005). Des Weiteren spielt die Position 37 von Rac2 bei der Aktivierung von Signalwegen eine Rolle, die für die Bildung von Lamellipodien und Filopodien verantwortlich sind. So führt eine Mutation an dieser Stelle dazu, dass COS-7-Zellen im Experiment keine Aktin-Polymerisation mehr zeigen und keine Zellfortsätze mehr ausbilden, zudem ist der Zellzyklus gestört (Lamarche *et al.* 1996). Eine weitere interessante Position im Rac2-Molekül ist die Aminosäure an Stelle 40. So führt die Mutation dieser Aminosäure dazu, dass Rac2 nicht mehr an Proteine wie WASP oder MSE55 binden kann, welche ein CRIB (Cdc42/Rac *interactive binding motif*)-Motiv enthalten. Zudem bindet diese Rac2-Mutante nicht mehr an Pak1 oder Por1 und ist nicht mehr dazu in der Lage, Chemotaxis zu bewirken (Lamarche *et al.* 1996, Price *et al.* 2002, Carstanjen *et al.* 2005). Interessanterweise verhindert die Mutation an Position 40 jedoch nicht, dass $p67^{phox}$ eine Membrantranslokation erfährt. Rac scheint also weitere Signalwege zu aktivieren, welche die Translokation von $p67^{phox}$ regulieren (Price *et al.* 2002). Auch Cdc42 trägt an Position 40 ein Tyrosin und zeigt bei dessen Mutation ein ähnliches Verhalten wie Rac: So ist für $Cdc42^{Y40C}$ die Bindung an CRIB-Motiv-enthaltende Proteine nicht mehr möglich. Des Weiteren kann es nicht mehr mit $p65^{PAK}$ interagieren, was auch für $Rac1^{Y40C}$ gezeigt werden konnte (Lamarche *et al.* 1996). Direkt vor der *switch-II*-Region, an Position 56, liegt eine weitere interessante und wichtige Aminosäure. Tauscht man dieses Tryptophan im Rac1-Molekül gegen ein Phenylalanin, welches im Cdc42-Molekül an dieser Stelle zu finden ist, so verliert Rac1 die Fähigkeit, durch Tiam1, ein Rac-spezifisches GEF, stimuliert zu werden. Allerdings ist Intersectin, ein Cdc42-spezifisches GEF, nun in der Lage, das $Rac1^{W56F}$-Molekül zu aktivieren. Eine $Cdc42^{F56W}$-Mutante, bei der das Phenylalanin an Position 56 gegen Tryptophan von Rac ausgetauscht wurde, ist wiederum nicht dazu fähig, Intersectin zu binden, dafür jedoch Tiam1 (Karnoub *et al.* 2001, Karnoub *et al.* 2004). Die Aminosäure an Position 56 vermittelt somit die Spezifität von GEFs für bestimmte Rho-GTPasen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden zunächst *in-vitro*-Versuche mit Rac2-Mutanten und PLC-Isozymen durchgeführt. Dabei wurde die $PLC\gamma_2$ mit der $PLC\beta_2$ verglichen, um Unterschiede und Gemeinsamkeiten der beiden Isoenzyme hinsichtlich ihrer Interaktionsmuster mit kleinen Rho-GTPasen erkennen zu können. Die PLCβ ist ein wichtiger Effektor kleiner Rho-GTPasen. Es konnte gezeigt werden, dass Rac1 ausschließlich mit seinen *switch*-Regionen an die PH-Domäne der $PLC\beta_2$ bindet (Jezyk *et*

al. 2006). Die Aminosäuren, die für diese Interaktion wichtig sind, sind in der Familie der kleinen Rho-GTPasen hochkonserviert, so können sowohl Rac als auch Cdc42 an die PLCβ_2 binden und sie aktivieren (Bunney *et al.* 2009). Erzeugte man Mutationen in der *switch-I*-Region von Rac2, so ergaben sich drei verschiedene Effekte. Bei Rekonstitution der PLCγ_2 mit Rac2^{N43A} kam es zu einer etwas stärkeren Stimulation der PLCγ_2 als durch wildtypisches Rac2 (Abb. 5). Auch bei der Rekonstitution dieser Mutante mit der PLCβ_2 ergaben sich gleiche Ergebnisse (Abb. 6). Es ist also davon auszugehen, dass diese Aminosäureposition für die Interaktion zwischen Rac2 und seinem Effektor, der PLC, eine untergeordnete Rolle spielt bzw. sogar entbehrlich ist. Daten der Arbeitsgruppe um Bunney unterstützen diese Ergebnisse ebenfalls. Bunney *et al.* konnten in Bindungsstudien zeigen, dass diese Rac2^{N43A}-Mutante mit ähnlicher Affinität an die zweigeteilte PH-Domäne der PLCγ_2 bindet wie wildtypisches Rac2 (Bunney *et al.* 2009). Hierzu konform sind die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Carstanjen, die beschreibt, dass die Mutation an Position 43 im Rac2-Molekül nicht dazu führt, dass die Bindung an Effektoren wie Por1 oder Pak1 aufgehoben oder vermindert ist (Carstanjen *et al.* 2005). Anders stellt sich die Situation für Rac2^{V36A} dar: Bei Austausch des Valins durch Alanin scheinen Bindungsfähigkeiten verloren zu gehen. Es zeigte sich eine geringfügige Abnahme der Aktivität der PLCγ_2, wenn diese mit Rac2^{V36A} rekonstituiert wurde (Abb. 5). Die Bindung und somit Aktivierung wird jedoch wohl nicht gänzlich aufgehoben. Es ist zu vermuten, dass diese Aminosäureposition Konformationsänderungen der *switch*-Regionen begünstigt, die zu einer höheren Affinität von Rac2 für die PLCγ_2 führen, jedoch für eine Stimulation der PLCγ_2 nicht essentiell sind. Dies lässt sich wiederum durch Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Bunney belegen: In Bindungsstudien bindet Rac2^{V36A} mit geringerer Affinität als wildtypisches Rac2 an die zweigeteilte PH-Domäne der PLCγ_2 (Bunney *et al.* 2009). Für die Interaktion zwischen Rac2 und der PLCβ_2 ergaben sich durch die Mutation an Position 36 keine Unterschiede. Rac2^{V36A} stimulierte die PLCβ_2 ähnlich wie wildtypisches Rac2 (Abb. 6). Es ist also davon auszugehen, dass hier ein Unterschied im Interaktionsverhalten der beiden Isoenzyme vorliegt: Die PLCβ_2 benötigt die Aminosäureposition 36 nicht für die Bindung an Rac2, die PLCγ_2 ist jedoch zu einem gewissen Ausmaß auf diese Position angewiesen. Neueste Forschungsergebnisse zeigen, dass die zur Signaltransduktion fähige Konformation des Rac2-Moleküls durch die Bindung an seinen Effektor, die PLCγ_2, stabilisiert wird. Hierbei spielt die Aminosäure Valin an Position 36 eine eminent wichtige Rolle (Bunney *et al.* 2009). Für die anderen in

der *switch-I*-Region gelegenen und untersuchten Aminosäurepositionen ergaben sich weitere interessante Ergebnisse. So führten die Mutanten $Rac2^{F37A}$, $Rac2^{D38A}$ und $Rac2^{Y40C}$ bei Rekonstitution mit der PLCγ_2 zu einer aufgehobenen Stimulation der PLCγ_2 (Abb. 5). Sie waren nicht mehr in der Lage, ihren Effektor zu aktivieren. Hier scheint es sich also um essentiell wichtige Interaktionspartner zwischen der PLCγ_2 und Rac2 zu handeln, ohne die eine Bindung und somit auch Stimulation nicht möglich ist. Diese Schlussfolgerung lässt sich mit Daten aus Bindungsstudien untermauern: So zeigen weder $Rac2^{D38A}$ noch $Rac2^{Y40C}$ eine dem wildtypischen Rac2 annähernd ähnliche Bindungsaffinität für die zweigeteilte PH-Domäne der PLCγ_2. $Rac2^{F37A}$ zeigt überhaupt keine Bindung mehr (Bunney *et al.* 2009). Ähnliches wurde bereits für $Rac1^{Y40C}$ beschrieben, welches z.B. nicht mehr dazu fähig ist, an Effektoren mit CRIB-Motiven zu binden (Price *et al.* 2002). Die Aminosäure an Stelle 40 spielt also eine zentrale Rolle bei der Bindung verschiedenster Effektoren von Rac-GTPasen. Dies zeigte sich ebenfalls bei Rekonstitutionsversuchen mit der PLCβ_2, die sich durch $Rac2^{Y40C}$ nicht mehr stimulieren ließ. Anders verhält es sich für $Rac2^{F37A}$ und $Rac2^{D38A}$, die noch in der Lage waren, die PLCβ_2 minimal zu stimulieren (Abb. 6). Bereits früher konnte in Versuchen mit intakten Zellen gezeigt werden, dass $Rac1^{F37A}$ zu einer verminderten Stimulation der PLCβ_2 führt (Jezyk *et al.* 2006).Die Aminosäurepositionen F37 und D38 spielen also wohl eine unterschiedliche Rolle bei der Interaktion von Rac2 mit den beiden Isoenzymen. Sie sind für eine Interaktion mit der PLCγ_2 unbedingt notwendig. Die PLCβ_2 benötigt sie wohl eher für eine hochaffine Bindung, wobei es aber auch ohne sie zu einer Interaktion mit Rac2 kommt. Diese verschiedenen Auswirkungen auf Effektoren sind für das Phenylalanin an Position 37 auch in der Literatur beschrieben: So kann $Rac2^{F37A}$ z. B. nicht mehr an Por1 oder $p160^{ROCK}$ binden, an $p67^{phox}$ allerdings schon (Lamarche *et al.* 1996, Carstanjen *et al.* 2005). Erst vor kurzem wurden Kristallstruktur-Analysen des Komplexes aus Rac2 und der zweigeteilten PH-Domäne der PLCγ_2 veröffentlicht, die zeigen, dass das Phenylalanin an Position 37 ein Schlüsselelement bei der Bindung von Rac2 an die PLCγ_2 darstellt. Zudem trägt sie wie das Valin an Stelle 36 zur Bildung der aktiven, durch die Bindung an die PLCγ_2 stabilisierten Konformation von Rac2 bei (Bunney *et al.* 2009). Auch für die Bildung eines aktiven Komplexes mit der PLCβ_2 kommt der Aminosäure an Position 37 von Rac eine essentielle Rolle zu, da sowohl die Rac1-Mutante $Rac1^{G12V/F37A}$ als auch die entsprechende Mutante von Rac3, $Rac3^{Q61L/F37L}$, die PLCβ_2 in intakten Zellen nicht mehr stimulieren können (Keller *et al.* 2005, Jezyk *et al.* 2006). Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die drei Aminosäuren an Position 37, 38 und 40 im Rac2-Molekül für eine

Interaktion mit der PLCγ_2 zwingend nötig sind. Für eine Rac2-vermittelte Stimulation der PLCβ_2 ist die Position 40 im Rac2-Molekül unbedingt notwendig, was die wichtige Rolle dieser Aminosäure hervorhebt. Des Weiteren gibt es Aminosäuren, die die Bindung von Rac2 an seine Effektoren zu verbessern scheinen: Für die Interaktion mit der PLCγ_2 ist dies die Aminosäure an Position 36, für die Interaktion mit der PLCβ_2 sind es die Aminosäuren an Position 37 und 38. Und schließlich gibt es Aminosäuren im Rac2-Molekül, die keinen Einfluss auf die Interaktion mit den beiden untersuchten PLC-Isoenzymen haben: So führt eine Mutation an Position 43 zu keiner veränderten Stimulation der PLCβ_2 und sogar zu einer etwas stärkeren Stimulation der PLCγ_2 , und eine Mutation an Position 36 beeinflusst die Stimulation der PLCβ_2 ebenfalls nicht.

Mit Hilfe der gewählten Mutanten von Rac2 konnten somit einzelne Aminosäurereste in der *switch-I*-Region von Rac2 identifiziert werden, welche für eine Interaktion mit der PLCγ_2 notwendig sind. Um zu untersuchen, ob die Interaktion auch durch die *switch-II*-Region von Rac2 vermittelt wird, wurden in dieser Arbeit *in-vitro*-Versuche mit Rac2-GTPasen durchgeführt, die eine Mutation in der *switch-II*-Region bzw. direkt vor der *switch-II*-Region trugen. Es erfolgte wiederum der direkte Vergleich der PLCγ_2 mit der PLCβ_2, um Unterschiede hinsichtlich der Interaktion mit Rac2 erkennen zu können. Tauschte man im Rac2-Molekül die Aminosäure Arginin an Position 66 durch ein Alanin aus, so zeigte sich sowohl für die PLCγ_2 als auch für die PLCβ_2 eine deutlich reduzierte Stimulation, die Inositphosphatbildung nahm im Vergleich zur Stimulation durch wildtypisches Rac2 vor allem bei der PLCβ_2 ab (Abb. 5, Abb. 6). Bei der PLCγ_2 ergab sich ein ähnlicher Effekt wie bei Rekonstitutionsversuchen mit Rac2^{V36A}. Die Aminosäure an Postition 66 des Rac2-Moleküls scheint also für eine Verstärkung der Interaktion zwischen Rac2 und der PLCγ_2 bzw. der PLCβ_2 nötig zu sein. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit in der Literatur beschriebenen Auswirkungen der Mutation an Position 66. So kann Cdc42^{R66A} weiterhin an Effektoren und Regulatoren binden, auch an solche, die ein CRIB-Motiv enthalten. Interessanterweise ist jedoch die Interaktion mit RhoGDIs aufgehoben, da die Position 66 von Cdc42 und Rac2 das N-terminale Segment von RhoGDI-Molekülen stabilisiert (Scheffzek *et al.* 2000, Lin *et al.* 2003). Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Versuchen wurden Rekonstitutionen mit einer Doppelmutanten durchgeführt, die sowohl eine Veränderung in der *switch-I*- als auch in der *switch-II*-Region trug. Hierbei zeigte sich eine im Vergleich zur Stimulation durch den Wildtyp verminderte Aktivität der PLCγ_2

(Abb. 7). Dieses Ergebnis geht konform mit den Ergebnissen, die man bei Rekonstitutionsversuchen mit den jeweiligen Einfachmutanten erhält. Sowohl $Rac2^{V36A}$ als auch $Rac2^{R66A}$ bewirken eine Verminderung der Aktivität der PLCγ_2. Die Aktivität der PLCβ_2 war in Gegenwart von $Rac2^{V36A/R66A}$ deutlich reduziert (Abb. 8), wobei die jeweiligen Einfachmutanten zu keiner (V36A) bzw. einer um etwa 50 % verminderten Aktivität (R66A) der PLCβ_2 führten. Direkt vor der *switch-II*-Region liegt an Position 56 ein Tryptophan. Wie bereits weiter oben beschrieben, konnte gezeigt werden, dass diese Aminosäure die Interaktion von Rac-GTPasen mit Rac-spezifischen GEFs wie Tiam1 vermittelt. Auch auf die Interaktion von Rac1 mit der PLCβ_2 hat diese Aminosäure Auswirkungen. So zeigte sich in intakten Zellen eine im Vergleich zu $Rac1^{G12V}$ verminderte Aktivierung der PLCβ_2 durch $Rac1^{G12V/W56A}$ (Karnoub *et al.* 2001, Karnoub *et al.* 2004, Jezyk *et al.* 2006). Eine weitere untersuchte Aminosäure ist das Leucin an Stelle 67 im Rac2-Molekül. Auch $Rac1^{G12V/L67A}$ führte in Rekonstitutionsversuchen zu einer verminderten Aktivität der PLCβ_2 (Jezyk *et al.* 2006). Für Rac2 war bisher noch nicht gezeigt worden, dass diese Aminosäurepositionen für eine Interaktion mit Effektoren, wie z.B. der PLCγ_2 notwendig sein können. Um diesen Aspekt zu untersuchen, wurde in den in dieser Arbeit dargestellten Versuchen der Einfluss von $Rac2^{W56A}$ auf die Aktivität der PLCγ_2 sowohl im zellfreien System als auch in intakten Zellen bestimmt. Hierbei konnte für die PLCγ_2 keinerlei Aktivität mehr nachgewiesen werden (Abb. 8, Abb. 9). Somit muss man von einer für die Interaktion mit der PLCγ_2 essentiellen Aminosäure an Position 56 ausgehen. Sie scheint nicht nur bei der Regulation von Rac durch GEFs, sondern auch bei der Interaktion von Rac2 mit Effektoren eine sehr/äußerst wichtige Rolle zu spielen. Dieses Ergebnis wird durch Kristallstrukturanalysen bestätigt. So konnte vor kurzem gezeigt werden, dass das Tryptophan an Position 56 für Protein-Protein-Interaktionen zwischen Rac2 und der PLCγ_2 und somit für eine Komplexbildung und die Aktivität der PLCγ_2 essentiell ist (Bunney *et al.* 2009). Von Jezyk *et al*. war gezeigt worden, dass das Tryptophan an Position 56 direkt an der Kontaktstelle zwischen Rac1 und der PLCβ_2 liegt (Jezyk *et al.* 2006). Interessanterweise hatte aber der Austausch von Tryptophan gegen Alanin an Position 56 keinen Einfluss auf die Rac2-vermittelte Stimulation der PLCβ_2 , sie wurde sowohl *in vitro* als auch in intakten Zellen ähnlich wie durch wildtypisches Rac2 stimuliert (Abb. 8, Abb. 10). Bei Rekonstitution mit der PLCγ_2 zeigte eine $Rac2^{L67A}$-Mutante keinerlei Aktivität mehr, sodass davon auszugehen ist, dass diese Aminosäure für eine Interaktion zwischen Rac2 und der PLCγ_2 essentiell ist. Auch in intakten Zellen war

eine Rac2$^{G12V/L67A}$-Mutante nicht mehr in der Lage, die PLCγ_2 zu stimulieren (Abb. 8, Abb. 9). Im Unterschied dazu wurde die PLCβ_2 sowohl *in vitro* als auch in intakten Zellen durch Rac2^{L67A} bzw. Rac2$^{G12V/L67A}$ in ähnlichem Ausmaß wie durch wildtypisches Rac2 stimuliert (Abb. 8, Abb. 10). Diese Ergebnisse werden durch neueste Bindungs- sowie Kristallstrukturstudien unterstützt: So konnten Bunney *et al.* zeigen, dass Rac2^{L67A} kaum Bindungsaffinität für die zweigeteilte PH-Domäne der PLCγ_2 besitzt. Wurde das Leucin an Position 67 des Rac2-Moleküls durch größere und/oder negativer geladene Aminosäuren wie Phenylalanin oder Glutamat ersetzt, so zeigte sich in Rekonstitutionsversuchen eine signifikante Verringerung der Aktivität der PLCγ_2. Im Gegensatz dazu wurde die Aktivität der PLCβ_2 durch Rac2^{L67F} oder Rac2^{L67E} nicht wesentlich beeinträchtigt (Bunney *et al.* 2009). Daraus lässt sich folgern, dass Rac2 mit der PLCβ_2 und der PLCγ_2 auf unterschiedliche Weise interagiert. Zusammenfassend zeigen die Experimente im zellfreien System und in intakten Zellen mit diversen Mutanten von Rac2, dass die PLCγ_2 und die PLCβ_2 durch Rac-GTPasen stimuliert werden können, sich jedoch in ihrem Interaktionsmuster mit Rac2 wesentlich unterscheiden. Es zeigt sich, dass sie die beiden PLCs mit unterschiedlichen Aminosäureresten von Rac2 interagieren. Auch die Kontaktregion innerhalb der zweigeteilten PH-Domäne der PLCγ_2 unterscheidet sich gänzlich von derjenigen innerhalb der N-terminalen PH-Domäne der PLCβ_2 im Rac1-PLCβ_2-Komplex (Jezyk *et al.* 2006, Bunney *et al.* 2009). Beiden PLCs gemeinsam ist, dass sie nur mit den *switch-I-* und *switch-II*-Regionen von Rac interagieren, wobei sie sich von anderen Effektoren von Rac und Cdc42 unterscheiden, die auch mit anderen Regionen von Rac und Cdc42 wie β1, α1, β2, α2 oder α5 interagieren können (Dvorsky und Ahmadian 2004).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass eine Rac2$^{G12V/W56A}$-Mutante keinen Einfluss auf die Stimulation der PLCβ_2 in intakten Zellen hat. Jezyk *et al.* hingegen beschreiben eine verminderte Stimulation der PLCβ_2 durch Rac1$^{G12V/W56A}$ (Jezyk *et al.* 2006). Diese Diskrepanz könnte dadurch erklärbar sein, dass in den Versuchen der Arbeitsgruppe um Jezyk die inaktive Form der Rac1-Variante, Rac1^{W56A}, nicht als Kontrolle verwendet wurde. In den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine inaktive Rac2^{W56A}-Mutante die basale Aktivität der PLCβ_2 inhibiert, dies wäre auch für eine inaktive Rac1^{W56A}-Mutante vorstellbar. Um dies zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit die Aktivität der PLCβ_2 in Anwesenheit der inaktiven

Rac-Mutanten $Rac1^{W56A}$, $Rac2^{W56A}$ und in Anwesenheit der konstitutiv aktiven Varianten $Rac1^{G12V/W56A}$ und $Rac2^{G12V/W56A}$ gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl $Rac1^{W56A}$ als auch $Rac2^{W56A}$ die basale Aktivität der PLCβ_2 inhibierten. Die konstitutiv aktiven Varianten konnten jedoch die PLCβ_2 in ähnlichem Ausmaß wie $Rac1^{G12V}$ bzw. $Rac2^{G12V}$ aktivieren (Abb. 11). Diese Ergebnisse verdeutlichen somit, dass zwischen Rac2 und Rac1 kein Unterschied besteht. Bei beiden GTPasen ist die Aminosäureposition W56 für die Interaktion mit der PLCγ_2 essentiell, jedoch für die Interaktion mit der PLCβ_2 entbehrlich.

In der Literatur wird eine fehlende Bindung von Cdc42 an die PLCβ_2 beschrieben. Des Weiteren konnte bei Versuchen in intakten Zellen keine Aktivierung der PLCβ_2 durch Cdc42 nachgewiesen werden (Snyder *et al.* 2003, Jezyk *et al.* 2006). Cdc42 besitzt an Position 56 anstatt eines Tryptophans ein Phenylalanin. Von der Arbeitsgruppe um Jezyk wurde daher postuliert, dass das Phenylalanin an Position 56 von Cdc42 für die reduzierte Affinität von Cdc42 für PLCβ-Isoenzyme verantwortlich sein könnte (Jezyk *et al.* 2006). Im Unterschied zu Jezyk *et al.* konnte in den Versuchen dieser Arbeit jedoch eine deutliche Stimulation der PLCβ_2 durch Cdc42 in intakten Zellen beobachtet werden, obwohl Cdc42 in den Zellen in wesentlich geringerem Ausmaß exprimiert wurde als Rac2 (Abb. 13). In früheren Rekonstitutionsexperimenten unserer Arbeitsgruppe wurde auch *in vitro* eine deutliche Stimulation der PLCβ_2 durch Cdc42 beobachtet, wenn auch hier Cdc42 mit geringerer Potenz und Effizienz die PLCβ_2 stimulierte als Rac2 (Illenberger *et al.* 2003). Der Austausch der Aminosäure Phenylalanin gegen Tryptophan in der Mutante $Cdc42^{F56W}$ hatte keinen Einfluss auf die Aktivierbarkeit der PLCβ_2 durch Cdc42. Somit konnte die von Jezyk *et al.* postulierte Hypothese, dass das Phenylalanin an Position 56 für eine reduzierte Affinität von Cdc42 zur PLCβ_2 verantwortlich sein könnte, nicht bestätigt werden. Des Weiteren ist die Rho-GTPase Cdc42 nicht in der Lage, die PLCγ_2 zu aktivieren (Piechulek *et al.* 2005, Bunney *et al.* 2009). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Tryptophan an Position 56 für eine Rac2-vermittelte Stimulation der PLCγ_2 unbedingt notwendig ist (Abb. 11, Abb. 12), da sowohl $Rac2^{W56A}$ als auch $Rac2^{W56F}$, bei welcher das Tryptophan an Position 56 durch das in Cdc42 enthaltene Phenylalanin ausgetauscht wurde, nicht mehr in der Lage waren, die PLCγ_2 zu aktivieren. Um zu überprüfen, ob die Position 56 für die selektive Aktivierung der PLCγ_2 durch Rac verantwortlich ist, wurden Mutanten von Cdc42, $Cdc42^{F56W}$ und $Cdc42^{G12V/F56W}$, hergestellt, bei welchen das Phenylalanin an Position 56 durch das in Rac enthaltene Tryptophan ausgetauscht wurde.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten jedoch, dass der Austausch des Phenylalanins gegen Tryptophan an Position 56 alleine nicht ausreicht, um eine Cdc42-vermittelte Stimulation der PLCγ_2 zu erzielen (Abb. 13). Dies konnte von unserer Arbeitsgruppe auch *in vitro* durch Rekonstitution gereinigter Proteine gezeigt werden (Bunney *et al.* 2009). Zwischen Rac2 und Cdc42 bestehen außer diesem Unterschied in der *switch-II*-Domäne (W56F) auch in der *switch-I*-Domäne drei Unterschiede in der Aminosäurensequenz, nämlich A27K, G30S und I33V. Wurden diese Aminosäuren einzeln oder alle zusammen ausgetauscht, sodass eine Vierfachmutante entstand, so führte dies jedoch zu keiner Cdc42-Varianten, die fähig war, die PLCγ_2 zu aktivieren. Dies war der Fall, obgleich die Bindungsaffinitäten der Cdc42^{F56W}-Mutante (K_D = 40 µM) und der Vierfachmutante (K_D = 40 µM) in einem Bereich liegen, in dem eine Stimulation der PLCγ_2 erwartet werden könnte (Bunney *et al.* 2009). Dies könnte somit bedeuten, dass Cdc42^{F56W} und die Vierfachmutante zwar an die PLCγ_2 binden können, jedoch für die effektive Stimulation des Enzyms Bereiche außerhalb der beiden *switch*-Domänen notwendig sind. Zudem konnte in Kristallstruktur-Analysen gezeigt werden, dass ein Tryptophan an Position 56 im Rac2-Molekül Kationen-π oder π-σ-Interaktionen mit der zweigeteilten PH-Domäne der PLCγ_2 unterstützt. Ein Phenylalanin an dieser Stelle vermag dies jedoch nicht zu leisten. Es wird somit postuliert, dass dieses Tryptophan für die Rac-Spezifität der PLCγ_2-Aktivierung verantwortlich ist (Bunney *et al.* 2009). In zukünftigen Experimenten müssten nun diejenigen strukturellen Bereiche identifiziert werden, die für die selektive Aktivierung der PLCγ_2 durch Rac2 verantwortlich sind.

Für die Zukunft ergeben sich mit diesen Ergebnissen viele interessante Forschungsansätze. Gerade mit den Mutanten Rac2^{W56A} und Rac2^{L67A}, die spezifisch die Aktivierung der PLCγ_2, nicht aber diejenige der PLCβ_2 hemmen, ließen sich wichtige Erkenntnisse gewinnen. So wäre es möglich, mithilfe dieser Mutanten den spezifischen Beitrag der PLCγ_2 in komplexen Zellsignalwegen zu ermitteln und zu erkennen, wo diese regulierend eingreift. Gerade in B-Zellen könnten so wichtige Erkenntnisse gewonnen werden, da beide PLC-Isozyme in diesem Zelltyp exprimiert werden. In fernerer Zukunft könnte es möglich sein, die physiologische Bedeutung der Rac2-vermittelten Aktivierung der PLCγ_2 zu klären. Hierbei würden sich auch die weiter oben beschriebenen PLCγ_2-Mutanten anbieten, die nicht mehr an Rac2 binden können.

Zudem bieten sich auch vielerlei pharmakologische Ansatzpunkte. So wurde z.B. von Pleines *et al.* vor kurzem gezeigt, dass Rac1 in Thrombozyten für eine Aktivierung der PLCγ_2 essentiell ist, die durch ITAM-gekoppelte Rezeptoren vermittelt und durch GPVI getriggert wird. Interessanterweise lassen sich Rac1-defiziente Thrombozyten weiterhin durch Thrombin, ADP und TxA_2 aktivieren. Dieser Signalweg verläuft über die Aktivierung von GPCRs und die Aktivierung der PLCβ, sodass davon auszugehen ist, dass Rac1 in Thrombozyten lediglich mit der PLCγ_2 interagiert. Dieser Signalweg könnte somit ein Ziel von anti-thrombotischen Agenzien sein, um Thrombosen und sogar Tumor-Metastasierungen zu verhindern (Pleines *et al.* 2009).

5. Zusammenfassung

Für die Signaltransduktion innerhalb der Zelle spielen Phospholipasen C (PLCs) eine entscheidende Rolle. Sie katalysieren die Bildung von *second messengers* wie D-*myo*-Inosit-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und 1,2-Diazyl-*sn*-glyzerol (DAG) aus dem Membranphospholipid Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat. Im Folgenden kommt es daraufhin zur IP_3-vermittelten Freisetzung von Ca^{2+}-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum und der DAG-vermittelten Aktivierung von Mitgliedern der Proteinkinase C-Familie. Für die Aktivierung von Mitgliedern der PLC-Familie sind heterotrimere G-Proteine und Tyrosinkinasen verantwortlich. Des Weiteren wurden kleine Rho-GTPasen als direkte Interaktionspartner und wichtige Aktivatoren der PLCs identifiziert. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Rac-GTPasen die PLCβ_2 zu stimulieren vermögen. Hierbei interagieren die *switch*-Regionen des Rac-Moleküls mit der aminoterminalen PH-Domäne der PLCβ_2. Auch die PLCγ_2 kann durch Rac1, Rac2 und Rac3 aktiviert werden. Erst kürzlich wurde von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass der carboxylterminale Anteil der zweigeteilten PH-Domäne der PLCγ_2 für die Interaktion mit Rac2 notwendig ist.

In dieser Arbeit wurde untersucht, welche strukturellen Elemente und spezifischen Aminosäuren im Rac2-Molekül für die Interaktion mit der PLCγ_2 und der PLCβ_2 von entscheidender Bedeutung sind. Es wurden Rac2-Mutanten erzeugt, die Mutationen innerhalb der *switch-I*- oder *switch-II*-Region tragen. Diese Mutanten von Rac2 wurden sowohl im zellfreien System *in vitro* als auch in intakten COS-7-Zellen mit der PLCγ_2 oder der PLCβ_2 rekonstituiert. Die Aktivität der PLC-Enzyme wurde anhand der Bildung von Inositphosphaten bestimmt. Somit konnten Rückschlüsse auf die Fähigkeit der Rac2-Mutanten gezogen werden, die PLCs zu stimulieren. In den Versuchen zeigte sich, dass in der *switch-I*-Region des Rac2-Moleküls die Aminosäuren Phenylalanin an Position 37, Aspartat an Position 38 und Tyrosin an Position 40 für eine Aktivierung der PLCγ_2 durch Rac2 notwendig sind. Für eine Aktivierung der PLCβ_2 durch Rac2 ist das Tyrosin an Position 40 im Rac2-Molekül essentiell. Die Aminosäure Valin an Position 36 von Rac2 ist für eine höhere Aktivität der PLCγ_2 verantwortlich, diejenigen Aminosäuren an Position 37 (Phenylalanin) und 38 (Aspartat) beeinflussen die Aktivität der PLCβ_2 und erhöhen sie. Innerhalb der *switch-II*-Region sind die beiden Aminosäurereste an den Positionen 56

(Tryptophan) und 67 (Leucin) für eine Aktivierung der PLCγ_2 durch Rac2 absolut notwendig, jedoch für eine Stimulation der PLCβ_2 entbehrlich. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die für eine Interaktion mit den Effektoren PLCγ_2 und PLCβ_2 essentiellen Aminosäurepositionen in Rac2 verschieden sind und somit der Kontaktbereich zwischen Rac2 und PLCγ_2 bzw. zwischen Rac2 und PLCβ_2 hochspezifisch ist. Des Weiteren konnten in dieser Arbeit zwei Mutanten von Rac2, Rac2^{W56A} und Rac2^{L67A} identifiziert werden, welche spezifisch die Aktivierung der PLCγ_2, jedoch nicht diejenige der PLCβ_2 hemmen. Mit Hilfe dieser Mutanten wird es in Zukunft möglich sein, den spezifischen Beitrag der PLCγ_2 in komplexen Rac2-vermittelten Signalwegen zu untersuchen, wie zum Beispiel in B-Zellen, die beide PLC-Isoenzyme exprimieren. Die Charakterisierung der spezifischen Kontaktstellen zwischen Rac2 und seinen Effektoren ist notwendig, um die molekularen Mechanismen, die bei der Signaltransduktion eine Rolle spielen, besser verstehen und unterscheiden zu können. So können z.B. Angriffspunkte für neue Pharmaka identifiziert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Aittaleb M, Boguth CA, Tesmer JJ: Structure and function of heterotrimeric G protein-regulated Rho guanine nucleotide exchange factors. Mol.Pharmacol. (2010) 77: 111-125
2. Baker S J, Rane S G, Reddy E P: Hematopoietic cytokine receptor signaling. Oncogene (2007) 26: 6724-6737
3. Barnard E A: Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. Trends Biochem.Sci. (1992) 17: 368-374
4. Bishop A L, Hall A: Rho GTPases and their effector proteins. Biochem.J. (2000) 348 Pt 2: 241-255
5. Bradford M M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem. (1976) 72: 248-254
6. Brown F D, Rozelle A L, Yin H L, Balla T, Donaldson J G: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. J.Cell Biol. (2001) 154: 1007-1017
7. Buchsbaum R J: Rho activation at a glance. J.Cell.Sci. (2007) 120: 1149-1152
8. Bunney T D, Opaleye O, Roe S M, Vatter P, Baxendale R W, Walliser C, Everett K L, Josephs M B, Christow C, Rodrigues-Lima F, Gierschik P, Pearl L H, Katan M: Structural insights into formation of an active signaling complex between Rac and phospholipase C gamma 2. Mol.Cell (2009) 34: 223-233
9. Bustelo X R, Sauzeau V, Berenjeno I M: GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. Bioessays (2007) 29: 356-370
10. Caraveo G, van Rossum D B, Patterson R L, Snyder S H, Desiderio S: Action of TFII-I outside the nucleus as an inhibitor of agonist-induced calcium entry. Science (2006) 314: 122-125
11. Carstanjen D, Yamauchi A, Koornneef A, Zang H, Filippi M D, Harris C, Towe J, Atkinson S, Zheng Y, Dinauer M C, Williams D A: Rac2 regulates neutrophil chemotaxis, superoxide production, and myeloid colony formation through multiple distinct effector pathways. J.Immunol. (2005) 174: 4613-4620
12. Cerione R A, Leonard D, Zheng Y: Purification of baculovirus-expressed Cdc42Hs. Methods Enzymol. (1995) 256: 11-15

13. Chesarone M A, DuPage A G, Goode B L: Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. Nat.Rev.Mol.Cell Biol. (2010) 11: 62-74
14. Crespo P, Schuebel K E, Ostrom A A, Gutkind J S, Bustelo X R: Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. Nature (1997) 385: 169-172
15. Croker B A, Tarlinton D M, Cluse L A, Tuxen A J, Light A, Yang F C, Williams D A, Roberts A W: The Rac2 guanosine triphosphatase regulates B lymphocyte antigen receptor responses and chemotaxis and is required for establishment of B-1a and marginal zone B lymphocytes. J.Immunol. (2002) 168: 3376-3386
16. Diebold B A, Bokoch G M: Rho GTPases and the control of the oxidative burst in polymorphonuclear leukocytes. Curr.Top.Microbiol.Immunol. (2005) 291: 91-111
17. Dietrich A, Meister M, Spicher K, Schultz G, Camps M, Gierschik P: Expression, characterization and purification of soluble G-protein beta gamma dimers composed of defined subunits in baculovirus-infected insect cells. FEBS Lett. (1992) 313: 220-224
18. Dvorsky R, Ahmadian M R: Always look on the bright site of Rho: structural implications for a conserved intermolecular interface. EMBO Rep. (2004) 5: 1130-1136
19. Etienne-Manneville S, Hall A: Rho GTPases in cell biology. Nature (2002) 420: 629-635
20. Fu C, Turck C W, Kurosaki T, Chan A C: BLNK: a central linker protein in B cell activation. Immunity (1998) 9: 93-103
21. Gorbatyuk V Y, Nosworthy N J, Robson S A, Bains N P, Maciejewski M W, Dos Remedios C G, King G F: Mapping the phosphoinositide-binding site on chick cofilin explains how PIP2 regulates the cofilin-actin interaction. Mol.Cell (2006) 24: 511-522
22. Gotthardt K, Ahmadian M R: Asef is a Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor. Biol.Chem. (2007) 388: 67-71
23. Hall A: Rho GTPases and the control of cell behaviour. Biochem.Soc.Trans. (2005) 33: 891-895
24. Harden T K, Sondek J: Regulation of phospholipase C isozymes by ras superfamily GTPases. Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. (2006) 46: 355-379
25. Hepler J R, Kozasa T, Smrcka A V, Simon M I, Rhee S G, Sternweis P C, Gilman A G: Purification from Sf9 cells and characterization of recombinant Gq alpha and G11

alpha. Activation of purified phospholipase C isozymes by G alpha subunits. J.Biol.Chem. (1993) 268: 14367-14375

26. Hill S J: G-protein-coupled receptors: past, present and future. Br.J.Pharmacol. (2006) 147 Suppl 1: S27-37
27. Horton RM, Pease LR: Recombination and Mutagenesis of DNA sequences using PCR. In: McPherson MJ (Hrsg.): Directed mutagenesis: A practical approach. Oxford University Press, England (1991) 217-247
28. Huang C L: Complex roles of PIP2 in the regulation of ion channels and transporters. Am.J.Physiol.Renal Physiol. (2007) 293: F1761-5
29. Humphries L A, Dangelmaier C, Sommer K, Kipp K, Kato R M, Griffith N, Bakman I, Turk C W, Daniel J L, Rawlings D J: Tec kinases mediate sustained calcium influx via site-specific tyrosine phosphorylation of the phospholipase Cgamma Src homology 2-Src homology 3 linker. J.Biol.Chem. (2004) 279: 37651-37661
30. Hwang J I, Oh Y S, Shin K J, Kim H, Ryu S H, Suh P G: Molecular cloning and characterization of a novel phospholipase C, PLC-eta. Biochem.J. (2005) 389: 181-186
31. Illenberger D, Schwald F, Pimmer D, Binder W, Maier G, Dietrich A, Gierschik P: Stimulation of phospholipase C-beta2 by the Rho GTPases Cdc42Hs and Rac1. EMBO J. (1998) 17: 6241-6249
32. Illenberger D, Walliser C, Nurnberg B, Diaz Lorente M, Gierschik P: Specificity and structural requirements of phospholipase C-beta stimulation by Rho GTPases versus G protein beta gamma dimers. J.Biol.Chem. (2003) 278: 3006-3014
33. Ishiai M, Sugawara H, Kurosaki M, Kurosaki T: Cutting edge: association of phospholipase C-gamma 2 Src homology 2 domains with BLNK is critical for B cell antigen receptor signaling. J.Immunol. (1999) 163: 1746-1749
34. Itoh T, Koshiba S, Kigawa T, Kikuchi A, Yokoyama S, Takenawa T: Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. Science (2001) 291: 1047-1051
35. Jaffe A B, Hall A: Rho GTPases: biochemistry and biology. Annu.Rev.Cell Dev.Biol. (2005) 21: 247-269
36. Jezyk M R, Snyder J T, Gershberg S, Worthylake D K, Harden T K, Sondek J: Crystal structure of Rac1 bound to its effector phospholipase C-beta2. Nat.Struct.Mol.Biol. (2006) 13: 1135-1140

37. Ji Q S, Winnier G E, Niswender K D, Horstman D, Wisdom R, Magnuson M A, Carpenter G: Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma1 in mammalian growth and development. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1997) 94: 2999-3003
38. Karnoub A E, Symons M, Campbell S L, Der C J: Molecular basis for Rho GTPase signaling specificity. Breast Cancer Res.Treat. (2004) 84: 61-71
39. Karnoub A E, Worthylake D K, Rossman K L, Pruitt W M, Campbell S L, Sondek J, Der C J: Molecular basis for Rac1 recognition by guanine nucleotide exchange factors. Nat.Struct.Biol. (2001) 8: 1037-1041
40. Karpen J W, Ruiz M: Ion channels: does each subunit do something on its own? Trends Biochem.Sci. (2002) 27: 402-409
41. Katan M: New insights into the families of PLC enzymes: looking back and going forward. Biochem.J. (2005) 391: e7-9
42. Keller P J, Gable C M, Wing M R, Cox A D: Rac3-mediated transformation requires multiple effector pathways. Cancer Res. (2005) 65: 9883-9890
43. Kouchi Z, Shikano T, Nakamura Y, Shirakawa H, Fukami K, Miyazaki S: The role of EF-hand domains and C2 domain in regulation of enzymatic activity of phospholipase Czeta. J.Biol.Chem. (2005) 280: 21015-21021
44. Kuang Y, Wu Y, Jiang H, Wu D: Selective G protein coupling by C-C chemokine receptors. J.Biol.Chem. (1996) 271: 3975-3978
45. Kuang Y, Wu Y, Smrcka A, Jiang H, Wu D: Identification of a phospholipase C beta2 region that interacts with Gbeta-gamma. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1996) 93: 2964-2968
46. Kurosaki T: Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. Nat.Rev.Immunol. (2002) 2: 354-363
47. Kurosaki T, Maeda A, Ishiai M, Hashimoto A, Inabe K, Takata M: Regulation of the phospholipase C-gamma2 pathway in B cells. Immunol.Rev. (2000) 176: 19-29
48. Kurosaki T, Okada T: Regulation of phospholipase C-gamma2 and phosphoinositide 3-kinase pathways by adaptor proteins in B lymphocytes. Int.Rev.Immunol. (2001) 20: 697-711
49. Kurosaki T, Tsukada S: BLNK: connecting Syk and Btk to calcium signals. Immunity (2000) 12: 1-5
50. Laemmli U K: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (1970), 227: 680-685

51. Lamarche N, Tapon N, Stowers L, Burbelo P D, Aspenstrom P, Bridges T, Chant J, Hall A: Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. Cell (1996) 87: 519-529
52. Lee C W, Lee K H, Lee S B, Park D, Rhee S G: Regulation of phospholipase C-beta 4 by ribonucleotides and the alpha subunit of Gq. J.Biol.Chem. (1994) 269: 25335-25338
53. Lee S B, Rao A K, Lee K H, Yang X, Bae Y S, Rhee S G: Decreased expression of phospholipase C-beta 2 isozyme in human platelets with impaired function. Blood (1996) 88: 1684-1691
54. Li S, Yamauchi A, Marchal C C, Molitoris J K, Quilliam L A, Dinauer M C: Chemoattractant-stimulated Rac activation in wild-type and Rac2-deficient murine neutrophils: preferential activation of Rac2 and Rac2 gene dosage effect on neutrophil functions. J.Immunol. (2002) 169: 5043-5051
55. Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka A V, Wu D: Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. Science (2000) 287: 1046-1049
56. Lin Q, Fuji R N, Yang W, Cerione R A: RhoGDI is required for Cdc42-mediated cellular transformation. Curr.Biol. (2003) 13: 1469-1479
57. Litosch I: Novel mechanisms for feedback regulation of phospholipase C-beta activity. IUBMB Life (2002) 54: 253-260
58. Liu J, Zuo X, Yue P, Guo W: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane for exocytosis in mammalian cells. Mol.Biol.Cell (2007) 18: 4483-4492
59. Liu M, Simon M I: Regulation by cAMP-dependent protein kinase of a G-protein-mediated phospholipase C. Nature (1996) 382: 83-87
60. Löffler G, Löffler-Petrides , Petrides P E: Biochemie und Pathobiochemie, Springer, Berlin, S. 790, 823, 797, 804 (2003)
61. Malarkey K, Belham C M, Paul A, Graham A, McLees A, Scott P H, Plevin R: The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. Biochem.J. (1995) 309 (Pt 2): 361-375
62. Mao G F, Vaidyula V R, Kunapuli S P, Rao A K: Lineage-specific defect in gene expression in human platelet phospholipase C-beta2 deficiency. Blood (2002) 99: 905-911

63. Marinissen M J, Gutkind J S: G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. Trends Pharmacol.Sci. (2001) 22: 368-376
64. Michaelson D, Silletti J, Murphy G, D'Eustachio P, Rush M, Philips M R: Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. J.Cell Biol. (2001) 152: 111-126
65. Michaely P A, Mineo C, Ying Y S, Anderson R G: Polarized distribution of endogenous Rac1 and RhoA at the cell surface. J.Biol.Chem. (1999) 274: 21430-21436
66. Miyamoto Y, Yamauchi J, Itoh H: Src kinase regulates the activation of a novel FGD-1-related Cdc42 guanine nucleotide exchange factor in the signaling pathway from the endothelin A receptor to JNK. J.Biol.Chem. (2003) 278: 29890-29900
67. Nakahara M, Shimozawa M, Nakamura Y, Irino Y, Morita M, Kudo Y, Fukami K: A novel phospholipase C, PLC(eta)2, is a neuron-specific isozyme. J.Biol.Chem. (2005) 280: 29128-29134
68. Nguyen Tle X, Ahn J Y: Lipase inactive mutant of PLC-gamma1 regulates NGF-induced neurite outgrowth via enzymatic activity and regulation of cell cycle regulatory proteins. J.Biochem.Mol.Biol. (2007) 40: 888-894
69. Nishida M, Sugimoto K, Hara Y, Mori E, Morii T, Kurosaki T, Mori Y: Amplification of receptor signalling by Ca^{2+} entry-mediated translocation and activation of PLCgamma2 in B lymphocytes. EMBO J. (2003) 22: 4677-4688
70. Noh D Y, Shin S H, Rhee S G: Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. Biochim.Biophys.Acta (1995) 1242: 99-113
71. Offermanns S: G-proteins as transducers in transmembrane signalling. Prog.Biophys.Mol.Biol. (2003) 83: 101-130
72. Offermanns S, Simon M I: G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. J.Biol.Chem. (1995) 270: 15175-15180
73. Park D, Jhon D Y, Lee C W, Lee K H, Rhee S G: Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits. J.Biol.Chem. (1993) 268: 4573-4576
74. Park D, Jhon D Y, Lee C W, Ryu S H, Rhee S G: Removal of the carboxyl-terminal region of phospholipase C-beta 1 by calpain abolishes activation by G alpha q. J.Biol.Chem. (1993) 268: 3710-3714
75. Piechulek T, Rehlen T, Walliser C, Vatter P, Moepps B, Gierschik P: Isozyme-specific stimulation of phospholipase C-gamma2 by Rac GTPases. J.Biol.Chem. (2005) 280: 38923-38931

76. Pleines I, Elvers M, Strehl A, Pozgajova M, Varga-Szabo D, May F, Chrostek-Grashoff A, Brakebusch C, Nieswandt B: Rac1 is essential for phospholipase C-gamma2 activation in platelets. Pflugers Arch. (2009) 457: 1173-1185
77. Price M O, Atkinson S J, Knaus U G, Dinauer M C: Rac activation induces NADPH oxidase activity in transgenic COSphox cells, and the level of superoxide production is exchange factor-dependent. J.Biol.Chem. (2002) 277: 19220-19228
78. Rebecchi M J, Pentyala S N: Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. Physiol.Rev. (2000) 80: 1291-1335
79. Rhee S G: Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. Annu.Rev.Biochem. (2001) 70: 281-312
80. Rhee S G, Bae Y S: Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. J.Biol.Chem. (1997) 272: 15045-15048
81. Ritter S L, Hall R A: Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. Nat.Rev.Mol.Cell Biol. (2009) 10: 819-830
82. Rong R, Ahn J Y, Chen P, Suh P G, Ye K: Phospholipase activity of phospholipase C-gamma1 is required for nerve growth factor-regulated MAP kinase signaling cascade in PC12 cells. J.Biol.Chem. (2003) 278: 52497-52503
83. Rossman K L, Der C J, Sondek J: GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. Nat.Rev.Mol.Cell Biol. (2005) 6: 167-180
84. Sanger F, Nicklen S, Coulson A R: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1977) 74: 5463-5467
85. Sankaran B, Osterhout J, Wu D, Smrcka A V: Identification of a structural element in phospholipase C beta2 that interacts with G protein betagamma subunits. J.Biol.Chem. (1998) 273: 7148-7154
86. Saunders C M, Larman M G, Parrington J, Cox L J, Royse J, Blayney L M, Swann K, Lai F A: PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. Development (2002) 129: 3533-3544
87. Scheffzek K, Ahmadian M R, Kabsch W, Wiesmuller L, Lautwein A, Schmitz F, Wittinghofer A: The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. Science (1997) 277: 333-338
88. Scheffzek K, Stephan I, Jensen O N, Illenberger D, Gierschik P: The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. Nat.Struct.Biol. (2000) 7: 122-126
89. Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell (2000) 103: 211-225

90. Servitja J M, Marinissen M J, Sodhi A, Bustelo X R, Gutkind J S: Rac1 function is required for Src-induced transformation. Evidence of a role for Tiam1 and Vav2 in Rac activation by Src. J.Biol.Chem. (2003) 278: 34339-34346
91. Shirai Y, Murakami T, Kuramasu M, Iijima L, Saito N: A novel PIP2 binding of epsilonPKC and its contribution to the neurite induction ability. J.Neurochem. (2007) 102: 1635-1644
92. Shirane M, Sawa H, Kobayashi Y, Nakano T, Kitajima K, Shinkai Y, Nagashima K, Negishi I: Deficiency of phospholipase C-gamma1 impairs renal development and hematopoiesis. Development (2001) 128: 5173-5180
93. Smith M R, Ryu S H, Suh P G, Rhee S G, Kung H F: S-phase induction and transformation of quiescent NIH 3T3 cells by microinjection of phospholipase C. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1989) 86: 3659-3663
94. Smrcka A V, Sternweis P C: Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C beta by G protein alpha and beta gamma subunits. J.Biol.Chem. (1993) 268: 9667-9674
95. Snyder J T, Singer A U, Wing M R, Harden T K, Sondek J: The pleckstrin homology domain of phospholipase C-beta2 as an effector site for Rac. J.Biol.Chem. (2003) 278: 21099-21104
96. Sternweis P C, Robishaw J D: Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. J.Biol.Chem. (1984) 259: 13806-13813
97. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T: Small GTP-binding proteins. Physiol.Rev. (2001) 81: 153-208
98. Tao W, Filippi M D, Bailey J R, Atkinson S J, Connors B, Evan A, Williams D A: The TRQQKRP motif located near the C-terminus of Rac2 is essential for Rac2 biologic functions and intracellular localization. Blood (2002) 100: 1679-1688
99. Tsygankov A Y: Non-receptor protein tyrosine kinases. Front.Biosci. (2003) 8: s595-635
100. Tybulewicz V L, Henderson R B: Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. Nat.Rev.Immunol. (2009) 9: 630-644
101. Uings I J, Farrow S N: Cell receptors and cell signalling. Mol.Pathol. (2000) 53: 295-299
102. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C: Rho GTPases and signaling networks. Genes Dev. (1997) 11: 2295-2322

103. van Rossum D B, Patterson R L, Sharma S, Barrow R K, Kornberg M, Gill D L, Snyder S H: Phospholipase Cgamma1 controls surface expression of TRPC3 through an intermolecular PH domain. Nature (2005) 434: 99-104
104. Vega F M, Ridley A J: Rho GTPases in cancer cell biology. FEBS Lett. (2008) 582: 2093-2101
105. Walliser C, Retlich M, Harris R, Everett K L, Josephs M B, Vatter P, Esposito D, Driscoll P C, Katan M, Gierschik P, Bunney T D: rac regulates its effector phospholipase Cgamma2 through interaction with a split pleckstrin homology domain. J.Biol.Chem. (2008) 283: 30351-30362
106. Walmsley M J, Ooi S K, Reynolds L F, Smith S H, Ruf S, Mathiot A, Vanes L, Williams D A, Cancro M P, Tybulewicz V L: Critical roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B cell development and signaling. Science (2003) 302: 459-462
107. Wang D, Feng J, Wen R, Marine J C, Sangster M Y, Parganas E, Hoffmeyer A, Jackson C W, Cleveland J L, Murray P J, Ihle J N: Phospholipase Cgamma2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. Immunity (2000) 13: 25-35
108. Wang T, Pentyala S, Elliott J T, Dowal L, Gupta E, Rebecchi M J, Scarlata S: Selective interaction of the C2 domains of phospholipase C-beta1 and -beta2 with activated Galphaq subunits: an alternative function for C2-signaling modules. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1999) 96: 7843-7846
109. Wen R, Jou S T, Chen Y, Hoffmeyer A, Wang D: Phospholipase C gamma 2 is essential for specific functions of Fc epsilon R and Fc gamma R. J.Immunol. (2002) 169: 6743-6752
110. Wennerberg K, Der C J: Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). J.Cell.Sci. (2004) 117: 1301-1312
111. Wilde J I, Watson S P: Regulation of phospholipase C gamma isoforms in haematopoietic cells: why one, not the other? Cell.Signal. (2001) 13: 691-701
112. Williams C L: The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: a regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences. Cell.Signal. (2003) 15: 1071-1080
113. Wu D Q, Lee C H, Rhee S G, Simon M I: Activation of phospholipase C by the alpha subunits of the Gq and G11 proteins in transfected Cos-7 cells. J.Biol.Chem. (1992) 267: 1811-1817

114. Yu H, Leitenberg D, Li B, Flavell R A: Deficiency of small GTPase Rac2 affects T cell activation. J.Exp.Med. (2001) 194: 915-926

115. Zhang B, Zhang Y, Wang Z, Zheng Y: The role of Mg^{2+} cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins. J.Biol.Chem. (2000) 275: 25299-25307

116. Zhang W, Neer E J: Reassembly of phospholipase C-beta2 from separated domains: analysis of basal and G protein-stimulated activities. J.Biol.Chem. (2001) 276: 2503-2508

117. Zhang Y, Hoon M A, Chandrashekar J, Mueller K L, Cook B, Wu D, Zuker C S, Ryba N J: Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. Cell (2003) 112: 293-301

118. Zhao X, Carnevale K A, Cathcart M K: Human monocytes use Rac1, not Rac2, in the NADPH oxidase complex. J.Biol.Chem. (2003) 278: 40788-40792

Danksagung

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Peter Gierschik für die Aufnahme in seine Abteilung als Doktorandin, sein reges Interesse am Verlauf der Arbeit und seine exzellente wissenschaftliche Unterstützung und Betreuung.

Ein weiterer großer Dank gilt Frau Dr. Claudia Walliser, die mich herzlich in ihr Labor-Team aufnahm und integrierte. Sie stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite, leitete mich gewissenhaft an und betreute mich hervorragend bei meiner experimentellen Arbeit.

Herrn Norbert Zanker möchte ich sehr für seine stete Hilfe und Unterstützung danken.

Des Weiteren danke ich Frau S. Gierschik für die DNA-Sequenzierungen.

Auch allen anderen Mitarbeitern der Abteilung gilt mein Dank. Es herrschte eine stets freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre, die das Arbeiten leicht machte.

Schließlich möchte ich meiner geliebten Familie danken. Ohne meine Eltern und meinen Bruder wäre ich nicht die, die ich heute bin, dafür und für all die Liebe und Hilfe, die sie mir stets schenken, bin ich unendlich dankbar.

Lebenslauf

17.04.1984	geboren in Stuttgart
1990-1994	Besuch der Grundschule in Weilheim an der Teck
1994-2003	Besuch des Schlossgymnasiums in Kirchheim unter Teck
2003	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
2003-2009	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
seit 2006	Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Leiter: Prof. Dr. P. Gierschik, Universität Ulm
2009	Approbation als Ärztin