Universität Ulm

Abteilung Pharmakologie und Toxikologie

Leiter: Prof. Dr. Peter Gierschik

Der Einfluss des Tumorsuppressorproteins Merlin auf die Regulation der beiden Rho-GTPasen Rac2 und Cdc42

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

(Dr. biol. hum.)

der Medizinischen Fakultät

der Universität Ulm

vorgelegt von

Torben Langer

geb. in Siegen

Ulm 2013

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Peter Gierschik
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Mertens
Tag der Promotion:	24.05.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung 1

1.1 Allgemeine Einführung 1

1.2 Neurofibromatose Typ 2 (NF2) 1

1.3 Die Protein-4.1-Familie 2

1.4 Die Familie der Rho-GTPasen 4

1.5 Das Tumorsuppressorprotein Merlin 7

1.6 Ziele der Arbeit 15

2 Material 17

3 Methoden 27

3.1 Mikrobiologische Methoden 27

3.2 Molekularbiologische Methoden 29

3.3 Kultivierung von *Sf*9-Insektenzellen 34

3.4 Proteinbiochemie 35

3.5 Proteinexpression in *Sf*9-Insektenzellen 39

3.6 Proteinexpression in Bakterien 41

3.7 Affinitätschromatographische Reinigung von Proteinen mit 6xHistidin- oder Strep-*tag*…... 46

3.8 Ionenaustauschchromatographie 47

3.9 Biacore (Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie) 48

3.10 Isoprenylierung der Rho-GTPasen *in vitro* 52

3.11 [^{35}S]GTPγS-Bindung 53

3.12 Translokation 54

3.13 Übersicht der verwendeten Puffer 55

4 Ergebnisse 58

4.1 Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine Merlin 1, Merlin-FERM, Rac2, Cdc42, rGGTase1, RhoGDIα, Ezrin-FERM und Radixin-FERM ... 58

4.1.1 Optimierung der Bedingungen zur Expression von Merlin 1 58

4.1.2 Expression und Reinigung der FERM-Domäne von Merlin (Merlin-FERM) ... 71

4.1.3 Expression und Reinigung der beiden Rho-GTPasen Rac2 und Cdc42 73

4.1.4 Koexpression und Reinigung der beiden rGGTase-Untereinheiten rFTα und rGGTβ über DEAE-Sephacel- und MonoQ-Säulen 75

4.1.5 Expression und Reinigung zwei verschiedener RhoGDIα-Varianten 77
4.1.6 Expression und Reinigung von Ezrin-FERM 78
4.1.7 Expression und Reinigung von Radixin-FERM mit Glutathion Sepharose® 4B 79
4.2 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie 80
4.2.1 Interaktion von RhoGDIα und Rac2 80
4.2.2 Interaktion von Merlin-FERM und RhoGDIα 85
4.2.3 Interaktion von Ezrin-FERM und RhoGDIα 90
4.2.4 Interaktion von Merlin-FERM und Radixin-FERM 94
4.2.5 Einfluss von Merlin-FERM auf die Interaktion von Rac2 und RhoGDIα 98
4.3 GTPγS-Bindungsversuche 100
4.3.1 Konzentrationsabhängige [^{35}S]GTPγS-Bindung an Cdc42 100
4.3.2 Einfluss von RhoGDIα auf die [^{35}S]GTPγS-Bindung an Cdc42 101
4.3.3 Einfluss von Merlin-FERM und RhoGDIα auf die [^{35}S]GTPγS-Bindung an Cdc42 102
4.4 Translokationsversuche 104
4.4.1 Translokationsversuche mit Liposomen 104
4.4.2 Translokationsversuche mit *Sf*9-Membranen 105
5 Diskussion 110
6 Zusammenfassung 127
7 Literaturverzeichnis 129
8 Publikationen 144
9 Danksagung 145
10 Lebenslauf 147

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AHTC	Anhydrotetracyclin
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Arp2/3	*actin-related protein* 2/3
BCA	Bicinchoninsäure
cAMP	*cyclic adenosine monophosphate*
CD43/44	*cluster of differentiation 43/44*
Cdc42	*cell division cycle 42*
cDNA	*complementary DNA*
Ci	Curie
CMF-PBS	Calcium- und magnesiumfreies PBS
COS-7	*african green monkey kidney cells*
$CRL4^{DCAF1}$	*cullin4A-RING E3 ubiquitin ligase*
DAL-1	*differentially expressed in adenocarcinoma of the lung-1*
Dbl	*diffuse B-cell lymphoma*
ddH_2O	bidestilliertes Wasser
DH	*Dbl-homology*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Desoxynukleotid-5´-triphosphat
ddNTP	2’-, 3’-Didesoxynukleotid-5´-triphosphat
E. coli	*Escherichia coli*
ECL	*enhanced chemoluminescence*
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid Hydrochlorid
EGFR	*epidermal growth factor receptor*

Epac	*exchange protein activated by cAMP*
Eps8L1a	*epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 1a*
ErbB	*avian V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog*
ERK	*extracellular-signal regulated kinase*
ERM-1	*ezrin-, radixin-, moesin-family-member-1*
FCS	*fetal calf serum* (fötales Kälberserum)
FERM	*four point one, ezrin, radixin, moesin*
FIR	*FERM-domain-including Rho-GEF*
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
g	Gramm
GAP	*GTPase-activating protein*
GDI	*GDP dissociation inhibitor*
GDP	Guanosin-5´-diphosphat
GEF	*guanine nucleotide exchange factor*
GGTase	Geranylgeranyltransferase
GST	*glutathione S-transferase*
GTP	Guanosin-5´-triphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure
HMW	*high molecular weight marker*
HUVEC	*human umbilical vein endothelial cell*
ICAM 1-2	*intercellular adhesion molecule 1-2*
IGFR	*insulin-like growth factor receptor*
IKKα	*IκB kinase α*
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JNK	*c-Jun N-terminal kinase*
k_a, k_d	Geschwindigkeitskonstanten (Assoziation, Dissoziation)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K_D	molare Dissoziationskonstante
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium

LMW	*low molecular weight marker*
M	Mol pro Liter
m/V	Masse pro Volumen
mA	Milliampere
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*
MBP	*maltose-binding protein*
Merlin	*moesin-ezrin-radixin-like protein*
Mg	Magnesium
min	Minute
ml	Milliliter
MLK	*mixed-lineage kinase*
mRNA	messenger RNA
mTORC	*mammalian target of rapamycin complex*
MYPT-1-PP1δ	Myosin-Phosphatase-1-PP1δ
Na	Natrium
NADP	*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NBL4	*novel band 4.1-like protein 4*
NF2	Neurofibromatose Typ 2
NF-κB	*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*
NHERF	*Na^+/H^+-exchanger-regulatory-factor*
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NIK	*NF-κB-inducing kinase*
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	*p21-activated kinase*
PBS	*phosphate-buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction* (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGFR	*platelet-derived growth factor receptor*
PH	*pleckstrin homology*
PIX	*PAK-interacting exchange factor*
PKA	Proteinkinase A

PKL	*paxillin kinase linker*
PLC	Phospholipase C
PTB	*phosphotyrosine-binding*
PtdIns-4,5-P_2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
Rac	*ras-related C_3 botulinum toxin substrate*
Ras	*rat sarcoma*
Rho	*ras homolog*
RhoGDIα	*Rho GDP dissociation inhibitor α*
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	*rotations per minute*
RT	Raumtemperatur
RU	*resonance units*
s	Sekunde
S	Schwefel
SAPK	*stress-activated protein kinase*
SDS	*sodium dodecyl sulfat,* Natriumdodecylsulfat
*Sf*9	*Spodoptera frugiperda*
SRE	*serum response element*
SRF	*serum response factor*
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TBS	*tris-buffered saline*
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
TNFα	*tumor necrosis factor α*
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-monolaurat
U	*unit*
UV	Ultraviolett
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
YAP	*yes-associated protein*

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Die Grundvoraussetzung für die Entwicklung und Organisation von Geweben ist ein streng regulierter Zellwachstumsprozess, an dem viele verschiedene Faktoren beteiligt sind. Wenn gesunde Zellen in Kontakt mit Nachbarzellen kommen, stoppen sie ihre Proliferation und beginnen damit, stabile Zell-Zell-Verbindungen aufzubauen. Verlieren Zellen diese Eigenschaften, geht dies meist mit einem übersteigerten und unkontrollierten Zellwachstum einher, was letztendlich zur Entstehung von Tumoren beitragen kann. In Zusammenhang mit der humanen Neurofibromatose Typ 2 wurde ein neuartiges Tumorsuppressorprotein entdeckt, das eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten spielt, gleichzeitig aber auch einen inhibitorischen Einfluss auf die Zellproliferation hat (Okada *et al*., 2007).

1.2 Neurofibromatose Typ 2 (NF2)

NF2 ist eine autosomal dominant vererbte Tumorerkrankung, die durch die Entstehung von gutartigen Tumoren, z.B. Schwannomen, Meningeomen und Ependymomen, gekennzeichnet ist (Evans *et al*., 1992). Die Inzidenz (Anzahl der Neuerkrankungen) beträgt etwa 1:25 000 bis 1:30 000 (Evans *et al*., 2005). Die Prävalenz (Krankheitshäufigkeit) liegt nach neusten Untersuchungen bei etwa 1:60 000 (Evans *et al*., 2010). Durch die Bildung von bilateralen vestibulären Schwannomen um die Verzweigungen des achten Hirnnervs (Hörnerv bzw. *Nervus vestibulocochlearis*) leiden Patienten mit NF2 häufig unter schweren Gleichgewichtsstörungen, Tinnitus und einem schrittweisen Verlust des Hörvermögens (Parry *et al*., 1994; Odat *et al*., 2011). Der Großteil der Patienten stirbt im Laufe der Erkrankung an der hohen Tumorlast (Morrison *et al*., 2007). Da bisher keine NF2-spezifischen Medikamente bis zum Stadium der Zulassung gelangt sind, beschränkt sich die aktuelle Therapie auf die chirurgische Entfernung der Tumore oder deren Bestrahlung mittels *gamma knife*. Problematisch in diesem Zusammenhang ist die mögliche Zerstörung des angrenzenden Gewebes durch die invasiven Behandlungsmethoden. Erschwerend kommt hinzu, dass Tumore in

Zusammenhang mit NF2 nicht auf Chemotherapie ansprechen und es nach chirurgischer Entfernung zu einer schnellen Tumorneubildung kommt (Baser *et al*., 2000; Evans *et al*., 1992; Maruta, 2011).

Ursache für die Entstehung von NF2 sind Mutationen im NF2-Gen, das für das Tumorsuppressorprotein Merlin (*moesin-ezrin-radixin-like protein*) kodiert (Trofatter *et al*., 1993). Dabei wird angenommen, dass ein defektes Allel des NF2-Gens vererbt wird und spontane Mutationen im zugehörigen zweiten Allel zum Verlust der genetischen Information führen (Knudson, 1971; Hanemann *et al*., 2007). Die Mutationen im ersten Allel des NF2-Gens haben häufig *frameshifts* zur Folge, aus denen ein verkürztes, nicht funktionelles Protein resultiert (MacCollin *et al*., 1994). Der Ausfall des zweiten Allels wird meist durch den Verlust des gesamten NF2-Genlocus auf Chromosom 22 verursacht (Warren *et al*., 2003). Unabhängig davon konnten auch im Falle von sporadisch auftretenden Schwannomen und Meningeomen Mutationen im NF2-Gen nachgewiesen werden (Louis *et al*., 1995). Merlin gehört zur Protein-4.1-Familie und stellt damit ein wichtiges Bindeglied zwischen Zellmembran und Zytoskelett dar (Fehon *et al*., 2010). Im folgenden Abschnitt soll ein grundlegender Überblick über die Mitglieder dieser Proteinfamilie und deren Bedeutung für die Zelle vermittelt werden.

1.3 Die Protein-4.1-Familie

Der erste gefundene Vertreter dieser Proteinfamilie war das aufgrund seines Laufverhaltens im SDS-Gel (*sodium dodecyl sulfate*) so benannte Protein 4.1. Es wurde aus Erythrozytenmembranen isoliert, in denen es Komplexe mit Spektrin und Aktin eingeht und damit maßgeblich an der Strukturgebung des Zytoskeletts beteiligt ist (Ungewickell *et al*., 1979; Ohanian und Gratzer, 1984; Bennett, 1989). Heute umfasst die Protein-4.1-Familie eine ganze Reihe von Mitgliedern, die an der Organisation der Zellmembran und ihrer Verbindung mit dem Aktinzytoskelett beteiligt sind (Shang *et al*., 2012). Es sind mehr als 40 Mitglieder der Familie bekannt, die in fünf verschiedene Gruppen unterteilt werden. Dazu gehören die Protein-4.1-Proteine, die Talin-verwandten Proteine, die Protein-Tyrosinphosphatasen sowie die NBL4-Proteine (*novel band 4.1-like protein 4*). Auch die FERM-Proteine (*four point one*, *ezrin*, *radixin*, *moesin*) Ezrin, Radixin, Moesin und Merlin gehören zur Protein-4.1-Familie (Chishti *et al*., 1998;

Diakowski *et al*., 2006). Allen FERM-Proteinen ist ein aminoterminal gelegener Abschnitt gemein, der als FERM-Domäne bezeichnet wird und etwa die ersten 300-340 Aminosäuren im jeweiligen Protein umfasst. Über ihre FERM-Domänen interagieren FERM-Proteine mit den zytoplasmatischen Anteilen membranständiger Proteine, z.B. CD43 (*cluster of differentiation 43*), CD44 und ICAM 1-2 (*intercellular adhesion molecule 1-2*) sowie zytosolischen Proteinen, wie RhoGDIα (*Rho GDP dissociation inhibitor α)* und p55 (Heiska *et al*., 1998; Maeda *et al*., 1999; Mori *et al*., 2007; Takai *et al*., 2007; Seo *et al*., 2009). Die carboxyterminalen Abschnitte der FERM-Proteine dienen unter anderem der Anheftung an das Aktinzytoskelett (Turunen *et al*., 1994; Pestonjamasp *et al*., 1995). Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeiten nehmen FERM-Proteine verschiedene Aufgaben in der Zelle wahr. Für Ezrin konnte gezeigt werden, dass dieses mit einem Mitglied der Eps8-Proteinfamilie, Eps8L1a (*epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 1a*), interagiert und dadurch dessen Eigenschaft zum Aktin-*capping* und zur Aktinbündelung moduliert (Zwaenepoel *et al*., 2012). Des Weiteren kann Ezrin mit den zytoplasmatischen Bereichen von membranständigen Proteinen sowie *scaffolding*-Proteinen der NHERF-Familie (*Na^+/H^+-exchanger-regulatory-factor*) interagieren, wobei der carboxyterminale Anteil von Ezrin die Bindung an Aktin übernimmt (Turunen *et al*., 1994; Fehon *et al*., 2010). Ezrin-defiziente Mäuse sterben innerhalb von 3 Wochen nach der Geburt, wobei die Effekte des Ezrin-Mangels größtenteils auf den Gastrointestinaltrakt beschränkt sind (Saotome *et al*., 2004). Radixin spielt eine wichtige Rolle bei der cAMP-vermittelten (cAMP, *cyclic adenosine monophosphate*) Zellproliferation von Thyreozyten (PCCL3-Zellen), indem es als Gerüstprotein für Epac (*exchange protein activated by cAMP*) und PKA (*protein kinase A*) agiert (Hochbaum *et al*., 2011). Außerdem konnte für WIF-B Zellen (eine hybride Zelllinie, die ihren Ursprung in Hepatomzellen aus Ratten und humanen Fibroblasten hat) gezeigt werden, dass Radixin einen Einfluss auf die Zellpolarität und den Phänotyp dieser Zellen hat (Suda *et al*., 2011). Radixin-defiziente Mäuse sind lebensfähig, zeigen allerdings 8 Wochen nach der Geburt geringe funktionelle Leberdefekte (Kikuchi *et al*., 2002). Moesin ist ein wichtiger Regulator der Zytokinese. Es ist verantwortlich für die Regulation der Zellverlängerung während der Zytokinese, verhindert die Bildung von polaren, blasenförmigen Zellausbreitungen und trägt damit zur Aufrechterhaltung des intrazellulären Drucks bei, der für die Zytokinese benötigt wird (Roubinet *et al*., 2011). Für Moesin konnte außerdem eine Rolle bei der angeborenen Immunantwort gezeigt werden. Das Protein ist Teil eines Proteinclusters, das wichtig für die Erkennung von Lipopolysacchariden ist und damit zur Expression

proinflammatorischer Zytokine beiträgt (Zawawi *et al*., 2010). Moesin-defiziente Mäuse weisen keinen besonderen Phänotyp auf. Vermutlich kann der Verlust von Moesin durch andere FERM-Proteine kompensiert werden (Doi *et al*., 1999). Merlin hebt sich durch einen besonderen Aspekt von den anderen FERM-Proteinen ab. Bisher wurden nur bei diesem und einem anderen FERM-Protein, DAL-1 (*differentially expressed in adenocarcinoma of the lung-1*), proliferationshemmende und damit tumorsuppressive Eigenschaften gefunden (Okada *et al*., 2007; Tran *et al*., 1999; Bernkopf und Williams 2008). Unter anderem wegen der Interaktion von FERM-Domänen mit RhoGDIα geht man mittlerweile davon aus, dass ein Teil der Funktionen der FERM-Proteine über Rho-GTPase-gekoppelte Signalwege vermittelt wird (Rho, *ras homolog*; GTP, Guanosin-5´-triphosphat) (Fehon *et al*., 2010). Wichtige Eigenschaften der Rho-GTPasen sollen im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

1.4 Die Familie der Rho-GTPasen

Rho-GTPasen gehören zur Ras-Superfamilie kleiner GTPasen (Ras, *rat sarcoma*). Als wichtiges Bindeglied zwischen extrazellulärer Signalaufnahme und intrazellulärer Signalverarbeitung sind sie maßgeblich am Aufbau und an der Organisation des Aktinzytoskeletts beteiligt (Ridley und Hall, 1992; Ridley *et al*., 1992; Hall, 1998; Del Pozo *et al*., 2002). Bis heute umfassen die Rho-GTPasen mehr als 20 Mitglieder, zu denen beispielsweise RhoA, Rac1 (*ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) und Cdc42 (*cell division cycle 42*) gehören (Lozano *et al*., 2003). Die Besonderheit der Rho-GTPasen liegt in ihrer Fähigkeit, zwischen einem inaktiven GDP-gebundenen (Guanosin-5´-diphosphat) und einem aktiven GTP-gebundenen Zustand zu wechseln. Sie stellen damit eine Art Schalter auf molekularer Ebene dar. In ihrer GTP-gebundenen Form interagieren die Rho-GTPasen mit Effektorproteinen und lösen damit Funktionsänderungen bestimmter intrazellulärer Signalkaskaden aus. Durch intrinsische GTP-Hydrolyse werden die Rho-GTPasen wieder in ihren inaktiven Zustand überführt. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, zu erwähnen, dass, zumindest in einigen wenigen Fällen, auch GDP-gebundene Rho-GTPasen Effektorproteine aktivieren können. So konnte gezeigt werden, dass der Komplex aus Rac1 und RhoGDI in der Lage ist, den NADPH-Oxidase-Komplex zu aktivieren (NADP, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*). Letzterer ist unter anderem an der Immunabwehr beteiligt (Di Poi *et al*., 2001; Grizot *et al*., 2001). Der

GDP/GTP-Austausch an den Rho-GTPasen wird durch Rho-GEFs (*Rho-guanine nucleotide exchange factors*) vermittelt. Das erste Rho-, Rac- bzw. Cdc42-spezifische GEF war das in diffusen B-Lymphom-Zellen entdeckte Dbl (*diffuse B-lymphoma*), welches über seine DH-Domäne (*Dbl-homology*) fähig ist, den GDP/GTP-Austausch an den Rho-GTPasen zu beschleunigen (Miki *et al*., 1993; Hart *et al*., 1994). Im humanen Genom konnten bisher etwa 70 Dbl-homologe Mitglieder identifiziert werden (Rossman und Sondek, 2005). Auf der Gegenseite der Rho-GEFs stehen die Rho-GAPs (*Rho-GTPase-activating proteins*). Diese steigern die intrinsische GTPase-Aktivität der Rho-GTPasen und fördern damit die GTP-Hydrolyse. Seit der Entdeckung des ersten GAPs im Jahre 1987 wurden zahlreiche weitere Vertreter dieser Proteinfamilie gefunden. Dazu gehören unter anderem die Ras-GAPs, wie p120-GAP, rap-GAPs, wie rap1-GAP, und Rho- bzw. Rac-spezifische GAPs (Trahey und McCormick, 1987; Boguski und McCormick, 1993). Interessanterweise zeigen sich im Falle der Neurofibromatose Typ 1 Mutationen in einem Gen, das für ein Ras-GAP, Neurofibromin 1, kodiert (Xu *et al*., 1990a). Das fehlerhafte GAP führt zur Anhäufung der *signaling*-aktiven Form der GTPase und damit zu einer unkontrollierten Signalweiterleitung (Xu *et al*., 1990b; Bollag und McCormick, 1991). In ihrer inaktiven, GDP-gebundenen Form befinden sich Rho-GTPasen meist in einem Komplex mit verschiedenen RhoGDIs (Abb. 1). Diese halten die Rho-GTPasen in ihrer inaktiven Konformation und verhindern deren erneute Aktivierung. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass RhoGDIs Rho-GTPasen vor Degradation durch das Proteasom schützen (Boguski und McCormick, 1993; Boulter *et al*., 2010). Interessanterweise können RhoGDIs auch einen inhibitorischen Einfluss auf verschiedene Rho-GAPs haben. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von p190-GAP durch RhoGDIα gehemmt wird. Außerdem wurde ein direkter inhibitorischer Effekt von RhoGDIα auf die GTP-Hydrolyse von Rac1 beobachtet (Chuang *et al*., 1993).

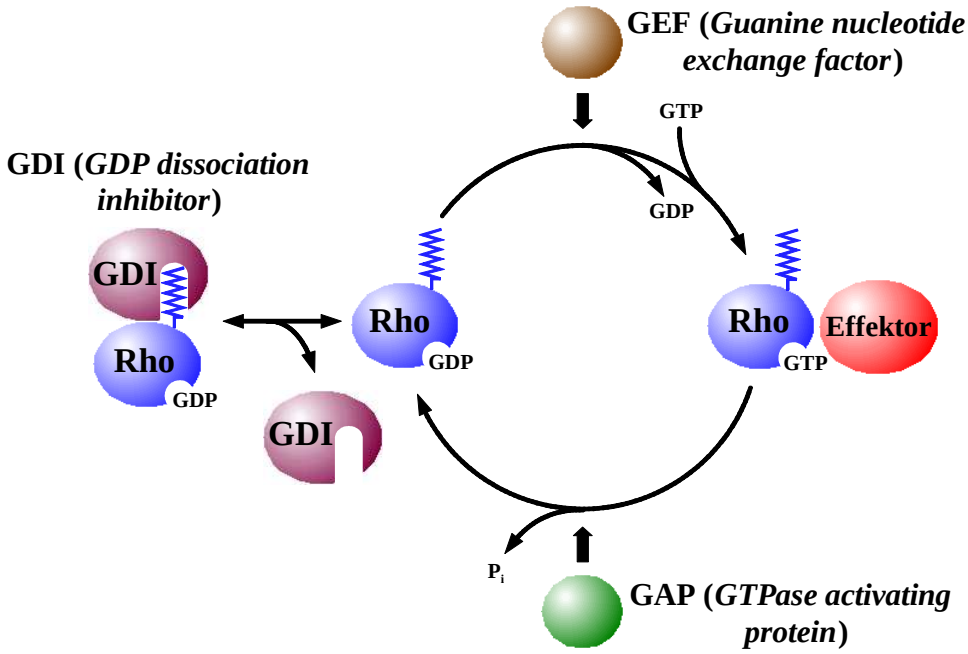


Abb. 1: Aktivierungszyklus einer Rho-GTPase. Rho-GTPasen wechseln zwischen einem inaktiven GDP-gebundenen und einem aktiven GTP-gebundenen Zustand. Rho-GEFs katalysieren dabei den Übergang von der GDP- in die GTP-gebundene Form, während Rho-GAPs die intrinsische GTPase-Aktivität der Rho-GTPase steigern und damit zu ihrer Inaktivierung führen. Die GDP-gebundene Rho-GTPase geht einen Komplex mit RhoGDIs ein und wird dadurch in der inaktiven Konformation gehalten. Rho = *ras homolog*; GDP = Guanosin-5´-diphosphat; GTP = Guanosin-5´-triphosphat; Rho-GEF = *Rho-guanine nucleotide exchange factor*; Rho-GAP = *Rho-GTPase activating protein*; RhoGDI = *Rho GDP dissociation inhibitor*; P_i = anorganisches Phosphat.

Aktive Rho-GTPasen sind an der Membran lokalisiert. Diese Assoziation wird über einen posttranslational angefügten Isoprenanker vermittelt, über den die Rho-GTPasen fest mit der Membran verbunden werden. Das Anhängen dieses Ankers erfolgt durch verschiedene Prenyltransferasen, zu denen beispielsweise die GGTaseI (CAAX-Geranylgeranyltransferase I) gehört. Diese aus den zwei Untereinheiten FT/GGT-α und GGT-β bestehende Transferase erkennt die im C-Terminus der GTPase liegende CAAX-Box und fügt die Geranylgeranyl-Gruppe an das Cystein der CAAX-Box an. Die nach dem Cystein folgenden Aminosäuren sind aliphatischer Natur (A) und diesen schließt sich entweder Methionin oder Serin an (Clarke, 1992). GDIs bilden eine Art Tasche aus, in die der hydrophobe Prenylrest der modifizierten GTPasen eingebettet werden kann (Boulter *et al.*, 2010).

Rho-GTPasen übernehmen eine Vielzahl unterschiedlicher Aufgaben in der Zelle. Es konnte gezeigt werden, dass sie entscheidende Rollen bei der Zelladhäsion, -migration, Gentranskription und Zellteilung wahrnehmen (Didsbury *et al.*, 1989; Ridley und Hall,

1992; Ridley *et al*., 1992; Kozma *et al*., 1997). Gerade in Zusammenhang mit der Organisation des Aktinzytoskeletts kommen den Rho-GTPasen einige sehr wichtige Aufgaben zu. So führt die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes (*actin-related protein* 2/3) durch die beiden Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 zur Aktinpolimerisation und damit zur Ausbildung von Lamellipodien (Rac1) bzw. Filopodien (Cdc42). Bei der Aktivierung von RhoA in Fibroblasten und anderen Zellarten kommt es dahingegen zur Ausbildung von Stressfasern (Hall, 1998; Insall und Machesky, 2009). In migrierenden Zellen führt RhoA zur Myosin-vermittelten Kontraktion des Aktinzytoskeletts und damit zur Ablösung der Zellen von ihrem Untergrund (Alblas *et al*., 2001). In Hefen wird die polare Ausrichtung des Exocyst-Proteinkomplexes, der eine entscheidende Rolle beim Vesikeltransport und bei der Exozytose spielt, über Rho1 reguliert (Guo *et al*., 2001). Rho-GTPasen können aber auch über viele andere Wege in die Signal- und Regulationsprozesse von Zellen eingreifen. Für einige Rho-GTPasen konnte gezeigt werden, dass diese die Aktivität des SRF (*serum response factor*) und verschiedener Kinasen, z.B. JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), stimulieren können und damit die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren regulieren (Coso *et al*., 1995; Hill *et al*., 1995; Minden *et al*., 1995). In B-Zellen reguliert RhoA sehr wahrscheinlich die Herstellung von PtdIns-4,5-P_2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat), des Substrates der PLCγ_2 (*phospholipase-C gamma* 2), und ist damit an der Steuerung des Calciumeinstroms und der Zellproliferation beteiligt (Saci und Carpenter, 2005).

Befunde aus den letzten Jahren lassen darauf schließen, dass auch ein Teil der Eigenschaften des Tumorsuppressorproteins Merlin über Rho-GTPase gekoppelte Signalwege vermittelt wird (Okada *et al*., 2005; Ryu *et al*., 2005; Wong *et al*., 2012). Auf diese soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.5 Das Tumorsuppressorprotein Merlin

Das 1993 in Zusammenhang mit NF2 entdeckte Tumorsuppressorprotein Merlin wird durch das auf Chromosom 22 liegende NF2-Gen kodiert, wobei 2 dominierende Spleißvarianten vorkommen. Merlin 1 mit 595 Aminosäuren wird durch die Exons 1-15 und 17 gebildet, während Merlin 2 mit 590 Aminosäuren durch Exons 1-16 kodiert wird. Beide Proteine unterscheiden sich folglich in ihren carboxyterminalen Abschnitten. Sie

besitzen eine ähnliche subzelluläre Verteilung und kommen in vielen verschiedenen Zelltypen gemeinsam vor (Rouleau *et al*., 1993; Trofatter *et al*., 1993; Xu *et al*., 1998; Shaw *et al*., 1998). Basierend auf der Homologie zu den anderen FERM-Proteinen wurden für die beiden Merlin-Varianten 3 Proteindomänen vorausgesagt. Dazu gehören ein aminoterminal gelegener Bereich, der die FERM-Domäne umfasst (Aminosäuren 1-335), eine sich anschließende α-Domäne (Aminosäuren 336-505) sowie die carboxyterminale Domäne (Aminosäuren 506-590/595). Im Jahr 2001 gelang es der Arbeitsgruppe um Kang, die FERM-Domäne von Merlin zu kristallisieren. Vergleiche mit den kristallisierten FERM-Domänen von Radixin und Moesin zeigten, dass die Domänen sehr hohe Ähnlichkeiten untereinander aufweisen. Die grundlegende Struktur dieser Domänen ähnelt der eines Kleeblattes, das aus 3 unterschiedlichen Untereinheiten aufgebaut ist. Die erste N-terminale Subdomäne besitzt eine Ubiquitin-ähnliche Faltung, der sich eine einem Acyl-CoA-Bindeprotein ähnliche Domäne anschließt. Die dritte Subdomäne zeigt Analogien zu einer PTB- (*phosphotyrosine-binding*) oder PH- (*pleckstrin homology*) Domäne (Pearson *et al*., 2000; Hamada *et al*., 2000; Kang *et al*., 2001; Shimizu *et al*., 2002, Sher *et al*., 2012). An die FERM-Domäne schließt sich die α-Domäne an, die sehr wahrscheinlich eine α-helikale *coiled-coil*-Struktur ausbildet. Man geht mittlerweile davon aus, dass die α-Domäne entscheidend an der Regulation der Selbstassoziation und der Dimerisierung der FERM-Proteine beteiligt ist (Bhartur und Goldenring, 1998; Bretscher *et al*., 2000). Die carboxyterminale Domäne spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Aktivität von Merlin 1. Die Aktivierung und Inaktivierung von Merlin 1 wird über die Dephosphorylierung bzw. Phosphorylierung von Serin 518 gesteuert (Rong *et al*., 2004; Surace *et al*., 2004). Die Phosphorylierung von Merlin an dieser Position führt zu einer Konformationsänderung, durch die die intramolekulare Assoziation zwischen den amino- und carboxyterminalen Abschnitten unterbunden wird. In dieser offenen Konformation zeigt Merlin keine tumorsuppressiven Eigenschaften (Shaw *et al*., 2001). Die Phosphorylierung von Merlin an Serin 518 erfolgt durch PAK1/2 (*p21-activated kinase 1/2*) und PKA (Kissil *et al*., 2002; Xiao *et al*., 2002; Alfthan *et al*., 2004). Wird Merlin an Serin 518 dephosphoryliert, geht es in die geschlossene Konformation über, die tumorsuppressive Eigenschaften besitzt (Abb. 2). So konnte gezeigt werden, dass die geschlossene Konformation von Merlin einen inhibitorischen Einfluss auf das Wachstum von Schwannomzellen hat, während sich dieser Effekt für die offene Konformation nicht nachweisen ließ (Sherman *et al*., 1997). Interessanterweise führen einige gefundene Mutationen in Merlin dazu, dass dieses nicht mehr in die geschlossene Konformation

wechseln kann (Okada *et al*., 2007). Mit der Myosin-Phosphatase MYPT-1-PP1δ konnte ein Protein identifiziert werden, das Merlin an Serin 518 dephosphorylieren und damit aktivieren kann (Jin *et al*., 2006).

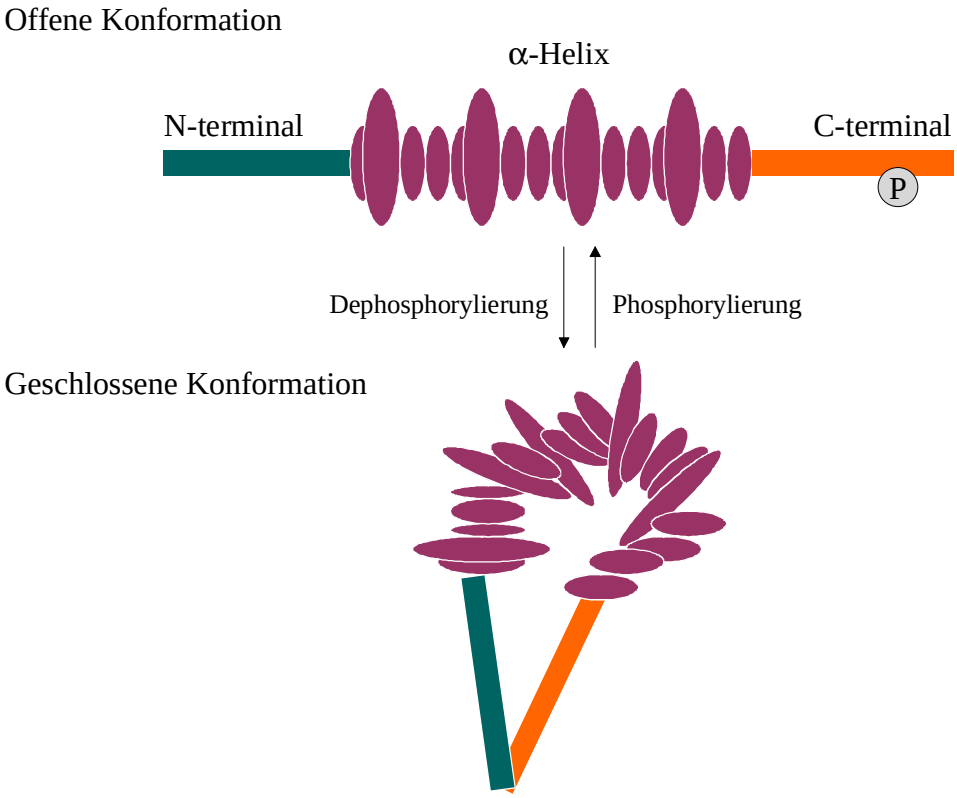


Abb. 2: Offene und geschlossene Konformation von Merlin 1. Wird Merlin 1 an Serin 518 dephosphoryliert, nimmt es eine geschlossene Konformation ein, bei der es zur Ausbildung einer intramolekularen *head-to-tail* Interaktion des N-terminalen Abschnittes mit dem C-Terminus kommt. In dieser Konformation agiert Merlin als Tumorsuppressor. Kommt es zur Phosphorylierung von Merlin 1 an Serin 518, fällt die intramolekulare *head-to-tail* Interaktion weg und Merlin befindet sich in der offenen, nicht-tumorsuppressiven Konformation. Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; P = Phosphat.

Die Tatsache, dass die Phosphorylierung von Merlin an Serin 518 ausreicht, um über Aktivität bzw. Inaktivität des Proteins zu entscheiden, macht man sich in funktionellen Studien durch die Verwendung zweier verschiedener Varianten von Merlin zunutze. Bei der ersten Variante, Merlin S518A (S, Serin; A, Alanin), wurde Serin gegen Alanin ausgetauscht, welches nicht phosphoryliert werden kann. Sie ahmt somit die geschlossene, aktive Konformation des Proteins nach. Im Unterschied zur S518A-Mutante simuliert die S518D-Mutante (D, Asparaginsäure) die phosphorylierte Konformation von Merlin und ist damit funktionell inaktiv (Surace *et al*., 2004).

Im Gegensatz zu Merlin 1 konnte für Merlin 2 bisher kein inhibitorischer Einfluss auf das Wachstum von Schwannomzellen gesehen werden, weder *in vitro* noch *in vivo*. Der Grund dafür könnte in den strukturellen Unterschieden beider Merlin-Isoformen zu finden sein. Aufgrund seiner Beschaffenheit ist Merlin 2 nicht in der Lage, eine intramolekulare *head-to-tail* Interaktion und damit die geschlossene Konformation von Merlin 1 auszubilden (Sherman *et al*., 1997). In neueren Publikationen konnte gezeigt werden, dass es zwischen offener und geschlossener Konformation der FERM-Proteine verschiedene Zwischenstufen gibt. Man geht mittlerweile davon aus, dass die FERM-Proteine wie eine Art Rheostat (Widerstandsregler) reguliert werden können. Je nach Aktivitätsgrad und gebundenen Interaktionspartnern nehmen sie dabei unterschiedliche Öffnungsgrade ein (Li *et al*., 2007; Sher *et al*., 2012).

Merlin und die anderen FERM-Proteine sind wichtige Bindeglieder zwischen Zytoskelett und Zellmembran und sichern als solche die Strukturierung der Membran und die Organisation des Aktinzytoskeletts. So konnte gezeigt werden, dass Merlin mit Ezrin, Radixin und Moesin gehäuft in dynamischen Strukturen wie Lamellipodien, Filopodien und Zell-Zell-Kontakten vorkommt (den Bakker *et al*., 1995; Gonzalez-Agosti *et al*., 1996; James *et al*., 2001; Shaw *et al*., 1998; Lallemand *et al*., 2003). Je nach Zelltyp kann die Lokalisation von Merlin und den anderen FERM-Proteinen aber auch sehr unterschiedlich sein. Es wurde z.B. gezeigt, dass das FERM-Ortholog von Moesin von *Drosophila melanogaster* in Epithelzellen apikal verteilt ist und zusätzlich in apikalen Zellverbindungen vorkommt. Merlin hingegen zeigt eher eine punktuelle Verteilung an den apikalen Zellverbindungen und am angrenzenden Zytoplasma (McCartney und Fehon, 1996). In *Caenorhabditis elegans* liegt ein weiterer FERM-Protein-Vertreter, ERM-1 (*ezrin-, radixin-, moesin-family-member-1*), einheitlich an den apikalen Oberflächen tubulärer Organepithelien vor, während NFM-1 (*C. elegans merlin orthologue*) an basolateralen Oberflächen von tubulären Epithelien angereichert ist (Gobel *et al*., 2004). Merlin besitzt im Gegensatz zu den anderen FERM-Proteinen in der carboxyterminalen Domäne keine Bindungsstelle für Aktin (Gutmann *et al*., 1999). Nur im aminoterminalen Abschnitt von Merlin konnte eine Bindungsstelle mit schwacher Affinität für Aktin nachgewiesen werden (Xu und Gutmann, 1998).

Interessanterweise unterscheidet sich Merlin 1 ebenso hinsichtlich seiner Phosphorylierung von den anderen FERM-Proteinen. Während die phosphorylierte Form von Merlin 1

inaktiv ist, werden Ezrin, Radixin und Moesin durch Phosphorylierung aktiviert (Sekido, 2011). Merlin hat im Gegensatz zu den anderen FERM-Proteinen tumorsuppressive Eigenschaften (Morrison *et al*., 2001). Über welche Signalwege diese entfaltet werden, ist bis heute nicht genau geklärt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass Merlin einen inhibitorischen Einfluss auf die Zellproliferation hat. Einen wichtigen Aspekt der Regulation der Zellproliferation durch Merlin konnte die Arbeitsgruppe um Curto unter anderem anhand von Studien mit Maus-Embryo-Fibroblasten zeigen. Die Tyrosinkinase- bzw. EGFR-Aktivität (*epidermal growth factor receptor*) in wildtypischen Fibroblasten von Mausembryos wird durch Wachstumsfaktoren reguliert. In konfluenten Zellen wird die Aktivität beider Proteinklassen abreguliert. In Abwesenheit von Merlin ist dieser Prozess unterbrochen, was dazu führt, dass die Zellen trotz eines konfluenten Zustandes proliferieren. Vermutlich assoziiert Merlin über andere Proteine mit dem EGFR und hält ihn dadurch in einem Membrankompartiment fest, von dem aus keine Internalisierung oder eine Signalweiterleitung des Rezeptors erfolgen kann (Curto *et al*., 2007). In *Drosophila* regulieren Merlin und der Tumorsuppressor Expanded die Dichte von Membranrezeptoren, die an der Zelladhäsion und am Zellwachstum beteiligt sind. Dazu gehören unter anderem E-Cadherin und das atypische Cadherin Fat, für die gezeigt werden konnte, dass sie in Merlin-Expanded-defizienten Zellen hochreguliert werden. Man geht davon aus, dass das Fehlen von Merlin und Expanded in diesen Zellen zu einer veränderten Internalisierung von Membranrezeptoren führt und es dadurch zur Anhäufung dieser Rezeptoren auf der Zelloberfläche kommt (Maitra *et al*., 2006). Die Arbeitsgruppe um Lallemand konnte zeigen, dass Merlin die Anzahl membranständiger Wachstumsrezeptoren, z.B. von ErbB2- und ErbB3-Rezeptoren (*avian V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2/3*), verringern kann. Dies hat eine Hemmung der nachgeschalteten mitogenen Signalwege zur Folge, die im Falle der ErbB-Rezeptoren zu einer Hemmung der mitogenen Kinasen, PKB (*protein kinase B*) und MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) führt (Lallemand *et al*., 2009a). In Schwannomzellen von Ratten führte die Überexpression von Merlin zu einer gesteigerten Degradation des PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) (Fraenzer *et al*., 2003). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass konfluent gewachsene $NF2^{-/-}$-Mausembryofibroblasten im Vergleich zu wildtypischen Zellen keine Hemmung der mitogenen Signalwege aufwiesen. So blieben die Proteinmengen von Cyclin D1, c-Jun, phosphorylierter ERK1/2 (*extracellular-signal regulated kinase*) und JNK auch nach Erreichen eines konfluenten Zustandes erhöht (Lallemand *et al*., 2009b). Zudem stabilisiert Merlin verschiedene Arten von Zell-Zell-

Kontakten (*adherens junctions*) und verhindert damit ebenfalls eine unkontrollierte Proliferation der Zellen (Lallemand *et al*., 2003).

Insbesondere das sog. *blue-box*-Motif in Merlin stellt einen für die Regulation der Proliferation von Zellen unabdingbaren Bereich dar. Diese 7 Aminosäuren umfassende Sequenz innerhalb der FERM-Domäne ist vollständig zwischen Fliegen und Säugetieren konserviert. In *Drosophila* führt die Expression einer Merlin-Variante ohne *blue-box*-Motif oder mit Mutationen in diesem zu einer gesteigerten Proliferation von Flügelepithelzellen (LaJeunesse *et al*., 1998). Die Expression einer Merlin-*blue-box*-Mutante in 3T3-Fibroblasten führt zu einem Verlust der Zell-Zell-Kontakt-Inhibierung und damit ebenfalls zu einer verstärkten Zellproliferation (Johnson *et al*., 2002). Auch in der embryonalen Entwicklung scheint Merlin eine wichtige Rolle zu spielen. So führen homozygote Mutationen des NF2-Gens in Mausembryonen zu stark ausgeprägten Entwicklungsfehlern innerhalb der ersten Tage. Zu diesen gehört z.B. ein fehlerhaft organisiertes extraembryonales Ektoderm (McClatchey *et al*., 1997).

Weiterhin beeinflusst Merlin das NF-κB-Netzwerk (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), welches für die Regulation der Zellproliferation und der Apoptose wichtig ist. Die Aktivierung von NF-κB erfolgt neben anderen Stimuli durch TNFα (*tumor necrosis factor α*) und Interleukin-1. Diese führen zu einer verstärkten Expression verschiedener Kinasen, wie NIK (*NF-κB inducing kinase*) und IKKα (*IκB kinase α*), die NF-κB über verschiedene Zwischenstufen aktivieren können. Merlin kann über verschiedene Wege in diesen Signalweg eingreifen. Zum einen kann es die TNFα-induzierte NF-κB-Aktivierung hemmen, zum anderen scheint Merlin einen direkten Einfluss auf die Bindung von NF-κB an die DNA zu haben (Kim *et al*., 2002). Des Weiteren wurde eine Rolle Merlins im Hipposignalweg beschrieben. Dieser umfasst eine Kaskade von Tumorsuppressorkinasen, die die Zellviabilität und Zellproliferation in *Drosophila* steuern (Edgar, 2006). Eine bedeutende Komponente dieses Signalweges stellt der transkriptionelle Koaktivator YAP1 (*yes-associated protein 1*) dar. Es konnte gezeigt werden, dass Merlin die Phosphorylierung von YAP1 steigert und dieses damit inaktiviert. Aufgrund der Inaktivierung von YAP erfolgt eine Verringerung der Transkription von Genen, deren kodierte Proteine für die Zellproliferation und antiapoptotische Signalwege wichtig sind (Yokoyama *et al*., 2008). Ein weiterer Weg, über den Merlin in die Zellproliferation und Zellteilung eingreifen kann, wird über Integrin-spezifische

Signalwege und mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) reguliert. Aktiviertes mTORC1 kontrolliert die Expression von Cyclin D1, einem wichtigen Regulator des Zellzyklus. Der Verlust von Merlin führt zu einer verstärkten mTORC1 Aktivierung und damit zu einer erhöhten Expression von Cyclin D1, was eine verstärkte Proliferation und Überlebensfähigkeit der Zellen zur Folge hat (Lopez-Lago *et al*., 2009). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass Merlin auch direkt im Zellkern regulatorische Aufgaben wahrnehmen kann. So kann sich die geschlossene, wachstumshemmende Form von Merlin im Zellkern anhäufen und dort die E3 Ubiquitin Ligase $CRL4^{DCAF1}$ (*cullin4A-RING E3 ubiquitin ligase*) in ihrer Aktivität hemmen. Dies zieht die Expression zahlreicher Tumorsuppressorgene nach sich, die ihrerseits dazu führen, dass die Expression zellzyklusantreibender Gene abreguliert und zellzyklushemmender Gene hochreguliert wird. Interessanterweise konnten Merlin-Varianten mit Mutationen, wie sie bei der humanen NF2 vorkommen, nicht mit $CRL4^{DCAF1}$ interagieren, was die Annahme bestärkt, dass Merlin einen Teil seiner tumorsuppressiven Eigenschaften über diesen Signalweg ausübt (Ahronowitz *et al*., 2007; Li *et al*., 2010). Aktuelle Untersuchungen des Jahres 2012 haben noch zwei andere Aspekte der Funktion von Merlin hervorgebracht. Zum Ersten konnte gezeigt werden, dass Merlin über die Hemmung von Rac1 in der Lage war, die Expression von Proteinen zu steuern, die der Angiogenese entgegenwirken. Dazu gehört z.B. Semaphorin 3F, das sowohl an der Regulation der physiologischen als auch an der pathologischen Angiogenese beteiligt ist (Wong *et al*., 2012). Zum Zweiten wurde eine Rolle für Merlin bei der Steuerung des Vesikeltransportes beschrieben. Die Regulation erfolgt dabei über einen Rac-MLK/$p38^{SAPK}$-gekoppelten Signalweg (MLK, *mixed-lineage kinase*; SAPK, *stress-activated protein kinase*) (Hennigan *et al*., 2012).

Die Folgen des Verlustes von Merlin wurden auch im Mausmodell genauer untersucht. Merlin-defiziente Mäuse sterben im Verlauf der embryonalen Entwicklung, während Mäuse, die eine heterozygote Merlin-Mutation tragen, eine große Bandbreite an hochinvasiven und metastasenbildenden Tumoren in späteren Lebensabschnitten entwickeln (McClatchey *et al*., 1998). Konditionelle Knockout-Mäuse, bei denen beide Allele für Merlin in den Schwannzellen ausgeschaltet wurden, entwickeln die NF2-typischen Tumore der Schwannzellen und andere Symptome, wie Katarakte (Giovannini *et al*., 2000).

Verschiedene Befunde weisen auf eine direkte und/oder indirekte Interaktion eines oder beider Proteinprodukte, Merlin 1 bzw. Merlin 2 mit Rho-GTPasen, hin (Sherman und Gutmann, 2001; McClatchey, 2003; Ramesh, 2004). In HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) führt die Expression einer inaktiven Merlin-Mutante zu einer verstärkten Translokation der Rho-GTPase Rac1 an die Plasmamembran, was mit einer gesteigerten Zellproliferation einhergeht. In umgekehrter Weise führt die Expression der konstitutiv aktiven Merlin-Variante S518A zu einer Hemmung der PAK-vermittelten Zellproliferation (Okada *et al*., 2005). PAK1 ist ein wichtiges Effektorprotein der Rho-GTPase Rac1. Die Aktivierung der Kinase durch Rac1 führt zur Phosphorylierung und Inaktivierung von Merlin 1 (Xiao *et al*., 2002). Ein anderes Effektorprotein der Rho-GTPasen ist MLK3. Merlin 1 kann direkt mit MLK3 interagieren und verhindert damit dessen Aktivierung durch Cdc42 (Zhan und Chadee, 2010).

Für die FERM-Domänen von Ezrin, Radixin und Moesin wurde eine Interaktion mit RhoGDIα beschrieben. Interessanterweise konnten Maeda und Mitarbeiter bereits 1999 zeigen, dass sowohl Merlin 1 als auch Merlin 2 direkt oder indirekt mit RhoGDIα interagieren (Maeda *et al*., 1999). Die Interaktion erfolgt sehr wahrscheinlich über den den beiden Merlin-Varianten gemeinsamen N-terminalen Anteil von Merlin (Merlin-FERM, Aminosäuren 1-335) und steht in Kompetition mit der Bindung des N-terminalen Anteils von Radixin (Radixin-FERM, Aminosäuren 1-318). Während die funktionellen Auswirkungen der Interaktion von Merlin-FERM mit RhoGDIα bislang unbekannt sind, konnte für Radixin-FERM gezeigt werden, dass dieser Anteil den durch Rho-GEFs katalysierten Austausch von gebundenem GDP für GTP am RhoA-RhoGDIα-Heterodimer beschleunigt oder gar erst ermöglicht (Takahashi *et al*., 1997). Für eine in Kolonkarzinomzellen identifizierte, die Metastasierung von Tumorzellen fördernde Variante von RhoGDIβ konnte kürzlich eine direkte oder indirekte Interaktion mit Radixin und Moesin gezeigt werden (Ota *et al*., 2004). Die auf einer Tagung vorgestellte Kristallstruktur des heterodimeren Komplexes von Radixin-FERM mit RhoGDIα lässt vermuten, dass die stimulierende Wirkung von Radixin-FERM auf die Rho-GEF-vermittelte Aktivierung von Rho-GTPasen auf einer Öffnung der Rho-RhoGDI-Bindung beruht, die die Rho-GTPase für Rho-GEFs zugänglich macht (Hamada *et al*., 2001; Ahmadian *et al*., 2002). Welchen Beitrag die darüber hinaus beobachtete Interaktion von Radixin mit dem Rho-GEF Dbl zu dieser Aktivierung leistet, ist nicht geklärt (Takahashi *et al*., 1998).

Interessanterweise bilden die FERM-Proteine nicht nur intramolekulare *head-to-tail*-Interaktionen, sondern auch intermolekulare aus, wodurch es nicht nur zur Entstehung von homo- und heterodimeren Komplexen der beiden Merlin-Varianten, sondern auch zur Heterodimerisierung von Merlin 1 oder Merlin 2 mit anderen Mitgliedern der Protein-4.1-Familie, z.B. Ezrin, kommt (Grönholm *et al*., 1999; Meng *et al*., 2000; Nguyen *et al*., 2001). Dabei zeigt der isolierte C-Terminus von Merlin 1 sogar eine höhere Affinität zum N-Terminus von Ezrin als zu seinem eigenen N-Terminus (Nguyen *et al*., 2001).

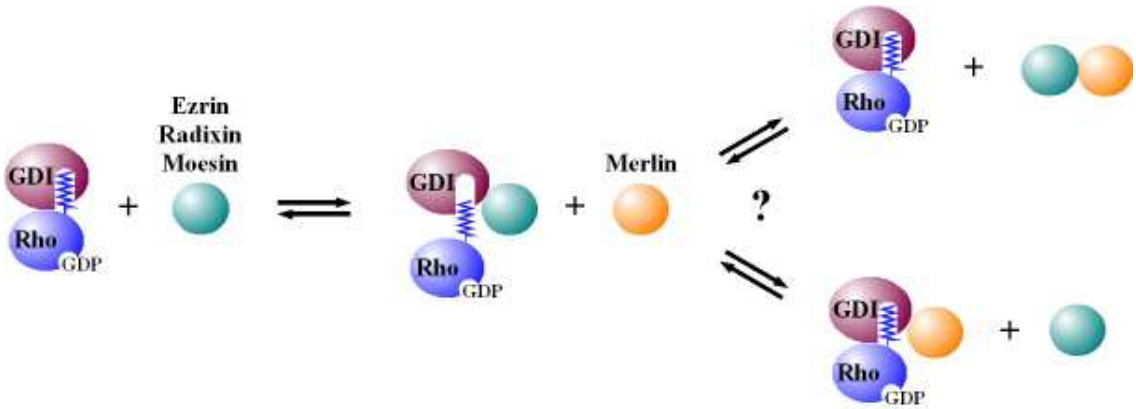


Abb. 3: Hypothetische Rolle von Merlin bei der Regulation der Aktivierung der Rho-GTPasen durch andere FERM-Proteine. Zum einen wäre die Interaktion von Merlin mit anderen FERM-Proteinen und deren damit verbundene Inaktivierung denkbar. Zum anderen könnte sich ein Komplex aus Merlin, RhoGDI (GDI) und der Rho-GTPase (Rho) ausbilden, der dazu führt, dass die Rho-GTPase nicht aktiviert werden kann. Rho = *ras homolog*; FERM = *four point one, ezrin, radixin, moesin*; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; RhoGDI = *Rho GDP dissociation inhibitor*; GDP = Guanosin-5´-diphosphat.

1.6 Ziele der Arbeit

Diese bekannten Interaktionen bestimmter FERM-Domänen mit RhoGDIα einerseits und C-terminalen Bestandteilen desselben oder anderer FERM-Proteine andererseits führten zur wesentlichen Hypothese der vorliegenden Arbeit. Diese besteht darin, dass Merlin 1 die Aktivierung von Rho-GTPasen durch Aufhebung der stimulatorischen Wirkung anderer Protein-4.1-Familienmitglieder auf Rho-GTPasen blockiert. Zwei Mechanismen könnten dieser Interferenz zugrunde liegen: (i) die direkte Konkurrenz von Merlin und anderen Protein-4.1-Proteinen um eine gemeinsame Bindungsstelle auf der Oberfläche von RhoGDIs und/oder Rho-GEFs bei fehlender oder gar negativer intrinsischer Aktivität von Merlin an dieser Bindungsstelle und (ii) die Inaktivierung der FERM-Domänen anderer Protein-4.1-Familienmitglieder durch Heterodimerisierung.

Um diese funktionellen Interaktionen zwischen Merlin und anderen FERM-Proteinen und den Rho-GTPasen Rac2 und Cdc42 und ihrem Regulator RhoGDIα zu untersuchen, sollten Merlin 1 voller Länge sowie die FERM-Domänen von Merlin, Radixin und Ezrin in löslicher Form hergestellt werden. Mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie sollten anschließend kinetische Parameter der Interaktionen zwischen den FERM-Domänen und RhoGDIα gewonnen werden. Zusätzlich sollte das Bindungsverhalten der FERM-Domäne von Merlin mit RhoGDIα in Kombination mit Rac2 getestet werden. Des Weiteren sollte mit Hilfe von [^{35}S]GTPγS-Bindungsversuchen die Frage geklärt werden, ob die FERM-Domäne von Merlin einen Einfluss auf die Aktivierung der beiden Rho-GTPasen Cdc42 und Rac2 hat. Da für Merlin 1 auch eine Rolle bei der Proteintranslokation beschrieben worden war, sollte untersucht werden, wie dieser Prozess reguliert wird und welche Proteine daran beteiligt sind. Aus diesem Grund sollten Translokationsversuche mit Rac2, RhoGDIα und Merlin-FERM an *in vitro* hergestellten Liposomen und nativen Insektenzellmembranen durchgeführt werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Acrylamid-Lösung 30 % 4K Mix	AppliChem, Darmstadt
Adefo Entwickler/Fixierer RTU60	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach
Agar Agar Serva high gel-strength	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ameisensäure	Roth, Karlsruhe
ECL™	GE Healthcare, München
Ammoniumpersulfat	Serva - Bioproducts, Heidelberg
Ampicillin, Natrium-Salz	Roth, Karlsruhe
Aprotinin (Trasylol®)	Bayer, Leverkusen
Arginin	Serva - Electrophoresis, Heidelberg
Bacto-Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Scientific, Rockford, SA
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Borax (Decahydrat)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Serva - Electrophoresis, Heidelberg
BSA Fraktion V	Serva-Electrophoresis, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva-Electrophoresis, Heidelberg
Deoxynucleotid Triphosphat (dNTP) mix	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Dithiothreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
DNAse	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
D (+)-Glucose	Merck, Darmstadt
EDTA, Dinatriumsalz	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
Fötales Kälberserum	GIBCO®Invitrogen Cell Culture, Karlsruhe
Glutathion Sepharose™ 4B	GE Healthcare, München
Guanosin-5´-diphosphat (GDP)	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
High molecular weight marker	Sigma, Deisenhofen

HEPES	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Merck, Darmstadt/Roth, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
Lambda DNA/EcoRI + Hind III Marker	Thermo Scientific, Rockford, USA
Leupeptin	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Low molecular weight marker	Sigma, Deisenhofen
Lysozym	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Serva, Heidelberg
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	AppliChem, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva - Electrophoresis, Heidelberg
N',N',N',N'-Tetramethyl-ethan-1,2-diamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt
Pepstatin A	Serva Electrophoresis, Heidelberg
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S-Konzentrat	Sigma, Deisenhofen
Pyronin Y	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure 37 %	VWR, BDH PROLABO®
Skim Milk Powder (Magermilchpulver)	Fluka, Neu-Ulm
Szintillationsflüssigkeit Ultima Gold™	PerkinElmer, Rodgau
Tris (ultrarein)	USB Corporation, Ohio, USA
Triton-X100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsininhibitor aus Sojabohnen (STI)	Fluka, Neu-Ulm
Tween® 20	Sigma, Deisenhofen
Yeast Extract SERVABACTER®	Serva - Electrophoresis, Heidelberg

Alle verwendeten und hier nicht aufgeführten Chemikalien, Biochemikalien und Lösungsmittel wurden in p. a.-Qualität von Merck (Darmstadt), Riedel-de Haen (Seelze) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.2 Radioaktiv markierte Nukleotide

[^{35}S]GTPγS (1250 Ci/mmol)	PerkinElmer, Rodgau

2.3 Enzyme, Kits und Nukleinsäuren

Amine coupling kit	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Micro Bio-Spin® P-6 columns	Bio-Rad, Hercules, CA,USA
Nucleobond™ AX PC-Kit-100	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin™-Kit	Macherey-Nagel, Düren
Phusion™ *High-Fidelity* Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
Zero Blunt®PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

Alle Restriktionsendonukleasen wurden von Fermentas, St. Leon-Rot oder New England Biolabs, Frankfurt bezogen.

2.4 Verbrauchsmaterial

Agfa Cronex5 Medical X-Ray Film	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
Biacore Sensorchip CM5	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Blotpapier GB002	Schleicher & Schuell, Dassel
His-Trap™ 1 ml	GE Healthcare, München
Kanüle, 100 Sterican (0.45 x 25mm, 26 G x 1”, Gr. 18)	Braun, Melsungen
Reagiergefäße (1,5 ml, 39 x 10,8 mm ∅, farblos)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen (1 ml, 10 ml, 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	Sarstedt, Nümbrecht
Whatman® Protran® Nitrozellulose	Sigma-Aldrich®
Zellkulturflasche, 75 cm^2 und 150 cm^2	Renner, Dannstadt
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Tube (15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Tube (50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

2.5 Prokaryotische Zellstämme

Escherichia coli DH5α	Clontech/ITC Biotechnology, Heidelberg
Escherichia coli Rosetta 2 (DE3)	Novagen, Madison, WI, USA

2.6 Insektenzellen und Baculoviren

Spodoptera frugiperda (*Sf*9) Zellen	Invitrogen, Karlsruhe
BaculoGold™ Baculovirus DNA	BD Biosciences, MD, USA
rFTα	Patrick J. Casey, Durham, NC, USA
rGGTβ	Patrick J. Casey, Durham, NC, USA

2.7 Plasmide

pCR®-Blunt	Invitrogen, Karlsruhe
pLic-MBP, pLic-GST	Prof. Stephen Bottomley, Monash University, Australia
pGEX-2T/4T1	Pharmacia, Freiburg
pASK-IBA43plus®	IBA GmbH, Göttingen
pVL1393	Invitrogen, Leek, NL

2.8 Verwendete Plasmid-DNA-Konstrukte

Folgende DNA-Konstrukte waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden oder wurden selbst hergestellt und für die Experimente in dieser Arbeit verwendet:

pASK-IBA43plus®/Merlin 1	
pASK-IBA43plus®/Merlin-FERM	
pASK-IBA43plus®/Rac2	
pASK-IBA43plus®/RhoGDIα	
pASK-IBA43plus®/Ezrin-FERM	
pLic-MBP/Merlin 1	PD Dr. Barbara Möpps
pLic-GST/Merlin 1	PD Dr. Barbara Möpps
pGEX-2T/Radixin-FERM	Angelika Bauer
pGEX-2T/RhoGDIα	Norbert Zanker
pGEX-4T1/Cdc42	Norbert Zanker

2.9 Proteine

Aus *Sf*9-Membranen extrahiertes und gereinigtes Rac2 wurde freundlicherweise von Frau Dr. Petra Vatter zur Verfügung gestellt.

2.10 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Electron Corporation, Ulm bezogen.

2.10.1 Vektorspezifische Oligonukleotide

pCR-Blunt:

pCR Blunt-reverse:	5’-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3’
pCR Blunt-universe:	5’-GTA AAA CGA CGG CCA G-3’

pASK-IBA43plus®:

pASK-IBA43-forward: 5’-GAG TTA TAC CAC TCC CT-3’

pASK-IBA43-reverse: 5’-CGC AGT AGC GGT AAA CG-3’

2.10.2 Oligonukleotide für die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Merlin 1-sense:

5'-AT GGT AGG TCT CAG GCC ATG GCC GGG GCC ATC GCT TC-3'

Merlin 1-antisense:

5'-ATG GTA GGT CTC AGC GCT GAG CTC TTC AAA GAA GGC CAC TC-3'

Merlin-FERM-sense:

5'-AT GGT AGG TCT CAG GCC ATG GCC GGG GCC ATC GCT TC -3'

Merlin-FERM-antisense:

5'-ATG GTA GGT CTC AGC GCT CCT CAT CTG CTT CTC TCG AGC GAG GC-3'

Ezrin-FERM-sense:

5'-GG TCT CAG GCC ATG CCG AAA CCA ATC A AT GTC C-3'

Ezrin-FERM-antisense:

5'-GGT CTC AGC GCT TCT CCT TTT CTT CTC TGT TTC CAG C-3'

RhoGDIα-sense:

5'-GG TCT CAG GCC ATG GCT GAG CAG GAG CCC ACA G-3'

RhoGDIα-antisense:

5'-GGT CTC AGC GCT CAG TCC TTC CAC TCC TTC TTG A-3'

Rac2-sense:

5'-GGT CTC AGG CCA TGC AGG CCA TCA AGT GTG TGG-3'

Rac2-antisense:

5'-GGT CTC AGC GCT CTA GAG GAG GCT GCA GGC GC-3'

2.11 Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Für die Bestimmung der molekularen Massen verschiedener Proteine wurde der LMW- (*low molecular weight*) bzw. HMW-Marker (*high molecular weight*) der Firma Sigma (Deisenhofen) verwendet.

Tab. 1: Zusammensetzung des HMW-Markers.

Protein	Molekulargewicht (kDa)
Myosin, Kaninchenmuskel	205
β-Galaktosidase, *E. coli*	116
Phosphorylase b, Kaninchenmuskel	97.4
Rinderserumalbumin	66
Ovalbumin	45
Carboanhydrase, Rindererythrozyten	29

Tab. 2: Zusammensetzung des LMW-Markers.

Protein	Molekulargewicht (kDa)
Phosphorylase b, Kaninchenmuskel	94
Rinderserumalbumin	67
Ovalbumin	43
Carboanhydrase, Rindererythrozyten	30
Trypsin Inhibitor, Sojabohne	20,1
α-Lactalbumin, Rindermilch	14,4
Aprotinin	6,5

2.12 Antikörper

Primäre Antikörper gegen:

Anti-GST	Polyklonales Kaninchen-IgG	Santa Cruz, Heidelberg
Anti NF2/Merlin (A-19)	Polyklonales Kaninchen-IgG	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Penta-His	Monoklonales Maus-IgG	Quiagen, Hilden
Anti-Rac2 (C-11)	Polyklonales Kaninchen-IgG	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-rFTα	Polyklonales Kaninchen-IgG	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-rGGTβ	Polyklonales Kaninchen-IgG	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Strep	Monoklonales Maus-IgG	IBA, Göttingen
Anti-RhoGDIα (K-21)	Polyklonales Kaninchen-IgG	Santa Cruz, Heidelberg
*Strep*MAB-immo	Monoklonales Maus-IgG	IBA, Göttingen

Sekundäre Peroxidase-gekoppelte Antikörper:

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

2.13 Geräte

ABI 310 PRISM™ 310 Genetic Analyser	Applied Biosystems, Weiterstadt
Brutschrank Kelvitron ®T	Heraeus Instruments, Fellbach
Biacore 2000, X	Biacore AB, Uppsala, Schweden
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Certomat® R (Schüttlereinheit)	Braun, Melsungen
Concentrator 5301 (*speed vac*)	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammer groß für SDS-PAGE	Hoefer-Amersham Biosciences, Freiburg
Elektrophoresekammer klein für SDS-PAGE	Sigma, Deisenhofen
Flüssigszintillationszähler, LSC 2200 CA	Canberra Packard, Dreieich
Flüssigszintillationszähler, LSC 1600 TR	Canberra Packard, Dreieich
Hamilton Microliter™ -Spritze; 100 µl, 25 µl	Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Schweiz
Horizontalgelkammer	MBT-Brand, Heidelberg
Immunoblot Transferkammer	Renner GmbH, Dannstadt

Inkubator CB 210	Binder, Tuttlingen
J2-HS Zentrifuge	Beckman Instruments, München
Magnetrührer IkaCombimag RCH	Janke & Kunkel, Staufen
Magnetrührer IkaCombimag RCO	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg
Milli-Q^{UF}_{PLUS}	Millipore, Eschborn
Minifuge T	Heraeus Sepatech, Osterode
Netzgerät EPS 3500	Amersham Biosciences, Freiburg
Photometer Gene Quant *pro*	Amersham Biosciences, Freiburg
pH-Meter P207	Consort, Turnhou
Omnifuge 2.0 RS	Hereaus Sepatech, Osterode
Optima™ TLX Ultrazentrifuge	Beckman, Instruments, München
Schüttler Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Schüttler Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Sicherheitswerkbank Uniflow UVUB 1200	Uni Equip, Martinsried
Sonifier B-12	Branson Ultrasonics Corp., Danbury, USA
Sorvall OTD 50B Ultrazentrifuge	DuPont, Wilmington, USA
Spektralphotometer DU 640	Beckman Instruments, München
Thermocycler PTC-200	MJ-Research, Biozym, Oldendorf
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator IL 200M	Bachofer, Reutlingen
Überkopfschüttler Reax II	Heidolph, Schwabach
Videodokumentations-System CF8/1 DX	Kappa Meßtechnik GmbH, Gleichen

2.14 Software

GraphPad Prism®	Version 4.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA.
Micrografx Designer 9.0	Micrografx Inc. 2001, München
Microsoft® Word 2003	Microsoft Corp., Washington, USA
Adobe® Photoshop® 10.0	Adobe Systems Inc., San Jose, USA

Chromas 2	Version 2.33, Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australien
PGProt	P. Gierschik, Ulm
Unicorn	Version 5.01, GE Healthcare, München
BIAevaluation Software	Version 3.01, Biacore AB, Uppsala, Schweden
Biacore 2000 Software	Version 3.2, Biacore AB, Uppsala, Scheden

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Herstellung von Luria-Bertani (LB)-Medium

Der verwendete *E. coli*-Stamm DH5α wurde in LB-Medium kultiviert. Das LB-Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert und bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Um die Vektor-tragenden Bakterien anhand der Plasmid-kodierten Resistenz zu selektieren, wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum Ampicillin (50 µg/ml), Kanamycin (30 µg/ml) oder Chloramphenicol (34 µg/ml) zugegeben. Um SOB-Agarplatten herzustellen, wurde der LB-Agar autoklaviert, auf Handwärme abgekühlt und nach Zugabe von 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$ und des Antibiotikums in sterile Petrischalen gegossen. Diese wurden nach dem Erstarren des Agars bei 4 °C gelagert.

LB-Medium:	1 % (m/V) Bactotrypton, 0,5 % (m/V) Hefeextrakt,
	1 % (m/V) NaCl
SOB-Agar:	2 % (m/V) Agar in LB-Medium
	10 mM $MgCl_2$ (sterilfiltriert)
	10 mM $MgSO_4$ (sterilfiltriert)
Ampicillin-Lösung:	50 mg/ml in ddH_2O, durch einen Zelluloseacetatfilter
	(0,22 µm Porenweite) sterilfiltriert
Kanamycin-Lösung:	30 mg/ml in ddH_2O; sterilfiltriert
Chloramphenicol-Lösung:	34 mg/ml in Ethanol (absolut, p.a.)

3.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien mittels TSS-Methode

Zehn ml LB-Medium wurden mit 100 µl einer Übernachtkultur beimpft und die Kulturen bei 37 °C und 200 *rpm* bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,3-0,4 angezogen. Anschließend wurden die Kulturen für 30 min auf Eis inkubiert, mit 10 ml eiskaltem 2x

TSS-Puffer versetzt und im Anschluss in Aliquoten zu je 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2x TSS-Puffer: 2 % (m/V) Bactotrypton, 1 % (m/V) Hefeextrakt, 2 % (m/V) NaCl, 100 mM $MgCl_2$, 20 % (V/V) Polyethylenglycol 4000 (steril), 10 % (V/V) Dimethylsulfoxid (Zellkultur getestet)

3.1.3 Transformation kompetenter Bakterien

Ein Aliquot (100 µl) kompetenter *E. coli* DH5α-Bakterien wurde auf Eis aufgetaut, mit 10 µl eines Ligationsansatzes (Abschnitt 3.2.6) oder 2 µl einer Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock bei 42 °C für 90 s führte zur Perforation der Bakterienwand und zur Aufnahme der zur Transformation zugesetzten Plasmid-DNA. Die Bakterien wurden danach 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium wurden die Bakterien schließlich für 60 min unter Standardbedingungen inkubiert. Zweihundert µl dieser Bakterienkultur (bei Plasmidtransformation) bzw. der gesamte Transformationsansatz (bei einer Ligation) wurden auf zuvor getrocknete SOB-Platten (mit entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert.

SOC-Medium: 20 mM Glucose, 10 mM $MgSO_4$, 10 mM $MgCl_2$ in LB-Medium

Die Transformation in *E. coli* Rosetta 2 (DE3) erfolgte ebenfalls wie oben beschrieben.

3.1.4 Herstellung einer Glyceringefrierkultur

Zur Herstellung einer Glycerin-Stocklösung von Plasmid-tragenden Bakterien wurden 1,5 ml Antibiotikum-haltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft. Die Kultur wurde anschließend über Nacht bei Standardbedingungen inkubiert. 850 µl dieser Kultur wurden mit 150 µl 100 % Glycerin (sterilfiltriert) versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-tragende *E. coli* DH5α wurden in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht bei Standardbedingungen inkubiert. Zur Präparation der Plasmid-DNA aus 1,5 ml Bakterienkultur wurde der Nukleospin-Kit® von Macherey-Nagel (Minipräparation) verwendet. Für die DNA-Präparation aus 50 ml Bakterienkultur wurde der Nukleobond® PC 100 Kit von Macherey-Nagel (Midipräparation) eingesetzt. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die präparierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentration einer Lösung wurde durch die spektralphotometrische Messung der Extinktion bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Eine optische Dichte (1 OD) entspricht dabei 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotid-DNA oder 40 µg/ml RNA. Die Reinheit der Nukleinsäurelösung wurde über das Verhältnis der Extinktionen der Lösung bei 260 und 280 nm ($OD_{260/280}$) ermittelt. Reine Nukleinsäurelösungen ergeben Werte zwischen 1,8 und 2,0. Niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen durch Proteine hin.

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren wurden anhand ihrer Größe im 1,5 % (m/V) Agarosegel in einer Horizontalgelapparatur elektrophoretisch aufgetrennt. 1,2 g Agarose wurden in 80 ml Elektrophoresepuffer (1x TAE) unter Rühren aufgekocht. Nach Abkühlen auf *ca.* 50 °C wurde die Lösung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelschlitten gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 5 µl Probenpuffer versetzt, in die Taschen des erstarrten Gels geladen und bei einer konstanten Feldstärke von 10 V/cm in 1x TAE elektrophoretisch aufgetrennt. Der Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen die

komplementären Basen doppelsträngiger DNA. Unter UV-Beleuchtung (λ = 312 nm) fluoresziert er rot-orange (λ = 560 nm). Dies erlaubt die photographische Dokumentation und Auswertung des Agarosegels auf einem Transilluminator (Bachofer) mit Hilfe eines Videodokumentationssystems (Kappa Messtechnik).

1x TAE:	40 mM Tris/HCl, pH 8,0,
	1 mM EDTA, 0,1 % (V/V) Essigsäure
6x DNA-Probenpuffer:	30 % (V/V) Glycerin, 50 mM EDTA,
	0,25 % (m/V) Bromphenolblau, pH 8,0

3.2.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA wurde die gewünschte DNA-Bande auf dem Transilluminator unter UV-Beleuchtung mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß mit bekanntem Leergewicht überführt. Anschließend wurde das Eppendorf-Gefäß gewogen und daraus das Gewicht des ausgeschnittenen Gelstücks bestimmt. Die DNA wurde mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben aus dem Gelstück extrahiert.

3.2.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltungen von DNA wurden mit Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Standardansatz:	0,5 - 1 µg	(Plasmid-)DNA
	0,3 µl	Restriktionsendonukleasen (10 U/µl)
	2 µl	10x Restriktionspuffer
	ad 20 µl	mit ddH_2O

Der Restriktionsansatz wurde bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur mindestens 1 h inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 5 µl 6x DNA-Probenpuffer versetzt und mit einem bekannten Marker (MarkerIII, Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker)

gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Produkte der DNA-Spaltung wurden danach unter UV-Beleuchtung ausgewertet.

3.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Zur Herstellung rekombinanter Plasmide muss ein DNA-Fragment (*insert*) mit einem linearisierten Plasmidvektor mit Hilfe einer DNA-Ligase über Phoshodiesterbindungen verknüpft werden.

Standard-Ligationsansatz:	2 µl	10x Ligationspuffer
	1,0 µl	Vektor (*ca.* 20 ng)
	8,0 µl	DNA-Fragment (*ca.* 100 ng)
	1,5 µl	T4-Ligase (1 U/µl)
	ad 20 µl	mit ddH_2O

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert.

3.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der PCR kann enzymatisch *in vitro* ein bestimmter DNA- oder cDNA-Bereich mit Hilfe zweier Oligonukleotide, die den zu amplifizierenden Bereich in 5'→3'-Richtung begrenzen, vervielfältigt werden. Durch Verwendung von Oligonukleotiden, die in ihrer Basensequenz von der des *templates* abweichen, kann zudem modifizierte DNA hergestellt werden. So können gezielt neue Restriktionsschnittstellen oder Mutationen in eine Nukleinsäuresequenz eingebracht werden. Des Weiteren wird die PCR in der automatisierten, nichtradioaktiven DNA-Sequenzanalyse (*cycle sequencing)* angewendet. Das Prinzip der PCR basiert auf sich wiederholenden Zyklen aus DNA-Doppelstrangdenaturierung (*denaturation*), Anbindung beider Oligonukleotide an ihre jeweilige Matrize (*annealing*) und Verlängerung der Komplementärstränge an der entsprechenden Matrize (Primer *extension*) durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Alle PCR-Versuche wurden in einem *thermocycler* (PTC-200, MJ-Research) durchgeführt.

Standard-PCR

Standard-PCR-Ansatz:	10 µl	5x Phusion HF-Puffer (Finnzymes)
	1 µl	10 µM Oligonukleotid 1
	1 µl	10 µM Oligonukleotid 2
	1 µl	10 mM dNTP-Mix
	x µl	Matrizen-DNA (*ca.* 500 ng)
	1µl	Phusion™ *High-Fidelity* Polymerase (2 U/µl)
	ad 50 µl mit ddH_2O	

PCR-Standard-Programm:	Start	95 °C	3 min	
	Denaturierung	95 °C	1 min	40 x
	annealing	x °C	2 min	
	Extension	72 °C	1 min/kb	
	Schlussextension	72 °C	10 min	
	Ende	4 °C	∞	

Vor dem Zyklusprogramm wurden alle Matrizenstränge vollständig denaturiert (Start). Die Phusion™ *High-Fidelity* Polymerase (Finnzymes) wurde hinzupipettiert, wenn der *thermocycler* auf 95 °C geheizt hatte (*hot start).* Die *annealing*-Temperatur lässt sich anhand der Oligonukleotid-Sequenzen berechnen: Jedem A- und T-Nukleotid entsprechen 2 °C, jedem G- und C-Nukleotid 4 °C. Die Schlussextension diente dazu, unvollständig synthetisierte Stränge aufzufüllen. Nach Beendigung der PCR wurde ein 25 µl-Aliquot des PCR-Ansatzes auf ein 1,5 % (m/V) Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Beleuchtung analysiert.

3.2.8 Automatisierte, nichtradioaktive DNA-Sequenzanalyse

Das automatisierte Sequenzierverfahren besteht aus einer Kombination von linearer (*single primer*) PCR und der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al*. (1977). Die rekombinante DNA eines Plasmids kann je nach Bedarf von beiden Seiten der *multiple cloning site* mit zwei Vektor-spezifischen Oligonukleotiden ansequenziert werden, wobei das eine Oligonukleotid komplementär zum *sense*-Strang, das andere

komplementär zum *antisense*-Strang des Vektors bindet. Damit eine unidirektionale Strangsynthese mit einem definierten Startpunkt erfolgen kann, wird pro Sequenzieransatz ein Oligonukleotid eingesetzt. Vom 3´-OH-Ende des gebundenen Oligonukleotids aus beginnend wird ein zur Matrize komplementärer Strang unter Verwendung der vier 2'-Desoxynukleotide (dNTPs) synthetisiert. Parallel dazu erfolgt der Einbau von fluoreszenzmarkierten 2'-, 3'-Didesoxynukleotiden (ddNTPs) und damit der rein statistische Strangabbruch, da bei den ddNTPs die für die Elongation nötige 3'-OH-Gruppe fehlt. Bei der *dye terminator*-Methode sind die vier ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Somit entstehen unterschiedlich lange fluoreszenzfarbstoffmarkierte DNA-Stücke, die auf einem automatischen Sequenz-Analysegerät untersucht werden können. Nach der Elongation der Oligonukleotide durch PCR mit der *Taq*-DNA-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 Kapillargelelektrophorese im Sequenz-Analysegerät wird die DNA-Sequenz ermittelt.

Standardansatz:		
	4 µl	*BigDye™ Terminator Ready Reaction Mix*
	1 µl	dsDNA-Plasmid (200-400 ng)
	2,5 µl	Sequenzier-*primer* (2 pmol/µl)
	ad 10 µl	mit ddH_2O

***Cycle sequencing*-Programm:**				
	Denaturierung	96 °C	2,5 min	
	Denaturierung	96 °C	0,5 min	25 x
	Anlagerung der Oligonukleotide	51 °C	20 s	
	Extension	60 °C	4 min	
	Schlussextension	60 °C	5 min	
	Lagerung	4 °C	∞	

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 für 20 min bei Raumtemperatur und 15 800 x *g* zentrifugiert. Das DNA-Pellet des Sequenzieransatzes wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in der *speed vac* getrocknet. Die DNA-Pellets wurden in 11 µl *Template Suppression Reagent* (ABI) gelöst, für 2 min bei 90 °C denaturiert, kurz auf Eis inkubiert und in den Probenwechsler des Sequenzers gestellt. Die Auftrennung der DNA-

Fragmente erfolgte durch Kapillargelelektrophorese (POP6 Rapid Polymer, ABI) mit 1x *Genetic Analysis Buffer* (ABI) für 36 min bei 50 °C und 15 kV. Die Sequenzierungen wurden freundlicherweise von Frau S. Gierschik durchgeführt.

3.3 Kultivierung von *Sf*9 (*Spodoptera frugiperda*)-Insektenzellen

3.3.1 Medien und Kultivierung der Zellen

Für die Kultivierung von *Sf*9-Zellen wurden Medien verwendet, die von den Firmen PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach und Lonza, Walkersville (USA) bezogen wurden. Dem Medium wurden teilweise noch FCS und Antibiotika zugesetzt.

Medium für die Kultivierung von adhärenten *Sf*9-Insektenzellen

1000 ml Insect-Xpress™ (Lonza)
100 ml fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert, steril filtriert)
1000 µl Gentamicin (50 mg/ml)

Medium für die Kultivierung von Suspensionskultur

TNM-FH-Medium (von PAN, enthält bereits 10 % FCS) für *Sf*9-Zellen versetzt mit
- 2 ml Pluronic F-68® (10 % m/V) auf 100 ml Medium
- 1 ml Fungizone® (250 µg/ml) auf 100 ml Medium

Für die adhärente Kultur wurden *Sf*9-Zellen in 15 ml Insect-Xpress™ bei 27 °C in 75 cm^2-Kulturflaschen (Renner, Dannstadt) kultiviert. Wenn die Zellen konfluent gewachsen waren (*ca.* 2 x 10^7 Zellen/Flasche), wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen anschließend vom Boden der Kulturflaschen mit frischem Medium abgespült. In Abhängigkeit von der Zelldichte wurden die Zellen 1:2 bzw. 1:3 verdünnt und in neue Kulturflaschen überführt. Für die Suspensionskultur wurden von 7-10 konfluent gewachsenen Kulturschalen mit *Sf*9-Zellen das Medium abgesaugt, die Zellen mit frischem TNM-FH-Medium abgelöst und in einen sterilen Fernbachkolben überführt. Die Zellzahl pro ml wurde durch Auszählen eines mit Trypanblau-Lösung (0,5 % in 0,85 %iger NaCl-Lösung) verdünnten Aliquots mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Sie betrug etwa 3,35 x 10^6 Zellen/ml (das entspricht 837,5 x 10^6 Zellen in 250 ml Medium). Der

Fernbachkolben wurde bei 27 °C und 80 *rpm* geschüttelt. Die Generationszeit der Zellen betrug unter diesen Umständen ungefähr 48 h.

3.3.2 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Die Insektenzellen wurden mittels Zellschaber vom Zellkulturschalenboden gelöst, zentrifugiert und das Zellpellet in neuem Kulturmedium resuspendiert. Zur Zellzahlbestimmung wurden nun 20 µl dieser Zellsuspension mit 60 µl Trypanblaulösung versetzt und ein Aliquot in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Zellen wurden anschließend unter einem Mikroskop ausgezählt. Die Anzahl der Zellen in einem der großen Quadranten mit dem Volumen von 0,1 mm^3 bzw. 1 x 10^{-4} ml berechnete sich nach der folgenden Formel:

Zellzahl x 10^4 = Zellzahl pro ml Medium

Trypanblaulösung: 0,5 % (m/V) Trypanblau in 0,85 %iger (m/V) NaCl-Lösung

3.4 Proteinbiochemie

3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Vertikalapparaturen verwendet. Für große Gele wurde ein Hoefer-System (Hoefer-Amersham Biosciences) mit 16 x 18 cm großen Glasplatten und 1,5 mm dicken Abstandshaltern und für kleine Gele ein Sigma-System (Sigma) mit 8 x 10 cm großen Glasplatten und 1 mm dicken Abstandshaltern verwendet. Ein SDS-Polyacrylamidgel setzte sich aus einem 12,5 %igen Trenngel und einem 6 %igen Sammelgel zusammen. Für das Trenngel und das Sammelgel wurden die in der unten angegeben Tabelle beschriebenen Lösungen hergestellt. Die angegebenen Mengen sind für ein großes oder 4 kleine Gele ausreichend.

Tab. 3: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel.

	Trenngellösung	**Sammelgellösung**
Prozent (m/V) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	**12,5 %**	**6 %**
Monomerlösung	12,5 ml	2 ml
ddH_2O	9,5 ml	5,3 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml	2,5 ml
10 % (m/V) SDS	300 µl	100 µl
10 % (m/V) APS	300 µl	100 µl
TEMED	20 µl	10 µl

Die Proteinproben wurden mit 2 x Probenpuffer versetzt und mit einer 100 µl Hamilton Spritze in die mit 1 x Laufpuffer gespülten Geltaschen geladen. Die Elektrophorese wurde in 1 x Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 45 mA für ein großes Gel (90 mA bei zwei Gelen) oder bei konstanter Spannung von 105 V für kleine Gele durchgeführt. Die Auftrennung wurde beendet, wenn der Farbmarker das Ende des Gels erreicht hatte.

Monomerlösung: 30 % (m/V)-Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)-Fertiglösung
Trenngelpuffer: 1,5 M /HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
10x Laufpuffer: 250 mM Tris/HCl, 1,9 M Glycin
1x Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl, 190 mM Glycin, 0,1 % (m/V) SDS, pH 8,6
2x Probenpuffer: 125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 4 % (m/V) SDS, 20 % (V/V) Glycerin, 10 % (V/V) β-Mercaptoethanol, 0,02 % (m/V) Pyronin Y

3.4.2 Immunoblotting von Proteinen (*Western-blot*)

Um Proteine mit spezifisch gegen sie gerichteten Antikörpern nachweisen zu können, mussten die Proteine zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden anschließend aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden.

3.4.3 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen

Nach der SDS-PAGE wurden das Gel und ein Stück Nitrozellulosemembran (Whatman Protran) passender Größe mit Transferpuffer getränkt. Die Membran wurde luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt, das Sandwich zwischen zwei Schaumstoffschwämmen und einer Lage Blotpapier in eine Plastikhalterung eingespannt und in die mit Transferpuffer gefüllte Immunoblot-Transferkammer eingehängt. Das Gel war der Kathode, die Membran der Anode zugewandt, so dass die negativ geladenen Proteine aus dem Gel zur Membran hinwanderten. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 125 mA und einer Leistung von 2 W für 12 h. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau-S-Lösung gefärbt. Die Markerbanden wurden markiert und die Membran in ddH_2O entfärbt.

Transferpuffer: 25 mM Tris/HCl, 190 mM Glycin, 20 % (V/V) Methanol
Ponceau S-Lösung: 0,2 % (m/V) Ponceau S, 3 % (m/V) Trichloressigsäure

3.4.4 Immunchemischer Nachweis transferierter Proteine

Die Membran wurde nach dem Transfer für 1 h in einer 5 %igen Milchpulverlösung inkubiert, um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membran zu blockieren. Anschließend wurde die Membran für 2 h bei Raumtemperatur mit dem ersten Antikörper inkubiert. Die Antikörper wurden in PBS/Tween oder TBS/Tween nach Angaben des Herstellers verdünnt. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min in PBS/Tween wurde der zweite, in PBS/Tween 1:1000 verdünnte Antikörper (Peroxidase-gekoppeltes Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-IgG) für 45 min auf den Blot gegeben. Danach wurde dreimal mit PBS/Tween und einmal mit PBS (jeweils für 5 min) gewaschen. Sämtliche Inkubationen wurden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler durchgeführt. Der Nachweis der Immunkomplexe erfolgte mit Hilfe des ECL™-Systems (GE Healthcare) durch Inkubation der Membran in einer 1:1-Mischung der jeweiligen Lösungen 1 und 2 für 1-2 min. Die Chemolumineszenzsignale wurden durch Schwärzung eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht.

PBS: 80 mM Na_2HPO_4, 20 mM NaH_2PO_4, 100 mM NaCl, pH 7,5
TBS: 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl

PBS/Tween:	0,5 % (V/V) Tween 20 in PBS
TBS/Tween:	0,05 % (V/V) Tween 20 in TBS
Milchpulverlösung:	5 % (m/V) Magermilchpulver in PBS/Tween oder TBS/Tween je nach verwendetem Antikörper
BSA-Lösung:	3 % (m/V) BSA in PBS/Tween oder TBS/Tween je nach verwendetem Antikörper

3.4.5 Coomassie-Blau-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

SDS-Polyacrylamidgele wurden entweder automatisch mit dem Hoefer Processor Plus-System oder manuell mit Coomassie-Blau-Färbelösung gefärbt. Für die Färbung wurde das Trenngel nach der Gelelektrophorese für 1 h in einer Schale mit *ca.* 200 ml Färbelösung unter Schütteln inkubiert. Zum Entfärben des Gels wurde dieses in Entfärbelösung überführt, die so lange gewechselt wurde, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

Färbelösung:	0,14 % (m/V) Coomassie Brilliantblau R 250, 50 % (V/V) Methanol, 10 % (V/V) Essigsäure
Entfärbelösung:	10 % (V/V) Methanol, 10 % (V/V) Essigsäure

3.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach der BCA-Methode

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Proteinproben wurde mittels der BCA-Methode durchgeführt. Diese basiert auf der proteinkonzentrationsabhängigen Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+}, welches mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bildet, der bei 562 nm spektroskopisch nachweisbar ist. Als Standardproteinlösung wurde BSA (*bovine serum albumin*; 2 mg/ml in H_2O) verwendet. Für die Erstellung der Kalibriergeraden wurden 6 Standardproben mit unterschiedlichen BSA-Konzentrationen nach folgendem Schema pipettiert:

Tab. 4: Zusammensetzung der Standardproben zur Erstellung der Kalibriergeraden. BSA = *bovine serum albumin*; BCA = *bicinchoninic acid*.

Standardprobe	BSA (2 mg/ml)	H_2O	BCA-Reagenz
1	0 µl	50 µl	1 ml
2	10 µl	40 µl	1 ml
3	20 µl	30 µl	1 ml
4	30 µl	20 µl	1 ml
5	40 µl	10 µl	1 ml
6	50 µl	0 µl	1 ml

Die zu messenden Proben wurden aus je 10 µl Proteinlösung, 40 µl H_2O und 1 ml BCA-Reagenz hergestellt. Alle Proben wurden für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Extinktion wurde bei 562 nm gemessen und die Proteinkonzentration durch lineare Regression der Kalibriergeraden mittels des Computerprogramms PG Prot bestimmt. Alle Werte wurden durch Doppelbestimmung ermittelt.

BCA-Reagenz: 10 ml BCA Protein Assay Reagent A
200 µl $CuSO_4$-Lösung 4% (m/V)

3.5 Proteinexpression in *Sf*9-Insektenzellen

Für die Expression von Proteinen in Insektenzellen wurde das Baculovirus-Expressionssystem (BD Biosciences) verwendet. In diesem eukaryotischen Expressionssystem sind die meisten posttranslationalen Modifikationen der rekombinant exprimierten Proteine wie Acylierungen, Phosphorylierungen und Methylierungen möglich. Bei der Baculovirus-DNA handelt es sich um eine modifizierte Form der DNA des *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV), die eine letale Deletion enthält. Durch homologe Rekombination mit einem entsprechenden Transfervektor (z.B. pVL1392 oder pVL1393) kann diese Deletion kompensiert werden. Die Baculovirus-Transfervektoren besitzen zudem einen starken Promotor für das viruseigene Polyhedringen, das in der modifizierten Baculovirus-DNA deletiert ist. Nach erfolgreicher Rekombination kontrolliert dieser, der einklonierten cDNA vorgeschaltete, Polyhedrinpromotor die Expression der rekombinanten Proteine.

3.5.1 Amplifikation der Baculoviren

Für die Amplifikation der Viren wurden 10-15 x 10^6 Zellen (das entspricht 50 % konfluenten Zellen) in eine 150 cm^2-Kulturschale (TPP, Trasadingen, Schweiz) ausgesät. Nach dem Absetzen der Zellen (*ca*. 30 min) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Virusüberstand und 5 ml frischem Medium für 1 h bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurden weitere 30 ml Medium zugegeben und die Zellen für mindestens 3 Tage bei 27 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (250 x *g*) und zur Kontrolle der Expression aufgeschlossen. Der Überstand (Viruslösung) wurde bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

3.5.2 Infektion von *Sf*9-Insektenzellen

Die Infektion erfolgte analog zur Amplifikation. Die Virusmenge sowie die Dauer der Infektion für eine optimale Expression des rekombinanten Proteins wurden anhand der Proteinmenge auf SDS-Polyacrylamidgelen bestimmt. Gleiches galt für das Verhältnis der Virusmengen bei Koinfektionen. Um größere Proteinmengen zu produzieren, wurden Suspensionskulturen von Insektenzellen infiziert. Die Infektion erfolgte 3 Tage. Pro 15 Millionen Zellen wurden 0,15 ml Virusüberstand eingesetzt. Das ergab für 837,5 Millionen Zellen ein Gesamtvolumen von 8,4 ml Virusüberstand. Da es sich um eine Koinfektion handelte, wurden von beiden Virusüberständen je 8,4 ml zu den Zellen gegeben. Die Zellen (837,5 x 10^6) wurden bei 250 x *g* für 5 min abzentrifugiert, in 50 ml Medium resuspendiert und mit 16,8 ml Virussuspension in einen Fernbachkolben gegeben. Nach Inkubation bei 27 °C für 1 h wurden 350 ml frisches Medium zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend für 3 Tage bei 27 °C inkubiert.

3.5.3 Präparation der GGTase

Für die Präparation von löslicher und partikulärer Fraktion Baculovirus-infizierter *Sf*9-Insektenzellen wurden die Zellen zunächst in 50 ml Röhrchen bei 250 x *g* und RT

zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 500 µl eiskaltem Waschpuffer pro 10 x 10^6 Zellen resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis überführt, mit eiskaltem GGTase-Lysepuffer (200 µl pro 10 x 10^6 Zellen) versetzt und unter häufigem Durchmischen 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 6-10-mal durch eine 0,45 x 25 mm (Gr. 18) Kanüle auf- und abgezogen und dadurch homogenisiert. Durch eine Zentrifugation bei 100 000 x *g* für 1 h bei 4 °C wurde die partikuläre Fraktion (Kerne, Membranen der aufgebrochenen Zellen) von der löslichen Fraktion getrennt. Der resultierende Überstand wurde nach der Bestimmung der Proteinkonzentration aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

Waschpuffer (1 x CMF-PBS-Puffer): 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM $Na_2HPO_4H_2O$, 1,8 mM KH_2PO_4, pH 7,4

GGTase-Lysispuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 3mM Benzamidine, 0,1 mM PMSF, 1 µM Pepstatin, 1 µM Leupeptin, 2 µg/µl STI, 1 µg/ml Aprotinin, 1 mM $MgCl_2$

3.6 Proteinexpression in Bakterien

3.6.1 Expression von Merlin 1

Kompetente *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurden mit dem Expressionsplasmid pASK-IBA43plus®/Merlin 1 transformiert. Eine Kolonie der Starterplatte wurde anschließend mit einer sterilen Pipettenspitze in 20 ml LB-Medium (+ 50 µg/ml Ampicillin; 34 µg/ml Chloramphenicol) gegeben. Die so hergestellte Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler (200 *rpm*) inkubiert und am nächsten Tag zum Ansetzten der Hauptkultur verwendet. Dabei wurden 2 ml der Vorkultur zu 100 ml LB-Medium (+ 50 µg/ml Ampicillin; 34 µg/ml Chloramphenicol) gegeben. Die Bakterien wurden anschließend bei 37 °C inkubiert, wobei stündlich 1 ml der Kultur abgenommen wurde, um die OD bei 550 nm zu messen. Bei Erreichen einer OD_{550} von 0,6 wurde die Proteinexpression mit 200

ng/ml Anhydrotetracyclin gestartet. Die Hauptkulturen wurden anschließend für 3 h bei 24 °C und 37 °C, bzw. für 20 h bei 16 °C inkubiert. Die Bakterien wurden danach 10 min bei 2935 x *g* zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet nochmals mit PBS gewaschen. Das Bakterienpellet wurde schließlich mit 2 ml Lysispuffer F versetzt, für 1 h auf Eis inkubiert und anschließend 4-mal für 15 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Zwischen den einzelnen Ultraschallschritten wurden die Proben für jeweils eine Minute auf Eis gekühlt. Danach erfolgte die Zentrifugation des Lysats für 60 min bei 100 000 x *g* und 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in Lysispuffer F (ohne Lysozym und Inhibitorcocktail) gelöst.

3.6.1.1 Verwendung von BugBuster™ und Guanidinhydrochlorid

Bakterien aus 7 ml Hauptkultur (nach Inkubation für 3 h bei 37 °C bzw. für 20 h bei 16 °C) wurden in 0,5 ml BugBuster™ und 5 µl 100x Inhibitoren-Cocktail resuspendiert und für 20 min bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurde das Lysat für 10 min bei 20 000 x *g* und 4 °C zentrifugiert, der Überstand zur Kontrolle eingefroren und das erhaltene Pellet wieder in 0,5 ml BugBuster™ resuspendiert. Dann wurden 3 ml BugBuster™ (1:10 verdünnt in H_2O) zu der Lösung gegeben und diese anschließend für eine Minute mit dem Vortexer gemischt. Die Lösung wurde für 15 min bei 5000 x *g* und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das resultierende Pellet in 5 ml BugBuster™ (1:10 verdünnt in H_2O) für eine Minute mit dem Vortexer resuspendiert. Die letzten beiden Schritte wurden 3-mal wiederholt. Zuletzt wurde die Lösung für 15 min bei 16 000 x *g* und 4 °C zentrifugiert, der Überstand zur Kontrolle eingefroren und das Pellet in 500 µl Guanidinhydrochlorid (5 M) oder Harnstoff (8 M) gelöst.

3.6.1.2 Verwendung von Benzylalkohol

Kurz vor Zugabe von Anhydrotetracyclin wurden die Bakterien entweder mit 10 µM Benzylalkohol versetzt oder für 30 Minuten einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen. Anschließend wurden die Bakterien für 20 h bei 16 °C inkubiert, danach geerntet, in Lysispuffer B gelöst und mit Ultraschall aufgeschlossen.

3.6.1.3 Stabilisierung von Merlin 1 mit Hilfe von Arginin

Über eine Streptactin™-Säule gereinigtes und in 0,5 M Arginin-haltigem Puffer solubilisiertes Merlin 1 wurde über Micro Bio-Spin® P-6 Säulen in Puffer absteigender Argininkonzentrationen gebracht. Dazu wurden die Micro Bio-Spin® P-6 Säulen nach Angaben des Herstellers in Puffer W mit 0 bis 0,5 M Arginin umgepuffert. Je 75 µl des vorbehandelten Merlin 1 wurden anschließend über die Säulen gegeben.

3.6.2 Expression von GST (*glutathione S-transferase*)- bzw. MBP (*maltose-binding protein*)-Merlin 1

Kompetente *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurden mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transformiert und dann weiter behandelt wie in 3.6.1, mit dem Unterschied, dass die Proteinexpression bei Erreichen einer OD_{600} von 0,5 mit 100 µM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) gestartet wurde. Die Bakterien wurden anschließend für 20 h bei 16 °C bzw. 24 °C inkubiert und danach mit Lysispuffer F in An- oder Abwesenheit von 0,5 M Arginin aufgeschlossen.

Proteolyse von MBP-Merlin 1 mittels TEV-Protease (*tobacco etch virus*)

Die Proteolyse von MBP-Merlin 1 wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Standardansatz:

ProTEV Puffer	5 µl
DTT 100 mM	1 µl
Fusionsprotein	20 µg
ProTEV Plus (10 U)	2 µl
ad 100 µl mit ddH_2O	

Der Ansatz wurde für 48 h bei 4 °C inkubiert. Nach 24 bzw. 48 h wurden Aliquote abgenommen und auf SDS-Polyacrylamidgele (12,5 %) geladen.

3.6.3 Expression von Merlin-FERM und Ezrin-FERM

Kompetente *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurden mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert und dann weiter behandelt wie in 3.6.1. Die Bakterien wurden anschließend für 20 h bei 20 °C inkubiert und dann mit Lysispuffer C (Merlin-FERM) mit 0,5 M Arginin oder Lysispuffer A (Ezrin-FERM) aufgeschlossen.

3.6.4 Expression von Rac2 und RhoGDIα

Kompetente *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurden mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert und dann weiter behandelt wie in 3.6.1. Die Bakterien wurden anschließend für 20 h bei 16 °C inkubiert und danach mit Puffer D mit 2 mg/ml Lysozym, 1x Proteinaseinhibitorencocktail und 0,5 M Arginin aufgeschlossen. Die Expression von RhoGDIα erfolgte analog zu der von Rac2, mit dem Unterschied, dass hier Lysispuffer F verwendet wurde.

3.6.5 Expression und Reinigung von GST-RhoGDIα, -Radixin-FERM und -Cdc42

Kompetente *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurden mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert und dann weiter behandelt wie in 3.6.1, mit dem Unterschied, dass die Proteinexpression bei Erreichen einer OD_{600} von 0,5 mit 100 µM IPTG gestartet wurde. Die Hauptkulturen wurden anschließend für 20 h bei 16 °C auf einem Schüttler (180 *rpm*) inkubiert und danach für 10 min bei 2935 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in GST-Puffer A resuspendiert. Die Bakterien wurden für 30 min bei 6000 x *g* und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Vor Gebrauch wurde das Bakterienpellet in kaltem Wasser aufgetaut, mit 4 ml GST-Puffer B versetzt und unter häufigem Vortexen 1 h lang auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Lyse der Bakterien durch dreimalige Ultraschallbehandlung für je 30 s bei 4 °C. Das Lysat

wurde für 1 h bei 100 000 x *g* und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Proteingehalt bestimmt.

GST-Puffer A: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5
1 mM EDTA
1 mM DTT
0,1 mM PMSF

GST-Puffer B: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
50 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM DTT
1 mM PMSF
0,1 mg/ml Lysozym

Die Reinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte affinitätschromatographisch. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden 250 µl Glutathion-Sepharose® 4B 3-mal mit je 500 µl GST-Waschpuffer 1 durch Zentrifugation für 1 min bei 800 x *g* und 4 °C gewaschen. Der Überstand aus den Waschschritten wurde jeweils verworfen. Der lösliche Überstand des Bakterienlysats wurde zu den gewaschenen Glutathion Sepharose® Beads gegeben und der Ansatz für 20 h im Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Glutathion Sepharose® Beads bei 800 x *g* und 4 °C für 1 min pelletiert und der Überstand verworfen. Die Glutathion Sepharose® Beads wurden dann noch 6-mal mit jeweils einem ml GST-Waschpuffer 2 durch Zentrifugation für 1 min bei 800 x *g* und 4 °C gewaschen und die entstehenden Überstände jeweils verworfen. Um das an die Glutathion Sepharose® Beads gebundene Protein zu eluieren, wurde ein Thrombinverdau durchgeführt, bei dem sowohl die Beads selbst als auch der GST-*tag* vom Zielprotein entfernt werden. Dabei schneidet 1 *unit* Thrombin 100 µg GST-Fusionsprotein. Je nach vorhandener GST-Fusionsprotein-Konzentration wurden 1 ml GST-Waschpuffer 2 mit der entsprechenden Menge an Thrombin zu den Beads gegeben und diese anschließend auf einem Überkopfschüttler für 20 h bei 4 °C inkubiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Die Glutathion Sepharose® Beads wurden dann für 2 min bei 800 x *g* abzentrifugiert. Dem Überstand wurde p-Aminobenzamidinagarose

zugesetzt. 14,3 µl p-Aminobenzamidinagarose (100 %) binden 10 U bzw. 100 µg Thrombin. Die Lösung wurde anschließend für 2 h bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert, danach für 2 min bei 800 x *g* und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

GST-Waschpuffer 1:
50 mM Tris/HCl, pH 7,5
50 mM NaCl
1 mM EDTA
1x Proteinaseinhibitoren-Cocktail

GST-Waschpuffer 2:
50 mM Tris/HCl, pH 7,5
50 mM NaCl
2 mM $MgCl_2$
0,1 % (V/V) Triton X-100
1 mM DTT

3.7 Affinitätschromatographische Reinigung von Proteinen mit 6xHistidin- oder Strep-*tag*

3.7.1 Reinigung von MBP-Merlin 1

Die nach Lyse erhaltene, lösliche Fraktion MBP-Merlin-1-exprimierender *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurde auf eine 1 ml His-Trap™ Säule geladen. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit 5 Säulenvolumina Puffer C mit 0,5 M Arginin und 30 mM Imidazol gewaschen und MBP-Merlin 1 anschließend mit Puffer C mit 250 mM Imidazol eluiert. Durchfluss und Eluate wurden in 3000 µl bzw. 500 µl Fraktionen gesammelt.

3.7.2 Reinigung von Merlin-FERM und Ezrin-FERM

Die nach Lyse mit Lysispuffer A erhaltene, lösliche Fraktion Merlin-FERM- bzw. Ezrin-FERM-exprimierender *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurde auf eine 1 ml His-Trap™ Säule geladen. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit Hilfe eines absteigenden Argininggradienten (0,5-0 M Arginin in Puffer B + 30 mM Imidazol) gewaschen und Merlin-FERM bzw. Ezrin-FERM anschließend mit Puffer B mit 500 mM Imidazol eluiert.

3.7.3 Reinigung von Rac2 und RhoGDIα

Die nach Lyse erhaltene, lösliche Fraktion Rac2-exprimierender *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurde auf eine 1 ml His-Trap™-Säule geladen. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit Hilfe eines absteigenden Argininggradienten (0,5-0 M Arginin in Puffer D + 30 mM Imidazol) gewaschen und Rac2 anschließend mit Puffer D mit 250 mM Imidazol eluiert. Die Reinigung von RhoGDIα erfolgte analog zu der von Rac2, mit dem Unterschied, dass hier kein Argininggradient für die Reinigung eingesetzt wurde.

3.7.4 Reinigung von Merlin 1 über Streptactin™

Der Überstand Merlin-1-exprimierender und mit Lysispuffer C (mit 0,5 M Arginin) aufgeschlossener Bakterien wurde mit Avidin versetzt (51 µg Avidin binden 1 nmol Biotin) und anschließend auf eine 9 ml Streptactin™-Säule geladen. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit 4 Säulenvolumina Puffer W mit 0,5 M Arginin gewaschen und Merlin 1 anschließend mit Puffer W mit 2,5 mM Desthiobiotin und 0,5 M Arginin eluiert. Durchfluss und Eluate wurden in 3000 µl bzw. 500 µlFraktionen gesammelt.

3.8 Ionenaustauschchromatographie

Die Anionenaustauschchromatographie wurde an einer DEAE Sephacel-Säule (2 x 9 cm, 20 ml Säulenvolumen) und an einer MonoQ-Säule (1 ml) durchgeführt. Nach Anschluss

der Säulen an das Äkta-Chromatographie-System und der Äquilibrierung mit Puffer A wurde die Probe aufgetragen. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min bei der MonoQ- und 0,75 ml/min bei der DEAE Sephacel-Chromatographie und es wurden 0,5 ml-Fraktionen (MonoQ) bzw. 3 ml-Fraktionen (DEAE Sephacel) aufgefangen. Die Säulen wurden mit 5 Säulenvolumina gewaschen und die Proteine dann mit einem linearen Gradienten (10 ml bei MonoQ, 100 ml bei DEAE Sephacel) von 0-500 mM NaCl, enthalten in Puffer A, eluiert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Coomassie-Blau-Färbung oder Immunoblotting.

Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH 7,7, 1 mM DTT

3.9 Biacore (Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie)

3.9.1 Immobilisierung der Proteine

Die Immobilisierung der gereinigten Proteine und Antikörper erfolgte mit Hilfe des *amine-coupling-kit*. Dabei werden die Proteine über freie Aminogruppen (Lysin, Arginin) bzw. freie N-Termini kovalent an die aktivierten Carboxylgruppen der Dextranmatrix gebunden. Die carboxymethylierte Dextranmatrix wurde durch eine 7-minütige Injektion eines 1:1-Gemisches aus 0,05 M NHS (N-Hydroxysuccinimid) und 0,2 M EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimidhydrochlorid) bei einer Flussrate von 5 µl/min aktiviert. Die Carboxylgruppen der Dextranmatrix reagieren mit EDC zu reaktiven Estergruppen, die stabile Amidbindungen zu den freien Aminogruppen der injizierten Proteine eingehen. Durch Anlagerung von Wasser können die reaktiven Estergruppen wieder zu stabilen Carboxylgruppen regeneriert werden. Dieser Vorgang würde zu einer reduzierten Kopplungseffizienz führen. Daher werden die instabilen Estergruppen mit Hilfe von NHS zu stabileren, aber dennoch reaktiven NHS-Estern umgeformt. Diese gehen dann mit den freien Aminogruppen der Proteine eine stabile Amidbindung ein und ermöglichen eine höhere Immobilisierungseffizienz.

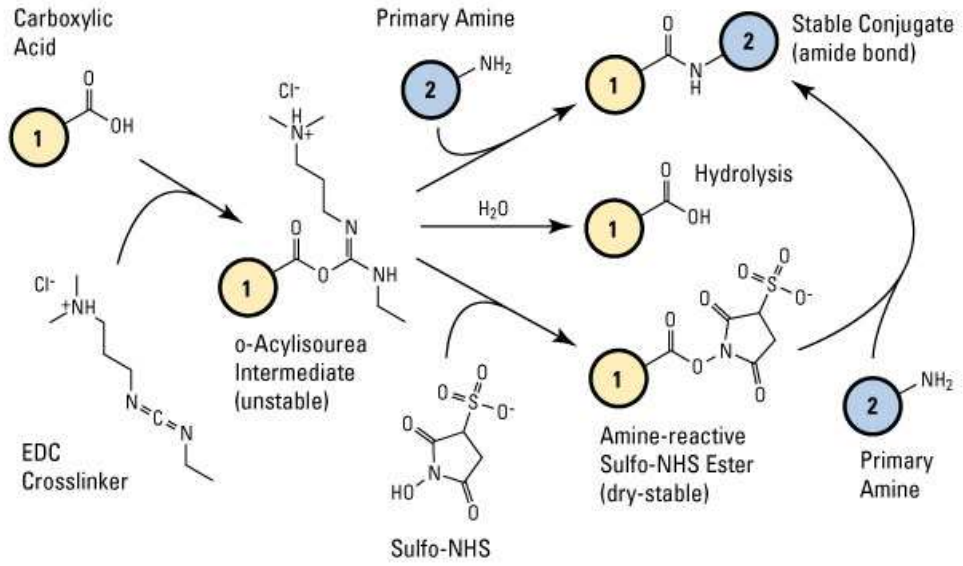


Abb. 4: Aktivierung der carboxymethylierten Dextranmatrix (1) durch NHS (N-Hydroxysuccinimid) und EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimidhydrochlorid) und Kopplung eines Proteins (2) über eine freie Aminogruppe (Piercenet, 2013)

Vor der eigentlichen Immobilisierung wurde untersucht, unter welcher Bedingung die zu immobilisierenden Proteine eine maximale Affinität zu der Dextranmatrix hatten. Dazu wurden die Proteine in Natriumazetatpuffern mit unterschiedlichen pH-Werten (4,5 - 5,5) verdünnt und anschließend über die Flusszellen gegeben, auf denen die Proteine immobilisiert werden sollten. Der saure pH-Wert der Natriumazetatpuffer führt zu einer Konzentrierung der positiv geladenen Proteine an der negativ geladenen carboxymethylierten Dextranmatrix über elektrostatische Wechselwirkungen. Durch die niedrigen pH-Werte bei der Kopplungsreaktion kommt es zusätzlich zu einer Stabilisierung der instabilen, aber reaktiven Estergruppen. Für die Immobilisierung wurde der Natriumazetatpuffer verwendet, bei dem die Kopplungseffizienz maximal war. Die in Natriumazetatpuffer gelösten Proteine wurden dann nach Aktivierung der Dextranmatrix mit 5 µl/min über die entsprechende Flusszelle gegeben, bis das gewünschte Immobilisierungsniveau erreicht war. Als letzter Schritt erfolgte die Absättigung der freien reaktiven Gruppen durch eine 7-minütige Injektion von Ethanolaminhydrochlorid, pH 8,5 (*amine-coupling-kit*), bei einer Flussrate von 5 µl/min. Nach erfolgter Immobilisierung wurde etwa für 1 h Laufpuffer über die Flusszellen gegeben, um die Stabilität der Basislinie zu überprüfen. Regenerationsschritte wurden wie im jeweiligen Experiment angegeben durchgeführt. Alle Analyten wurden vor Injektion über den CM5-Sensorchip mit Hilfe von Micro Bio-Spin® P-6 Säulen in den jeweiligen Laufpuffer gebracht.

Da kinetische Reaktionsparameter aus den einzelnen Messungen gewonnen werden sollten, war es notwendig, das Immobilisierungsniveau so anzupassen, dass die maximale Signalantwort des Analyten (R_{max}) bei Injektion in einem Bereich von 50-100 RU (*resonance units*, entspricht der Signalantwort) lag. Bei zu hohen R_{max}-Werten können unspezifische Bindungen und die Aggregation des Analyten zu Messfehlern führen. Mit Hilfe von Formel (1) lässt sich berechnen, wie viel von einem Liganden (in RU) immobilisiert werden muss, um in den angestrebten Bereich von R_{max} zu kommen.

$$R_{max} = \frac{\text{Molekulargewicht des Analyten}}{\text{Molekulargewicht des Liganden}} \cdot R_I \cdot s \qquad (1)$$

R_I entspricht dabei dem Immobilisierungsniveau des Liganden, während s das stöchiometrische Verhältnis der Interaktion zwischen Analyt und Ligand wiedergibt. Die Formel (1) kann nun nach R_I aufgelöst werden; man erhält Gleichung (2).

$$R_I = \frac{R_{max} \cdot \text{Molekulargewicht des Liganden}}{s \cdot \text{Molekulargewicht des Analyten}} \qquad (2)$$

Mit Hilfe der Gleichung (2) wurde berechnet, wie viel RU vom jeweiligen Liganden immobilisiert werden mussten, um im vorgegebenen R_{max}-Bereich zu liegen.

Im Folgenden sollen anhand einer Beispielrechnung die quantitativen Verhältnisse für die Interaktion von löslichem Rac2 (Analyt) mit immobilisiertem RhoGDIα (Ligand) dargestellt werden. Dabei nimmt man an, dass die beiden Proteine im Verhältnis 1:1 miteinander interagieren. Auf diese Weise ergibt sich folgende Aufstellung:

$$R_I = \frac{100\,\text{RU} \cdot 27\,\text{kDa}}{1 \cdot 21\,\text{kDa}} = 128{,}57\,\text{RU}$$

Das theoretische Immobilisierungsniveau (R_I) von RhoGDIα sollte 128 RU betragen, damit die maximale Signalantwort bei Injektion von Rac2 einen Wert von 100 RU nicht überschreitet. Dieser Wert gibt allerdings nur einen groben Hinweis auf die zu immobilisierende Proteinmenge, da im Einzelfall geprüft werden muss, wie viel Protein

nach der Immobilisierung funktionell aktiv ist. Im Fall von RhoGDIα lag der Anteil an bindungsfähigem Protein nach Kopplung bei etwa 20-30 %.

Mit Hilfe von Formel (1) kann auch berechnet werden, wie viel Analyt von einer Flusszelle mit immobilisiertem Liganden gebunden werden kann [Formel (3)].

$$\text{Bindungskapazität}\,[\text{RU}] = \text{Immobilisierungslevel}\,[\text{RU}] \times \frac{\text{Molekulargewicht des Analyten}}{\text{Molekulargewicht des Liganden}} \qquad (3)$$

3.9.2 Ermittlung und Berechnung der kinetischen Parameter

Nach erfolgter Immobilisierung des Liganden wurde der jeweilige Analyt in unterschiedlichen Konzentrationen über die Flusszellen gegeben. Die in den jeweiligen Experimenten angewandten Flussraten und Injektionszeiten sind beim jeweiligen Experiment angegeben. Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation (k_a und k_d) wurde mithilfe der BIAevaluation-Software durchgeführt. Dabei wurde die im Folgenden dargestellte Differentialgleichung (4) verwendet.

$$dR/dt = k_a \times C \times (R_{max} - R) - k_d \times R \qquad (4)$$

R entspricht der Signalantwort, dR/dt der Änderung der Signalantwort zum Zeitpunkt t (Steigung des Sensorgramms) und R_{max} der maximalen Signalantwort bzw. Bindekapazität. k_a und k_d stellen die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation bzw. Dissoziation dar. Die Änderung der Signalantwort ist demnach abhängig von den Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation. Die Dissoziation des Analyten ist von der Analytenkonzentration C unabhängig und wird nur durch die Menge des gebundenen Analyten (Höhe der Analytantwort: R) bestimmt. Mit Hilfe der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation lässt sich unter Verwendung von Formel (5) die molare Dissoziationskonstante (K_D) bestimmen.

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} \qquad (5)$$

Um die Genauigkeit der kinetischen Auswertung zu überprüfen, wird mit Hilfe folgender Formel der Wert X^2 (Chi^2) berechnet:

$$X^2 = \frac{\sum_{1}^{n} (R_f - R_x)^2}{n - p} \qquad (6)$$

R_f berechnetes Signal

R_x gemessenes Signal

n Anzahl der Datenpunkte

p Anzahl der berechneten Parameter

Mit steigender Übereinstimmung von R_f und R_x wird X^2 kleiner. Eine 100 %ige Übereinstimmung von berechneten und gemessenen Werten würde folglich einen X^2-Wert von 0 ergeben.

3.10 Isoprenylierung der Rho-GTPasen *in vitro*

Um den ersten Schritt der carboxyterminalen Modifikation von Rac2/Cdc42 *in vitro* durchzuführen, wurde zunächst das Lösungsmittel des Isoprenyldonors Geranylgeranylpyrophosphat mit einem Vakuumkonzentrator entfernt. Danach wurden GGPP in Reaktionspuffer resupendiert (je 5 min Vortexer und Ultraschallbad), Rac2 oder Cdc42 und GGTase hinzugefügt und die Proben für 15 min bei 30 °C inkubiert. Die Rho-GTPasen wurden vor Isoprenylierung in Puffer D umgepuffert. Im Folgenden ist ein typischer Ansatz für die Isoprenylierungsreaktion dargestellt.

Tab. 5: Ansatz zur Isoprenylierung der Rho-GTPase Rac2.

Geranylgeranylpyrophosphat	17,2 µl (eingedampft in Vakuumkonzentrator)
Reaktionspuffer (5x konzentriert)	114,4 µl
GGTase	12 µl
GGTase-Puffer	45,2 µl
Rac2 (gereinigt aus *E. coli*)	60 µl (etwa 14 µg/µl)
Puffer D	340 µl

GGtase-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,7

1 mM DTT

Reaktionspuffer: 250 mM Tris/Maleat pH 7,3

50 µM $ZnCl_2$

3.11 [^{35}S]GTPγS-Bindung

Die Bindung von GTP an Cdc42 wurde mit Hilfe des [^{35}S]Guanosin-5'-O-3-thiotriphosphat ([^{35}S]GTPγS)-Bindungsassays durchgeführt (Northup *et al*., 1982). Vor Versuchsbeginn wurden alle Proteine mit Hilfe von Micro Bio-Spin® P-6 Säulen in Bindungspuffer (ohne Genapol und [^{35}S]GTPγS) umgepuffert und der Proteingehalt in den Filtraten mittels BCA-Methode bestimmt. Zur Kontrolle wurde nach dem Umpuffern auch ein SDS-Polyacrylamidgel angefertigt und mit den Proben beladen. GDP wurde über eine gesonderte Fraktion in den jeweiligen Ansatz eingebracht (final 1 µM/Ansatz). Die Proteine wurden wie angegeben vorinkubiert, danach mit Bindungspuffer versetzt und dann wieder bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Über den Bindungspuffer wurde [^{35}S]GTPγS in die Reaktion eingebracht. Unspezifische Bindungen von [^{35}S]GTPγS an die Proteine wurden durch Zusatz von nicht markiertem GTPγS bestimmt (finale Konzentration 400 µM). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml eiskaltem Stopp-Puffer beendet. Die Ansätze wurden über feuchte Nitrozelluloserundfilter (Ø 25 mm, 0.45 µm) filtriert. Anschließend wurden die Filter dreimal mit je 2 ml Stopp-Puffer gewaschen, in Szintilationsgefäßen für 45 min getrocknet und mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold) versetzt. Nach gutem Durchmischen der Proben wurde die auf den Filtern zurückgehaltene Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler gemessen. Jeder Wert wurde durch Dreifachbestimmungen ermittelt. Die Gesamtmenge eingesetzter Radioaktivität im Ansatz wurde durch direktes Messen von 60 bzw. 70 µl Bindungspuffer (mit allen Zusätzen) bestimmt.

Bindungspuffer: 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$,
1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 % (V/V) Genapol

Stopp-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$

3.12 Translokation

3.12.1 Herstellung von Liposomen

Phosphatidylserin (25 % (V/V)), Phosphatidylethanolamin (35 % (V/V)), Phosphatidylinositol (5 % (V/V)) und Cholesterin (35 % (V/V)) wurden zusammen in ein Glasröhrchen überführt und für etwa 5 min unter Stickstoffbegasung getrocknet. Ab diesem Zeitpunkt erfolgten alle Schritte bei 4 °C. Die getrockneten Komponenten wurden in 250 µl TBSM (*tris-buffered saline* mit $MgCl_2$) resuspendiert (15 min Vortexer), mit einer Pipettenspitze vorsichtig vom Glas gelöst und nochmals für 15 min auf dem Vortexer geschüttelt. Anschließend wurden die Liposomen für 5 min mit Ultraschall behandelt. Fünfzig µl der so hergestellten Liposomenlösung wurden dann mit angegebener Menge an Protein versetzt, auf 100 µl Gesamtvolumen mit TBSM aufgefüllt und danach für 10 min auf Eis inkubiert. Bei Anfertigung der Kontrolle ohne Liposomen wurde die Liposomenlösung durch TBSM ersetzt. Nach Inkubation auf Eis wurde die Liposomen-Protein-Lösung für 20 min bei 20 000 x *g* und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das erhaltene Pellet in 100 µl TBSM-Puffer resuspendiert. Die Lösung wurde noch einmal zentrifugiert und das resultierende Pellet wieder in 100 µl TBSM-Puffer resuspendiert.

3.12.2 Präparation von Membranvesikeln aus nativen Insektenzellmembranen

*Sf*9-Zellen aus 15 ml Kulturvolumen (etwa 25-30 Millionen Zellen) wurden in 10 ml PBS resuspendiert und für 5 min bei 173 x *g* und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Zellpellet in 1 ml hypotonischen Lysispuffer aufgenommen. Die Zellen wurden dann mittels Spritze und Kanüle (Ø 0,45 x 25 mm) aufgeschlossen, bei 900 x *g* zentrifugiert und der erhaltene Überstand nochmals für 20 min bei 16 000 x *g* und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit den Membranen in 100 µl des jeweils angegebenen Puffers gelöst.

3.12.3 Translokationsversuche

Ansteigende Mengen der zu testenden Proteine wurden wie im Text angegeben mit den Membranen inkubiert. Die Membranen mit gebundenen Proteinen wurden anschließend für 20 min bei 20 000 x *g* und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet einmal im angegebenen Puffer (z.B. TBSM-Puffer) gewaschen und dann gelöst. Je 15 µl der zytoslischen und partikulären Fraktionen wurden dann auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulose transferiert und mit angegebenen Antikörpern immunchemisch nachgewiesen.

3.13 Übersicht der verwendeten Puffer

Tab. 6: Verwendete Puffer.

Puffer	**Zusammensetzung**
Puffer A	50 mM Tris/HCl, pH 7,7 1 mM DTT 0-500 mM NaCl über Äkta-Gradient
Puffer B	50 mM Natriumhydrogenphosphat, pH 7,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT 100 µM PMSF
Puffer C	20 mM Tris/HCl, pH 7,5 100 mM NaCl 1 mM EDTA
Puffer D	20 mM Tris/HCl, pH 7,5 100 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT 1 mM $MgCl_2$ 100 µM PMSF
Puffer W	100 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA
100x Inhibitorcocktail:	10 µM Leupeptin 2 µM Pepstatin A

	200 µM PMSF 2 µg/ml Sojatrypsininhibitor 1 µg/ml Aprotinin 3 mM Benzamidin 1 mM DTT
Biacore-Phosphatpuffer	50 mM Natriumhydrogenphosphat, pH 7,0 150 mM NaCl 3 mM EDTA 0,005 % (V/V) Surfactant P20
HBS-EP	10 mM Hepes, pH 7,4 150 mM NaCl 3 mM EDTA 0.005 % (V/V) Surfactant P20
PBS (*phosphate-buffered saline*)	80 mM Na_2HPO_4, pH 7,5 20 mM NaH_2PO_4 100 mM NaCl
TBS (*tris-buffered saline*)	20 mM Tris/HCl, pH 7,5 100 mM NaCl
TBSM (*tris-buffered saline* mit $MgCl_2$)	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 5 mM $MgCl_2$
Lysispuffer	**Zusammensetzung**
Lysispuffer A	50 mM Natriumhydrogenphosphat, pH 7,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT 100 µM PMSF 2 mg/ml Lysozym 0,5 M Arginin 1x Inhibitoren Cocktail
Lysispuffer B	50 mM Tris/HCl, pH 7,4 300 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT 2 mg/ml Lysozym 1x Inhibitorencocktail
Lysispuffer C	100 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT 2 mg/ml Lysozym 1x Inhibitorencocktail

Lysispuffer D	50 mM Natriumhydrogenphosphat, pH 7,0 150 mM NaCl 1mM EDTA 1mM DTT 2 mg/ml Lysozym 1x Inhibitorencocktail
Lysispuffer E	100 mM Tris/HCl, pH 8,0 300 mM NaCl 1 mM EDTA 2 mg/ml Lysozym 1x Inhibitorencocktail
Lysispuffer F	20 mM Tris/HCl, pH 7,5 100 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT 2 mg/ml Lysozym 1x Inhibitorencocktail
Lysispuffer G	50 mM Natriumhydrogenphosphat, pH 7,4 500 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5 M Arginin 2 mg/ml Lysozym 1x Inhibitorencocktail
Lysispuffer H	20 mM Tris/HCl, pH 7,4 100 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5 M Arginin 2 mg/ml Lysozym 1x Inhibitorencocktail

4 Ergebnisse

4.1 Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine Merlin 1, Merlin-FERM, Rac2, Cdc42, rGGTase1, RhoGDIα, Ezrin-FERM und Radixin-FERM

4.1.1 Optimierung der Bedingungen zur Expression von Merlin 1

Die Expression von Merlin 1 gestaltet sich sehr schwierig, da dieses Protein bei Expression in *E. coli* dazu neigt, sogenannte Einschlusskörperchen (*inclusionbodies*) zu bilden. Deshalb sollte zu Beginn der Untersuchungen getestet werden, unter welchen Bedingungen eine möglichst hohe Ausbeute an löslichem Material erzielt werden kann.

4.1.1.1 Auswahl der Expressionstemperatur

Kompetente *E. coli* wurden mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert und anschließend für die Proteinexpression verwendet. Die Hauptkulturen wurden nach Zugabe von Anhydrotetracyclin für unterschiedliche Zeiten und bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend geerntet, aufgeschlossen und lösliche und partikuläre Fraktionen auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteine wurden im Folgenden auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-Penta-His-Antikörpern immunchemisch nachgewiesen.

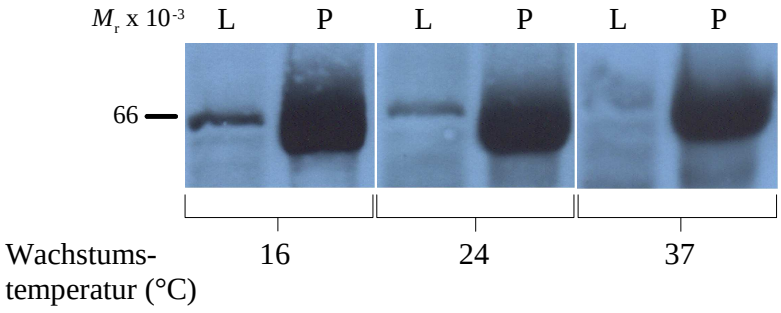


Abb. 5: Abhängigkeit der Expression von Merlin 1 von der Inkubationszeit und Inkubationstemperatur. Merlin-1-exprimierende *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurden nach Erreichen einer

optischen Dichte (OD_{550}) von 0,6 mit 200 ng/ml Anhydrotetracyclin versetzt und anschließend für 3 h bei 24 °C und 37 °C, bzw. für 20 h bei 16 °C inkubiert. Die Bakterien wurden dann mit Lysispuffer F aufgeschlossen und der Proteingehalt in den jeweiligen zytosolischen und partikulären Fraktionen bestimmt. Von jeder zytosolischen Fraktion wurden 100 µg, von den partikulären Fraktionen je 20 µg Protein auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-Penta-His-Antikörpern immunchemisch nachgewiesen. L = löslich, P = partikulär; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Die Ausbeute an löslichem Merlin 1 war sehr gering, während eine deutlich sichtbare Menge an unlöslichem Protein vorlag. Beachtet man dabei die Proteinmengen, die auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen worden waren (100 µg zytosolisches und 20 µg partikuläres Protein), so fällt dieser Unterschied noch deutlicher ins Gewicht. Während bei einer Inkubationszeit von 3 h bei 37 °C kein lösliches Protein vorlag, zeigten sich bei 24 °C (3 h) und 16 °C (20 h) Anstiege in der Menge von Merlin 1 in den löslichen Fraktionen.

4.1.1.2 Einfluss der Puffersubstanz und des pH-Werts

Durch Veränderungen im pH-Wert kommt es zu Ladungsänderungen innerhalb der Proteine, die deren potentielle Aggregation verstärken oder hemmen können. Dieser Effekt kann sich auch auf die Löslichkeit eines Proteins auswirken. Aus diesem Grund sollte getestet werden, ob Merlin 1 bei unterschiedlichen pH-Werten Änderungen in der Löslichkeit aufweist.

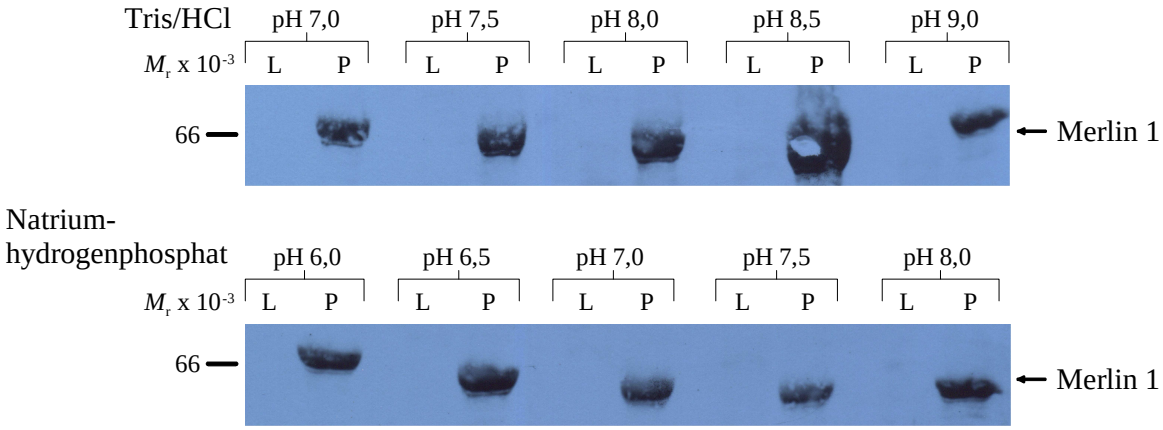


Abb. 6: Löslichkeit von Merlin 1 in Tris- und Phosphatpuffern mit unterschiedlichen pH-Werten. Merlin-1-exprimierende *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurden nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{550}) von 0,6 mit 200 ng/ml Anhydrotetracyclin versetzt und anschließend für 20 h bei 20 °C inkubiert. Die Bakterien wurden dann mit Lysispuffer C (Tris/HCl: pH 7,0 – 9,0) oder D (Natriumhydrogenphosphat: pH 6,0 – 8,0) aufgeschlossen. Von den löslichen und partikulären Fraktionen wurden je 50 µg Protein auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulose transferiert und

mit Anti-Penta-His-Antikörpern immunchemisch nachgewiesen. L = löslich, P = partikulär; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Die Lyse der Merlin-1-exprimierenden *E. coli* Rosetta 2 (DE3) in Tris- und Phosphatpuffern unterschiedlicher pH-Werte führte nicht zu einer Veränderung der Löslichkeit von Merlin 1.

4.1.1.3 Verwendung spezieller Lysispuffer

BugBuster® ist ein spezieller Lysispuffer, der besondere Zusätze enthält, um die Zellwände von *E. coli* aufzuschließen (Novagen, *User ProtocolTB245*). Dieser Puffer kann außerdem zur Gewinnung unlöslicher Proteine aus Einschlusskörperchen verwendet werden. Die Proteinextraktion mit Hilfe von BugBuster® wurde dabei nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zusätzlich wurden die partikulären Fraktionen, die als letzte bei der Präparation mit Verwendung von BugBuster® anfielen, in einer 5-molaren Guanidinhydrochlorid-Lösung solubilisiert.

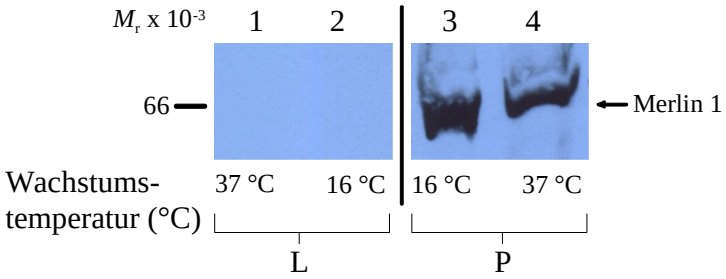


Abb. 7: Aufreinigung der Einschlusskörperchen aus *E. coli* mit Hilfe von BugBuster® und Guanidinhydrochlorid. Merlin-1-exprimierende *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurden nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{550}) von 0,6 mit 200 ng/ml Anhydrotetracyclin versetzt und anschließend für 3 h bei 37 °C bzw. für 20 h bei 16 °C inkubiert. Die Bakterien wurden dann mit Hilfe von BugBuster® aufgeschlossen. Anschließend wurden die Einschlusskörperchen aufgereinigt (BugBuster®-Protokoll) und das letzte erhaltene Proteinpellet in 5 M Guanidinhydrochlorid gelöst. Von den beiden zytosolischen Fraktionen wurden 100 µg, von den partikulären je 10 µg Protein auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-Penta-His-Antikörpern immunchemisch nachgewiesen. Spur 1 und 2: Merlin 1 nach Einschlusskörper-Aufreinigung (EKA); Spur 3 und 4: Merlin 1 nach EKA solubilisiert in Guanidinhydrochlorid. L = löslich, P = partikulär; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Durch die Verwendung von BugBuster® ließ sich kein lösliches Merlin 1 aus den Einschlusskörperchen extrahieren. Erst der Einsatz von 5 M Guanidinhydrochlorid brachte Merlin 1 in Lösung (Abb. 7). Die Guanidinhydrochlorid-Lösung wurde anschließend mit einem MicroDispoDialyzer® gegen TBS-Puffer dialysiert und der Proteingehalt in den

Dialysaten mittels BCA-Proteinbestimmung gemessen. Da sich kein Protein nachweisen ließ, wurden 50 µl von jedem Dialysat direkt auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die Proteine wurden dann auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-Penta-His-Antikörpern behandelt. Merlin 1 konnte in keiner Spur nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Wurde statt Guanidinhydrochlorid Harnstoff eingesetzt, so zeigte sich auch hier keine verbesserte Löslichkeit von Merlin 1.

4.1.1.4 Verwendung spezieller Zusatzstoffe

Die Arbeitsgruppe um De Marco konnte zeigen, dass man die Löslichkeit von Proteinen bei Expression in *E. coli* durch eine verstärkte Chaperonaktivierung verbessern kann (De Marco *et al.*, 2005). Benzylalkohol hat sich dabei als sehr nützliches Werkzeug herausgestellt, da dieser in *E. coli* zu einer verstärkten Chaperonsynthese führt, die sich positiv auf die Proteinfaltung auswirken kann. Deshalb wurden den Bakterien kurz vor Induktion der Proteinsynthese mit Anhydrotetracyclin 10 µM Benzylalkohol zugesetzt. Alternativ wurden die Bakterien einem 30-minütigen Hitzeschock bei 42 °C unterzogen. Dieser führt ebenfalls zu einer verstärkten Chaperonsynthese in *E. coli* (Arsène *et al.*, 2000; Bukau, 1993). Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte dann für 20 h bei 16 °C. Die Bakterien wurden anschließend geerntet, aufgeschlossen und Aliquots der löslichen und partikulären Fraktionen auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteine wurden im Folgenden auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-Penta-His-Antikörpern immunchemisch nachgewiesen.

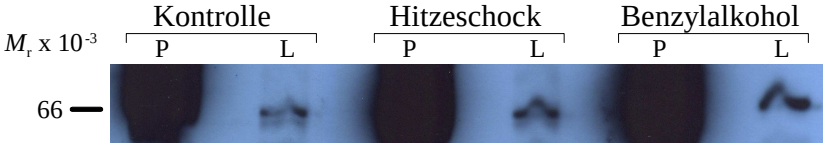


Abb 8. Einfluss von Benzylalkohol und Zellstress (Hitzeschock) auf die Expression von Merlin 1. *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurden vor Zugabe von Anhydrotetracyclin entweder mit 10 µM Benzylalkohol versetzt oder für 30 Minuten einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen. Anschließend wurden die Bakterien für 20 h bei 16 °C inkubiert, danach geerntet und lysiert. Von den partikulären Fraktionen wurden je 4 µg, von den löslichen je 20 µg Protein auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-Penta-His-Antikörpern immunchemisch nachgewiesen. L = löslich, P = partikulär; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Die Behandlung der Bakterien mit Benzylalkohol führte zu einem sehr leichten Anstieg der Menge von Merlin 1 in der löslichen Fraktion. Vergleicht man die Kontrolle mit den hitzebehandelten Bakterien, so zeigen sich hier kaum Veränderungen in der Löslichkeit von Merlin 1. Die Arbeitsgruppe um Golovanov konnte zeigen, dass man die Löslichkeit eines Proteins auch durch Zugabe geringer Mengen an Arginin verbessern kann (Golovanov *et al*., 2004). Aus verschiedenen Vorversuchen war hervorgegangen, dass auch Merlin 1 durch die Zugabe von 0,5 M Arginin in Lösung gehalten werden kann. Im nächsten Versuch sollte deshalb geklärt werden, welche Argininkonzentration mindestens eingesetzt werden muss, um Merlin 1 zu stabilisieren. Zu diesem Zweck wurden Micro Bio-Spin® P-6 Säulen in Puffer mit steigenden Argininkonzentrationen umgepuffert (0-0,5 M). Anschließend wurde Merlin 1, welches zuvor durch 0,5 M Arginin solubilisiert worden war, auf die unterschiedlich vorbereiteten Säulen geladen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

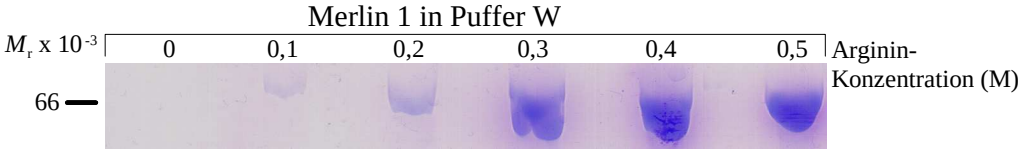


Abb. 9: Löslichkeit von Merlin 1 in Abhängigkeit von der Argininkonzentration. Micro Bio-Spin® P-6 Säulen wurden in Puffer W mit ansteigenden Konzentrationen von Arginin umgepuffert (0-0,5 M). Anschließend wurde in 0,5 M Arginin solubilisiertes Merlin 1 auf die unterschiedlichen Säulen geladen und je 10 µl der Filtrate auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Dieses wurde mit Coomassie Blau gefärbt. Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Merlin 1 wird durch Zugabe von Arginin in Lösung gehalten. Ohne Arginin lässt sich kein Protein in der löslichen Fraktion nachweisen. Erst mit 0,1 M Arginin im Puffer zeigt sich eine schwache Bande im Gel. Steigende Argininkonzentrationen führen zu einer stärkeren Löslichkeit des Proteins. Ab Zugabe von 0,4 M Arginin scheint die maximale Löslichkeit von Merlin 1 erreicht zu sein.

Um weitere Möglichkeiten zur Verbesserung der Ausbeute von Merlin 1 zu erhalten, sollte auch getestet werden, ob verschiedene Detergenzien in der Lage sind, Merlin 1 in Lösung zu halten. Dazu wurden Merlin-1-exprimierende *E. coli* in Puffern mit Natriumdodecylsulfat, Natriumdesoxycholat oder Triton X-100 lysiert, die Lysate anschließend in lösliche und partikuläre Fraktionen getrennt und diese dann auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen.

Aufschluss der Bakterien ohne Zusätze im Lysispuffer:

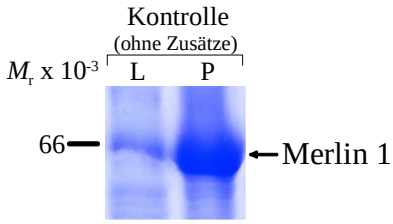


Abb. 10: Löslichkeit von Merlin 1. Merlin-1-exprimierende *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurden nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{550}) von 0,6 mit 200 ng/ml Anhydrotetracyclin versetzt und anschließend für 20 h bei 16 °C inkubiert. Die Bakterien wurden dann mit Lysispuffer B (ohne Zusätze) aufgeschlossen. Zehn µl der löslichen und 5 µl der partikulären Fraktion wurden anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) geladen. Dieses wurde mit Coomassie Blau gefärbt. L = löslich, P = partikulär; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Aufschluss der Bakterien mit Natriumdodecylsulfat im Lysispuffer:

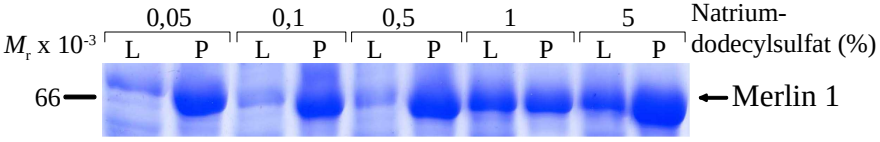


Abb. 11: Einfluss von Natriumdodecylsulfat auf die Löslichkeit von Merlin 1. Merlin-1-exprimierende *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurden nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{550}) von 0,6 mit 200 ng/ml Anhydrotetracyclin versetzt und anschließend für 20 h bei 16 °C inkubiert. Die Bakterien wurden dann mit Lysispuffer B aufgeschlossen, der mit 0,05 - 5 % (m/V) Natriumdodecylsulfat versetzt worden war. Zehn µl der löslichen und 5 µl der partikulären Fraktionen wurden anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) geladen. Dieses wurde mit Coomassie Blau gefärbt. L = löslich, P = partikulär; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Aufschluss der Bakterien mit Natriumdesoxycholat im Lysispuffer:

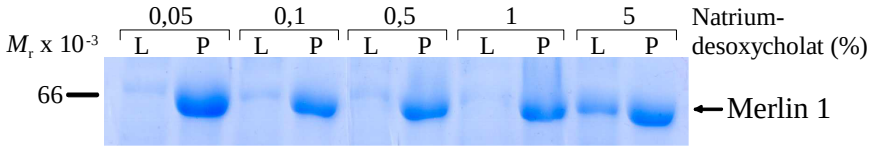


Abb. 12: Einfluss von Natriumdesoxycholat auf die Löslichkeit von Merlin 1. Merlin-1-exprimierende *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurden nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{550}) von 0,6 mit 200 ng/ml Anhydrotetracyclin versetzt und anschließend für 20 h bei 16 °C inkubiert. Die Bakterien wurden dann mit Lysispuffer B aufgeschlossen, der mit 0,05 - 5 % (m/V) Natriumdesoxycholat versetzt worden war. Zehn µl der löslichen und 5 µl der partikulären Fraktionen wurden anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) geladen. Dieses wurde mit Coomassie Blau gefärbt. L = löslich, P = partikulär; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Aufschluss der Bakterien mit Triton X-100 im Lysispuffer:

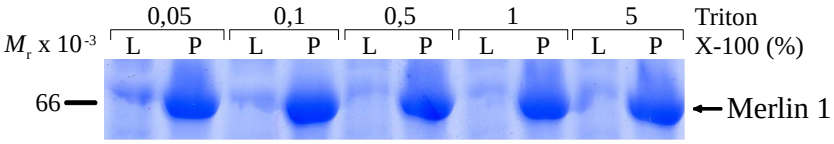


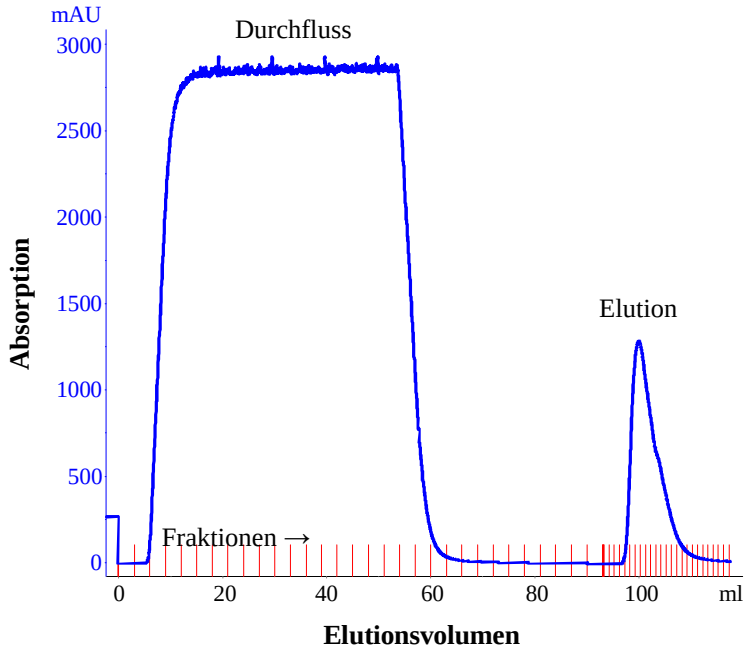
Abb. 13: Einfluss von Triton X-100 auf die Löslichkeit von Merlin 1. Merlin-1-exprimierende *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurden nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{550}) von 0,6 mit 200 ng/ml Anhydrotetracyclin versetzt und anschließend für 20 h bei 16 °C inkubiert. Die Bakterien wurden dann mit Lysispuffer B aufgeschlossen, der mit 0,05 - 5 % (V/V) Triton X-100 versetzt worden war. Zehn µl der löslichen und 5 µl der partikulären Fraktionen wurden anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) geladen. Dieses wurde mit Coomassie Blau gefärbt. L = löslich, P = partikulär; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Natriumdodecylsulfat hält Merlin 1 ab einer Konzentration von 1 % in Lösung, während Natriumdesoxycholat dies erst ab einer Konzentration von 5 % vermag. Triton X-100 führt bei keiner der eingesetzten Konzentrationen zu einer verbesserten Löslichkeit von Merlin 1.

Da nur die Verwendung eines Arginingradienten zu einer signifikanten Verbesserung der Löslichkeit von Merlin 1 beigetragen hatte, sollte im Folgenden versucht werden, Merlin 1 unter Zugabe von Arginin über eine Streptactin^{TM}-Säule zu reinigen. Dazu wurden Lysis-, Lauf- und Elutionspuffer mit 0,5 M Arginin versetzt. Für einige Proteine konnte in der Literatur gezeigt werden, dass die Reinigung unter diesen Bedingungen zu einer verbesserten Stabilität der Proteine führt, da es zu einer Abreinigung potentieller Interaktions- und Aggregationspartner kommt.

4.1.1.5 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Merlin 1

a)



b)

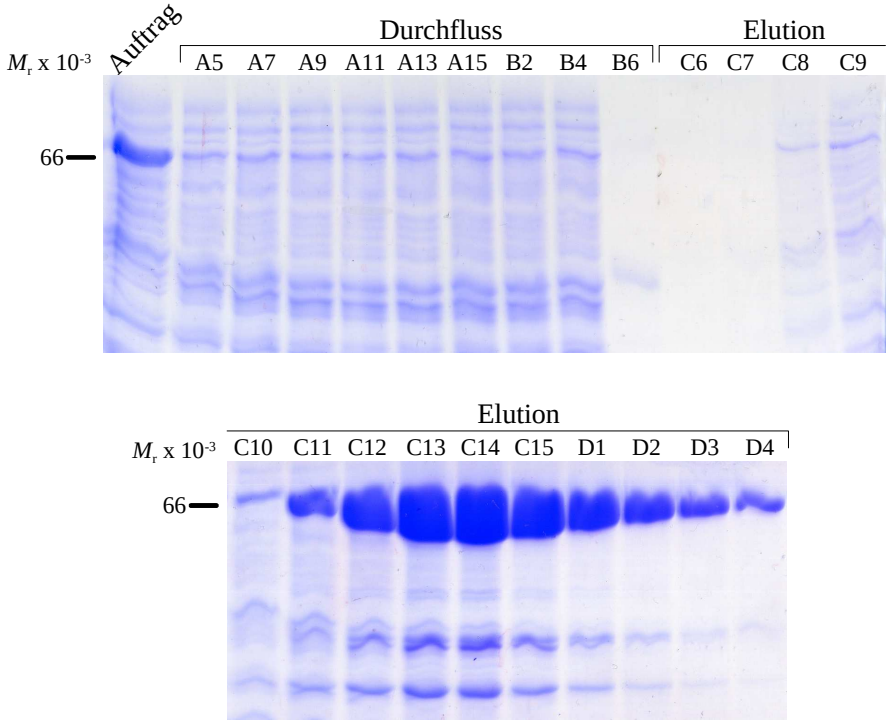


Abb. 14: Affinitätschromatographische Aufreinigung von Merlin 1 und Analyse ausgewählter Fraktionen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. a) Chromatogramm b) Coomassie-Blau-Färbung. Die nach Lyse in Lysispuffer C mit 0,5 M Arginin erhaltene, lösliche Fraktion Merlin-1-exprimierender *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurde auf eine 9 ml Streptactin^{TM}-Säule geladen. Nach dem Probenauftrag wurde die Säule mit Puffer W mit 0,5 M Arginin gewaschen und Merlin 1 anschließend mit Puffer W mit 2,5 mM Desthiobiotin und 0,5 M Arginin eluiert. Durchfluss und Eluat wurden in 3000 µl-

bzw. 500 µl-Fraktionen gesammelt. Je 50 µl der angegebenen Fraktionen wurden anschließend zur Kontrolle auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Dieses wurde mit Coomassie Blau gefärbt. AU = *absorbance units*; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Merlin 1 bindet spezifisch an die Streptactin™-Säule (Fraktionen C11 bis D4). Nur ein sehr geringer Anteil des Proteins befindet sich im Durchfluss (Fraktionen A5 bis B4). In den Elutionsfraktionen zeigen sich neben der Bande von Merlin 1 zusätzliche Proteinbanden in verschiedenen Größen. Die Fraktion C14 wurde anschließend per Dialyse oder Micro Bio-Spin® P-6 Säulen in Puffer ohne Arginin umgepuffert. Dies führte jedoch zu einer direkten Präzipitation des Proteins (Ergebnisse nicht gezeigt).

Da keine der bisher angewandten Möglichkeiten zu einer messbaren Steigerung der Löslichkeit von Merlin 1 geführt hatte, sollte im Anschluss getestet werden ob die Fusion von Merlin 1 mit verschiedenen Löslichkeits-*tags* zu einer Verbesserung der Ausbeute an löslichem Protein beitragen kann.

4.1.1.6 Expression von Merlin 1 unter Verwendung verschiedener Löslichkeits-*tags*

Die Fusion schlecht löslicher Proteine mit Löslichkeits-*tags*, wie GST oder MBP, kann die Löslichkeit dieser Proteine verbessern (Cabrita *et al.*, 2006). Aus diesem Grund sollten Fusionsproteine aus Merlin 1 und GST bzw. Merlin 1 und MBP hergestellt werden. Dazu wurden kompetente *E. coli* mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transformiert und anschließend für die Proteinexpression verwendet. Die Hauptkulturen wurden nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5 mit IPTG versetzt und für 20 h bei 16 °C bzw. 24 °C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend geerntet, in An- und Abwesenheit von Arginin aufgeschlossen und lösliche und partikuläre Fraktionen auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

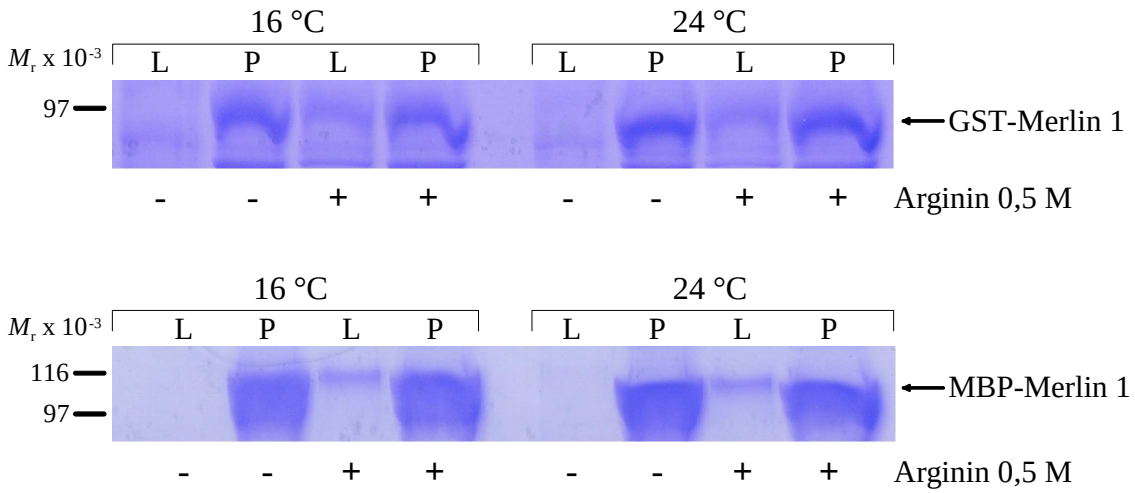


Abb. 15: Expression von GST- und MBP-Merlin 1. GST- und MBP-Merlin-1-exprimierende *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurden nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5 mit 100 µM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) versetzt und anschließend für 20 h bei 16 °C bzw. 24 °C inkubiert. Die Bakterien wurden dann mit Lysispuffer F in An- oder Abwesenheit von 0,5 M Arginin lysiert und die Lysate anschließend in lösliche und partikuläre Fraktionen aufgeteilt. Fünf µl jeder Fraktion wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen, und dieses mit Coomassie Blau gefärbt. L = löslich, P = partikulär; GST = *glutathione S-transferase*; MBP = *maltose-binding protein*; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Das Fusionsprotein aus GST und Merlin 1 zeigte weder bei 16 °C noch bei 24 °C eine Bande in der löslichen Fraktion. Wurden die GST-Merlin-1-exprimierenden Bakterien in Arginin-haltigen Lysispuffern lysiert, sah man eine sehr schwache Bande in der löslichen Fraktion. MBP-Merlin 1 zeigte genau wie GST-Merlin 1 nur dann lösliche Anteile, wenn dem Lysispuffer Arginin zugesetzt worden war. Die Wachstumstemperatur hatte dabei keinen Einfluss auf die Löslichkeit von MBP-Merlin 1. Etwa 5 % von MBP-Merlin 1 befanden sich in der löslichen Fraktion, während der Rest partikulär vorlag.

4.1.1.7 Einfluss der Puffersubstanz auf die Löslichkeit von MBP-Merlin 1

Im Folgenden sollte getestet werden, ob die Verwendung unterschiedlicher Puffersubstanzen zu einer Veränderung der Löslichkeit von MBP-Merlin 1 führt. Dazu wurden MBP-Merlin 1 in *E. coli* Rosetta 2 (DE3) exprimiert und die Bakterien anschließend in Natriumhydrogenphosphat- bzw. Tris-enthaltenden Lysispuffern aufgeschlossen.

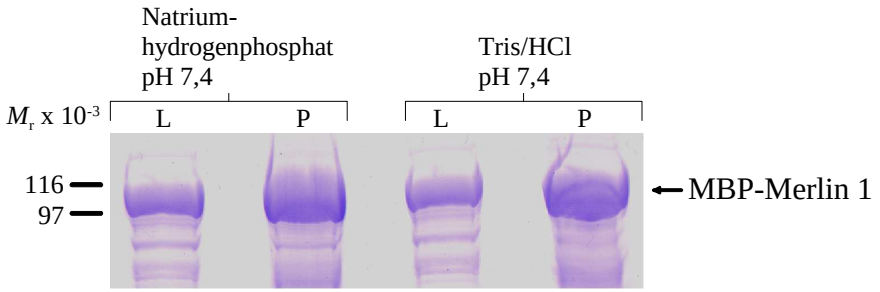


Abb. 16: Löslichkeit von MBP-Merlin 1 in Phosphat- und Trispuffer. MBP-Merlin-1-exprimierende *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurden nach Erreichen einer OD_{600} von 0,5 mit 100 µM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) versetzt und anschließend für 20 h bei 24 °C inkubiert. Die Bakterien wurden dann mit Lysispuffer G (Natriumhydrogenphosphat) oder H (Tris/HCl) aufgeschlossen. Von allen Fraktionen wurden je 2 µl auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen, und dieses mit Coomassie Blau gefärbt. L = löslich, P = partikulär; MBP = *maltose-binding protein*; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Es zeigte sich kein Unterschied in der Löslichkeit von MBP-Merlin 1 bei der Verwendung von Phosphat- bzw. Tris-enthaltenden Lysispuffern. Sowohl Gesamtexpression als auch die löslichen und partikulären Anteile von MBP-Merlin 1 waren bei beiden Puffersystemen identisch. Es sollte nun getestet werden, ob MBP-Merlin 1 gereinigt werden kann und Merlin 1 nach Entfernung von MBP stabil bleibt.

4.1.1.8 Reinigung von MBP-Merlin 1 über His-Trap™ Säulen

Nach Expression von MBP-Merlin 1 wurde dieses zur Reinigung über eine His-Trap™-Säule gegeben. Der Laufpuffer war mit 0,5 M Arginin versetzt worden. Die Elution erfolgte in Puffer ohne Arginin.

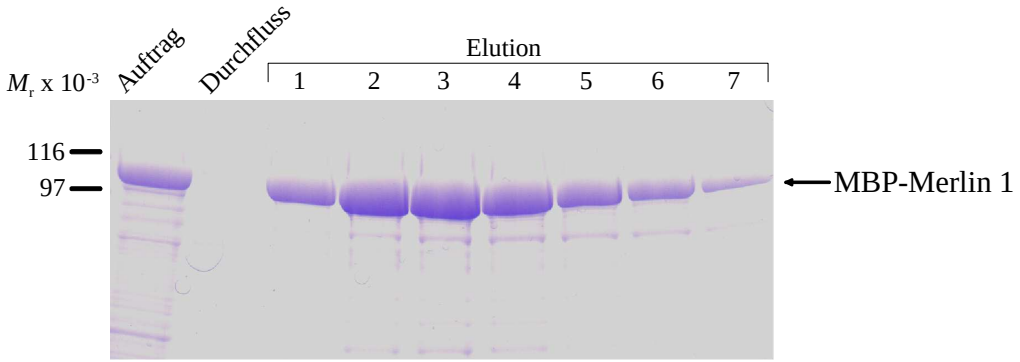


Abb. 17: Affinitätschromatographische Aufreinigung von MBP-Merlin 1 und Analyse ausgewählter Fraktionen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Die nach Lyse in Lysispuffer H mit 0,5 M Arginin erhaltene, lösliche Fraktion MBP-Merlin-1-exprimierender *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurde mit 30 mM Imidazol versetzt und auf eine 1 ml His-Trap™ Säule geladen. Nach dem Probenauftrag wurde die Säule

mit Puffer C mit 0,5 M Arginin und 30 mM Imidazol gewaschen und gebundenes MBP-Merlin 1 anschließend mit Puffer C mit 250 mM Imidazol eluiert. Von Auftrag und Durchfluss wurden je 2 µl, von den restlichen Fraktionen je 10 µl auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Dieses wurde mit Coomassie Blau gefärbt. MBP = *maltose-binding protein*; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

MBP-Merlin 1 konnte erfolgreich über die His-Trap™-Säule gereinigt werden. Es zeigte sich kein Protein im Durchfluss. Selbst ohne Arginin schien MBP-Merlin 1 in Lösung zu bleiben.

4.1.1.9 Entfernung von MBP mittels TEV-Protease

Um die Stabilität von Merlin 1 ohne MBP zu testen, wurde der MBP-*tag* mittels TEV-Protease entfernt und der lösliche Anteil von Merlin 1 in den Überständen bestimmt.

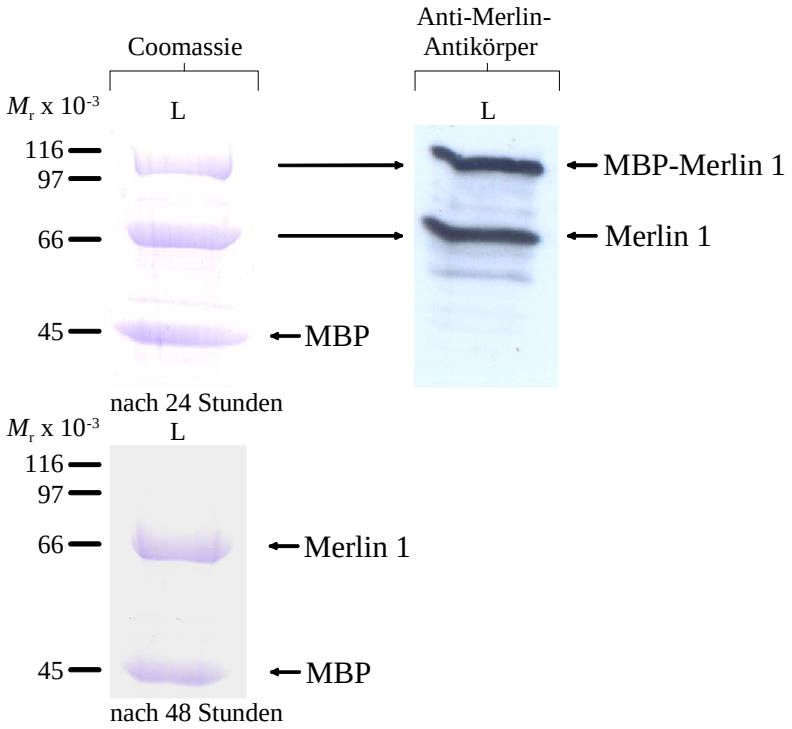


Abb. 18: Proteolyse von MBP-Merlin 1 mittels TEV-Protease. Über eine His-Trap™-Säule gereinigtes MBP-Merlin 1 wurde für 48 h mit der TEV-Protease inkubiert. Nach 24 bzw. 48 h wurden Aliquots zur Analyse abgenommen. Je 10 µl des Proteolysats wurden pro Spur auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Linke Teilabbildung: Coomassie-Blau-Färbung; rechte Teilabbildung: Immunchemischer Nachweis mit Anti-Merlin-Antikörpern. L = löslich; MBP = *maltose-binding protein*; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Nach 48 h Behandlung mit der TEV-Protease konnte kein MBP-Merlin 1 mehr nachgewiesen werden. Merlin 1 blieb nach der Proteolyse in Lösung. Um sicherzustellen, dass kein Protein ausgefallen war, wurde die Proteinlösung nach der Proteolyse nochmals bei 20 000 x *g* zentrifugiert. Im Anschluss daran sollte versucht werden, Merlin 1 und MBP chromatographisch voneinander zu trennen. Dazu wurde eine 1 ml His-Trap™-Säule mit der TEV-behandelten Proteinlösung beladen. Der ursprünglich zur Reinigung von MBP-Merlin 1 verwendete His-*tag* verbleibt nach der Behandlung mit der TEV-Protease am MBP-Anteil. MBP sollte also an die Säule binden, während sich Merlin 1 im Durchfluss befindet. Leider war es nicht möglich, MBP und Merlin 1 nach der TEV-Behandlung voneinander zu trennen, da jeder Versuch zum direkten Ausfallen von Merlin 1 aus der Lösung führte. Die Verwendung von Säulen führte zu deren Verstopfung. Im *batch*-Verfahren mit Ni-NTA-*beads* zeigte sich ein weißliches Präzipitat nach Trennung der beiden Proteine. Dieses wurde in Probenpuffer gelöst und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Es handelte sich dabei um Merlin 1 (Ergebnisse nicht gezeigt).

Leider war es nicht möglich, eine adäquate Menge an löslichem Merlin herzustellen. Es wurden zwar Versuche mit dem stabilen Fusionsprotein MBP-Merlin 1 durchgeführt, jedoch stellte sich heraus, dass MBP bereits alleine einen Einfluss auf die Assaysysteme hatte, die für die Charakterisierung von Merlin 1 verwendet werden sollten (Ergebnisse nicht gezeigt). Daher sollte eine kürzere Version von Merlin 1 hergestellt werden, die nur die FERM-Domäne umfasst. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von Merlin 1 voller Länge waren bereits viele Studien an verkürzten Merlin-Varianten, z.B. an Merlin-FERM, durchgeführt worden. In zahlreichen Veröffentlichungen war beschrieben worden, dass die FERM-Domäne wesentliche funktionelle Anteile von Merlin enthält, während α-Domäne und C-terminaler Anteil eher für die Regulation der Aktivität von Merlin 1 verantwortlich sind (Tikoo *et al*., 1994; Takahashi *et al*., 1998).

4.1.2 Expression und Reinigung der FERM-Domäne von Merlin (Merlin-FERM)

4.1.2.1 Expression von Merlin-FERM

Kompetente *E. coli* wurden mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert und anschließend für die Proteinexpression verwendet. Die Hauptkulturen wurden nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{550}) von 0,6 mit Anhydrotetracyclin versetzt und für 20 h bei 20 °C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend geerntet, aufgeschlossen und lösliche und partikuläre Fraktionen auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Etwa 20 - 30 % von Merlin-FERM befanden sich in der löslichen Fraktion (Abb. 19).

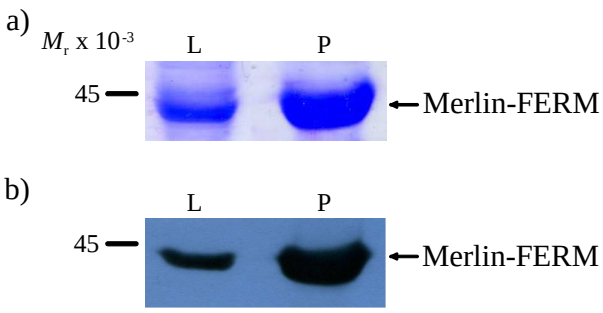


Abb. 19: Expression von Merlin-FERM. Merlin-FERM-exprimierende *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurden nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{550}) von 0,6 mit 200 ng/ml Anhydrotetracyclin versetzt und anschließend für 20 h bei 20 °C inkubiert. Die Bakterien wurden dann mit Lysispuffer E aufgeschlossen. Zwanzig bzw. 50 µg Protein der löslichen und partikulären Fraktion wurden anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) geladen. a) Coomassie-Blau-Färbung; b) Immunchemischer Nachweis mit Anti-Penta-His-Antikörpern. L = löslich, P = partikulär; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; FERM = *four point one, ezrin, radixin, moesin*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

4.1.2.2 Einfluss von Arginin auf die Ausbeute von löslichem Merlin-FERM

Merlin 1 zeigte durch Zugabe von Arginin eine stark verbesserte Löslichkeit. Im Folgenden sollte getestet werden, ob dieser Effekt auch bei Merlin-FERM sichtbar wird. Dazu wurden Merlin-FERM-exprimierende *E. coli* in Lysispuffern mit und ohne Arginin lysiert. Abbildung 20 zeigt die Auswirkungen von Arginin auf die Löslichkeit von Merlin-FERM.

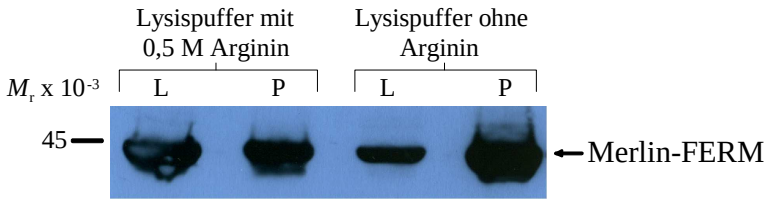


Abb. 20: Löslichkeit von Merlin-FERM in An- und Abwesenheit von Arginin. Merlin-FERM-exprimierende *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurden nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{550}) von 0,6 mit 200 ng/ml Anhydrotetracyclin versetzt und anschließend für 20 h bei 20 °C inkubiert. Die Bakterien wurden dann mit Lysispuffer C ohne oder mit 0,5 M Arginin aufgeschlossen. Von den löslichen und partikulären Fraktionen wurden je 30 µg Protein auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-Penta-His-Antikörpern immunchemisch nachgewiesen. L = löslich, P = partikulär; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; FERM = *four point one, ezrin, radixin, moesin*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Auch Merlin-FERM wurde durch Zugabe von Arginin besser in Lösung gehalten. Wurde die Lyse in Arginin-haltigem Puffer durchgeführt, waren etwa 60 – 70 % des Proteins löslich, während ohne Arginin etwa 20 % des Proteins in Lösung blieben. Im Gegensatz zu Merlin 1 blieb der hohe Anteil an löslichem Merlin-FERM nach Lyse in Arginin-haltigem Puffer auch nach Dialyse erhalten. Deshalb wurde im Folgenden die Reinigung von Merlin-FERM unter Zuhilfenahme eines Argininggradienten durchgeführt.

4.1.2.3 Reinigung von Merlin-FERM

Für die Reinigung von Merlin-FERM wurde die verwendete 1 ml His-Trap™ Säule mit Arginin-haltigem Puffer (0,5 M) äquilibriert, mit der bakteriellen, zytosolischen Fraktion beladen und anschließend mit Puffern absteigenden Argininggehaltes gewaschen. Die Elution von Merlin-FERM erfolgte dann in einem Puffer ohne Arginin. Es konnte eine große Menge an reinem Merlin-FERM hergestellt werden. Nur ein sehr geringer Anteil des Proteins befand sich im Durchfluss (Abb. 21).

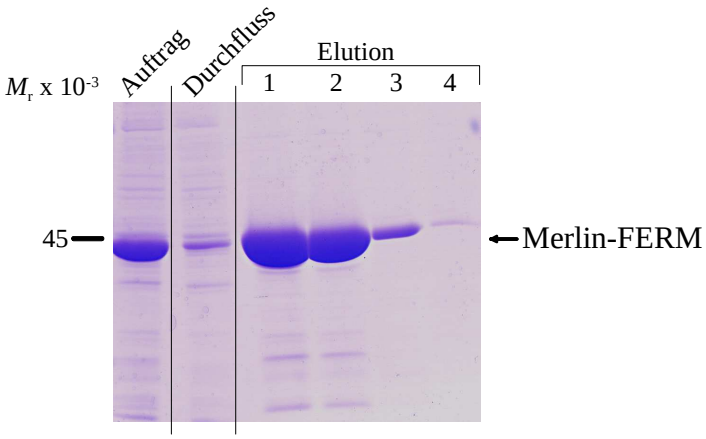


Abb. 21: Affinitätschromatographische Aufreinigung von Merlin-FERM über eine His-Trap™ Säule und Analyse ausgewählter Fraktionen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Die nach Lyse in Lysispuffer A erhaltene, lösliche Fraktion Merlin-FERM-exprimierender *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurde auf eine 1 ml His-Trap™ Säule geladen. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit Hilfe eines absteigenden Arginingradienten (0,5-0 M Arginin in Puffer B) gewaschen und Merlin-FERM anschließend mit Puffer B mit 500 mM Imidazol eluiert. Je 5 µl der Fraktionen wurden zur Kontrolle auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Dieses wurde mit Coomassie Blau gefärbt. Vertikale Linien kennzeichnen ausgeschnittene Leerspuren. Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; FERM = *four point one*, *ezrin*, *radixin*, *moesin*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Ein Ziel der Arbeit war es, zu testen, welchen Einfluss Merlin bzw. dessen FERM-Domäne auf die Aktivierung und Membrantranslokation der beiden Rho-GTPasen Rac2 und Cdc42 haben. Aus diesem Grund sollten die beiden Rho-GTPasen als rekombinante Proteine exprimiert und gereinigt werden.

4.1.3 Expression und Reinigung der beiden Rho-GTPasen Rac2 und Cdc42

4.1.3.1 Expression und Reinigung von Rac2

Kompetente *E. coli* wurden mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert und anschließend für die Proteinexpression verwendet. Die Hauptkulturen wurden nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{550}) von 0,6 mit Anhydrotetracyclin versetzt und für 20 h bei 16 °C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend geerntet, aufgeschlossen und die lösliche Fraktion auf eine 1 ml His-Trap™ Säule geladen. Auch hier wurde ein Arginingradient zur Verbesserung der Proteinausbeute eingesetzt. Rac2 zeigte einen sehr hohen Reinheitsgrad. Es befand sich kein Protein im Durchfluss (Abb. 22).

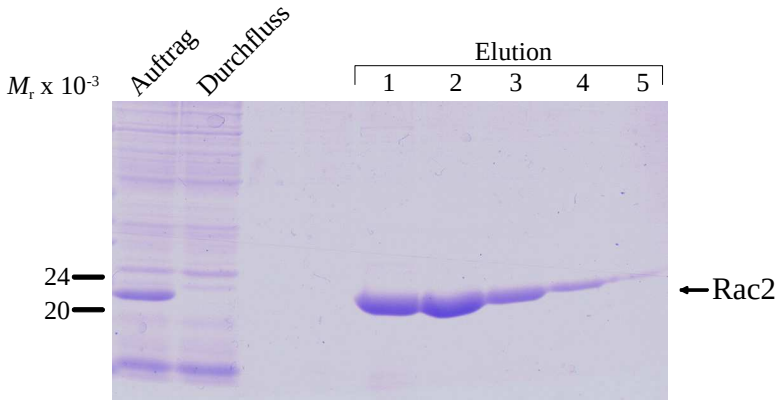


Abb. 22: Affinitätschromatographische Aufreinigung von Rac2 und Analyse ausgewählter Fraktionen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Die nach Lyse erhaltene, lösliche Fraktion Rac2-exprimierender *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurde auf eine 1 ml His-Trap™ Säule geladen. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit Hilfe eines absteigenden Arginingradienten (0,5-0 M Arginin in Puffer D) gewaschen und Rac2 anschließend mit Puffer D mit 250 mM Imidazol eluiert. Von Auftrag und Durchfluss wurden jeweils 2 µl, von den Elutionsfraktionen jeweils 1 µl auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Dieses wurde mit Coomassie Blau gefärbt. Rac2 = *ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

4.1.3.2 Expression und Reinigung von Cdc42

Die Expression von Cdc42 wurde analog zur Expression von Rac2 durchgeführt, mit dem Unterschied, dass den Cdc42-exprimierenden Bakterien zum Start der Proteinexpression IPTG zugesetzt wurde. Die Bakterien wurden anschließend geerntet, aufgeschlossen und die lösliche Fraktion auf Glutathion Sepharose® 4B geladen. Cdc42 zeigte einen hohen Reinheitsgrad. Ein geringer Anteil des Proteins befand sich im Durchfluss (Abb. 23).

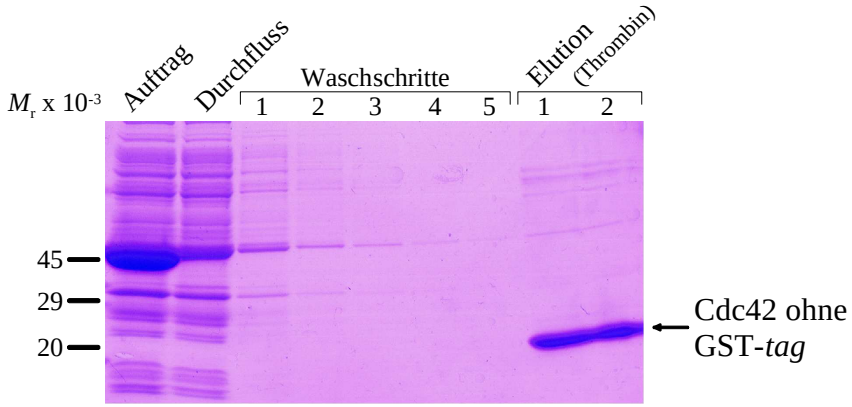


Abb. 23: Affinitätschromatographische Aufreinigung von Cdc42 und Analyse ausgewählter Fraktionen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Die nach Lyse erhaltene, lösliche Fraktion GST-Cdc42-exprimierender *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurde auf Glutathion Sepharose® 4B geladen. Nach Probenauftrag wurden die *beads* 5-mal mit GST-Waschpuffer 2 gewaschen. Anschließend erfolgte die Proteolyse der Probe mit Thrombin und die Abtrennung der GST-*beads* von löslichem Cdc42 mittels Zentrifugation. Zur Kontrolle wurden 5 µl von jeder Probe auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %)

aufgetragen. Dieses wurde mit Coomassie Blau gefärbt. Cdc42 = *cell division cycle 42*; GST = *glutathione S-transferase*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Damit Rho-GTPasen wie Rac2 und Cdc42 eine korrekte Lokalisation in der Zelle einnehmen und extrazelluläre Signale entsprechend weiterverarbeiten können, benötigen sie postranslational angefügte Modifikationen. Dazu gehört z.B. das Anfügen eines Isoprenankers durch verschiedene GGTasen (Geranylgeranyltransferasen). In Bakterien hergestellte Rho-GTPasen verfügen nicht über diese Modifikationen, müssen also nachträglich *in vitro* modifiziert werden. Zu diesem Zweck sollte die aus 2 Untereinheiten bestehende GGTase1 hergestellt werden. Diese ist in der Lage, einen Isoprenanker an bestimmte Erkennungssequenzen verschiedener Rho-GTPasen anzufügen („CAAX-Box"; C steht für Cystein, A für aliphatische Aminosäuren, X für eine beliebige Aminosäure). Dazu gehören auch Rac2 und Cdc42.

4.1.4 Koexpression und Reinigung der beiden rGGTase-Untereinheiten rFTα und rGGTβ über DEAE-Sephacel- und MonoQ-Säulen

Die beiden rGGTase-Untereinheiten rFTα und rGGTβ wurden in *Sf*9-Zellen koexprimiert und anschließend über DEAE-Sephacel- und MonoQ-Säulen aufgereinigt.

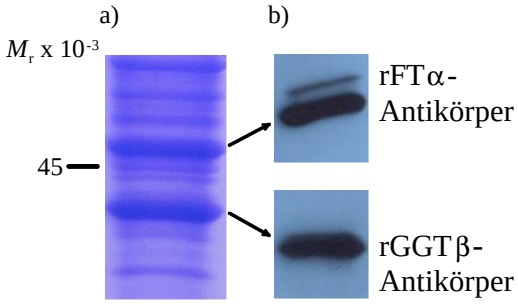


Abb. 24: Koexpression von rFTα und rGGTβ in *Sf*9-Zellen. *Sf*9-Zellen wurden mit Baculoviren, die für rFTα und rGGTβ kodierten, infiziert, nach 72 h geerntet, lysiert und das Zelllysat mittels Zentrifugation bei 100 000 x *g* in eine lösliche und partikuläre Fraktion getrennt. Fünfzig µg Protein der zytosolischen Fraktion wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. a) Coomassie-Blau-Färbung; b) Immunchemischer Nachweis mit rFTα- und rGGTβ-Antikörpern; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Nach der Expression erfolgte die Reinigung der beiden Untereinheiten rFTα und rGGTβ. Dazu wurde der lösliche Überstand aufgeschlossener und zentrifugierter *Sf*9-Zellen auf

eine DEAE-Sephacel-Säule geladen. Gebundene Proteine wurden mit einem 100 ml Gradienten von 0 bis 500 mM NaCl eluiert. Die erhaltenen Eluate wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Ausgewählte Eluate wurden vereinigt und für einen zweiten Reinigungsschritt über eine MonoQ-Säule gegeben. Gebundene Proteine wurden wieder mit einem NaCl-Gradienten (10 ml, 0-500 mM NaCl) von der Säule eluiert. Nach dem zweiten Reinigungsschritt wurden die Eluate erneut auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die beiden rGGTase-Untereinheiten rFTα und rGGTβ konnten exprimiert und anschließend mit hohem Reinheitsgrad gereinigt werden (Abb. 25).

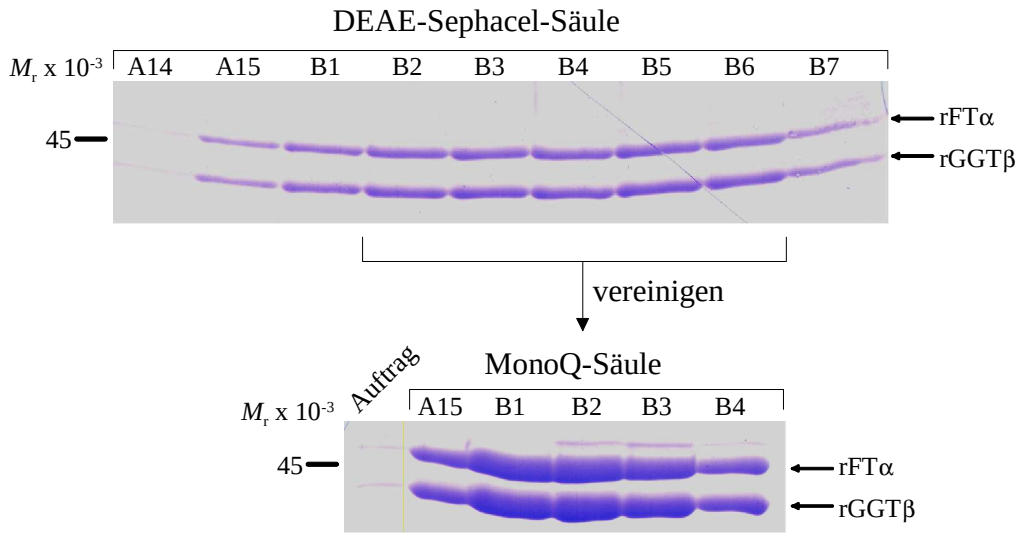


Abb. 25: Chromatographische Aufreinigung von rFTα und rGGTβ und Analyse ausgewählter Fraktionen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Die nach Lyse erhaltene, lösliche Fraktion rFTα- und rGGTβ-exprimierender *Sf*9-Zellen wurde auf eine DEAE-Sephacel-Säule aufgetragen. Die erhaltenen Eluate wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (12,5 %) analysiert (10 µl/Spur). Fraktionen B2 bis B6 wurden vereinigt und für einen zweiten Reinigungsschritt auf eine MonoQ-Säule geladen. Auch hier wurden die Eluate zur Kontrolle auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen (10 µl/Spur). Beide Gele wurden mit Coomassie Blau gefärbt. SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Nachdem die beiden Rho-GTPasen Rac2 und Cdc42 sowie deren für die Modifikation zuständige GGTase gereinigt worden waren, sollte ein wichtiges Regulatorprotein von Rac2 und Cdc42, RhoGDIα, hergestellt werden.

4.1.5 Expression und Reinigung zwei verschiedener RhoGDIα-Varianten

4.1.5.1 Expression und Reinigung von His-RhoGDIα über His-Trap™ Säulen

Kompetente *E. coli* wurden mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert und anschließend für die Proteinexpression verwendet. Die Hauptkulturen wurden nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{550}) von 0,6 mit Anhydrotetracyclin versetzt und für 20 h bei 16 °C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend geerntet, aufgeschlossen und die lösliche Fraktion auf eine 1 ml His-Trap™ Säule geladen. RhoGDIα zeigte einen hohen Reinheitsgrad und es befand sich kein Protein im Durchfluss (Abb. 26).

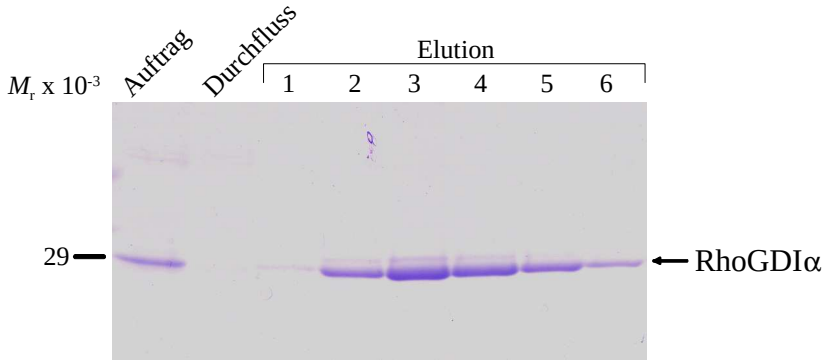


Abb. 26: Affinitätschromatographische Aufreinigung von RhoGDIα und Analyse ausgewählter Fraktionen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Die nach Lyse in Lysispuffer F erhaltene, lösliche Fraktion RhoGDIα-exprimierender *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurde auf eine 1 ml His-Trap™ Säule geladen. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit Puffer D mit 30 mM Imidazol gewaschen und RhoGDIα anschließend mit Puffer D mit 250 mM Imidazol eluiert. Von allen Proben wurden je 5 µl auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Dieses wurde mit Coomassie Blau gefärbt. RhoGDIα = *Rho GDP dissociation inhibitor α*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

4.1.5.2 Expression und Reinigung von GST-RhoGDIα mit Glutathion Sepharose® 4B

Kompetente *E. coli* wurden mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert und anschließend für die Proteinexpression verwendet. Die Hauptkulturen wurden nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5 mit IPTG versetzt und für 20 h bei 16 °C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend geerntet, aufgeschlossen und die lösliche Fraktion auf Glutathion Sepharose® 4B geladen. Auch mit GST versehenes RhoGDIα konnte sehr gut in Reinform hergestellt werden (Abb. 27).

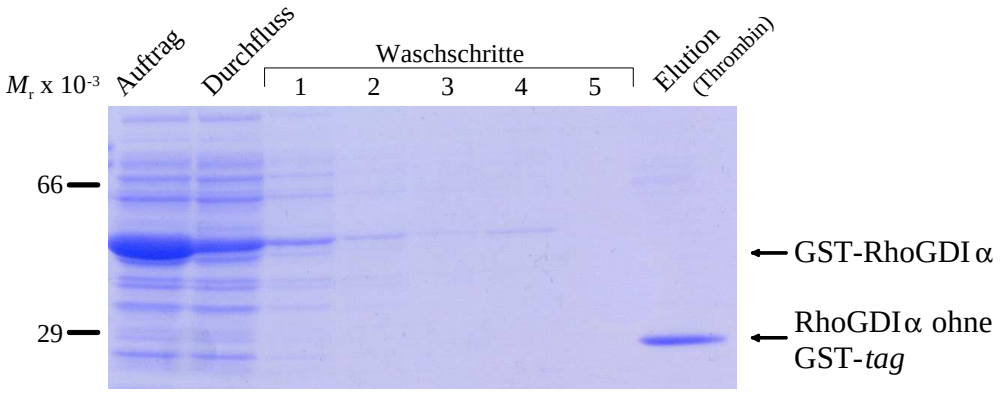


Abb. 27: Affinitätschromatographische Aufreinigung von GST-RhoGDIα und Analyse ausgewählter Fraktionen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Die nach Lyse erhaltene, lösliche Fraktion GST-RhoGDIα-exprimierender *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurde auf Glutathion Sepharose® 4B geladen. Nach Probenauftrag wurden die *beads* 5-mal mit GST-Waschpuffer 2 gewaschen. Anschließend erfolgte die Proteolyse der Probe mit Thrombin und die Abtrennung der GST-*beads* von löslichem RhoGDIα mittels Zentrifugation. Zur Kontrolle wurden 4 µl von jeder Probe auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Dieses wurde mit Coomassie Blau gefärbt. GST = *glutathione S-transferase*; RhoGDIα = *Rho GDP dissociation inhibitor α*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Neben der FERM-Domäne von Merlin sollten zusätzlich die FERM-Domänen von zwei weiteren FERM-Proteinen, Ezrin und Radixin, exprimiert, gereinigt und in späteren Versuchen mit RhoGDIα verwendet werden.

4.1.6 Expression und Reinigung von Ezrin-FERM

Die Expression und Reinigung von Ezrin-FERM wurde analog zu der von Merlin-FERM durchgeführt. Auch hier wurde ein Argiringradient zur Verbesserung der Proteinausbeute eingesetzt. Es konnte eine große Menge an reinem Ezrin-FERM hergestellt werden. Im Durchfluss ließ sich kein Ezrin-FERM nachweisen (Abb. 28).

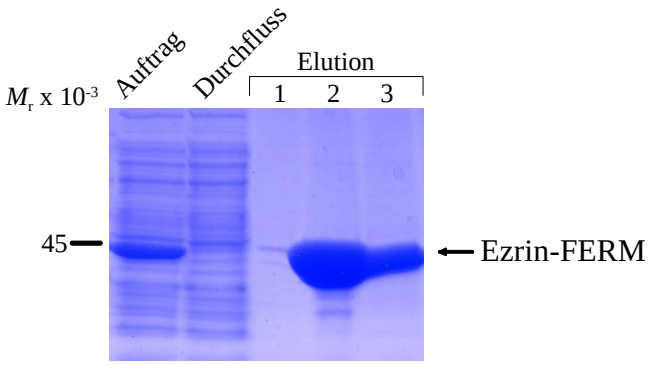


Abb. 28: Affinitätschromatographische Aufreinigung von Ezrin-FERM über eine His-Trap™ Säule und Analyse ausgewählter Fraktionen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Die nach Lyse in Lysispuffer A erhaltene, lösliche Fraktion Ezrin-FERM-exprimierender *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurde auf eine 1 ml His-Trap™ Säule geladen. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit Hilfe eines absteigenden Arginingradienten (0,5-0 M Arginin in Puffer B) gewaschen und Ezrin-FERM anschließend mit Puffer B mit 500 mM Imidazol eluiert. Fünf µl Auftrag, 10 µl Durchfluss und je 3 µl der Elutionsfraktionen wurden zur Kontrolle auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Dieses wurde mit Coomassie Blau gefärbt. FERM = *four point one, ezrin, radixin, moesin*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

4.1.7 Expression und Reinigung von Radixin-FERM mit Glutathion Sepharose® 4B

Kompetente *E. coli* wurden mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert und anschließend für die Proteinexpression verwendet. Die Hauptkulturen wurden nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5 mit IPTG versetzt und für 20 h bei 16 °C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend geerntet, aufgeschlossen und die lösliche Fraktion auf Glutathion Sepharose® 4B geladen. Die gereinigte FERM-Domäne von Radixin zeigte einen sehr hohen Reinheitsgrad (Abb. 29).

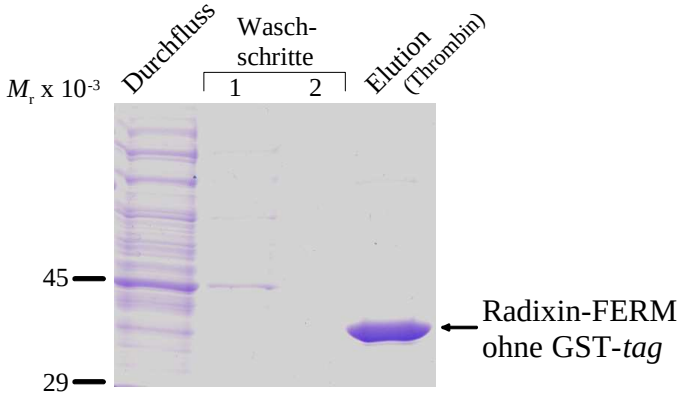


Abb. 29: Affinitätschromatographische Aufreinigung von GST-Radixin-FERM und Analyse ausgewählter Fraktionen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Die nach Lyse erhaltene, lösliche Fraktion GST-Radixin-FERM-exprimierender *E. coli* Rosetta 2 (DE3) wurde auf Glutathion Sepharose® 4B geladen. Nach Probenauftrag wurden die *beads* 5-mal mit GST-Waschpuffer 2 gewaschen (2 Waschschritte dargestellt). Anschließend erfolgten die Proteolyse der Probe mit Thrombin und die Abtrennung der GST-*beads* von löslichem Radixin-FERM mittels Zentrifugation. Zur Kontrolle wurden 4 µl von jeder Probe auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Dieses wurde mit Coomassie Blau gefärbt. GST = *glutathione S-transferase*; FERM = *four point one, ezrin, radixin, moesin*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Nachdem alle notwendigen Proteine hergestellt und gereinigt waren, wurden diese im Folgenden für die Analyse ihrer Interaktion mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie herangezogen.

4.2 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie

4.2.1 Interaktion von RhoGDIα und Rac2

4.2.1.1 Immobilisierung von RhoGDIα

Die Immobilisierung von gereinigtem RhoGDIα erfolgte mit Hilfe des *amine-coupling-kit*. RhoGDIα wurde in Natriumazetatpuffer (pH 5,0) auf eine Konzentration von 50 µg/ml verdünnt. Zur Immobilisierung des Proteins wurde der im System integrierte *application wizard* verwendet. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 5 µl/min konnten etwa 900 RU des Proteins auf den Biacore CM5-Sensorchip immobilisiert werden. Die einzelnen Phasen der Immobilisierung sind in Abbildung 30 dargestellt. Um die Immobilisierungseffizienz zu steigern, ist es notwendig, das zu immobilisierende Protein in die Nähe der Dextranmatrix zu bringen. Diese Vorkonzentrierung von RhoGDIα in der Dextranmatrix wurde im ersten Schritt bestimmt. Danach erfolgte ein Regenerationsschritt mit HBS-EP (HEPES-Puffer mit EDTA und Surfactant P20), dem 1 M NaCl zugesetzt worden war, um gebundenes Protein aus der Dextranmatrix zu entfernen. In Schritt 3 wurde die Flusszelle mittels NHS und EDC aktiviert und so lange RhoGDIα injiziert, bis das gewünschte Immobilisierungsniveau erreicht war. Zuletzt wurde Ethanolamin über die Flusszelle gegeben, um verbliebene, freie reaktive Gruppen abzusättigen.

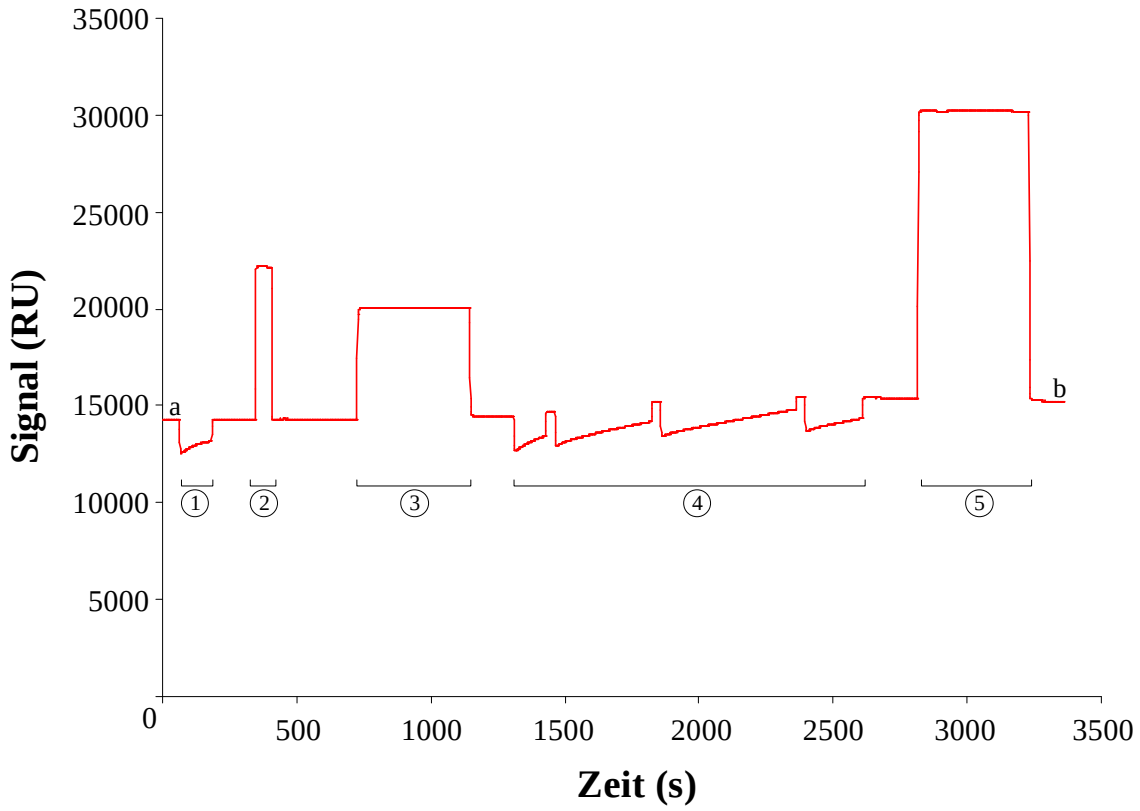


Abb. 30: Aminokopplung von gereinigtem RhoGDIα auf einen CM5-Sensorchip. 1: Bestimmung der Vorkonzentrierung von RhoGDIα in der Dextranmatrix. 2: Regenerationsschritt (1 M NaCl in HBS-EP). 3: Aktivierung der Sensorchipoberfläche mit NHS (N-Hydroxysuccinimid) und EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimidhydrochlorid). 4: Injektion von RhoGDIα. 5: Absättigung der verbliebenen, freien reaktiven Gruppen mit Hilfe von Ethanolamin. a+b: Basislinie vor Immobilisierung (a) bzw. danach (b). RU = *resonance units*; RhoGDIα = *Rho GDP dissociation inhibitor α*; HBS-EP = HEPES-Puffer mit EDTA und Surfactant P20.

Die Basislinie blieb nach erfolgter Immobilisierung stabil. Ausgehend vom erreichten RhoGDIα-Immobilisierungsniveau (etwa 900 RU) und den bekannten Molekulargewichten der Interaktionspartner kann die theoretisch maximale Rac2-Bindungskapazität der Flusszelle berechnet werden.

$$\text{Rac2 - Bindungskapazität} = 900\ \text{RU} \cdot \frac{21\ \text{kDa}}{27\ \text{kDa}} = 700\ \text{RU}$$

Unter Berücksichtigung der Molekulargewichte von RhoGDIα (27 kDa) und Rac2 (21 kDa) ergibt sich eine theoretische Rac2-Bindungskapazität der Flusszelle von etwa 700 RU.

4.2.1.2 Interaktion von RhoGDIα und Rac2

Ansteigende Konzentrationen von isoprenyliertem, aus *Sf*9-Zellmembranen gewonnenem Rac2 wurden über zwei hintereinander liegende Flusszellen gegeben. Zelle 1 (aktiviert und deaktiviert ohne Protein) wurde dabei als Referenz herangezogen, während Zelle 2 mit RhoGDIα für die eigentliche Messung genutzt wurde. Die eingesetzten Rac2-Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie einen möglichst großen Bereich um die potentielle Dissoziationskonstante abdeckten. Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass diese etwa in einem Bereich von 400-500 nM zu erwarten ist. Die untere Abbildung 31 zeigt das zugehörige Sensorgramm mit den erhaltenen Bindungskurven. Alle Kurven wurden doppelt referenziert, zum einen durch die direkte Subtraktion der Referenzelle 1, zum anderen durch die miteinberechnete Laufpufferspur.

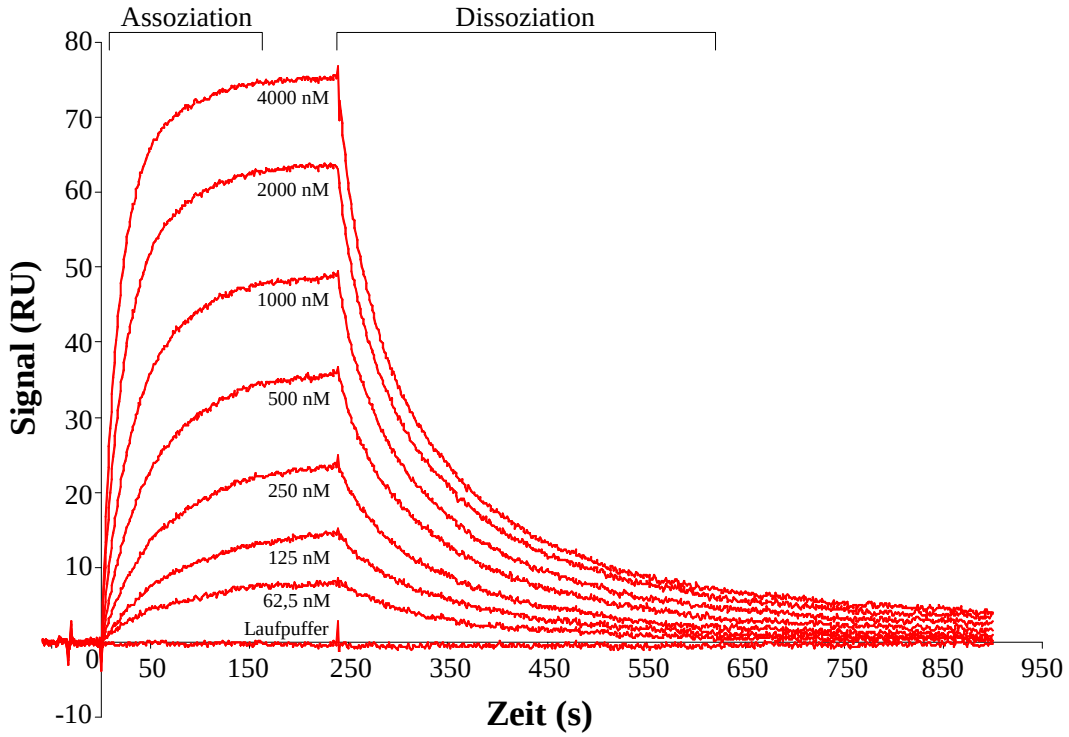


Abb. 31: Interaktion von RhoGDIα und Rac2. Gereinigtes RhoGDIα wurde auf einen CM5-Sensorchip immobilisiert. Ansteigende Konzentrationen von isoprenyliertem, aus *Sf*9-Zellmembranen gewonnenem Rac2 wurden über die Flusszellen gegeben (62,5 nM - 4000 nM). Laufpuffer: HBS-EP. RU = *resonance units*; RhoGDIα = *Rho GDP dissociation inhibitor α*; Rac2 = *ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*; HBS-EP = HEPES-Puffer mit EDTA und Surfactant P20.

Folgende Parameter wurden für die Messung verwendet:

Tab. 7: Parameter der Messung.

Flussrate	30 µl/min
Temperatur	25 °C
Stabilisierungszeit	300 s
Injektionszeit	240 s
Dissoziationszeit	1200 s
Laufpuffer	HBS-EP

Zu Anfang (t < 0 s) sieht man das Basislinienniveau. Hier wird nur Laufpuffer über die Flusszellen gepumpt. Ab dem Zeitpunkt t = 0 s beginnt die Injektion von Rac2 über die Flusszellen. Je höher die eingesetzte Konzentration von Rac2 gewählt wird, desto mehr Komplex wird in einer bestimmten Zeit gebildet. Auch die Gleichgewichtseinstellung wird mit höherer Rac2-Konzentration schneller erreicht. Ab t = 240 s beginnt die Dissoziation. Auch hier wird nur Laufpuffer über die Flusszellen gepumpt. Bis zum Zeitpunkt t = 850 s ist der RhoGDIα-Rac2-Komplex fast vollständig dissoziiert. Nach abgelaufener Dissoziationszeit von 1200 s wurden zwei jeweils 60 s lange Regenerationsschritte mit HBS-EP mit 1000 mM NaCl durchgeführt (nicht gezeigt). Nach den beiden Regenerationsschritten wurde wieder das Basislinienniveau erreicht und der nächste Messzyklus wurde gestartet. Die Stabilität des gekoppelten RhoGDIα wurde durch die zweimalige Injektion von Rac2 mit einer Konzentration von 500 nM getestet. Beide Injektionen zeigten das gleiche Bindungsverhalten (nicht gezeigt).

Anhand experimentell gewonnener Daten lassen sich mit Hilfe mathematischer Modelle die kinetischen Parameter einer Protein-Protein-Interaktion bestimmen. Dazu wurden die erhaltenen Assoziations- und Dissoziationsphasen der Sensorgramme mit Hilfe der BIAevaluation-Software ausgewertet und anschließend die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation (k_a und k_d) ermittelt. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden dabei durch *global-curve-fitting* mit Hilfe des 1:1-Langmuir-Bindungsmodells bestimmt. Für die Assoziationsphasen wurde ein Messbereich von t = 5 s bis t = 230 s ausgewählt. Der Messbereich für die einzelnen Dissoziationsphasen wurde auf 5 Sekunden nach Injektionsende bis zu t = 286 s gelegt. Abbildung 32 zeigt die Überlagerung der experimentell erhaltenen Daten mit den berechneten Kurven des zugrunde gelegten Modells.

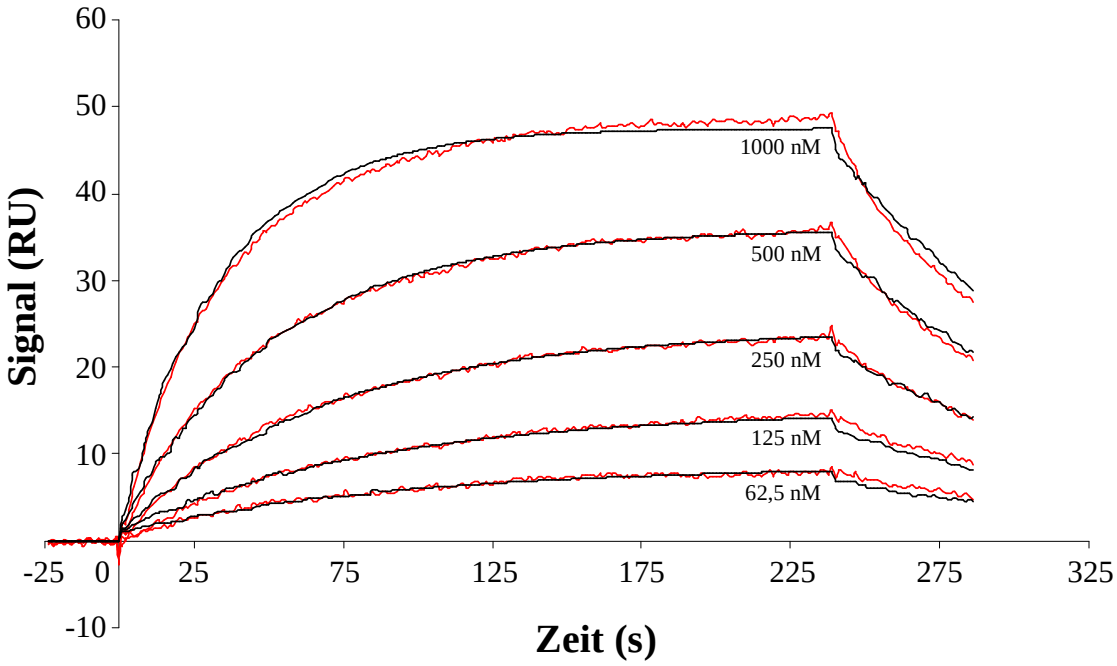


Abb. 32: Analyse der Interaktion von RhoGDIα und Rac2. Gereinigtes RhoGDIα wurde auf einen CM5-Sensorchip immobilisiert. Ansteigende Konzentrationen von gereinigtem, aus *Sf*9-Zellmembranen gewonnenem Rac2 wurden über die Flusszellen gegeben. Die roten Linien zeigen experimentell ermittelte Werte, während die schwarzen die Ergebnisse des *global-curve-fitting* an das 1:1 Modell nach Langmuir zeigen. RU = *resonance units*; RhoGDIα = *Rho GDP dissociation inhibitor α*; Rac2 = *ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*.

Bei den Injektionen von Rac2 bis zu einer Konzentration von 500 nM liegen experimentell ermittelte und berechnete Werte sehr nah beieinander. Erst bei der höchsten Konzentration (1000 nM) zeigen sich kleine Abweichungen vom zugrunde gelegten Modell. Diese liegen im Übergang von der Assoziation zur Gleichgewichtseinstellung und in der Gleichgewichtseinstellung selbst. Auch in der Dissoziation gibt es kleinere Abweichungen. Hier verläuft die experimentell erhaltene Kurve etwas tiefer als der dem Modell angepasste Kurvenverlauf.

In der folgenden Tabelle sind die berechneten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation sowie die molare Dissoziationskonstante für die Interaktion zwischen RhoGDIα und Rac2 aufgeführt.

Tab. 8: Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation (k_a und k_d) und molare Dissoziationskonstante (K_D) für die Interaktion von RhoGDIα und Rac2. Der Chi^2-Wert zeigt die Genauigkeit zwischen berechnetem *curve-fitting* und den experimentell erhaltenen Daten. RhoGDIα = *Rho GDP dissociation inhibitor α*; Rac2 = *ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*.

k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)	Chi^2
$1{,}94*10^4$	$9{,}49*10^{-3}$	489	0,274

4.2.2 Interaktion von Merlin-FERM und RhoGDIα

4.2.2.1 Indirekte Immobilisierung von Merlin-FERM durch *Strep*MAB-Immo-Antikörper

Die Immobilisierung der gereinigten FERM-Domäne von Merlin erfolgte mit Hilfe von speziellen Antikörpern. Die *Strep*MAB-Immo-Antikörper binden an den C-terminalen *Strep-tag* von Merlin-FERM und halten das Protein damit auf der Sensorchipoberfläche. Die Antikörper wurden dabei wieder unter Verwendung des *amine-coupling-kit* gekoppelt. Dazu wurden die *Strep*MAB-Immo-Antikörper in Natriumazetatpuffer (pH 5,0) auf eine Konzentration von 14 µg/ml verdünnt. Zur Immobilisierung der Antikörper wurde der im System integrierte *application wizard* verwendet. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 5 µl/min konnten etwa je 2100 RU des Proteins auf Flusszelle 1 und 2 des CM5-Sensorchips immobilisiert werden. Die einzelnen Phasen der Immobilisierung sind in Abbildung 33 dargestellt. Zuerst wurde die Vorkonzentrierung der *Strep*MAB-Immo-Antikörper in der Dextranmatrix bestimmt. Danach erfolgte die Aktivierung der jeweiligen Flusszelle mittels NHS und EDC und die *Strep*MAB-Immo-Antikörper wurden solange injiziert, bis das gewünschte Immobilisierungsniveau erreicht war. Zuletzt wurde Ethanolamin über die Flusszellen gegeben, um verbliebene, freie reaktive Gruppen abzusättigen.

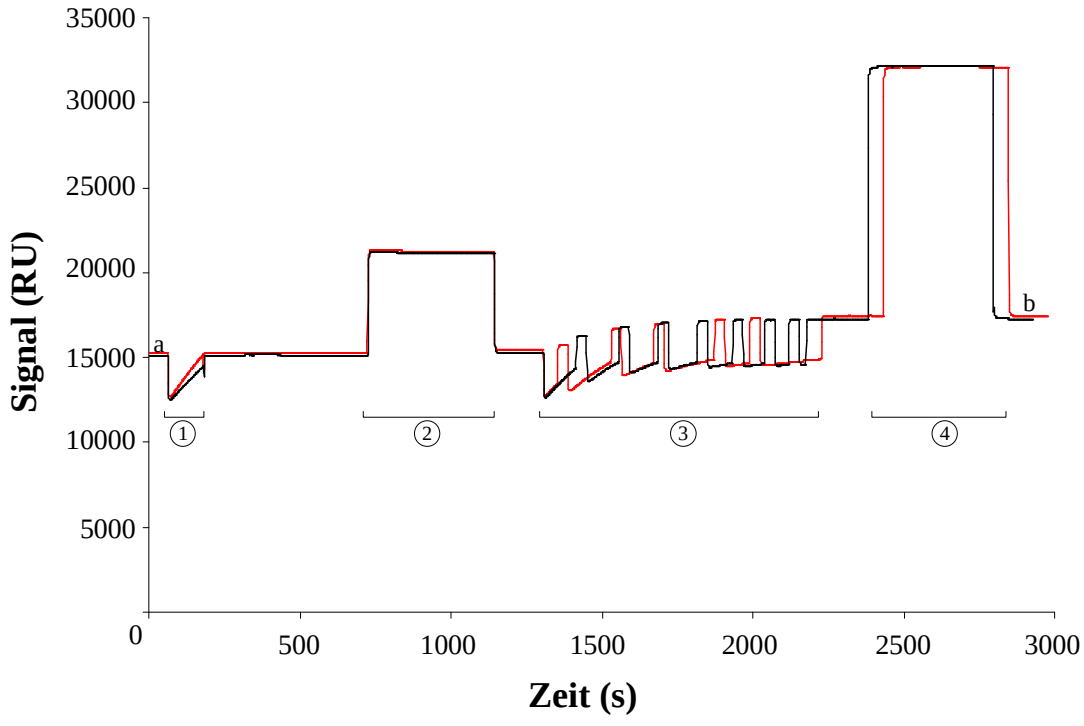


Abb. 33: Aminokopplung von *Strep*MAB-Immo-Antikörpern auf einen CM5-Sensorchip. 1: Bestimmung der Vorkonzentrierung der *Strep*MAB-Immo-Antikörper in der Dextranmatrix. 2: Aktivierung der Sensorchipoberfläche mit NHS (N-Hydroxysuccinimid) und EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimidhydrochlorid). 3: Injektion der *Strep*MAB-Immo-Antikörper. 4: Absättigung der verbliebenen, freien reaktiven Gruppen mit Hilfe von Ethanolamin. a+b: Basislinie vor Immobilisierung (a) bzw. danach (b). Rote Linie: Flusszelle 1; schwarze Linie: Flusszelle 2. RU = *resonance units*.

Die Basislinie blieb nach erfolgter Immobilisierung stabil. Nach der Immobilisierung der *Strep*MAB-Immo-Antikörper wurde die FERM-Domäne von Merlin an diese gekoppelt. Dazu wurde Merlin-FERM in Biacore-Phosphatpuffer auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt und mehrmals über Flusszelle 2 gegeben, bis ein Immobilisierungsniveau von etwa 730 RU erreicht wurde. Die einzelnen Bindungsschritte sind in folgender Abbildung dargestellt.

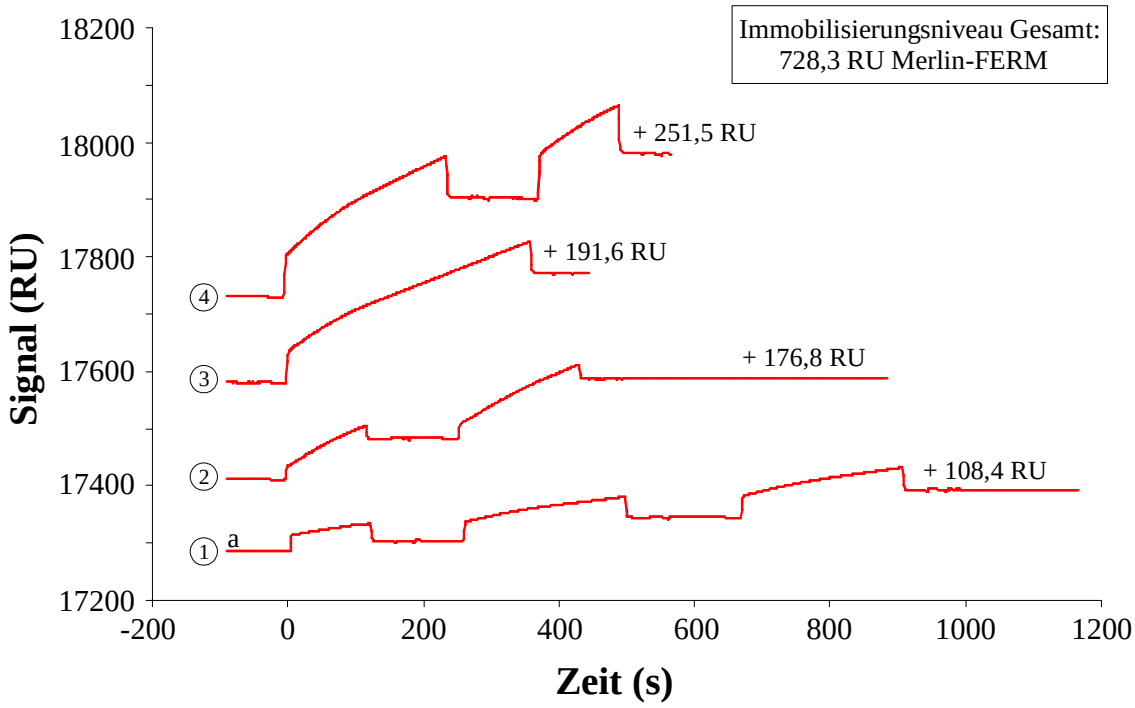


Abb. 34: Kopplung von Merlin-FERM an die *Strep*MAB-Immo-Antikörper auf Flusszelle 2 eines CM5- Sensorchips. 1-4: Aufeinanderfolgende Injektionen von Merlin-FERM. a: Basislinie vor Kopplung (wird zur Berechnung des Gesamt-Immobilisierungsniveaus auf 0 RU gesetzt). Gesamt-Immobilisierungsniveau: 728,3 RU Merlin-FERM. RU = *resonance units*; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; FERM = *four point one, ezrin, radixin, moesin*.

Ausgehend vom erreichten Merlin-FERM-Immobilisierungsniveau und den bekannten Molekulargewichten der Interaktionspartner kann die theoretisch maximale Bindungskapazität der Flusszelle berechnet werden.

$$\text{RhoGDI}\alpha\text{ - Bindungskapazität} = 730\,\text{RU} \cdot \frac{27\,\text{kDa}}{42\,\text{kDa}} = 469\,\text{RU}$$

Unter Berücksichtigung der Molekulargewichte von Merlin-FERM (42 kDa) und RhoGDIα (27 kDa) ergibt sich eine theoretische RhoGDIα-Bindungskapazität der Flusszelle von etwa 469 RU.

4.2.2.2 Interaktion von Merlin-FERM und RhoGDIα

Ansteigende Konzentrationen von RhoGDIα wurden über zwei hintereinander liegende Flusszellen gegeben. Zelle 1 wurde dabei als Referenz herangezogen, während Zelle 2 mit indirekt gekoppeltem Merlin-FERM für die eigentliche Messung genutzt wurde. Abbildung 35 zeigt das Sensorgramm mit den erhaltenen Bindungskurven der Interaktion von Merlin-FERM und RhoGDIα. Alle Kurven wurden doppelt referenziert, zum einen durch die direkte Subtraktion der Referenzelle 1, zum anderen durch die miteinberechnete Laufpufferspur.

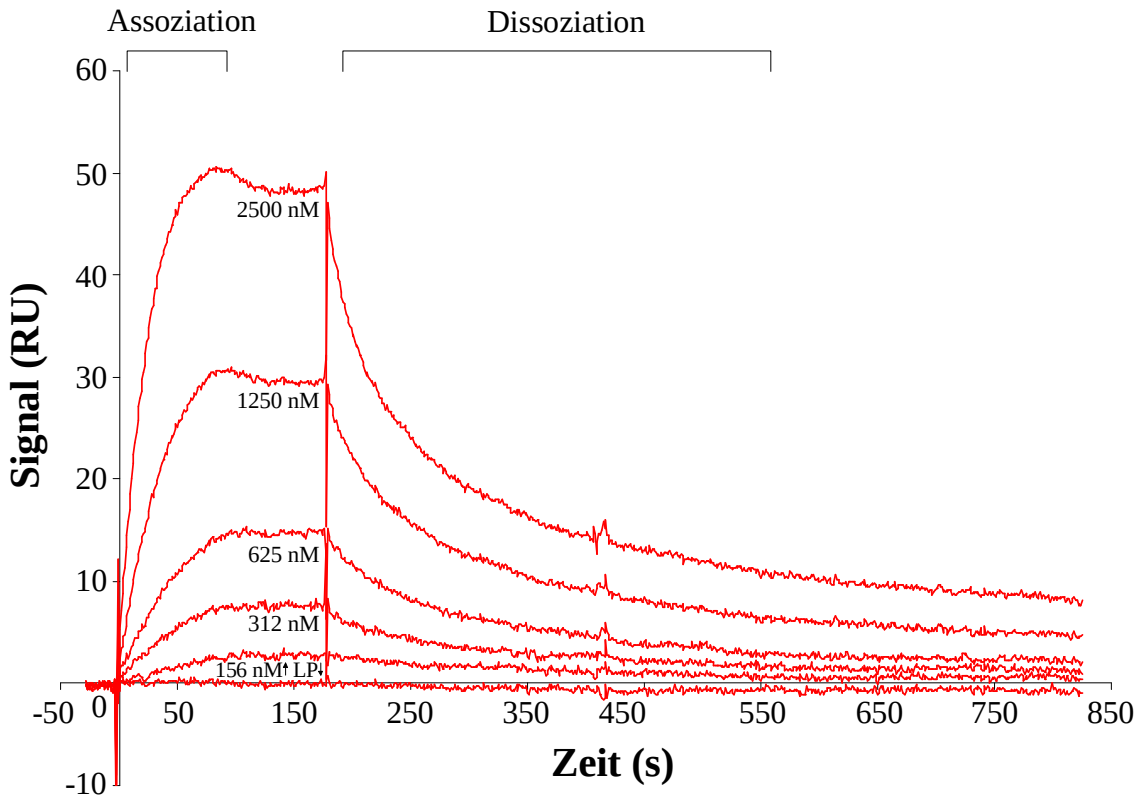


Abb. 35: Interaktion von Merlin-FERM und RhoGDIα. Gereinigtes Merlin-FERM wurde indirekt über *Strep*MAB-Immo-Antikörper auf einen CM5-Sensorchip immobilisiert. Ansteigende Konzentrationen von

RhoGDIα wurden über die Flusszellen gegeben (156 nM - 2500 nM). LP: Laufpuffer, Biacore-Phosphatpuffer. RU = *resonance units*; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; FERM = *four point one, ezrin, radixin, moesin*; RhoGDIα = *Rho GDP dissociation inhibitor α*.

Folgende Parameter wurden für die Messung verwendet:

Tab. 9: Parameter der Messung.

Flussrate	60 µl/min
Temperatur	25 °C
Stabilisierungszeit	600 s
Injektionszeit	180 s
Dissoziationszeit	1200 s
Regenerationszeit	600 s
Laufpuffer	Biacore-Phosphatpuffer

Zu Anfang (t < 0 s) sieht man das Basislinienniveau. Hier wird nur Laufpuffer über die Flusszellen gepumpt. Ab dem Zeitpunkt t = 0 s beginnt die Injektion von RhoGDIα über die Flusszellen. Je höher die eingesetzte Konzentration von RhoGDIα gewählt wird, desto mehr Komplex wird in einer bestimmten Zeit gebildet. Auch die Gleichgewichtseinstellung wird mit höherer RhoGDIα-Konzentration schneller erreicht. Ab t = 180 s beginnt die Dissoziation. Auch hier wird nur Laufpuffer über die Flusszellen gepumpt. Bis zum Zeitpunkt t = 750 s ist der Merlin-FERM-RhoGDIα-Komplex mit einer RhoGDIα-Konzentration bis zu 625 nM fast vollständig dissoziiert. Bei RhoGDIα-Konzentrationen über 625 nM steigt die Zeit, bis der Proteinkomplex völlig dissoziiert ist, an. Die Stabilität des gekoppelten Merlin-FERM wurde durch die zweimalige Injektion von RhoGDIα mit einer Konzentration von 625 nM analysiert. Nach beiden Injektionen wurde das gleiche Bindungsverhalten beobachtet (nicht gezeigt).

Die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation wurden durch *global-curve-fitting* mit Hilfe des 1:1-Langmuir-Bindungsmodells bestimmt. Für die Assoziationsphasen wurde ein Messbereich von t = 5 s bis t = 175 s ausgewählt. Der Messbereich für die einzelnen Dissoziationsphasen wurde auf 5 Sekunden nach Injektionsende bis zu t = 209 s gelegt. Abbildung 36 zeigt die Überlagerung der experimentell erhaltenen Daten mit den berechneten Kurven des zugrunde gelegten Modells.

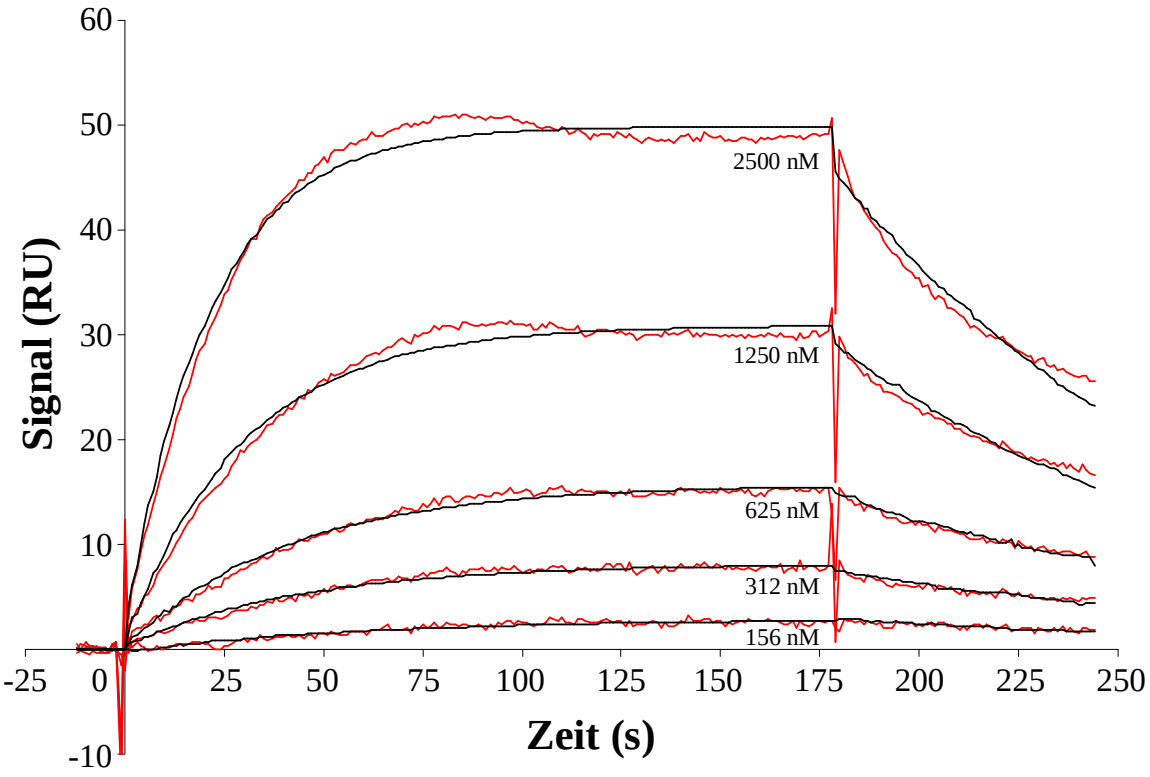


Abb. 36: Analyse der Interaktion von Merlin-FERM und RhoGDIα. Merlin-FERM wurde indirekt über *Strep*MAB-Immo-Antikörper auf einen CM5-Sensorchip immobilisiert. Ansteigende Konzentrationen von RhoGDIα wurden über die Flusszellen gegeben (156 nM - 2500 nM). Die roten Linien zeigen experimentell ermittelte Werte, während die schwarzen die Ergebnisse des *global-curve-fitting* an das 1:1 Modell nach Langmuir zeigen. RU = *resonance units*; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; FERM = *four point one, ezrin, radixin, moesin*; RhoGDIα = *Rho GDP dissociation inhibitor α*.

In den niedrigen Konzentrationen liegen experimentell ermittelte und berechnete Werte sehr nah beieinander. Erst in höheren Konzentrationen (ab 1250 nM) ergeben sich Abweichungen vom zugrunde gelegten Modell. Diese liegen im Übergang von der Assoziation zur Gleichgewichtseinstellung und in der Gleichgewichtseinstellung selbst. Die berechneten Dissoziationskurven für die beiden höchsten RhoGDIα-Konzentrationen zeigen einen stärkeren Abfall als die experimentell erhaltenen Werte.

In der folgenden Tabelle sind die berechneten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation sowie die molare Dissoziationskonstante für die Interaktion von Merlin-FERM und RhoGDIα aufgeführt.

Tab. 10: Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation (k_a und k_d) und molare Dissoziationskonstante (K_D) für die Interaktion von Merlin-FERM und RhoGDIα. Der Chi^2-Wert zeigt die Genauigkeit zwischen berechnetem *curve-fitting* und den experimentell erhaltenen Daten. Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; FERM = *four point one, ezrin, radixin, moesin*; RhoGDIα = *Rho GDP dissociation inhibitor α.*

k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)	Chi^2
$3{,}29*10^4$	$9{,}11*10^{-3}$	277	0,489

4.2.3 Interaktion von Ezrin-FERM und RhoGDIα

4.2.3.1 Indirekte Immobilisierung von Ezrin-FERM durch *Strep*MAB-Immo-Antikörper

Die Kopplung der gereinigten FERM-Domäne von Ezrin wurde analog zur Immobilisierung der FERM-Domäne von Merlin durchgeführt. Es wurden *ca.* 2150 RU des *Strep*MAB-Immo-Antikörpers pro Flusszelle immobilisiert. Nach der Immobilisierung der *Strep*MAB-Immo-Antikörper wurde die FERM-Domäne von Ezrin an diese gekoppelt. Dazu wurde Ezrin-FERM in Biacore-Phosphatpuffer auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt und über Flusszelle 2 gegeben, bis ein Immobilisierungsniveau von etwa 650 RU erreicht wurde. Die Bindung von Ezrin-FERM an die *Strep*MAB-Immo-Antikörper ist in folgender Abbildung dargestellt.

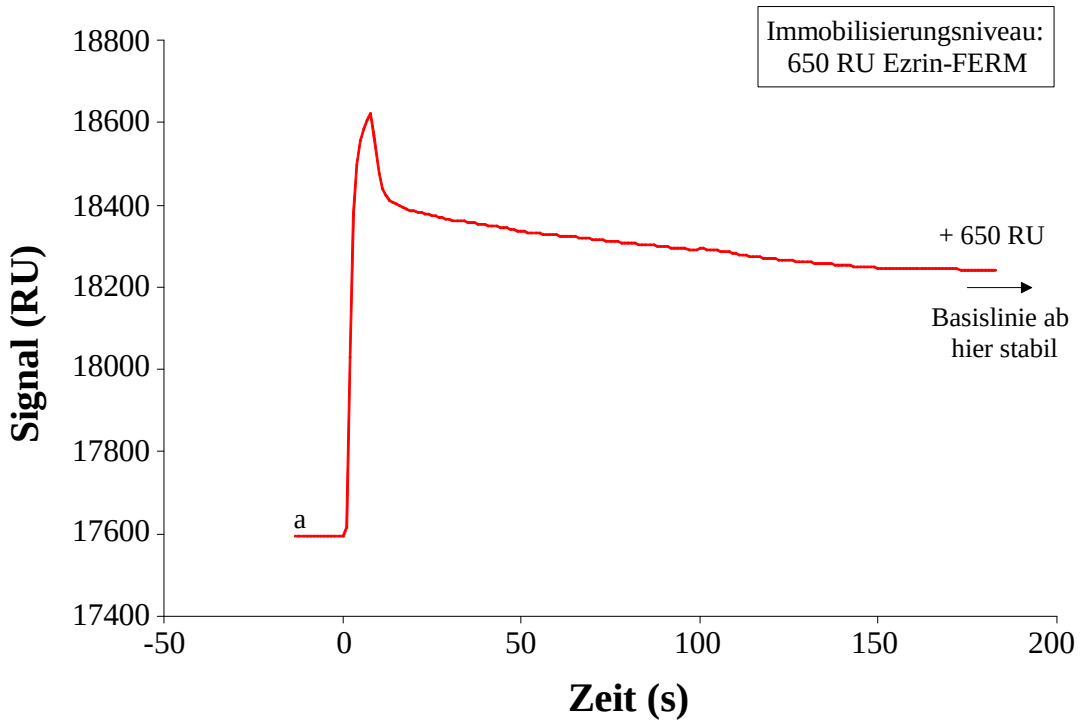


Abb. 37: Kopplung von Ezrin-FERM an *Strep*MAB-Immo-Antikörper auf Flusszelle 2 eines CM5-Sensorchips. a: Basislinie vor Kopplung (wird zur Berechnung des Immobilisierungsniveaus auf 0 RU gesetzt). Immobilisierungsniveau: 650 RU Ezrin-FERM. RU = *resonance units*; FERM = *four point one, ezrin, radixin, moesin*.

Ab etwa 170 Sekunden nach Injektionsende von Ezrin-FERM stellte sich eine stabile Basislinie ein. Ausgehend vom erreichten Ezrin-FERM-Immobilisierungsniveau und den bekannten Molekulargewichten der Interaktionspartner kann die theoretisch maximale Bindungskapazität der Flusszelle berechnet werden.

$$\text{RhoGDI - Bindungskapazität} = 650\,\text{RU} \times \frac{27\,\text{kDa}}{40\,\text{kDa}} = 438\,\text{RU}$$

Unter Berücksichtigung der Molekulargewichte von Ezrin-FERM (40 kDa) und RhoGDIα (27 kDa) ergibt sich eine theoretische RhoGDIα-Bindungskapazität der Flusszelle von etwa 438 RU.

4.2.3.2 Interaktion von Ezrin-FERM und RhoGDIα

Ansteigende Konzentrationen von RhoGDIα wurden über zwei hintereinander liegende Flusszellen gegeben. Zelle 1 wurde dabei als Referenz herangezogen, während Zelle 2 mit

indirekt gekoppeltem Ezrin-FERM für die eigentliche Messung genutzt wurde. Die untere Abbildung 38 zeigt das zugehörige Sensorgramm mit den erhaltenen Bindungskurven. Alle Kurven wurden doppelt referenziert, zum einen durch die direkte Subtraktion der Referenzelle 1, zum anderen durch die miteinberechnete Laufpufferspur.

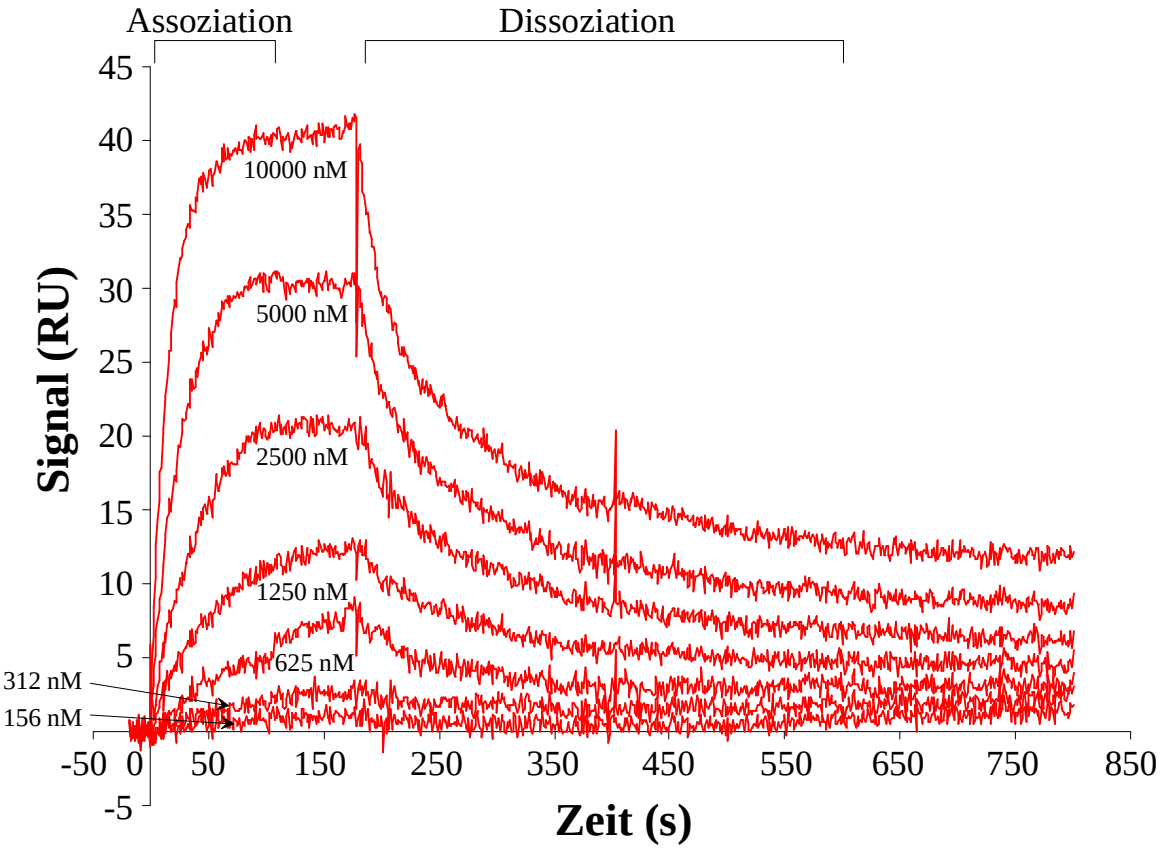


Abb. 38: Interaktion von Ezrin-FERM und RhoGDIα. Gereinigtes Ezrin-FERM wurde indirekt über *Strep*MAB-Immo-Antikörper auf einen CM5-Sensorchip immobilisiert. Ansteigende Konzentrationen von RhoGDIα wurden über die Flusszellen gegeben (156 nM – 10 000 nM). Laufpuffer: Biacore-Phosphatpuffer. RU = *resonance units*; FERM = *four point one*, *ezrin*, *radixin*, *moesin*; RhoGDIα = *Rho GDP dissociation inhibitor α*.

Folgende Parameter wurden für die Messung verwendet:

Tab. 11: Parameter der Messung.

Flussrate	60 µl/min
Temperatur	25 °C
Stabilisierungszeit	600 s
Injektionszeit	180 s
Dissoziationszeit	1200 s
Regenerationszeit	600 s
Laufpuffer	Biacore-Phosphatpuffer

Zu Anfang (t < 0 s) sieht man das Basislinienniveau. Hier wird nur Laufpuffer über die Flusszellen gepumpt. Ab dem Zeitpunkt t = 0 s beginnt die Injektion von RhoGDIα über die Flusszellen. Je höher die eingesetzte Konzentration von RhoGDIα gewählt wird, desto mehr Komplex wird in einer bestimmten Zeit gebildet. Auch die Gleichgewichtseinstellung wird mit höherer RhoGDIα-Konzentration schneller erreicht. Ab t = 180 s beginnt die Dissoziation. Auch hier wird nur Laufpuffer über die Flusszellen gepumpt. Bis zum Zeitpunkt t = 750 s ist der Ezrin-FERM-RhoGDIα-Komplex mit einer Konzentration von RhoGDIα bis zu 625 nM fast vollständig dissoziiert. Bei RhoGDIα-Konzentrationen über 625 nM steigt die Zeit, bis der Proteinkomplex völlig dissoziiert ist, an. Das Basislinienniveau wurde nach insgesamt 30-minütiger Dissoziations- und Regenerationszeit wieder erreicht. Ein Regenerationsschritt wurde nicht eingefügt. Die Stabilität des gekoppelten Ezrin-FERM wurde durch die zweimalige Injektion von RhoGDIα mit einer Konzentration von 625 nM analysiert. Nach beiden Injektionen wurde das gleiche Bindungsverhalten beobachtet (nicht gezeigt).

Die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation wurden durch *global-curve-fitting* mit Hilfe des 1:1-Langmuir-Bindungsmodells bestimmt. Für die Assoziationsphasen wurde ein Messbereich von t = 3,5 s bis t = 176 s ausgewählt. Der Messbereich für die einzelnen Dissoziationsphasen wurde auf 4 Sekunden nach Injektionsende bis zu t = 215 s gelegt. Abbildung 39 zeigt die Überlagerung der experimentell erhaltenen Daten mit den berechneten Kurven des zugrunde gelegten Modells.

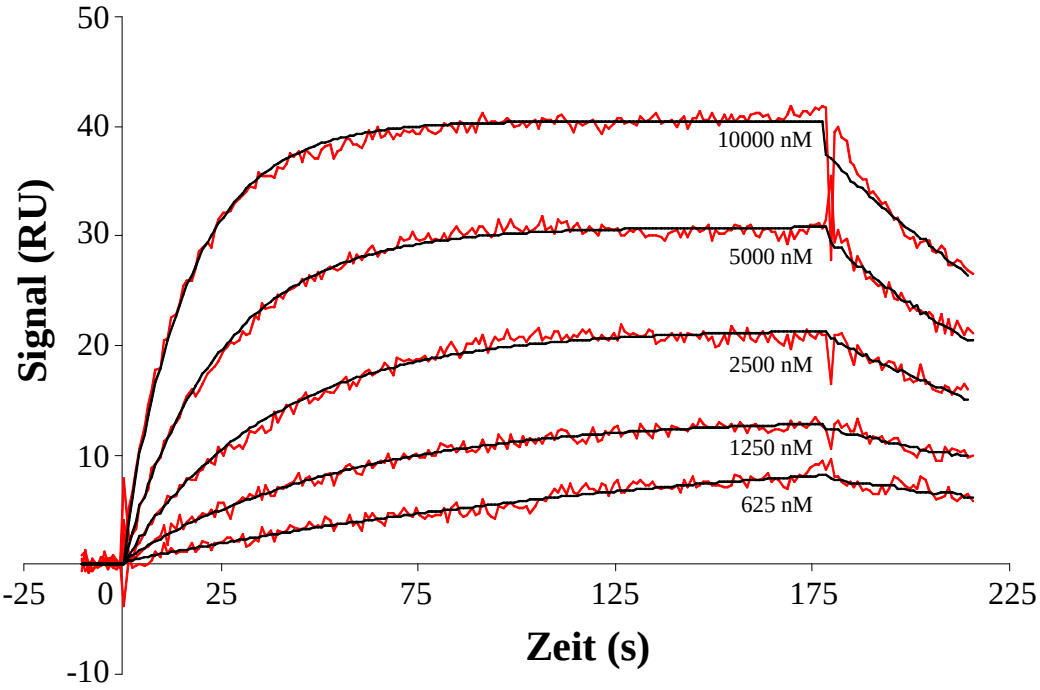


Abb. 39: Analyse der Interaktion von Ezrin-FERM und RhoGDIα. Ezrin-FERM wurde indirekt über *Strep*MAB-Immo-Antikörper auf einen CM5-Sensorchip immobilisiert. Ansteigende Konzentrationen von RhoGDIα wurden über die Flusszellen gegeben (625 nM – 10 000 nM). Die roten Linien zeigen experimentell ermittelte Werte, während die schwarzen die Ergebnisse des *global-curve-fitting* an das 1:1 Modell nach Langmuir zeigen. RU = *resonance units*; FERM = *four point one, ezrin, radixin, moesin*; RhoGDIα = *Rho GDP dissociation inhibitor α*.

Bei allen injizierten RhoGDIα-Konzentrationen liegen experimentell ermittelte und berechnete Werte sehr nah beieinander. In der folgenden Tabelle sind die berechneten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation sowie die molare Dissoziationskonstante für die Interaktion zwischen Ezrin-FERM und RhoGDIα aufgeführt.

Tab. 12: Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation (k_a und k_d) und molare Dissoziationskonstante (K_D) für die Interaktion von Ezrin-FERM und RhoGDIα. Der Chi^2-Wert zeigt die Genauigkeit zwischen berechnetem *curve-fitting* und den experimentell erhaltenen Daten. FERM = *four point one, ezrin, radixin, moesin*; RhoGDIα = *Rho GDP dissociation inhibitor α*.

k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)	Chi^2
$6{,}99*10^{3}$	$8{,}07*10^{-3}$	1152	0,34

4.2.4 Interaktion von Merlin-FERM und Radixin-FERM

Interaktionsanalysen mit verschiedenen FERM-Proteinen voller Länge hatten gezeigt, dass diese dazu in der Lage sind, Homo- und Heterodimere auszubilden (Grönholm *et al.*,

1999). Zur Überprüfung einer der wesentlichen Hypothesen dieser Arbeit, dass die Inaktivierung der FERM-Domänen anderer Protein-4.1-Familienmitglieder durch Heterodimerisierung mit der FERM-Domäne von Merlin möglich ist, sollte untersucht werden, ob die FERM-Domänen von Merlin und Radixin Heterodimere ausbilden können.

4.2.4.1 Indirekte Immobilisierung von Merlin-FERM durch *Strep*MAB-Immo-Antikörper

Die Kopplung der gereinigten FERM-Domäne von Merlin wurde wieder mit Hilfe von *Strep*MAB-Immo-Antikörpern durchgeführt. Es wurden *ca.* 2300 RU des *Strep*MAB-Immo-Antikörpers pro Flusszelle immobilisiert. Nach der Immobilisierung der *Strep*MAB-Immo-Antikörper wurde die FERM-Domäne von Merlin an diese gekoppelt. Dazu wurde Merlin-FERM in Biacore-Phosphatpuffer auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt und über Flusszelle 2 gegeben, bis ein Immobilisierungsniveau von etwa 500 RU erreicht wurde. Die Bindung von Merlin-FERM an die *Strep*MAB-Immo-Antikörper ist in folgender Abbildung dargestellt.

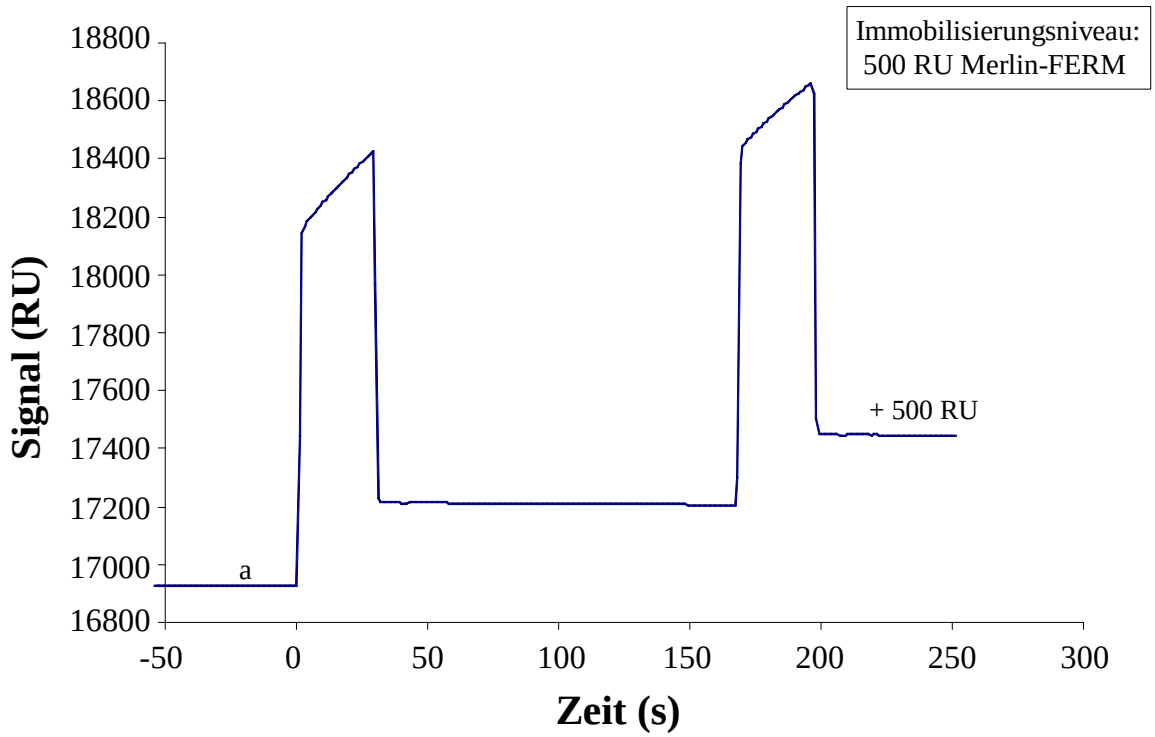


Abb. 40: Kopplung von Merlin-FERM an *Strep*MAB-Immo-Antikörper auf Flusszelle 2 eines CM5-Sensorchips. a: Basislinie vor Kopplung (wird zur Berechnung des Immobilisierungsniveaus auf 0 RU gesetzt). Immobilisierungsniveau: 500 RU Merlin-FERM. RU = *resonance units*; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; FERM = *four point one, ezrin, radixin, moesin*.

Ab etwa 200 Sekunden nach Injektionsstart von Merlin-FERM stellte sich eine stabile Basislinie ein. Ausgehend vom erreichten Merlin-FERM-Immobilisierungsniveau und den bekannten Molekulargewichten der Interaktionspartner kann die theoretisch maximale Bindungskapazität der Flusszelle berechnet werden.

$$\text{Radixin - FERM - Bindungskapazität} = 500\ \text{RU} \times \frac{38\ \text{kDa}}{42\ \text{kDa}} = 452\ \text{RU}$$

Unter Berücksichtigung der Molekulargewichte von Merlin-FERM (42 kDa) und Radixin-FERM (38 kDa) ergibt sich eine theoretische Radixin-FERM-Bindungskapazität der Flusszelle von etwa 452 RU.

4.2.4.2 Interaktion von Merlin-FERM und Radixin-FERM

Ansteigende Konzentrationen von Radixin-FERM wurden über zwei hintereinander liegende Flusszellen gegeben. Zelle 1 wurde dabei als Referenz herangezogen, während

Zelle 2 mit indirekt gekoppeltem Merlin-FERM für die eigentliche Messung genutzt wurde. Die untere Abbildung 41 zeigt das zugehörige Sensorgramm mit den erhaltenen Bindungskurven. Alle Kurven wurden doppelt referenziert, zum einen durch die direkte Subtraktion der Referenzelle 1, zum anderen durch die miteinberechnete Laufpufferspur.

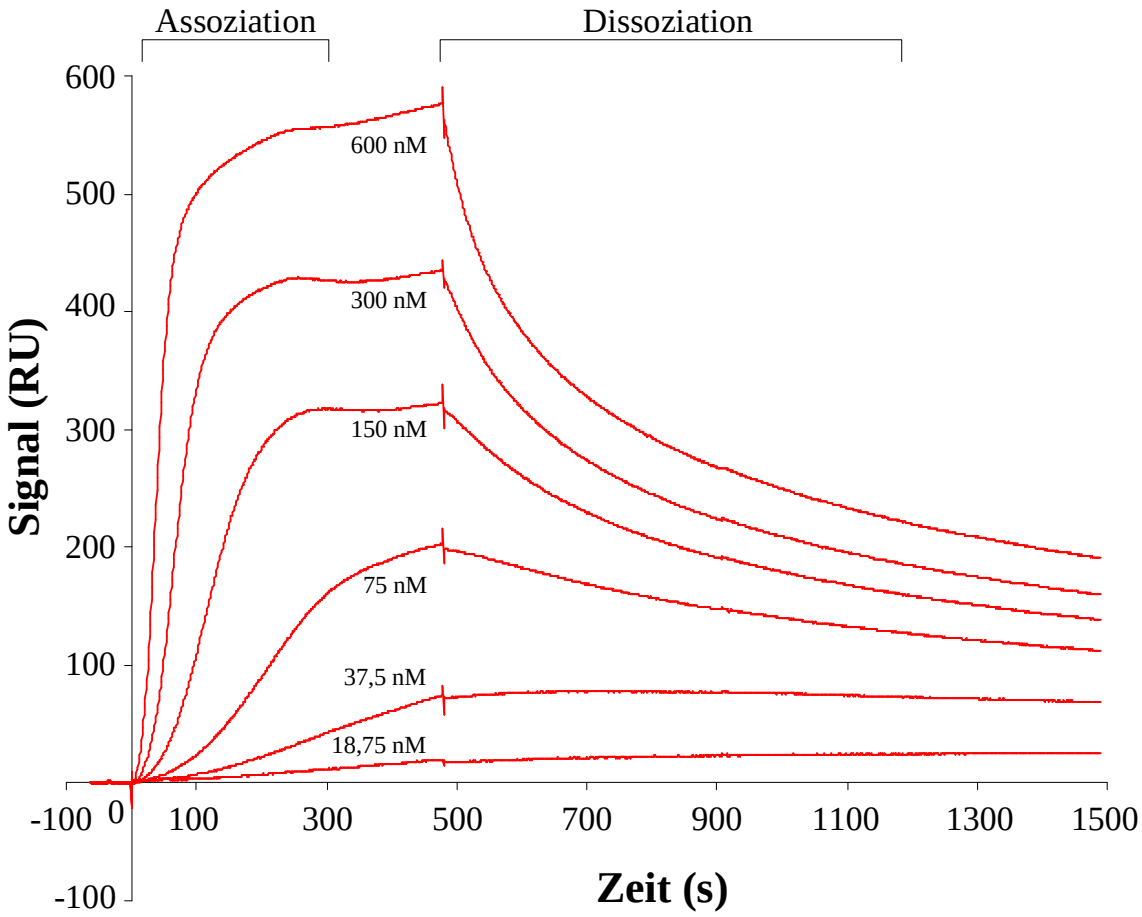


Abb. 41: Interaktion von Merlin-FERM und Radixin-FERM. Gereinigtes Merlin-FERM wurde indirekt über *Strep*MAB-Immo-Antikörper auf einen CM5-Sensorchip immobilisiert. Ansteigende Konzentrationen von Radixin-FERM wurden über die Flusszellen gegeben (18,75 nM - 600 nM). Laufpuffer: Biacore-Phosphatpuffer. RU = *resonance units*; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; FERM = *four point one, ezrin, radixin, moesin*.

Folgende Parameter wurden für die Messung verwendet:

Tab. 13: Parameter der Messung.

Flussrate	30 µl/min
Temperatur	25 °C
Stabilisierungszeit	1200 s
Injektionszeit	480 s
Dissoziationszeit	1200 s
Laufpuffer	Biacore-Phosphatpuffer

Zu Anfang (t < 0 s) sieht man das Basislinienniveau. Ab dem Zeitpunkt t = 0 s beginnt die Injektion von Radixin-FERM über die Flusszellen. Je höher die eingesetzte Konzentration von Radixin-FERM gewählt wird, desto mehr Komplex wird in einer bestimmten Zeit gebildet. Auch die Gleichgewichtseinstellung wird mit höherer Radixin-FERM-Konzentration schneller erreicht. Ab t = 480 s beginnt die Dissoziation. Bei den beiden niedrigsten Konzentrationen zeigt sich fast gar keine Dissoziation des Merlin-FERM-Radixin-FERM-Komplexes, während der Komplex mit höheren Radixin-FERM-Konzentrationen (ab 75 nM) eine stärker werdende Dissoziation zeigt.

Verschiedene Publikationen hatten gezeigt, dass einige FERM-Proteine, wie Radixin und Merlin, einen Einfluss auf Rho-GTPase-gekoppelte Signalwege ausüben können. Größtenteils war dabei jedoch unklar geblieben, welche molekularen Mechanismen hinter diesen Vorgängen stehen, und ob es sich dabei um direkte oder indirekte Eingriffe in diese Signalwege handelt. Um einen möglichen direkten Einfluss der FERM-Domäne von Merlin auf die Interaktion von Rac2 und RhoGDIα und eine potentielle Ternärkomplexbildung dieser Proteine zu untersuchen, wurden weitere Interaktionsanalysen durchgeführt.

4.2.5 Einfluss von Merlin-FERM auf die Interaktion von Rac2 und RhoGDIα

Zu Beginn dieses Versuchs wurde die gereinigte FERM-Domäne von Merlin über *Strep*MAB-Immo-Antikörper immobilisiert. Die Flusszelle wurde dabei mit Merlin-FERM abgesättigt, so dass annähernd alle Bindungsstellen der *Strep*MAB-Immo-Antikörper besetzt waren. Dazu wurde Merlin-FERM in Puffer D auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt und über Flusszelle 2 gegeben, bis eine deutliche Sättigung sichtbar wurde (nicht gezeigt). Zelle 1 wurde als Referenz herangezogen, während Zelle 2 mit indirekt gekoppeltem Merlin-FERM für die eigentliche Messung genutzt wurde. Zuerst wurde RhoGDIα in einer Konzentration von einem µM über die Flusszellen gegeben. Es zeigte sich eine rasche Komplexbildung von Merlin-FERM und RhoGDIα. Nach *ca.* 75 s geht die Reaktion in die Gleichgewichtsphase über (Abb. 42). Nach Injektionsende bei 200 s erfolgt die Dissoziation des Komplexes. Um zu testen, welchen Einfluss Merlin-FERM auf die

Interaktion zwischen RhoGDIα und *in vitro* isoprenyliertem Rac2 hat, wurden 3 verschiedene Konzentrationen von Rac2 mit einem µM RhoGDIα für 10 Minuten auf Eis vorinkubiert und anschließend über die Flusszellen gegeben. In der folgenden Abbildung sind die entsprechenden Bindungskurven dargestellt.

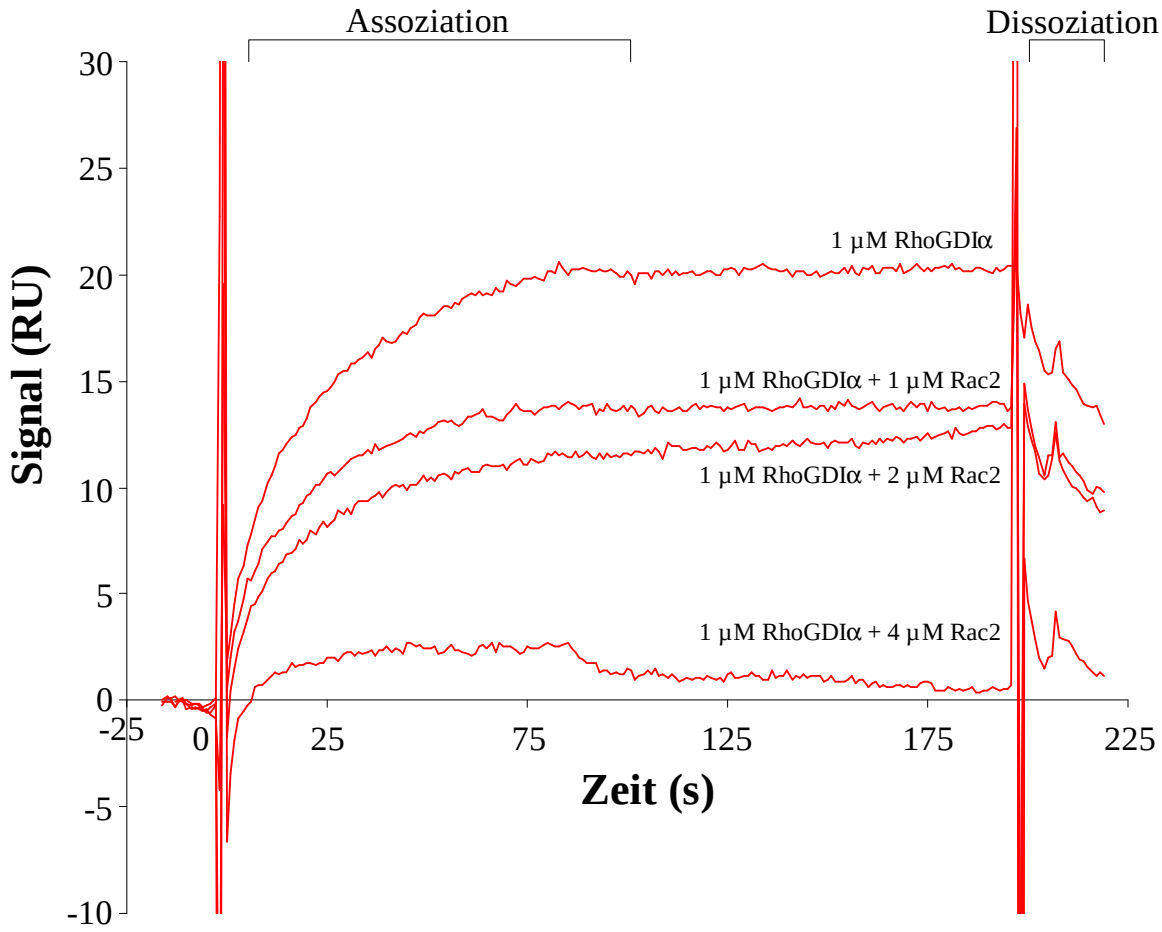


Abb. 42: Einfluss von Merlin-FERM auf die Interaktion von Rac2 und RhoGDIα. Gereinigtes Merlin-FERM wurde indirekt über *Strep*MAB-Immo-Antikörper auf einen Biacore CM5-Sensorchip immobilisiert. Anschließend wurden gleichbleibende Konzentrationen von RhoGDIα ohne Rac2 oder mit ansteigenden Konzentrationen von *in vitro* isoprenyliertem Rac2 über die beiden Flusszellen gegeben. Laufpuffer: Puffer D. RU = *resonance units*; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; FERM = *four point one*, *ezrin*, *radixin*, *moesin*; Rac2 = *ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*; RhoGDIα = *Rho GDP dissociation inhibitor α.*

Folgende Parameter wurden für die Messung verwendet:

Tab. 14: Parameter der Messung.

Flussrate	30 µl/min
Temperatur	25 °C
Injektionszeit	200 s
Dissoziationszeit	600 s
Laufpuffer	Puffer D

Es zeigte sich, dass es zu einer Abnahme der Komplexbildung zwischen Merlin-FERM und RhoGDIα kommt, wenn steigende Konzentrationen von Rac2 mit RhoGDIα vorinkubiert und dann injiziert werden. Ab einer Rac2-Konzentration von 4 µM war die Interaktion von Merlin-FERM und RhoGDIα nahezu komplett unterbunden. Des Weiteren kommt es vermutlich nicht zu einer Trimerbildung von Merlin-FERM, RhoGDIα und Rac2. Eine direkte Interaktion von Merlin-FERM und Rac2 konnte weder in diesem noch in verschiedenen anderen Vorversuchen beobachtet werden.

Die Arbeitsgruppe um Takahashi hatte zeigen können, dass die direkte Interaktion der FERM-Domäne von Radixin mit RhoGDIα zu einer Aktivierung der Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 führt (Takahashi *et al*., 1997). Im Folgenden sollte getestet werden, ob die FERM-Domäne von Merlin einen Einfluss auf die Aktivierung der Rho-GTPase Cdc42 hat.

4.3 GTPγS-Bindungsversuche

4.3.1 Konzentrationsabhängige [^{35}S]GTPγS-Bindung an Cdc42

Um den Einfluss von Merlin-FERM auf Mitglieder der Rho-GTPase-Familie zu untersuchen, wurden Bindungsversuche mit radioaktiv markiertem GTPγS, [^{35}S]GTPγS, durchgeführt. Zu Beginn der Untersuchungen sollten die Bindung von [^{35}S]GTPγS an Cdc42 sowie die Hemmung dieser Bindung durch RhoGDIα getestet werden. Hierzu wurden unterschiedliche Konzentrationen (30 nM, 100 nM, 300 nM und 1000 nM) von Cdc42 für 30 min bei 30 °C mit [^{35}S]GTPγS inkubiert. Als Puffer wurde GTPγS-Bindungspuffer mit 10 mM $MgCl_2$ und 1 µM GDP eingesetzt. Protein-gebundenes [^{35}S]GTPγS wurde durch Filtration über Nitrozellulosefilter von freiem [^{35}S]GTPγS getrennt. Die unspezifische Bindung von [^{35}S]GTPγS wurde durch Zugabe eines Überschusses an nicht markiertem GTPγS (400 µM) bestimmt.

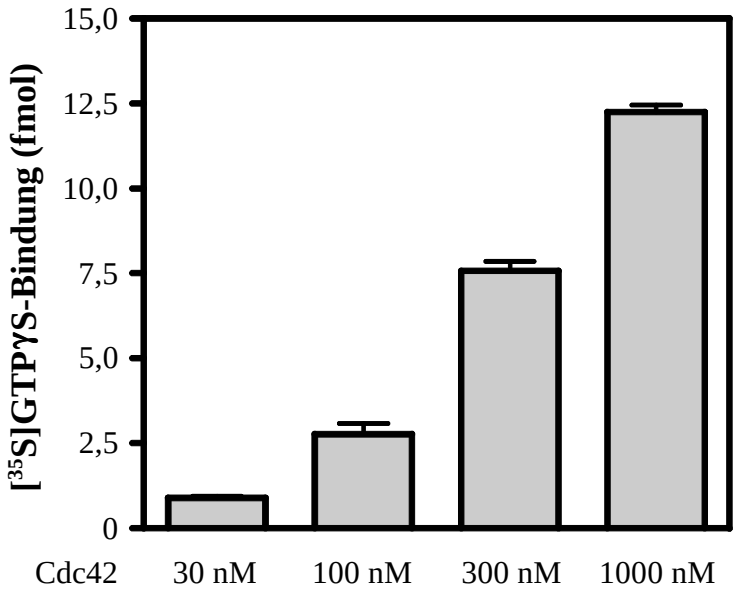


Abb. 43: Konzentrationsabhängige Bindung von [^{35}S]GTPγS an Cdc42. Ansteigende Konzentrationen von *in vitro* isoprenyliertem Cdc42 wurden für 30 min bei 30 °C mit [^{35}S]GTPγS inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml Stopp-Puffer beendet. Alle Proben wurden durch Nitrozellulosefilter filtriert. Die auf den Filtern gebundene Radioaktivität wurde über Flüssigszintillation bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus den Dreifachbestimmungen des jeweiligen Experiments. Zur Kontrolle wurden alle Versuche unter Zugabe eines Überschusses an nicht markiertem GTPγS (final 400 µM) durchgeführt. GTP = Guanosin-5´-triphosphat; Cdc42 = *cell division cycle 42*.

Je mehr Cdc42 eingesetzt wurde, desto mehr radioaktiv markiertes [^{35}S]GTPγS lag in Protein-gebundener Form vor.

4.3.2 Einfluss von RhoGDIα auf die [^{35}S]GTPγS-Bindung an Cdc42

Um den Einfluss von RhoGDIα auf die [^{35}S]GTPγS-Bindung an Cdc42 zu untersuchen, wurde RhoGDIα in unterschiedlichen Konzentrationen für 30 min bei Raumtemperatur mit 300 nM Cdc42 vorinkubiert. Anschließend wurde [^{35}S]GTPγS hinzugegeben und es folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 20 min bei 30 °C.

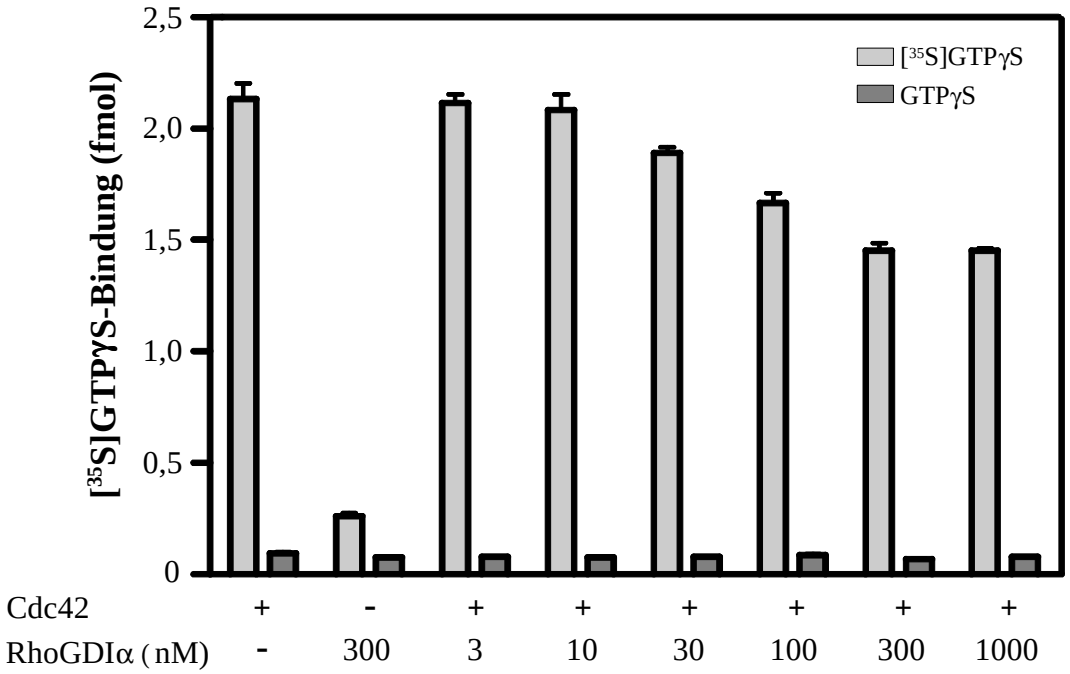


Abb. 44: Einfluss von RhoGDIα auf die [^{35}S]GTPγS-Bindung an Cdc42. Zur Bestimmung des Einflusses von RhoGDIα auf die [^{35}S]GTPγS-Bindung an Cdc42 wurden 300 nM der *in vitro* isoprenylierten Rho-GTPase mit ansteigenden Konzentrationen von RhoGDIα für 30 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von [^{35}S]GTPγS und die Proteine wurden für weitere 20 min bei 30 °C inkubiert. RhoGDIα = *Rho GDP dissociation inhibitor α*; GTP = Guanosin-5´-triphosphat; Cdc42 = *cell division cycle 42*.

Cdc42 zeigte eine konzentrationsabhängige Bindung an [^{35}S]GTPγS (Abb. 43), die durch steigende Konzentrationen von RhoGDIα gehemmt wurde (Abb. 44). Bei einer Konzentration von 30 nM RhoGDIα verringerte sich die [^{35}S]GTPγS-Bindung an Cdc42 um etwa 15 %. Ab einer RhoGDIα-Konzentration von 300 nM ließ sich keine weitere Zunahme des inhibitorischen Effekts nachweisen. Der maximale inhibitorische Effekt lag bei einer RhoGDIα-Konzentration von 1000 nM vor und betrug etwa 35 %. Es sollte nun untersucht werden, ob Merlin-FERM einen direkten Einfluss auf die Bindung von [^{35}S]GTPγS an Cdc42 oder auf den inhibitorischen Effekt von RhoGDIα auf diese Interaktion hat.

4.3.3 Einfluss von Merlin-FERM und RhoGDIα auf die [^{35}S]GTPγS-Bindung an Cdc42

Merlin-FERM wurde in ansteigender Konzentration für 30 min bei Raumtemperatur mit 150 nM RhoGDIα vorinkubiert. Dann wurden 300 nM Cdc42 hinzugegeben. Nach

weiteren 30 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgten die Zugabe von [^{35}S]GTPγS und ein weiterer Inkubationsschritt für 20 min bei 30 °C.

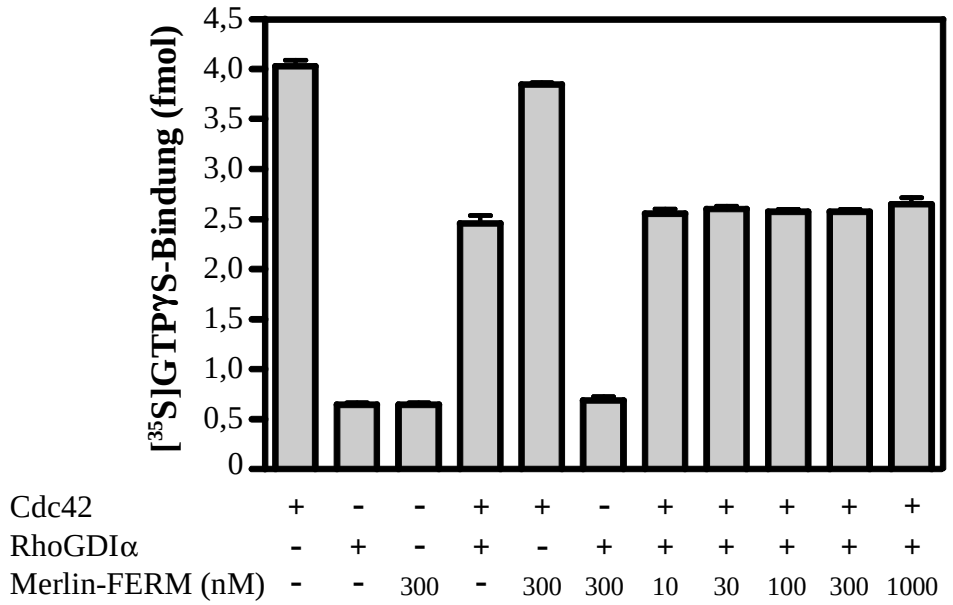


Abb. 45: Einfluss von RhoGDIα und Merlin-FERM auf die [^{35}S]GTPγS-Bindung an Cdc42. Zur Bestimmung des Einflusses von RhoGDIα und Merlin-FERM auf die [^{35}S]GTPγS-Bindung an Cdc42 wurden 150 nM RhoGDIα mit ansteigenden Konzentrationen von Merlin-FERM für 30 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Anschließend wurden je 300 nM der *in vitro* isoprenylierten Rho-GTPase zu den Ansätzen gegeben. Nach weiteren 30 min bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von [^{35}S]GTPγS und die Proteine wurden für 20 min bei 30 °C inkubiert. RhoGDIα = *Rho GDP dissociation inhibitor α*; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; FERM = *four point one*, *ezrin*, *radixin*, *moesin*; GTP = Guanosin-5´-triphosphat; Cdc42 = *cell division cycle 42*.

Auch in diesem Versuch sah man die deutliche Hemmung der [^{35}S]GTPγS-Bindung an Cdc42 durch RhoGDIα. Durch Zugabe von 150 nM RhoGDIα kam es zu einer Hemmung um etwa 40 %. Merlin-FERM alleine hatte keinen Einfluss auf die [^{35}S]GTPγS-Bindung an Cdc42. Auch in Kombination mit RhoGDIα ließ sich kein Effekt nachweisen. Die basale Hemmung der [^{35}S]GTPγS-Bindung durch RhoGDIα wurde durch den Einsatz steigender Konzentrationen von Merlin-FERM nicht beeinflusst. In Folgeversuchen wurde die eingesetzte RhoGDIα-Konzentration verringert, um auszuschließen, dass die basale Hemmung durch RhoGDIα bereits zu stark ausgeprägt war, um einen weiteren inhibitorischen Effekt von Merlin-FERM zu sehen. Auch in diesen Versuchen konnte kein Effekt von Merlin-FERM nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Versuche wurden ebenso für eine andere Rho-GTPase, Rac2, durchgeführt, jedoch zeigte sich auch hier kein Effekt von Merlin-FERM (Ergebnisse nicht gezeigt). Zudem wurde MBP-Merlin

in diesem Kontext überprüft. Leider bewirkte bereits MBP alleine eine Stimulation der [^{35}S]GTPγS-Bindung an Rac2 (Ergebnisse nicht gezeigt).

Unter den gewählten Bedingungen zeigte die FERM-Domäne von Merlin also keinen Einfluss auf die [^{35}S]GTPγS-Bindung und damit auf die Aktivierung der beiden Rho-GTPasen Cdc42 und Rac2. Deshalb sollte in weiteren Untersuchungen der Frage nachgegangen werden, ob Merlin die im Rahmen ihrer Aktivierung erfolgende Translokation von Rho-GTPasen an die Plasmamembran inhibiert (Okada *et al.*, 2005).

4.4 Translokationsversuche

4.4.1 Translokationsversuche mit Liposomen

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Merlin-FERM im zellfreien System die Translokation von Rac2 an die Zellmembran beeinflusst. Dazu wurden Liposomen aus unterschiedlichen Anteilen von Phosphatidyl-serin, -ethanolamin, -inositol und Cholesterin hergestellt. Anschließend wurden die Proteine zu den Liposomen gegeben und die Mischungen für 10 min bei 4 °C inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation wurden die Lipsosomen sedimentiert und gebundene Proteine durch *Western-blotting* nachgewiesen.

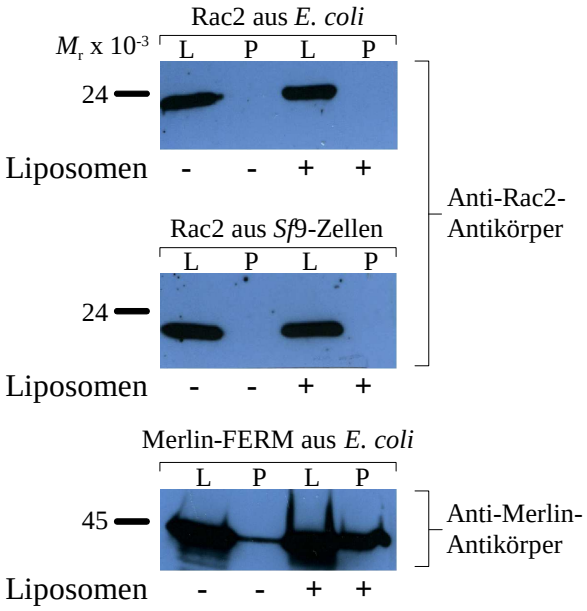


Abb. 46: Interaktion von Rac2 und Merlin-FERM mit Liposomen. Liposomen aus Phosphatidyl-serin (25 % (V/V)), -ethanolamin (35 % (V/V)), -inositol (5 % (V/V)) und Cholesterin (35 % (V/V)) wurden mit je etwa 10 µg nicht modifiziertem Rac2 aus *E. coli*, isoprenyliertem Rac2 aus *Sf*9-Membranen oder Merlin-FERM aus *E. coli* für 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation der Liposomen-Protein-Lösung wurde der Überstand abgenommen und das Pellet noch einmal mit TBSM-Puffer mit 1 µM GDP gewaschen. Je 15 µl der zytosolischen und partikulären Fraktionen wurden dann auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-Merlin- bzw. Anti-Rac2-Antikörpern immunchemisch nachgewiesen. Zur Kontrolle wurden jeweils Proteinansätze ohne Liposomen gemacht. L = löslich, P = partikulär; Rac2 = *ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; FERM = *four point one, ezrin, radixin, moesin*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Rac2, das in *E. coli* exprimiert wurde, zeigte keine Interaktion mit den Liposomen. Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch für modifiziertes Rac2, das aus Membranen von *Sf*9-Zellen extrahiert worden war. Merlin-FERM zeigte im Gegensatz zu den beiden Rac2-Varianten eine deutliche Interaktion mit den Liposomen. Ein kleiner Teil von Merlin-FERM fiel allerdings aus und ließ sich daher auch ohne Liposomen in der partikulären Fraktion nachweisen. Da auch in weiteren Versuchen keine Interaktion von modifiziertem Rac2 mit den Liposomen beobachtet werden konnte, wurden *Sf*9-Membranen isoliert und diese anschließend für die Translokationsversuche verwendet.

4.4.2 Translokationsversuche mit *Sf*9-Membranen

4.4.2.1 Translokation von gereinigtem und modifiziertem Rac2 aus *Sf*9-Membranen

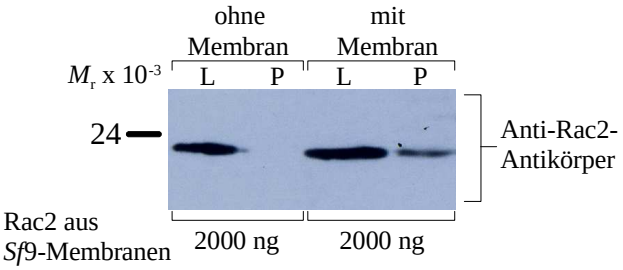


Abb. 47: Interaktion von modifiziertem Rac2 mit Zellmembranen von *Sf*9-Insektenzellen. *Sf*9-Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und anschließend in hypotonischem Lysispuffer suspendiert. Die Zellen wurden dann mittels Spritze und Kanüle aufgeschlossen, bei 900 x *g* zentrifugiert und der erhaltene Überstand nochmals bei 16 000 x *g* zentrifugiert. Im Folgenden wurden die Membranen mit TBSM-Puffer mit 1 µM GTPγS und 20 nM GDP gewaschen und für 20 min bei 30 °C mit 2000 ng modifiziertem Rac2 inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation der Membran-Protein-Lösung wurde der Überstand abgenommen und das Pellet noch einmal mit dem oben angegebenen Puffer gewaschen. Je 15 µl der zytosolischen und partikulären Fraktionen wurden dann auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-Rac2-Antikörpern immunchemisch nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Membranen gemacht. L = löslich, P = partikulär; Rac2 = *ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Rac2, das in *Sf*9-Zellen exprimiert und anschließend aus deren Membranen extrahiert und gereinigt worden war, konnte unter *in-vitro*-Bedingungen wieder mit nativen Insektenzellmembranen interagieren. Hier befanden sich etwa 15 % des eingesetzten Rac2 in der partikulären Fraktion, wenn Membranen hinzugegeben wurden. Es sollte nun getestet werden, ob auch Rac2, welches in *E. coli* exprimiert, anschließend gereinigt und *in vitro* isoprenyliert worden war, in der Lage ist, mit den nativen Insektenzellmembranen zu interagieren.

4.4.2.2 Translokation von gereinigtem, *in vitro* isoprenyliertem Rac2

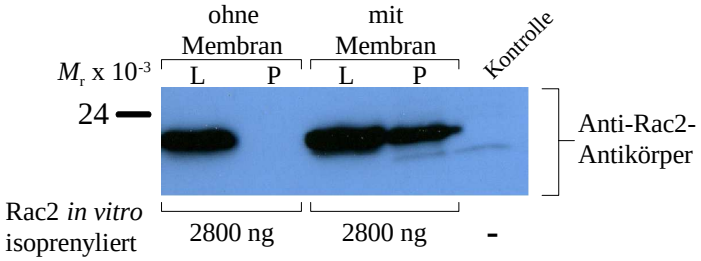


Abb. 48: Interaktion von *in vitro* isoprenyliertem Rac2 mit *Sf*9-Membranen. *Sf*9-Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und anschließend in hypotonischen Lysispuffer aufgenommen. Die Zellen wurden dann mittels Spritze und Kanüle aufgeschlossen, bei 900 x *g* zentrifugiert und der erhaltene Überstand nochmals bei 16 000 x *g* zentrifugiert. Im Folgenden wurden die Membranen nochmals mit TBSM mit 1 µM GTPγS und 20 nM GDP gewaschen und für 20 min bei 30 °C mit 2800 ng *in vitro* isoprenyliertem Rac2 inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation der Membransuspension wurde der Überstand abgenommen und das Pellet einmal mit TBSM-Puffer mit 1 µM GTPγS und 20 nM GDP gewaschen und dann resuspendiert. Je 15 µl der zytosolischen und partikulären Fraktionen wurden dann auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-Rac2-Antikörpern immunchemisch nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz mit Membranen ohne Protein angefertigt. L = löslich, P = partikulär; Rac2 = *ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Auch Rac2, das in *E. coli* exprimiert und anschließend *in vitro* isoprenyliert wurde, interagierte mit den *Sf*9-Membranen. Etwa 20-30 % des eingesetzten Rac2 befanden sich in der partikulären Fraktion, wenn Membranen hinzugegeben worden waren.

4.4.2.3 Einfluss von RhoGDIα auf die Membrantranslokation von Rac2

Um den Einfluss von RhoGDIα auf die Membrantranslokation von *in vitro* isoprenyliertem Rac2 zu untersuchen, wurden die beiden Proteine mit *Sf*9-Membranen inkubiert und der Anteil von Rac2 in den Membranen mittels *Western-blot*-Analyse bestimmt.

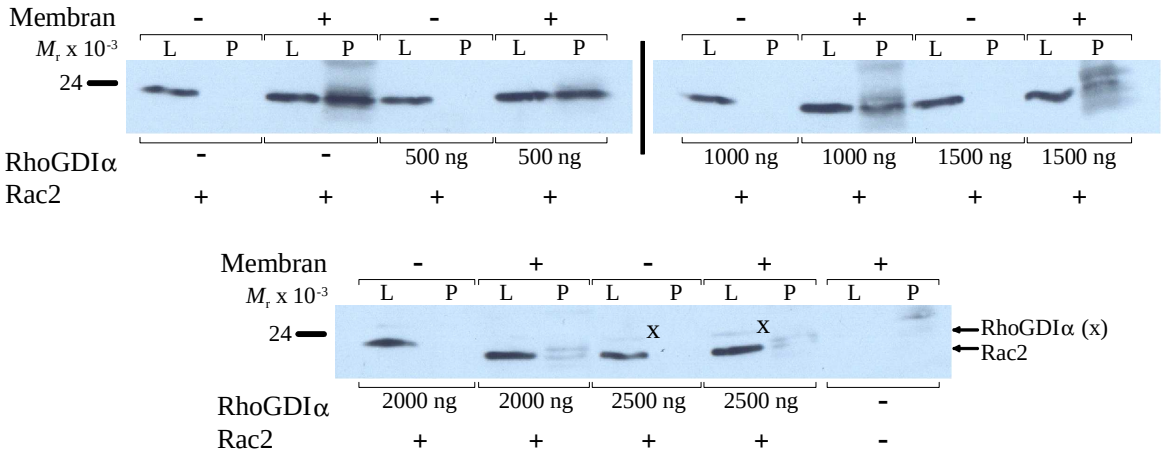


Abb. 49: Einfluss von RhoGDIα auf die Interaktion von *in vitro* isoprenyliertem Rac2 mit *Sf*9-Membranen. *Sf*9-Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und anschließend in hypotonischen Lysispuffer aufgenommen. Die Zellen wurden dann mittels Spritze und Kanüle aufgeschlossen, bei 900 x *g* zentrifugiert und der erhaltene Überstand nochmals bei 16 000 x *g* zentrifugiert. Im Folgenden wurden die Membranen nochmals mit TBSM mit 1 µM GDP gewaschen. Ansteigende Mengen von RhoGDIα wurden in Kombination mit *in vitro* isoprenyliertem Rac2 (3 µg Protein/Ansatz) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit den Membranen gemischt und anschließend noch einmal für 20 min bei 30 °C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation der Membran-Protein-Lösung wurde der Überstand abgenommen und das Pellet einmal in TBSM-Puffer mit 1 µM GDP gewaschen und dann gelöst. Je 15 µl der zytosolischen und partikulären Fraktionen wurden danach auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-Rac2- bzw. Anti-RhoGDIα-Antikörpern immunchemisch nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz mit Membranen ohne Proteine gemacht. L = löslich, P = partikulär; RhoGDIα = *Rho GDP dissociation inhibitor α*; Rac2 = *ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Nachträglich *in vitro* isoprenyliertes Rac2 assoziierte in Abwesenheit von RhoGDIα zu einem Anteil von etwa 40-50 % mit den *Sf*9-Membranen. Dieser Prozentsatz änderte sich in Abhängigkeit von der eingesetzten RhoGDIα-Menge. Fünfhundert ng RhoGDIα führten zu einem etwa 10 %igen Rückgang der Rac2-Membrantranslokation. Jener Effekt setzte sich bis zu einer Menge von etwa 1500 ng RhoGDIα fort. Ab dieser ließ sich kein Rac2 mehr in den Membranen nachweisen.

4.4.2.4 Einfluss von Merlin-FERM und RhoGDIα auf die Membrantranslokation von Rac2

Die aus den Vorversuchen gewonnenen Daten zeigten, dass RhoGDIα ab einer Menge von 1 µg Protein einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf die Translokation von Rac2 an die *Sf*9-Membranen hat. Es sollte nun getestet werden, ob Merlin-FERM diesen Effekt beeinflussen kann. Dazu wurden Merlin-FERM, RhoGDIα und *in vitro* isoprenyliertes

Rac2 mit *Sf*9-Membranen inkubiert und der Anteil von Rac2 in den Membranen mittels *Western-blot*-Analyse bestimmt.

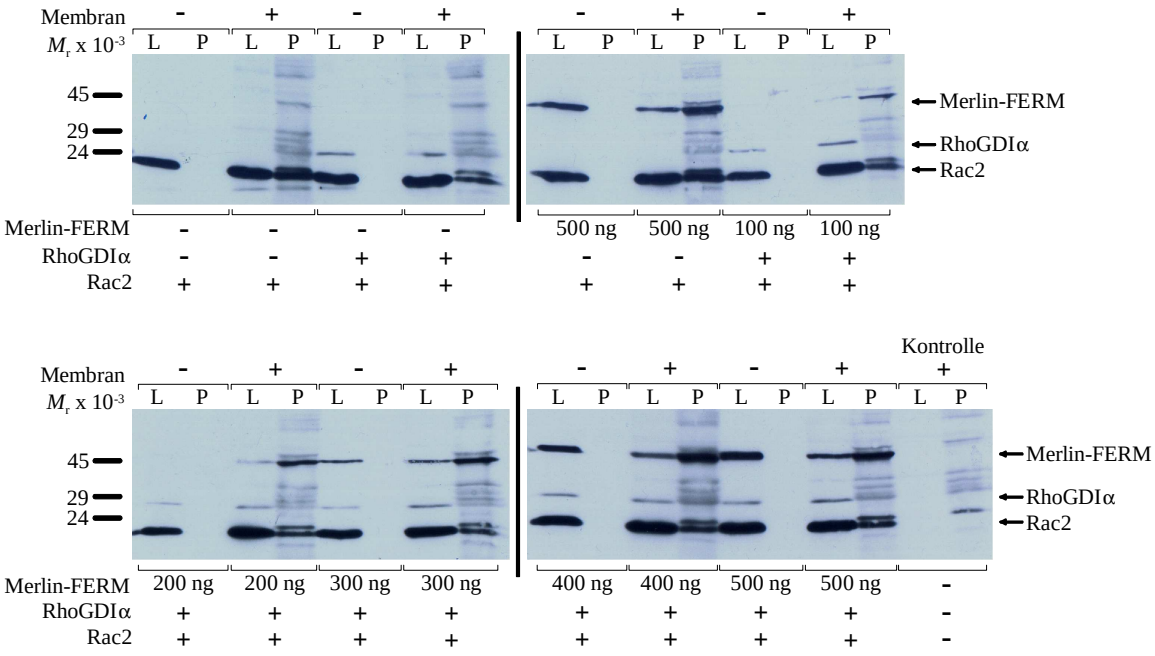


Abb. 50: Einfluss von Merlin-FERM und RhoGDIα auf die Membrantranslokation von Rac2. *Sf*9-Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und anschließend in hypotonischen Lysispuffer aufgenommen. Die Zellen wurden dann mittels Spritze und Kanüle aufgeschlossen, bei 900 x *g* zentrifugiert und der erhaltene Überstand nochmals bei 16 000 x *g* zentrifugiert. Im Folgenden wurden die Membranen nochmals mit TBSM mit 1 µM GDP gewaschen. Ansteigende Mengen von Merlin-FERM wurden in Kombination mit RhoGDIα (1 µg Protein/Ansatz) und *in vitro* isoprenyliertem Rac2 (3 µg Protein/Ansatz) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit den Membranen gemischt und anschließend noch einmal für 20 min bei 30 °C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation der Membran-Protein-Lösung wurde der Überstand abgenommen und das Pellet einmal in TBSM-Puffer mit 1 µM GDP gewaschen und dann gelöst. Je 15 µl der zytosolischen und partikulären Fraktionen wurden dann auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-Merlin-, Anti-Rac2- und Anti-RhoGDIα-Antikörpern immunchemisch nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz mit Membranen ohne Protein gemacht. L = löslich, P = partikulär; Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; FERM = *four point one, ezrin, radixin, moesin*; RhoGDIα = *Rho GDP dissociation inhibitor α*; Rac2 = *ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*; SDS = *sodium dodecyl sulfate*.

Auch in diesem Versuch wurde der inhibitorische Einfluss von RhoGDIα auf die Translokation von Rac2 deutlich. Die Zugabe von 1 µg RhoGDIα zu den *Sf*9-Membranen und Rac2 führte zu einer verringerten Interaktion von Rac2 mit den Membranen. Merlin-FERM allein (500 ng Protein) hatte keinen Einfluss auf die Translokation von Rac2. Auffallend ist hier, dass Merlin-FERM eine hohe Membranassoziation zeigte. Bei einer eingesetzten Merlin-FERM-Menge von 500 ng befanden sich etwa 70 - 80 % des Proteins in der Membran. Bei zusätzlicher Zugabe von Merlin-FERM zu RhoGDIα und Rac2 in einen Ansatz zeigten sich keine Unterschiede im Vergleich zu RhoGDIα und Rac2 alleine. Merlin-FERM schien unter den gegebenen Bedingungen keinen Einfluss auf die

Translokation von Rac2 zu haben, weder alleine noch in Kombination mit RhoGDIα. Dieser Versuch wurde unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, zeigte jedoch unter keiner der gewählten einen signifikanten Effekt durch Merlin-FERM. Auch die FERM-Domäne eines anderen FERM-Proteins, Ezrin-FERM, wurde getestet, jedoch ebenfalls ohne sichtbare Effekte (Ergebnisse nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Merlin 1 voller Länge unter den gegebenen Bedingungen nicht ohne Hilfsmittel als lösliches Protein herstellbar war. Durch den Zusatz von Arginin und die Fusion von Merlin mit MBP konnte zwar lösliches Protein exprimiert werden, dieses präzipitierte durch den Entzug von Arginin oder das Entfernen des MPB-*tags* jedoch sofort. In Arginin gelöstes bzw. mit MBP versehenes Merlin 1 voller Länge war in keinem der verwendeten Versuchssysteme funktionell aktiv (Ergebnisse nicht gezeigt). Im Gegensatz zu Merlin 1 in voller Länge wies seine FERM-Domäne eine bessere Löslichkeit auf. Etwa 20-30 % von Merlin-FERM befanden sich in der löslichen Fraktion.

Unter Verwendung der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die FERM-Domänen von Merlin und Radixin Heterodimere ausbilden. Zusätzlich konnte eine direkte Bindung der beiden FERM-Domänen von Merlin oder Ezrin an RhoGDIα beobachtet werden. Sowohl aus diesen Interaktionen als auch aus der Bindung zwischen Rac2 und RhoGDIα wurden kinetische Parameter bestimmt. Die Formation eines ternären Komplexes aus der FERM-Domäne von Merlin, Rac2 und RhoGDIα konnte unter gegebenen Bedingungen nicht beobachtet werden. In den durchgeführten [^{35}S]GTPγS-Bindungs- und Translokationsversuchen zeigte die FERM-Domäne von Merlin keinen Einfluss auf die Aktivierung oder Translokation der beiden Rho-GTPasen Rac2 und Cdc42 an die Zellmembran.

5 Diskussion

Das im Jahre 1993 entdeckte Tumorsuppressorprotein Merlin gehört zur Protein-4.1-Familie und stellt damit ein wichtiges Bindeglied zwischen Zellmembran und Zytoskelett dar (Trofatter *et al*., 1993; Fehon *et al*., 2010; Stamenkovic und Yu, 2010). Die Gemeinsamkeit der Mitglieder dieser Proteinfamilie besteht in dem Vorhandensein einer hochkonservierten N-terminalen Domäne, die als FERM-Domäne bezeichnet wird (Chishti *et al*., 1998). Obwohl die strukturellen Ähnlichkeiten einiger Mitglieder der Protein-4.1-Familie gerade im Hinblick auf ihre N-terminalen Abschnitte sehr groß sind, zeigen sich doch Abweichungen hinsichtlich ihrer Funktionen. Merlin sticht dabei besonders hervor, da es neben seiner Funktion als Membran-Zytoskelett-Organisator die Fähigkeit besitzt, negativ in Vorgänge einzugreifen, die wichtig für die Proliferation von Zellen und Geweben sind (Morrison *et al*., 2007; Lallemand *et al*., 2009b). Diese Eigenschaft konnte auch für das FERM-Protein DAL-1 gezeigt werden (Tran *et al*., 1999). Im Unterschied zu den anderen FERM-Proteinen besitzen Merlin und DAL-1 daher tumorsuppressive Eigenschaften. Inwieweit und in welcher Form Merlin einen Einfluss auf Zellteilung und Zellwachstum ausübt, ist bis heute jedoch nur teilweise verstanden (Okada *et al*., 2005). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktionen einer der beiden Merlin-Isoformen, Merlin 1, unter *in-vitro*-Bedingungen zu untersuchen. Dazu sollte das Protein nach Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen als Volle-Länge-Protein hergestellt werden. Dabei wurden die Expressionstemperaturen, -zeiten und die pH-Werte der verwendeten Puffer angepasst sowie verschiedene Denaturierungsmittel und Detergenzien eingesetzt. Zusätzlich wurde Merlin 1 mit den beiden Löslichkeits-*tags* GST und MBP versehen.

Keine der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Bedingungen führte zu einer wesentlichen Verbesserung der Löslichkeit von Merlin 1. Durch die Herabsetzung der Expressionstemperaturen konnte zwar lösliches Merlin 1 hergestellt werden, die Gesamtausbeute an löslichem Material blieb aber dennoch sehr gering (Abschn. 4.1.1.1; Abb. 5). Vermutlich führte die Geschwindigkeit der Proteinexpression bei höheren Inkubationstemperaturen zu einer schnelleren Aggregation von Merlin 1 und infolge dessen zur vermehrten Ausbildung von Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) in *E. coli* (Baneyx und Mujacic, 2004). Interessanterweise zeigt Protein 4.1, das aus dem Zytoskelett von Erythrozyten extrahiert und gereinigt worden war, bei Überschreitung bestimmter

Proteinkonzentrationen ebenfalls eine erhöhte Aggregation (Ohanian und Gratzer, 1984). Merlin 1 hat einen berechneten isoelektrischen Punkt von 6,11. Die Tendenz zur Aggregation des Proteins müsste dementsprechend bei einem pH-Wert um 6 am größten sein, da hier die Nettoladung des Proteins gegen 0 geht und die Abstoßung der Proteine untereinander am geringsten ist (Majhi *et al.*, 2006). Aufgrund dessen sollte eine mögliche Aggregation von Merlin 1 bei höheren pH-Werten geringer sein. Dieser Effekt ließ sich für Merlin 1 unter gegebenen Bedingungen allerdings nicht nachweisen (Abschn. 4.1.1.2; Abb. 6).

Mit Hilfe von Denaturierungsmitteln ist es möglich, aggregierte Proteine aus den Einschlusskörperchen zu extrahieren (Li *et al*., 2004; Singh *et al*., 2005; Vallejo und Rinas, 2004). Dementsprechend konnte Merlin 1 mit Hilfe von Guanidinhydrochlorid aus den Einschlusskörperchen extrahiert und anschließend in Lösung gehalten werden (Abschn. 4.1.1.3; Abb. 7). Allerdings führte die im Folgenden durchgeführte Renaturierung von Merlin 1 durch das schrittweise Entziehen des Denaturierungsmittels zur Präzipitation des Proteins. Welche Auswirkungen dieser Entzug der Denaturierungsmittel auf die Struktur und die Löslichkeit eines Proteins hat, wurde von der Arbeitsgruppe um Anand am Beispiel von BSA genauer untersucht (Anand *et al*., 2011). Hier konnte für BSA gezeigt werden, dass der Anteil an α-helikalen Inhalten im Protein bei Denaturierung durch Guanidinhydrochlorid bis zu einer Konzentration von 0,6 M zunimmt, über einer Konzentration von 1,2 M Guanidinhydrochlorid jedoch stark abfällt. Ab dieser Konzentration werden sehr wahrscheinlich native Strukturen im Protein aufgehoben. Es wäre durchaus denkbar, dass auch im Falle von Merlin 1 verschiedene Faltungsintermediate, sowohl bei der Denaturierung als auch bei der Renaturierung des Proteins, gebildet werden. Dabei könnte bei der Denaturierung zunächst die durch den flexiblen α-helikalen Linker organisierte native *head-to-tail*-Grobstruktur von Merlin 1 verloren gehen (Bretscher *et al*., 1995; Bretscher *et al*., 2000). Auch die Erhöhung des Anteils an löslichem Merlin 1 durch Zugabe von Arginin spricht für die Ausbildung von Faltungsintermediaten. So konnte z.B. für Lysozym gezeigt werden, dass Arginin durch Interaktion mit Faltungsintermediaten das Gleichgewicht zwischen Faltungs- und Aggregationsreaktionen zugunsten der Faltungsintermediate verschiebt (Waldman, 2005). Im Falle von Merlin 1 führte der Entzug von Arginin durch Chromatographie oder Dialyse zu einem vollständigen Verlust des Proteins, während geringe Argininkonzentrationen (100 mM) im Stande waren, etwa 5 % des Proteins in Lösung zu halten (Abschn. 4.1.1.4;

Abb. 9). Unklar war in diesem Fall, ob das durch Arginin (500 mM) solubilisierte Merlin 1 nativ gefaltetes Protein darstellte oder ob es sich um Faltungsintermediate handelte, einschließlich nichtfunktioneller Proteinstrukturen.

Es wurden daher auch funktionelle Versuche mit Merlin 1 durchgeführt, das zuvor in Arginin-haltigen Puffern solubilisiert und gereinigt worden war (Ergebnisse nicht gezeigt). Da bislang keine intrinsische Aktivität (z.B. enzymatische Aktivität) von Merlin 1 nachgewiesen werden konnte (Okada *et al*., 2007), sollten Bindungsversuche zeigen, ob Arginin strukturelle Änderungen innerhalb von Merlin 1 hervorruft. Mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (Biacore) wurde untersucht, ob entsprechend vorbehandeltes Merlin 1 mit RhoGDIα oder Merlin-FERM interagiert. Zusätzlich wurde untersucht, ob Merlin 1 zur Homodimerisierung befähigt ist. In diesen Untersuchungen konnte für Merlin 1 keine Interaktion mit RhoGDIα nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus der Literatur ist bekannt, dass die FERM-Domänen einiger FERM-Proteine mit RhoGDIα interagieren können. Eine solche Interaktion wurde jedoch nicht beobachtet, wenn diese FERM-Proteine in gesamter Länge exprimiert wurden (Maeda *et al*., 1999). Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit auch keine Interaktion zwischen der FERM-Domäne von Merlin und Merlin 1 voller Länge sowie keine Homodimerisierung von Merlin 1 beobachtet werden, obwohl es in der Literatur deutliche Hinweise darauf gibt (Ergebnisse nicht gezeigt) (Grönholm *et al*., 1999). Die Verwendung von Arginin führte damit zwar sehr wahrscheinlich zu einer Stabilisierung von löslichem Merlin 1, nahm aber zu große Eingriffe an dessen dreidimensionaler Struktur vor. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen in Anwesenheit von Arginin im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht als zielführend erachtet. Obwohl verschiedene Arbeitsgruppen zeigen konnten, dass einige Proteine unter Argininеinfluss funktionell kompetent sind, muss vor dem Hintergrund der hier vorliegenden Ergebnisse für jedes Protein gesondert bestimmt werden, ob die Durchführung von Analysen unter Verwendung von Arginin zur Stabilisierung der Proteine möglich ist (Tsumoto *et al*., 2003; Ishibashi *et al*., 2005a).

Im Folgenden wurde untersucht, ob unlösliches Merlin 1 mit Detergenzien in Lösung gebracht bzw. gehalten werden kann. Da bisher wenig über das Verhalten von Merlin 1 in Gegenwart von Detergenzien bekannt ist, wurden Versuchsreihen durchgeführt, bei denen Merlin 1 in Puffern mit verschiedenen Anteilen der anionischen Tenside Natriumdodecylsulfat, Natriumdesoxycholat und Triton X-100 gelöst wurde.

Natriumdodecylsulfat unterbricht nicht-kovalente Proteinwechselwirkungen und denaturiert auf diese Weise die Quartär- und Tertiärstrukturen der Proteine (Smith, 1994). Im Falle von Merlin 1 geschieht dies ab einer Natriumdodecylsulfat-Konzentration von etwa einem Prozent (m/V) (Abschn. 4.1.1.4; Abb. 11). Im Gegensatz zu Natriumdodecylsulfat sind Natriumdesoxycholat und Triton X-100 meist nicht Protein-denaturierend. Beide Detergenzien lassen häufig Quartärstrukturen und reversible Protein-Protein-Interaktionen intakt (Helenius und Simons, 1975). Interessanterweise führt Natriumdesoxycholat erst ab einer Konzentration von 5 % (m/V) zu einer verbesserten Löslichkeit von Merlin 1, während Triton X-100 keinen Einfluss auf diesen Parameter hat (Abschn. 4.1.1.4; Abb. 12 und 13). Geht man davon aus, dass weder Natriumdesoxycholat noch Triton X-100 in niedrigen Konzentrationen starke Änderungen in den Konformationen der meisten Proteine hervorrufen, so lässt sich aus den hier erzielten Ergebnissen schlussfolgern, dass zu einer Verbesserung der Löslichkeit des Proteins stärkere Veränderungen in seiner Struktur (z.B. durch Natriumdodecylsulfat) notwendig sind. Genauere Informationen über die Struktur von Merlin 1 sind nicht bekannt, da bisher nur dessen FERM-Domäne kristallisiert werden konnte (Kang *et al*., 2001; Shimizu *et al*., 2002).

Neben der Verwendung von Detergenzien haben sich auch Löslichkeits-*tags* als wertvolle Werkzeuge etabliert, um höhere Ausbeuten unlöslicher Proteine zu erzielen (Cabrita *et al*., 2006). In der vorliegenden Arbeit führte die Fusion von Merlin mit dem Löslichkeits-*tag* MBP zu einer Verbesserung der Löslichkeit von Merlin 1, wenn der Aufschluss der Merlin-1-exprimierenden Bakterien unter Zusatz von Arginin durchgeführt wurde (Abschn. 4.1.1.6; Abb. 15). Die Änderung der Struktur von Merlin 1 durch MBP erfolgte sehr wahrscheinlich durch Verringerung der unspezifischen Aggregation von Merlin 1 und der damit verbundenen verringerten Bildung von Einschlusskörperchen. Die Stabilität von MBP-Merlin 1 reichte aus, um das Fusionsprotein über den His-*tag* von MBP reinigen zu können (Abschn. 4.1.1.8; Abb. 17). Über die integrierte TEV-Schnittstelle sollte der MBP-*tag* nach der Reinigung entfernt werden. Die eigentliche Proteolyse funktionierte problemlos (Abschn. 4.1.1.9; Abb. 18). Interessanterweise blieb Merlin 1 stabil, solange MBP in der umgebenden Lösung vorhanden war. Der Versuch, MBP über chromatographische Verfahren aus der Lösung zu entfernen, führte zur sofortigen Präzipitation von Merlin 1. Weil die Trennung des MBP-*tag* von Merlin 1 unter den

gegebenen Bedingungen nicht möglich war, wurden im späteren Verlauf der vorliegenden Arbeit einige Versuche mit dem Fusionsprotein durchgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Da die Expression von löslichem Merlin 1 in *E. coli* unter den untersuchten Bedingungen nur in sehr geringem Maße möglich war, wurden auch 2 eukaryote Zelllinien als potentielle Expressionsysteme getestet (Ergebnisse nicht gezeigt). Dazu gehörten *Sf*9-Insektenzellen und COS7-Zellen. In beiden Zelllinien konnte lösliches Merlin 1 exprimiert werden, anschließende Reinigungsschritte führten allerdings zur Präzipitation des Proteins. Die Tatsache, dass Merlin 1 in diesen Fällen erst während der Reinigung verloren ging, spricht entweder dafür, dass Merlin 1 voller Länge auf Kofaktoren wie andere Proteine oder Metallionen angewiesen ist oder dass andere besondere Umgebungsbedingungen gewährleistet sein müssen, die für den Erhalt der Löslichkeit erforderlich sind. Ein Beispiel für solche Proteine sind die Rho-GTPasen, die Magnesiumionen als Kofaktor brauchen, um eine hochaffine Nukleotidbindung aufrechtzuerhalten (Vetter und Wittinghofer, 2001; Pan und Wessling-Resnick, 1998). Bei Entfernung von Magnesiumionen kommt es zu konformationellen Änderungen innerhalb der Rho-GTPase, die zur Dissoziation des Nukleotids und zu einer anschließenden Denaturierung des Proteins führen (Shimizu *et al*., 2000; Pan und Wessling-Resnick, 1998). Es wäre auch denkbar, dass Merlin 1 für seine Faltung spezielle Chaperone benötigt, die in *E. coli* nicht oder nur in einer sehr geringen Anzahl vorkommen. So konnte die Arbeitsgruppe um Yan zeigen, dass die Koexpression der Chaperone GroEL und GroES in Kombination mit humanem Interferon-γ in *E. coli* zu einer gesteigerten Löslichkeit und Aktivität des rekombinanten Proteins führt (Yan *et al*., 2012). Versuche der eigenen Arbeitsgruppe, bei denen GroEL und GroES zusammen mit Merlin 1 in *E. coli* exprimiert wurden, zeigten keinen Einfluss auf die Löslichkeit von Merlin 1 (Ergebnisse nicht gezeigt). Der wahrscheinlichste Grund besteht darin, dass Merlin 1 mit seinen rund 66 kDa die maximale Proteingröße übersteigt, die durch GroEL und GroES noch gefaltet werden kann. Diese liegt bei etwa 57 kDa (Sakikawa *et al*., 1999).

Aufgrund der schlechten Löslichkeit von Merlin 1 sind viele Arbeitsgruppen dazu übergegangen, mit verkürzten Varianten, wie der FERM-Domäne (Aminosäuren 1 bis *ca.* 340) von Merlin, zu arbeiten. Dabei geht man davon aus, dass viele Funktionen von Merlin 1 über dessen FERM-Domäne vermittelt werden und helikale sowie carboxyterminale Anteile eher regulatorische Aufgaben wahrnehmen (LaJeunesse *et al*., 1998; Lallemand *et*

al., 2009a; Kim *et al*., 2002; Li *et al*., 2010). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Versuche mit den FERM-Domänen von Merlin, Ezrin und Radixin durchgeführt. Im Gegensatz zur Expression von Merlin 1 in voller Länge konnte dessen FERM-Domäne unter normalen Bedingungen in ausreichender Menge als lösliches Protein exprimiert und gereinigt werden (Abschn. 4.1.2.1; Abb. 19). Darüber hinaus haben wir festgestellt, dass die zusätzliche Verwendung von Arginin zu einer maßgeblichen Verbesserung der Ausbeute und der Stabilität von Merlin-FERM führt (Abschn. 4.1.2.2; Abb. 20). Die Herstellung von RhoGDIα mit Hilfe unterschiedlicher Verfahren ist bereits mehrfach in der Literatur beschrieben worden und auch in der eigenen Arbeitsgruppe gut etabliert (Ueda *et al*., 1990; Scheffzek *et al*., 2000).

Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Inaktivierung der FERM-Domänen anderer Protein-4.1-Familienmitglieder durch Heterodimerisierung mit der FERM-Domäne von Merlin möglich ist, wurden Interaktionsstudien mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie durchgeführt. In bisherigen Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass verschiedene FERM-Proteine *head-to-tail*-, bzw. C-Term-N-Term-Heterodimere ausbilden können (Grönholm *et al*., 1999). Die Arbeitsgruppe um Gutmann konnte jedoch auch Interaktionen zwischen Anteilen der FERM-Domäne von Merlin und der kompletten FERM-Domäne von Radixin nachweisen (Gutmann *et al*., 1998). Da es widersprüchliche Aussagen bezüglich der Homo- bzw. Heterodimerisierung der FERM-Domänen in der Literatur gibt, sollte getestet werden, ob die FERM-Domänen von Merlin und Radixin unter den gegebenen Versuchsbedingungen Heterdimere ausbilden können. Dazu wurde Merlin-FERM über Antikörper an die Dextranmatrix eines Sensorchips gekoppelt und Radixin-FERM anschließend in der mobilen Phase über die Sensorchipoberfläche geleitet (Abschn. 4.2.4.2; Abb. 40 und 41). Bei der Auswertung der Messergebnisse fiel auf, dass sich die Interaktion beider Proteine nicht durch ein 1:1 Bindungsmodell beschreiben ließ. Besonders im Bereich der Assoziation ließen sich unterschiedliche Reaktionskinetiken feststellen. Zu Anfang zeigte sich eine langsame Interaktion beider FERM-Domänen, die im Laufe der Injektionszeit überproportional zunahm. Besonders deutlich wurde dieser Effekt an der Kurve sichtbar, die für die Injektion von Radixin-FERM in einer Konzentration von 75 nM erhalten wurde. Sehr wahrscheinlich kam es hier nicht nur zu einer Heterodimerisierung der Proteine sondern ebenfalls zu einer Aggregation von Radixin-FERM. Ausgehend von einer 1:1 Interaktion beider Proteine ergaben die Berechnungen, dass der mit Merlin-FERM

beladene Sensorchip maximal etwa 450 RU Radixin-FERM binden konnte. Die Tatsachen, dass die theoretisch maximale Bindungskapazität durch die Injektion von 600 nM Radixin-FERM weit überschritten wurde und kein Anzeichen einer Absättigung des Chips ersichtlich war, sprechen ebenfalls für eine Aggregation von Radixin-FERM.

Auch wenn sich die Interaktion der FERM-Domänen von Merlin und Radixin nicht durch ein einfaches Bindungsmodell beschreiben lässt, so bleibt doch festzuhalten, dass beide Proteine Heterodimere ausbilden konnten. Folglich scheint es zusätzlich zu der aus der Literatur bekannten *head-to-tail*- bzw. C-Term-N-Term-Heterodimerisierung auch eine *head-to-head*-Dimerisierung zu geben. Möglich wäre also, dass Merlin als Gegenspieler von Radixin in die Aktivierung der Rho-GTPasen eingreift, indem es Heterodimere mit diesem FERM-Protein ausbildet und dadurch dessen Interaktion mit RhoGDIs oder RhoGEFs unterbindet.

Vorversuche der eigenen Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass die Verwendung von Merlin-FERM als Analyt in der löslichen Phase, genau wie Radixin-FERM, keine Absättigung der Bindungsstellen des Liganden (RhoGDIα) zur Folge hatte, selbst wenn Merlin-FERM in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt wurde. Zusätzlich wurden Effekte beobachtet, die nicht über ein 1:1-Bindungsmodell zu erklären waren. Hierzu gehörten jeweils zwei unterschiedliche Reaktionskinetiken während der Assoziations- und Dissoziationsphase. In diesem Zusammenhang wäre gut denkbar, dass Merlin-FERM sowohl als Dimer als auch als Monomer an RhoGDIα binden kann oder dass es zu einer Aggregation von Merlin-FERM kommt. Um eine mögliche Dimerisierung oder Aggregation von Merlin-FERM während der Messung möglichst gering zu halten, wurde Merlin-FERM nicht als frei beweglicher Analyt, sondern als immobilisierter Ligand eingesetzt. Da direkte Immobilisierungsmethoden über Amino- bzw. Thiolgruppen kein bindungsaktives Protein hervorbrachten, wurde eine indirekte Immobilisierung über spezielle Antikörper durchgeführt (Abschn. 4.2.2.1.; Abb. 33 und 34). Für die Interaktion von Merlin-FERM und RhoGDIα konnte eine K_D von 277 nM ermittelt werden (Abschn. 4.2.2.2; Tab. 3). Interessanterweise stimmte dieser Wert mit den Ergebnissen überein, die mit einer gänzlich anderen Meßmethode, nämlich durch Immunpräzipitation, erhoben worden waren. Hier wurde ein K_D-Wert von *ca*. 200 nM beschrieben (Maeda *et al*., 1999). Betrachtet man die für die Interaktion zwischen RhoGDIα und Merlin-FERM erhaltenen Bindungskurven, so fällt auf, dass die Assoziations- und Dissoziationsphasen für die beiden niedrigsten

Konzentrationen jeweils nur mit einer Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation beschrieben werden können (Abschn. 4.2.2.2; Abb. 36). Bei höheren RhoGDIα-Konzentrationen ergeben sich Abweichungen vom 1:1-Langmuir-Bindungsmodell. Besonders auffällig war der schnellere Abfall der Kurve des zugrundegelegten Bindungsmodells im Vergleich zu den experimentell erhaltenen Kurven während der Dissoziationsphase. Dieser Effekt könnte durch erneute Bindung von RhoGDIα an Merlin-FERM zu erklären sein, was im verwendeten Bindungs-Modell nur bedingt berücksichtigt wird (BIAapplications Handbook, 1998; Biacore 2000 Instrument Handbook, 1999). Um diesem Effekt entgegenzuwirken, wurden höhere Flussraten und niedrigere Immobilisierungsgrade verwendet. Dieses Vorgehen war jedoch nur bei niedrigen Analytenkonzentrationen erfolgreich. Aus diesem Grund wäre gut denkbar, dass die nicht konstante Dissoziation durch eine Dimerisierung von Merlin-FERM auf dem Sensorchip und damit durch eine veränderte Reaktionskinetik verursacht wurde. Trotz der direkten oder indirekten Immobilisierung von Merlin-FERM an die Dextranmatrix ist eine "horizontale" Dimerisierung des Proteins an der Oberfläche des Sensorchips nicht völlig ausgeschlossen, da die Dextranmatrix eines CM5-Sensorchips sehr flexibel angeordnet ist und den immobilisierten Proteinen Bewegungsfreiheit bietet (Biacore Application Note, 2001). So konnte für einige Rezeptoren, die nur in dimerisierter Form aktiv sind, gezeigt werden, dass eine Immobilisierung der Rezeptoren in monomerer Form eine Rezeptoraktivierung nicht ausschließt.

Auch bei der Interaktion von RhoGDIα und Ezrin-FERM konnten Abweichungen zwischen den experimentellen Daten und dem zugrunde gelegten Bindungsmodell erkannt werden (Abschn. 4.2.3.2; Abb. 39). Diese Abweichungen zeigten jedoch eine wesentlich schwächere Ausprägung als bei der Interaktion von RhoGDIα mit Merlin-FERM. Möglicherweise gab es auch im Falle von Ezrin-FERM eine Art *rebinding*-Effekt. Einer Phase mit hoher Dissoziationsgeschwindigkeit schloss sich nämlich ein Bereich mit langsamer Dissoziation des RhoGDIα-Ezrin-FERM-Komplexes an. Die Auswertungen ergaben, dass RhoGDIα und Ezrin-FERM mit einer K_D von 1152 nM interagierten. Die Affinität zwischen Merlin-FERM und RhoGDIα war daher etwa 4-mal höher als die zwischen Ezrin-FERM und RhoGDIα. Für die FERM-Domäne von Radixin wurde ebenfalls eine Interaktion mit RhoGDIα beschrieben (Takahashi *et al.*, 1997). Die K_D lag in diesem Fall bei 600 nM. Die Affinitäten der einzelnen FERM-Domänen verschiedener

FERM-Proteine zu RhoGDIα liegen folglich nah beieinander. Die hochkonservierte Aminosäuresequenz und damit dreidimensionale Struktur der FERM-Proteine könnte ein Grund dafür sein. Radixin und Ezrin voller Länge zeigen Sequenzübereinstimmungen in 75 % ihrer Aminosäuren, während ihre FERM-Domänen in 85 % übereinstimmen (Funayama *et al.*, 1991). Die FERM-Domäne von Merlin stimmt in etwa 50 % ihrer Aminosäuren mit denen der FERM-Domänen anderer FERM-Proteine, z.B. Talin, Ezrin, Radixin und Moesin, überein (Tikoo *et al.*, 1994).

Unter Verwendung von Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie konnte in der vorliegenden Arbeit keine Interaktionen zwischen MBP-Merlin 1 und RhoGDIα bzw. Merlin-FERM nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine Homodimerisierung von MBP-Merlin 1 konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Tatsache, dass Merlin 1 in Verbindung mit MBP keine Interaktion mit bekannten Interaktionspartnern zeigte, führte uns zu der Annahme, dass die Fusion beider Proteine bestimmte Bindungsmotive innerhalb von Merlin 1 verdeckt oder eine Strukturänderung in Merlin 1 zur Folge hat, die diese Bindungsmotive zerstört. Für andere Proteine wurde bereits beschrieben, dass die Fusion mit Löslichkeits-*tags*, wie MBP, zu einer ausgeprägten Strukturänderung der Proteine und damit manchmal auch zu einem Verlust der Proteinfunktion führt (Kapust und Waugh, 2000; Fox und Waugh 2003).

Ein zentraler Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Merlin 1 bzw. Merlin-FERM auf die Signalweiterleitung verschiedener Rho-GTPasen. Zur Klärung dieser Frage wurden weitere Biacore-Analysen durchgeführt. Zu Beginn wurde die Interaktion zwischen Rac2 und RhoGDIα analysiert (Abschn. 4.2.1.2; Abb. 31 und 32). Unter den verwendeten Bedingungen wurde für die Interaktion beider Proteine eine K_D von etwa 490 nM ermittelt (Abschn. 4.2.1.2; Tab 2). Anschließend wurden zum ersten Mal Rac2, RhoGDIα und Merlin-FERM in Kombination untersucht. Dazu wurden Merlin-FERM immobilisiert und steigende Konzentrationen von Rac2 mit RhoGDIα über den Sensorchip gegeben (Abschn. 4.2.5; Abb. 42). Dabei stellte sich heraus, dass die FERM-Bindung von RhoGDIα, das mit steigenden Rac2-Konzentrationen vorinkubiert worden war, abnahm. Dieser wichtige Befund zeigt, dass die Heterodimerisierung von Rac2 und RhoGDIα mit der Bindung zwischen RhoGDIα und Merlin-FERM interferiert und dass es dementsprechend nicht zur Bildung eines ternären Komplexes aus den drei Proteinen kommt. Die Anwendung eines standardisierten Bindungsmodells, das Rac2, RhoGDIα und

Merlin-FERM in einem Diagramm zusammenfasst, wäre aufgrund der fehlenden Bildung eines ternären Komplexes nicht angezeigt. Wreggett und De Léan entwickelten solche Bindungsmodelle für Sieben-Transmembran-Rezeptoren, um damit mögliche Bindungsvarianten zu demonstrieren (*ternary complex model*; Wreggett und De Léan, 1984). Wir gehen stattdessen davon aus, dass die Bildung des Rac2-RhoGDIα-Komplexes bevorzugt wird und Merlin-FERM ungebunden zurückbleibt. Dabei wäre es denkbar, dass die Merlin-FERM-Bindungsstelle von RhoGDIα durch dessen Bindung an Rac2 verdeckt wird oder es zu strukturellen Änderungen innerhalb von RhoGDIα kommt, die eine Bindung an Merlin-FERM verhindern.

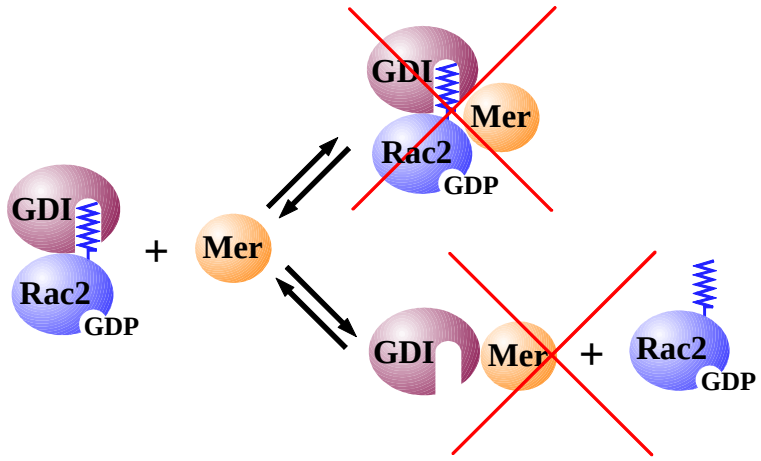


Abb. 51: Modell der Interaktionen zwischen Merlin-FERM (Mer), RhoGDIα (GDI) und Rac2. Der Komplex aus Rac2 und RhoGDIα wird durch die Gegenwart von Merlin-FERM nicht beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit konnte weder die Ausbildung eines ternären Komplexes noch eine Dissoziation der RhoGDIα-Rac2-Interaktion durch die Zugabe von Merlin-FERM beobachtet werden. Merlin = *moesin-ezrin-radixin-like protein*; FERM = *four point one, ezrin, radixin, moesin*; RhoGDIα = *Rho GDP dissociation inhibitor α*; Rac2 = *ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*; GDP = Guanosin-5´-diphosphat.

Bisher gibt es eine Veröffentlichung, in der ein direkter Zusammenhang zwischen den verschiedenen Rho-GTPasen, RhoGDIα und den FERM-Proteinen dargestellt werden konnte. Die Arbeitsgruppe um Takahashi konnte mittels GDP-Freisetzungs- und GTPγS-Bindungsversuchen zeigen, dass die direkte Interaktion der FERM-Domäne von Radixin mit RhoGDIα zu einer Aktivierung der Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 führt (Takahashi *et al.*, 1997). Es ist bekannt, dass die Aktivierung der kleinen Rho-GTPasen Rac2 und Cdc42 durch RhoGDIα gehemmt werden kann (Scheffzek *et al.*, 2000). Eine direkte Funktion von Merlin in Bezug auf den Guaninnukleotidaustausch von Rho-GTPasen konnte bisher nicht gezeigt werden (Maeda *et al.*, 1999).

Die Tatsache, dass, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, keine Trimerbildung zwischen Rac2, RhoGDIα und Merlin-FERM zu Stande kommt, wäre auch eine potentielle Erklärung dafür, dass in radioaktiven GTPγS-Bindungsversuchen keine Funktion von Merlin-FERM nachgewiesen werden konnte. Der Zusatz von Merlin-FERM zu dem Komplex aus RhoGDIα und Cdc42 führte weder zu einer Verstärkung noch Abschwächung des inhibitorischen Effekts von RhoGDIα auf die GTPγS-Bindung an Cdc42 (Abschn. 4.3.3; Abb. 45). Dieser Versuch wurde auch mit Rac2 durchgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt). Auch hier zeigte Merlin-FERM keinen Effekt. Zusätzlich wurde der Einfluss von MBP-Merlin 1 auf die GTPγS-Bindung an Cdc42 getestet. Leider zeigten Kontrollversuche, dass MBP bereits alleine in der Lage war, den GDP/GTP-Austausch der Rho-GTPase zu stimulieren (Ergebnisse nicht gezeigt).

In Zusammenhang mit der Funktion von Merlin wurde eine mögliche Rolle beim Proteintransport beschrieben. In HUVECs führte die Expression einer inaktiven Merlin-Mutante zu einer verstärkten Translokation der Rho-GTPase Rac1 an die Plasmamembran (Okada *et al*., 2005). Um einen möglichen direkten Effekt von Merlin-FERM auf die Translokation von Rac2 zu untersuchen, wurde die Membrantranslokation von Rac2 *in vitro* in An- und Abwesenheit von RhoGDIα untersucht (Abschn. 4.4.2.3; Abb. 49). Für die Membrantranslokation ist die Isoprenylierung der Rho-GTPasen unabdingbar, da diese über den Isoprenanker in die Membranen eingebaut werden (Scheffzek *et al*., 2000; Kinsella *et al*., 1991). Sowohl modifiziertes Rac2 aus *Sf*9-Zellen als auch nachträglich *in vitro* modifiziertes Rac2 aus *E. coli* interagierten mit nativen Zellmembranen aus unbehandelten *Sf*9-Zellen (Abschn. 4.4.2.1 und 4.4.2.2; Abb. 47 bzw. 48). Im Gegensatz dazu zeigten beide modifizierten Rac2-Spezies keine Interaktionen mit künstlichen Liposomen (Abschn. 4.4.1; Abb. 46). Ein Grund hierfür könnte darin bestehen, dass die Lipidzusammensetzung der Liposomen oder ihre physikalischen Eigenschaften nicht optimal waren.

In der Literatur wurde beschrieben, dass RhoGDIs in der Lage sind, den hydrophoben Isoprenanker der Rho-GTPasen abzuschirmen und diese dadurch in ihrer inaktiven Form im Zytosol zu halten (Scheffzek *et al*., 2000). Sie verhindern damit gleichzeitig die Aktivierung der Rho-GTPasen, beispielsweise durch Rho-GEFs (Kikuchi *et al*., 1992). Versuche der eigenen Arbeitsgruppe zeigten deutlich, dass der membranäre Anteil an Rac2 durch die Zugabe von steigenden Mengen an RhoGDIα verringert werden kann (Abschn.

4.4.2.3; Abb. 49). Der Zusatz von Merlin-FERM zu Rac2 alleine oder in Kombination mit RhoGDIα zeigte jedoch keinen Effekt (Abschn. 4.4.2.4; Abb. 50). Weder eine Zunahme von Rac2 in den nativen Membranpräparationen noch eine Abnahme konnte beobachtet werden. Zu bedenken ist hierbei, dass die Vorinkubation der drei Proteine in unterschiedlichen Versuchsreihen variiert wurde. Auch wenn RhoGDIα mit Merlin-FERM vorinkubiert und anschließend Rac2 zugegeben wurde, hatte RhoGDIα den gleichen inhibitorischen Einfluss auf die Translokation von Rac2 wie in den Versuchen ohne Merlin (Ergebnisse nicht gezeigt). Der in Lösung gebildete RhoGDIα-Merlin-FERM-Komplex wird wahrscheinlich durch die Zugabe von Rac2 getrennt, wobei Rac2 mit RhoGDIα interagiert und Merlin-FERM in mono- oder dimerer Form zurückbleibt. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Biacore-Analysen, bei denen zu erkennen war, dass Rac2 offensichtlich bevorzugt mit RhoGDIα interagiert, wenn RhoGDIα und Merlin-FERM als Interaktionspartner angeboten werden. Diese Versuche wurden auch unter Verwendung von MBP-Merlin 1 durchgeführt, wobei sich ebenfalls kein Einfluss auf die Translokation der Rho-GTPasen Rac2 und Cdc42 nachweisen ließ (Ergebnisse nicht gezeigt).

Es ist fraglich, ob Merlin seine tumorsuppressiven Eigenschaften direkt über die Rho-GTPasen weitergibt oder über Zwischenstufen in Rho-GTPase-gekoppelte Signalwege eingreift. Denkbar wären hier die Rho-GEFs oder Rho-GAPs als Zielproteine. In der Tat wurden einige dieser wichtigen Regulatorproteine der Rho-GTPasen als Interaktionspartner für FERM-Proteine erfasst. So wurde für Dbl eine Interaktion mit der FERM-Domäne von Radixin beschrieben (Takahashi *et al*., 1998). Es konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, welchen Einfluss dieser Komplex aus beiden Proteinen auf die Aktivierung und Signalweiterleitung der Rho-GTPasen hat. Interessant ist die Tatsache, dass Rho-GEFs mit einer FERM-Domäne gefunden wurden. Zu diesen gehört beispielsweise das Protein FIR (*FERM-domain-including Rho-GEF*; Diakowski *et al*., 2006). Auch hieraus lässt sich schlussfolgern, dass FERM-Proteine und Rho-GTPase-regulierte Signalwege miteinander gekoppelt sind.

Weiterhin wären indirekte Vorgänge bei der Regulation der Rho-GTPasen durch Merlin denkbar. So konnte die Arbeitsgruppe um Okada zeigen, dass die Rekrutierung von Rac1 an die Matrix-Adhäsionen der Zellmembranen von HUVECs durch die Expression einer inaktiven Merlin-Mutante gesteigert werden konnte. In diesem Zusammenhang wird davon ausgegangen, dass PAK die Translokation von Rac1 über die Phosphorylierung und die

damit verbundene Inaktivierung von Merlin steuert (Okada *et al.*, 2005). In umgekehrter Weise konnte gezeigt werden, dass Merlin PAK1 inhibieren kann (Hirokawa *et al*., 2004). Die Fragen, welche molekularen Mechanismen hinter diesen Vorgängen stehen und welche Aufgaben Merlin dabei übernimmt, konnten bisher nicht geklärt werden. Es ist jedoch bekannt, dass Merlin mit Paxillin, einem wichtigen Protein des Integrinnetzwerks, interagiert (Fernandez-Valle *et al*., 2002). Paxillin und PKL (*paxillin kinase linker*) agieren zusammen als eine Art Gerüst, das für die Rekrutierung von PAK und PIX (*PAK-interacting exchange factor*; ein GEF für Rac) an fokale Komplexe verantwortlich ist. Es besteht die Möglichkeit, dass Merlin die Rekrutierung und Aktivierung von Rac über den Paxillin-PKL-PIX-Komplex steuert, bis Merlin durch PAK phosphoryliert und damit inaktiviert wird (Okada *et al.*, 2005). Bezüglich dessen konnte ebenso gezeigt werden, dass RhoGDI durch PAK phosphoryliert werden kann und nach der Phosphorylierung von Rac dissoziiert (DerMardirossian *et al*., 2004). Interessanterweise konnte für viele Tumorarten eine gesteigerte Aktivität von PAK nachgewiesen werden, z.B. im Falle einiger Eierstock-, Brust- und Darmkrebsvarianten (Bekri *et al*., 1997; Schraml *et al*., 2003; Balasenthil *et al*., 2004; Carter *et al*., 2004). Zudem konnte für eine andere PAK-Isoform, PAK4, eine Überexpression in verschiedenen Karzinomzelllinien gezeigt werden (Callow *et al*., 2002). In der Tat werden im Moment Studien mit PAK-Inhibitoren durchgeführt, die in Zellkultur und im Mausmodell das Wachstum von Tumorzellen beeinflussen können (Maruta, 2011).

Bisher ist man sich nicht über die direkten molekularen Mechanismen im Klaren, die hinter den tumorsuppressiven Eigenschaften von Merlin 1 stehen. Ergebnisse der eigenen Arbeit haben zwar gezeigt, dass die FERM-Domäne von Merlin mit RhoGDIα interagieren kann, ein direkter Einfluss von Merlin-FERM auf die Interaktionen von RhoGDIα mit den Rho-GTPasen Rac2 und Cdc42 war in unseren Untersuchungen allerdings nicht ersichtlich. Welche Relevanz die *in vitro* beobachtete Interaktion der FERM-Domäne von Merlin mit RhoGDIα *in vivo* hat, ist unklar. Die Arbeitsgruppe um Boulter konnte zeigen, dass die korrekte Faltung und Stabilität der Rho-GTPasen durch RhoGDIs beeinflusst wird (Boulter *et al*., 2010). Durch die Interaktion der FERM-Domäne von Merlin mit RhoGDIα könnte folglich die (sub)zelluläre Verfügbarkeit von freiem RhoGDIα und damit die Stabilität von freiem Rac2 kontrolliert werden. Fraglich ist, ob es eine direkte Interaktion von Merlin 1 voller Länge und RhoGDIα sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gibt und welche Auswirkungen sie auf die Signalweiterleitung verschiedener Rho-GTPasen haben könnte. Eine solche Interaktion konnte bisher nicht beobachtet werden (Maeda *et al.*, 1999).

Möglicherweise ist die Bindungsstelle für RhoGDIα in Merlin 1 voller Länge durch die intramolekulare *head-to-tail* Interaktion von Merlin 1 verdeckt. Interessanterweise ist Merlin 2 voller Länge in der Lage, mit RhoGDIα zu interagieren (Maeda *et al.*, 1999). Die Arbeitsgruppe um Sherman konnte zeigen, dass Merlin 2 nicht fähig ist, die geschlossene Konformation von Merlin 1 einzunehmen, weshalb die Bindungsstelle für RhoGDIα in Merlin 2 sehr wahrscheinlich nicht verdeckt wird (Sherman *et al.*, 1997).

Die meisten *in vitro* Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen beziehen sich auf die Entdeckung neuer Interaktionspartner von Merlin, um damit Rückschlüsse auf mögliche Funktionen von Merlin ziehen zu können. Als problematisch erweist sich hierbei die Tatsache, dass viele Interaktionen nur für die FERM-Domäne von Merlin beschrieben wurden, nicht jedoch für Merlin 1 in kompletter Länge (Nguyen *et al*., 2001; Mani *et al*., 2011). Es bleibt unklar, ob es wirklich zu Interaktionen von Merlin 1 voller Länge und den getesteten Proteinen kommt und ob diese physiologisch relevant sind. Die Expression und Reinigung von Merlin 1 voller Länge wird folglich weiterhin ein großes Ziel sein, um die Funktionsweise dieses Proteins *in vivo* und *in vitro* untersuchen zu können.

Eigene Untersuchungen zeigten, dass Merlin-FERM und auch MBP-Merlin 1 sehr stark mit nativen Zellmembranen assoziieren. Es wäre also durchaus denkbar, dass das Volle-Länge-Protein Merlin 1 in Gegenwart von Zellmembranen eine höhere Stabilität aufweist. Auch in der Literatur wurde beschrieben, dass ein Großteil von endogenem Merlin 1 membranassoziiert vorliegt (Sainio *et al*., 1997; Mani *et al*., 2011). Daher bietet es sich an, zukünftig Versuche zu unternehmen, bei denen Merlin 1 in eukaryoten Zellen exprimiert und anschließend im Beisein von eukaryoten Membranen oder Membranfragmenten gereinigt wird.

Eine weitere Option könnte die Verwendung komplexerer Expressionssysteme darstellen. Viele Arbeitsgruppen sind mittlerweile dazu übergegangen, Hefen, wie *Pichia pastoris,* als Expressionssysteme zu verwenden, da diese artfremde Proteine in hohen Mengen produzieren können und zudem in der Lage sind, viele posttranslationale Modifikationen durchzuführen, die in eukaryotischen Organismen vorkommen (Cereghino und Cregg, 2000). Andere Zelllinien würden sich dabei ebenfalls als Expressionssysteme anbieten. Die Arbeitsgruppe um Maeda untersuchte die Löslichkeit von Merlin 1 in zwei verschiedenen Zelllinien, wobei unter bestimmten Lysebedingungen ein deutlicher Anteil löslichen

Materials in beiden Zelllinien gesehen werden konnte (Maeda *et al.*, 1999). Eine weiterführende Reinigung wurde allerdings nicht durchgeführt. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass die Verwendung von Insektenzellen als Expressionssystem zwar lösliches Merlin 1 hervorbrachte, dieses jedoch bei anschließenden Reinigungsschritten präzipitierte. Deshalb wäre es möglich, Kofaktoren zu untersuchen, die die Stabilität von Merlin 1 verbessern könnten.

Des Weiteren wäre die Untersuchung zusätzlicher, in der vorliegenden Arbeit noch nicht analysierter Löslichkeits-*tags* von großem Interesse, da hier gezeigt werden konnte, dass die Fusion von Merlin 1 und MBP lösliches Material hervorbrachte. Ungeachtet der Tatsache, dass in den eigenen Versuchen keine Funktion des Fusionsproteins beobachtet werden konnte, besteht durchaus die Möglichkeit, dass MBP-Merlin 1 unter anderen Versuchsbedingungen Aktivität, hinsichtlich einer möglichen Bindung oder Regulation, aufweist. Die gute lösliche Ausbeute und mögliche Reinigung des Fusionsproteins aus Merlin 1 und MBP wären dabei eine wertvolle Basis für weitere Experimente.

Denkbar wäre auch die Untersuchung von homologen Merlin-Varianten in anderen Spezies. Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Bretscher zeigten, dass die FERM-Domänen verschiedener FERM-homologer Proteine aus unterschiedlichen Organismen sehr hohe Ähnlichkeiten in ihren Aminosäuresequenzen aufweisen (Bretscher *et al.*, 2002). Um die Funktionsweisen der FERM-Proteine, wie Merlin, genauer verstehen zu können, wurden bis zum heutigen Tage zahlreiche Untersuchungen in *Drosophila melanogaster* durchgeführt. Auf diesem Wege konnte gezeigt werden, dass das *Drosophila*-Merlin-Homolog eine äußerst wichtige Rolle bei der Kontrolle der Zellproliferation in *Drosophila* übernimmt (LaJeunesse *et al.*, 1998).

Untersuchungen von Merlin 1 werden häufig unter Verwendung der beiden Merlin-Mutanten S518A und S518D durchgeführt (Shaw *et al.*, 2001). Die S518A-Mutante von Merlin 1 kann nicht phosphoryliert werden und ahmt somit die aktive Form von Merlin 1 nach, während die S518D-Mutante eine Phosphorylierung simuliert und folglich inaktiv ist. Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass die Löslichkeit beider Merlin-Mutanten etwa der von wildtypischem Merlin 1 entspricht. Aufgrund dessen ist eine Untersuchung dieser beiden Merlin-1-Mutanten unter *in vitro* Bedingungen nur schwer durchführbar. Man geht mittlerweile davon aus, dass Merlin 1 nicht nur zwischen

offener und geschlossener Konformation wechseln kann, sondern dass es sogar verschiedene Öffnungsgrade einnimmt und damit wie ein Widerstandsregler verschiedenen Aufgaben nachgehen kann (Sher *et al*., 2012). Dennoch könnte auch hier die Herstellung der beiden Merlin-1-Mutanten S518A und S518D in einer löslichen Form eine gute Ausgangsbasis für weitere *in vitro* Untersuchungen liefern.

Viele der in den letzten Jahren untersuchten Behandlungsmöglichkeiten für NF2 stehen in direktem Zusammenhang mit der Entdeckung potentieller Funktionen des Tumorsuppressorproteins Merlin. So wäre die Behandlung der NF2 durch EGFR-Inhibitoren denkbar, da in verschiedenen Zellarten gezeigt werden konnte, dass eine inaktive Merlin-Mutante zu einer gesteigerten Signalweiterleitung dieser Wachstumsrezeptoren führt (Curto *et al*., 2007). Für zwei andere Klassen von Wachstumsrezeptoren (IGFR, *insulin-like growth factor receptor*; PDGFR) wurde ebenfalls eine verstärkte Expression in Schwannomzellen beschrieben (Ammoun *et al*., 2008; Ammoun *et al*., 2012). Mit Hilfe von Inhibitoren beider Rezeptorklassen bzw. derer Signalwege konnte auch hier die Proliferation der Schwannomzellen gehemmt werden. Die PDGFR-Inhibitoren Sorafenib und Nilotinib befinden sich derzeit in klinischen Studien, um deren Effektivität bei der Behandlung von NF2 zu untersuchen. Mit der erhöhten Expression von Wachstumsrezeptoren in Schwannomzellen weisen folglich auch die den Rezeptoren nachgeschalteten Signalwege eine erhöhte Aktivität auf (Ammoun *et al*., 2011). Aus diesem Grund könnte die Hemmung dieser Signalwege ein potentieller Angriffspunkt für die Behandlung der NF2 sein. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von ERK 1/2 und PKB durch Imatinib und Nilotinib zu einer verringerten Schwannomzellproliferation führte (Ammoun *et al*., 2011).

Einen anderen Ansatz zur Behandlung von NF2 verfolgte die Arbeitsgruppe um Yang (Yang *et al*., 2011). Diese konnte nachweisen, dass bestimmte mutierte Formen des Merlin-Proteins schneller degradiert werden und damit verringerte Halbwertszeiten aufweisen. Die Behandlung von Meningeomzellen mit Proteolyseinhibitoren, wie Celastrol, führte zu einer verlängerten Halbwertszeit von Merlin und damit zu einer verringerten Zellproliferation. Neueste Untersuchungen zeigten, dass Merlin eine wichtige Rolle bei der Regulation der Angiogenese von Schwannzellen einnimmt, indem es die Expression antiangiogener Faktoren, wie Semaphorin3F, über verschiedene

Zwischenstufen steuert (Wong *et al.*, 2012). Die verstärkte Expression antiangiogener Faktoren könnte folglich eine Behandlungsoption für NF2 darstellen.

Die Ergebnisse der eigenen Arbeit zeigten keine direkte funktionelle Verbindung zwischen den Rho-GTPasen Rac2 und Cdc42 sowie der FERM-Domäne von Merlin. Stattdessen wäre jedoch denkbar, dass Merlin 1 bzw. dessen FERM-Domäne als Gegenspieler von Radixin in die Aktivierung der Rho-GTPasen eingreift, indem es Heterodimere mit diesem FERM-Protein ausbildet und dadurch dessen Interaktion mit RhoGDIs oder Rho-GEFs unterbindet. Die Entwicklung von Inhibitoren für Rho-GTPase-aktivierende FERM-Proteine, wie Radixin, könnte folglich ein möglicher Ansatzpunkt für die Behandlung von NF2 sein. Die Aufklärung der Mechanismen, über die Merlin seine tumorsuppressiven Eigenschaften vermittelt, wird auch in Zukunft ein bedeutendes Ziel sein, um die Entstehung von NF2 genauer nachvollziehen und gezieltere Behandlungsmöglichkeiten entwickeln zu können.

.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob das in Zusammenhang mit der humanen Neurofibromatose Typ 2 stehende Tumorsuppressorprotein Merlin (*moesin-ezrin-radixin-like protein*) bzw. dessen FERM-Domäne (*four point one, ezrin, radixin, moesin*) die Aktivierung von Rho-GTPasen (Rho, *ras homolog*; GTP, Guanosin-5´-triphosphat) beeinflussen kann und, wenn ja, ob dies über direkte oder indirekte Mechanismen erfolgt. Um die funktionellen Beziehungen zwischen Merlin, anderen FERM-Proteinen, den Rho-GTPasen Rac2 (*ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*) und Cdc42 (*cell division cycle 42*) und ihrem Regulator RhoGDIα (*Rho GDP dissociation inhibitor α)* zu untersuchen, sollten Merlin 1 voller Länge sowie die FERM-Domänen von Merlin, Radixin und Ezrin in löslicher Form hergestellt werden. Unter den gegebenen Bedingungen konnten alle Proteine, außer Merlin 1 voller Länge, in löslicher Form als rekombinante Proteine exprimiert und anschließend gereinigt werden. Die Stabilisierung von Merlin 1 mit Arginin oder MBP (*maltose-binding protein*) brachte lösliches, aber kein funktionelles Protein hervor. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Experimente mit der für die Aktivität von Merlin besonders wichtigen FERM-Domäne durchgeführt. Zur Überprüfung einer der wesentlichen Hypothesen dieser Arbeit, dass die Inaktivierung der FERM-Domänen anderer Protein-4.1-Familienmitglieder durch Heterodimerisierung mit der FERM-Domäne von Merlin möglich ist, wurde untersucht, ob die FERM-Domänen von Merlin und Radixin Heterodimere ausbilden. Unter Verwendung der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie konnte eine deutliche Heterodimerisierung beider FERM-Domänen beobachtet werden. Folglich scheint es, zusätzlich zu der aus der Literatur bekannten *head-to-tail*- bzw. C-Term-N-Term-Heterodimerisierung, eine direkte *head-to-head*-Dimerisierung zu geben. Merlin könnte also als Gegenspieler von Radixin in die Aktivierung der Rho-GTPasen eingreifen, indem es Heterodimere mit diesem FERM-Protein ausbildet und dadurch dessen Interaktion mit RhoGDIs oder Rho-GEFs (*Rho-guanine nucleotide exchange factors*) unterbindet.

Ein zentraler Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Klärung der Frage, ob die FERM-Domäne von Merlin einen direkten Einfluss auf die Interaktion der Rho-GTPase Rac2 mit ihrem wichtigen Regulatorprotein RhoGDIα hat. Mit Hilfe von Interaktionsanalysen konnte gezeigt werden, dass RhoGDIα bevorzugt mit Rac2 interagierte, wenn die FERM-Domäne von Merlin und die Rho-GTPase gleichzeitig als mögliche Bindungspartner

angeboten wurden. Dieser wichtige Befund zeigt, dass die Heterodimerisierung von Rac2 und RhoGDIα mit der Bindung zwischen RhoGDIα und Merlin-FERM interferiert und es dementsprechend nicht zur Bildung eines ternären Komplexes aus den drei Proteinen kommt. Die Anwendung eines klassischen Ternärkomplex-Modells wäre in diesem Fall nicht angezeigt. Wir gehen stattdessen davon aus, dass die Bildung des Rac2-RhoGDIα-Komplexes bevorzugt wird und das Merlin-FERM ungebunden zurückbleibt. Dabei wäre es denkbar, dass die Merlin-FERM-Bindungsstelle von RhoGDIα durch dessen Bindung an Rac2 verdeckt wird oder es zu strukturellen Änderungen innerhalb von RhoGDIα kommt, die eine Bindung an Merlin-FERM verhindern.

Neben den Interaktionsanalysen wurden Versuche durchgeführt, bei denen ein möglicher, direkter Einfluss der FERM-Domäne von Merlin auf die Bindung von [^{35}S]GTPγS an die Rho-GTPase Cdc42 untersucht werden sollte. Die aus der Literatur bekannte Hemmung der [^{35}S]GTPγS-Bindung an Cdc42 durch RhoGDIα konnte in diesen Versuchen deutlich beobachtet werden. Der Zusatz der FERM-Domäne von Merlin zu dem Komplex aus RhoGDIα und Cdc42 führte zu keiner Veränderung des Einflusses von RhoGDIα auf die [^{35}S]GTPγS-Bindung an Cdc42.

Um einen möglichen, direkten Effekt der FERM-Domäne von Merlin auf die Translokation von Rac2 an native Zellmembranen zu untersuchen, wurden *in vitro* Translokationsversuche in An- und Abwesenheit von RhoGDIα durchgeführt. Diese zeigten sehr deutlich, dass der membranäre Anteil an Rac2 durch die Zugabe von steigenden Mengen an RhoGDIα verringert werden konnte. Der Zusatz von Merlin-FERM zu Rac2 alleine oder in Kombination mit RhoGDIα zeigte jedoch keinen Effekt.

Aufgrund der gewonnen Erkenntnisse gehen wir davon aus, dass die FERM-Domäne von Merlin die Inaktivierung der Rho-GTPasen Rac2 und Cdc42 wahrscheinlich nicht über die direkte Interaktion mit den Rho-GTPasen oder dem RhoGDI-Rho-Heterodimer steuert. Stattdessen wäre denkbar, dass Merlin 1 bzw. dessen FERM-Domäne die Aktivität dieser Rho-GTPasen über Interferenz mit den anderen FERM-Proteinen reguliert oder die (sub)zelluläre Verfügbarkeit von freiem RhoGDI und damit Stabilität von freiem Rac2 kontrolliert.

7 Literaturverzeichnis

1. **Ahmadian MR, Wittinghofer A, Herrmann C** (2002) Fluorescence methods in the study of small GTP-binding proteins. *Methods Mol Biol* **189**, 45-63

2. **Ahronowitz I, Xin W, Kiely R, Sims K, MacCollin M, Nunes FP** (2007) Mutational spectrum of the NF2 gene: a meta-analysis of 12 years of research and diagnostic laboratory findings. *Hum Mutat* **28**, 1-12

3. **Alblas J, Ulfman L, Hordijk P, Koenderman L** (2001) Activation of Rhoa and ROCK are essential for detachment of migrating leukocytes. *Mol Biol Cell* **12**, 2137-2145

4. **Alfthan K, Heiska L, Gronholm M, Renkema GH, Carpen O** (2004) Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates merlin at serine 518 independently of p21-activated kinase and promotes merlin-ezrin heterodimerization. *J Biol Chem* **279**, 18559-18566

5. **Ammoun S, Flaiz C, Ristic N, Schuldt J, Hanemann CO** (2008) Dissecting and targeting the growth factor-dependent and growth factor-independent extracellular signal-regulated kinase pathway in human schwannoma. *Cancer Res* **68**, 5236-5245

6. **Ammoun S, Schmid MC, Triner J, Manley P, Hanemann CO** (2011) Nilotinib alone or in combination with selumetinib is a drug candidate for neurofibromatosis type 2. *Neuro Oncol* **13**, 759-766

7. **Ammoun S, Schmid MC, Ristic N, Zhou L, Hilton D, Ercolano E, Carroll C, Hanemann CO** (2012) The role of insulin-like growth factors signaling in merlin-deficient human schwannomas. *Glia* **60**, 1721-1733

8. **Anand U, Jash C, Mukherjee S** (2011) Protein unfolding and subsequent refolding: a spectroscopic investigation. *Phys Chem Chem Phys* **13**, 20418-20426

9. **Arsène F, Tomoyasu T, Bukau B** (2000) The heat shock response of Escherichia coli. *Int J Food Microbiol* **55**, 3-9

10. **Balasenthil S, Barnes CJ, Rayala SK, Kumar R** (2004) Estrogen receptor activation at serine 305 is sufficient to upregulate cyclin D1 in breast cancer cells. *FEBS Lett* **567**, 243-247

11. **Baneyx F, Mujacic M** (2004) Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. *Nat Biotechnol* **22**, 1399-1408

12. **Baser ME, Evans DG, Jackler RK, Sujansky E, Rubenstein A** (2000) Neurofibromatosis 2, radiosurgery and malignant nervous system tumours. *Br J Cancer* **82**, 998

13. **Bekri S, Adelaide J, Merscher S, Grosgeorge J, Caroli-Bosc F, Perucca-Lostanlen D, Kelley PM, Pebusque MJ, Theillet C, Birnbaum D, Gaudray P** (1997) Detailed map of a region commonly amplified at 11q13-->q14 in human breast carcinoma. *Cytogenet Cell Genet* **79**, 125-131

14. **Bennett V** (1989) The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons. *Biochim Biophys Acta* **988**, 107-121

15. **Bernkopf DB, Williams ED** (2008) Potential role of EPB41L3 (protein 4.1B/Dal-1) as a target for treatment of advanced prostate cancer. *Expert Opin Ther Targets* **12**, 845-853

16. **Bhartur SG, Goldenring JR** (1998) Mapping of ezrin dimerization using yeast two-hybrid screening. *Biochem Biophys Res Commun* **243**, 874-877

17. **Biacore AB** (1998) Kinetic measurements. BIAapplications Handbook, 5-1 – 5-10

18. **Biacore AB** (1999) The kinetic analysis wizard. Biacore 2000 Instrument Handbook, 5-23 – 5-32

19. **Biacore AB Application note** (2001) Comparison of a structural and functional binding domain in human growth hormone

20. **Boguski MS, McCormick F** (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**, 643-654

21. **Bollag G, McCormick F** (1991) Differential regulation of rasGAP and neurofibromatosis gene product activities. *Nature* **351**, 576-579

22. **Boulter E, Garcia-Mata R, Guilluy C, Dubash A, Rossi G, Brennwald PJ, Burridge K** (2010) Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nat Cell Biol* **12**, 477-483

23. **Bretscher A, Gary R, Berryman M** (1995) Soluble ezrin purified from placenta exists as stable monomers and elongated dimers with masked C-terminal ezrin-radixin-moesin association domains. *Biochemistry* **34**, 16830-16837

24. **Bretscher A, Chambers D, Nguyen R, Reczek D** (2000) ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 113-143

25. **Bretscher A, Edwards K, Fehon RG** (2002) ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 586-599

26. **Bukau B** (1993) Regulation of the Escherichia coli heat-shock response. *Mol Microbiol* **9**, 671-680

27. **Cabrita LD, Dai W, Bottomley SP** (2006) A family of E. coli expression vectors for laboratory scale and high throughput soluble protein production. *BMC Biotechnol* **6**, 12

28. **Callow MG, Clairvoyant F, Zhu S, Schryver B, Whyte DB, Bischoff JR, Jallal B, Smeal T** (2002) Requirement for PAK4 in the anchorage-independent growth of human cancer cell lines. *J Biol Chem* **277**, 550-558

29. **Carrio MM, Corchero JL, Villaverde A** (1998) Dynamics of in vivo protein aggregation: building inclusion bodies in recombinant bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **169**, 9-15

30. **Carter JH, Douglass LE, Deddens JA, Colligan BM, Bhatt TR, Pemberton JO, Konicek S, Hom J, Marshall M, Graff JR** (2004) Pak-1 expression increases with progression of colorectal carcinomas to metastasis. *Clin Cancer Res* **10**, 3448-3456

31. **Cereghino JL, Cregg JM** (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 45-66

32. **Chishti AH, Kim AC, Marfatia SM, Lutchman M, Hanspal M, Jindal H, Liu SC, Low PS, Rouleau GA, Mohandas N, Chasis JA, Conboy JG, Gascard P, Takakuwa Y, Huang SC, Benz EJ, Jr., Bretscher A, Fehon RG, Gusella JF, Ramesh V, Solomon F, Marchesi VT, Tsukita S, Tsukita S, Hoover KB** (1998) The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci* **23**, 281-282

33. **Choi SP, Park YC, Lee J, Sim SJ, Chang HN** (2012) Effects of L-arginine on refolding of lysine-tagged human insulin-like growth factor 1 expressed in Escherichia coli. *Bioprocess Biosyst Eng* **35**, 255-263

34. **Chuang TH, Xu X, Knaus UG, Hart MJ, Bokoch GM** (1993) GDP dissociation inhibitor prevents intrinsic and GTPase activating protein-stimulated GTP hydrolysis by the Rac GTP-binding protein. *J Biol Chem* **268**, 775-778

35. **Clarke S** (1992) Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu Rev Biochem* **61**, 355-386

36. **Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T, Gutkind JS** (1995) The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**, 1137-1146

37. **Curto M, Cole BK, Lallemand D, Liu CH, McClatchey AI** (2007) Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *J Cell Biol* **177**, 893-903

38. **de Marco A, Vigh L, Diamant S, Goloubinoff P** (2005) Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in Escherichia coli by osmolytes, plasmid- or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones. *Cell Stress Chaperones* **10**, 329-339

39. **Del Pozo MA, Kiosses WB, Alderson NB, Meller N, Hahn KM, Schwartz MA** (2002) Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol* **4**, 232-239

40. **den Bakker MA, Riegman PH, Hekman RA, Boersma W, Janssen PJ, van der Kwast TH, Zwarthoff EC** (1995) The product of the NF2 tumour suppressor gene localizes near the plasma membrane and is highly expressed in muscle cells. *Oncogene* **10**, 757-763

41. **DerMardirossian C, Schnelzer A, Bokoch GM** (2004) Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 mediates dissociation of Rac GTPase. *Mol Cell* **15**, 117-127

42. **Di Poi N, Faure J, Grizot S, Molnar G, Pick E, Dagher MC** (2001) Mechanism of NADPH oxidase activation by the Rac/Rho-GDI complex. *Biochemistry* **40**, 10014-10022

43. **Diakowski W, Grzybek M, Sikorski AF** (2006) Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily. *Folia Histochem Cytobiol* **44**, 231-248

44. **Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM, Evans T, Snyderman R** (1989) Rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem* **264**, 16378-16382

45. **Doi Y, Itoh M, Yonemura S, Ishihara S, Takano H, Noda T, Tsukita S** (1999) Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout. *J Biol Chem* **274**, 2315-2321

46. **Edgar BA** (2006) From cell structure to transcription: Hippo forges a new path. *Cell* **124**, 267-273

47. **Evans DG, Howard E, Giblin C, Clancy T, Spencer H, Huson SM, Lalloo F** (2010) Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: estimates from a UK family genetic register service. *Am J Med Genet A* **152A**, 327-332

48. **Evans DG, Huson SM, Donnai D, Neary W, Blair V, Newton V, Harris R** (1992) A clinical study of type 2 neurofibromatosis. *Q J Med* **84**, 603-618

49. **Evans DG, Moran A, King A, Saeed S, Gurusinghe N, Ramsden R** (2005) Incidence of vestibular schwannoma and neurofibromatosis 2 in the North West of England over a 10-year period: higher incidence than previously thought. *Otol Neurotol* **26**, 93-97

50. **Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF** (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**, 2606-2617

51. **Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A** (2010) Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 276-287

52. **Fernandez-Valle C, Tang Y, Ricard J, Rodenas-Ruano A, Taylor A, Hackler E, Biggerstaff J, Iacovelli J** (2002) Paxillin binds schwannomin and regulates its density-dependent localization and effect on cell morphology. *Nat Genet* **31**, 354-362

53. **Fox JD, Waugh DS** (2003) Maltose-binding protein as a solubility enhancer. *Methods Mol Biol* **205**, 99-117

54. **Fraenzer JT, Pan H, Minimo L, Jr., Smith GM, Knauer D, Hung G** (2003) Overexpression of the NF2 gene inhibits schwannoma cell proliferation through promoting PDGFR degradation. *Int J Oncol* **23**, 1493-1500

55. **Funayama N, Nagafuchi A, Sato N, Tsukita S, Tsukita S** (1991) Radixin is a novel member of the band 4.1 family. *J Cell Biol* **115**, 1039-1048

56. **Garcia-Fruitos E, Aris A, Villaverde A** (2007) Localization of functional polypeptides in bacterial inclusion bodies. *Appl Environ Microbiol* **73**, 289-294

57. **Giovannini M, Robanus-Maandag E, van d, V, Niwa-Kawakita M, Abramowski V, Goutebroze L, Woodruff JM, Berns A, Thomas G** (2000) Conditional biallelic Nf2 mutation in the mouse promotes manifestations of human neurofibromatosis type 2. *Genes Dev* **14**, 1617-1630

58. **Gobel V, Barrett PL, Hall DH, Fleming JT** (2004) Lumen morphogenesis in C. elegans requires the membrane-cytoskeleton linker erm-1. *Dev Cell* **6**, 865-873

59. **Golovanov AP, Hautbergue GM, Wilson SA, Lian LY** (2004) A simple method for improving protein solubility and long-term stability. *J Am Chem Soc* **126**, 8933-8939

60. **Gonzalez-Agosti C, Xu L, Pinney D, Beauchamp R, Hobbs W, Gusella J, Ramesh V** (1996) The merlin tumor suppressor localizes preferentially in membrane ruffles. *Oncogene* **13**, 1239-1247

61. **Grizot S, Faure J, Fieschi F, Vignais PV, Dagher MC, Pebay-Peyroula E** (2001) Crystal structure of the Rac1-RhoGDI complex involved in nadph oxidase activation. *Biochemistry* **40**, 10007-10013

62. **Grönholm M, Sainio M, Zhao F, Heiska L, Vaheri A, Carpen O** (1999) Homotypic and heterotypic interaction of the neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein merlin and the ERM protein ezrin. *J Cell Sci* **112**, 895-904

63. **Gunda V, Boosani CS, Verma RK, Guda C, Sudhakar YA** (2012) L-arginine mediated renaturation enhances yield of human, alpha6 type IV collagen non-collagenous domain from bacterial inclusion bodies. *Protein Pept Lett* **19**, 1112-1121

64. **Guo W, Tamanoi F, Novick P** (2001) Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat Cell Biol* **3**, 353-360

65. **Gutmann DH, Haipek CA, Hoang LK** (1999) Neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein, merlin, forms two functionally important intramolecular associations. *J Neurosci Res* **58**, 706-716

66. **Hall A** (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514

67. **Hamada K, Shimizu T, Matsui T, Tsukita S, Hakoshima T** (2000) Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *EMBO J* **19**, 4449-4462

68. **Hamada K, Seto A, Shimizu T, Matsui T, Takai Y, Tsukita S, Tsukita S, Hakoshima T** (2001) Crystallization and preliminary crystallographic studies of RhoGDI in complex with the radixin FERM domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 889-890

69. **Hanemann CO, Diebold R, Kaufmann D** (2007) Role of NF2 haploinsufficiency in NF2-associated polyneuropathy. *Brain Pathol* **17**, 371-376

70. **Hart MJ, Eva A, Zangrilli D, Aaronson SA, Evans T, Cerione RA, Zheng Y** (1994) Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product. *J Biol Chem* **269**, 62-65

71. **Heiska L, Alfthan K, Grönholm M, Vilja P, Vaheri A, Carpen O** (1998) Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Biol Chem* **273**, 21893-21900

72. **Helenius A, Simons K** (1975) Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta* **415**, 29-79

73. **Hennigan RF, Moon CA, Parysek LM, Monk KR, Morfini G, Berth S, Brady S, Ratner N** (2012) The NF2 tumor suppressor regulates microtubule-based vesicle trafficking via a novel Rac, MLK and $p38^{SAPK}$ pathway. *Oncogene* **32**, 1135-1143

74. **Henry MD, Gonzalez AC, Solomon F** (1995) Molecular dissection of radixin: distinct and interdependent functions of the amino- and carboxy-terminal domains. *J Cell Biol* **129**, 1007-1022

75. **Hill CS, Wynne J, Treisman R** (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* **81**, 1159-1170

76. **Hirokawa Y, Tikoo A, Huynh J, Utermark T, Hanemann CO, Giovannini M, Xiao GH, Testa JR, Wood J, Maruta H** (2004) A clue to the therapy of neurofibromatosis type 2: NF2/merlin is a PAK1 inhibitor. *Cancer J* **10**, 20-26

77. **Hochbaum D, Barila G, Ribeiro-Neto F, Altschuler DL** (2011) Radixin assembles cAMP effectors Epac and PKA into a functional cAMP compartment: role in cAMP-dependent cell proliferation. *J Biol Chem* **286**, 859-866

78. **Insall RH, Machesky LM** (2009) Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. *Dev Cell* **17**, 310-322

79. **Ishibashi M, Tsumoto K, Ejima D, Arakawa T, Tokunaga M** (2005a) Characterization of arginine as a solvent additive: a halophilic enzyme as a model protein. *Protein Pept Lett* **12**, 649-653

80. **Ishibashi M, Tsumoto K, Tokunaga M, Ejima D, Kita Y, Arakawa T** (2005b) Is arginine a protein-denaturant? *Protein Expr Purif* **42**, 1-6

81. **James MF, Manchanda N, Gonzalez-Agosti C, Hartwig JH, Ramesh V** (2001) The neurofibromatosis 2 protein product merlin selectively binds F-actin but not G-actin, and stabilizes the filaments through a lateral association. *Biochem J* **356**, 377-386

82. **Jin H, Sperka T, Herrlich P, Morrison H** (2006) Tumorigenic transformation by CPI-17 through inhibition of a merlin phosphatase. *Nature* **442**, 576-579

83. **Johnson KC, Kissil JL, Fry JL, Jacks T** (2002) Cellular transformation by a FERM domain mutant of the Nf2 tumor suppressor gene. *Oncogene* **21**, 5990-5997

84. **Kang BS, Cooper DR, Devedjiev Y, Derewenda U, Derewenda ZS** (2001) The structure of the FERM domain of merlin, the neurofibromatosis type 2 gene product. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 381-391

85. **Kapust RB, Waugh DS** (2000) Controlled intracellular processing of fusion proteins by TEV protease. *Protein Expr Purif* **19**, 312-318

86. **Kikuchi A, Kuroda S, Sasaki T, Kotani K, Hirata K, Katayama M, Takai Y** (1992) Functional interactions of stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins and their common substrate small GTP-binding protein. *J Biol Chem* **267**, 14611-14615

87. **Kikuchi S, Hata M, Fukumoto K, Yamane Y, Matsui T, Tamura A, Yonemura S, Yamagishi H, Keppler D, Tsukita S, Tsukita S** (2002) Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nat Genet* **31**, 320-325

88. **Kim JY, Kim H, Jeun SS, Rha SJ, Kim YH, Ko YJ, Won J, Lee KH, Rha HK, Wang YP** (2002) Inhibition of NF-kappaB activation by merlin. *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 1295-1302

89. **Kinsella BT, Erdman RA, Maltese WA** (1991) Carboxyl-terminal isoprenylation of ras-related GTP-binding proteins encoded by rac1, rac2, and ralA. *J Biol Chem* **266**, 9786-9794

90. **Kissil JL, Johnson KC, Eckman MS, Jacks T** (2002) Merlin phosphorylation by p21-activated kinase 2 and effects of phosphorylation on merlin localization. *J Biol Chem* **277**, 10394-10399

91. **Knudson AG, Jr.** (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**, 820-823

92. **Kozma R, Sarner S, Ahmed S, Lim L** (1997) Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol Cell Biol* **17**, 1201-1211

93. **LaJeunesse DR, McCartney BM, Fehon RG** (1998) Structural analysis of Drosophila merlin reveals functional domains important for growth control and subcellular localization. *J Cell Biol* **141**, 1589-1599

94. **Lallemand D, Curto M, Saotome I, Giovannini M, McClatchey AI** (2003) NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions. *Genes Dev* **17**, 1090-1100

95. **Lallemand D, Manent J, Couvelard A, Watilliaux A, Siena M, Chareyre F, Lampin A, Niwa-Kawakita M, Kalamarides M, Giovannini M** (2009a) Merlin regulates transmembrane receptor accumulation and signaling at the plasma membrane in primary mouse Schwann cells and in human schwannomas. *Oncogene* **28**, 854-865

96. **Lallemand D, Saint-Amaux AL, Giovannini M** (2009b) Tumor-suppression functions of merlin are independent of its role as an organizer of the actin cytoskeleton in Schwann cells. *J Cell Sci* **122**, 4141-4149

97. **Li ZF, Nie J, Dai YC, Chen Q, Yu SY** (2004) Renaturation of thermolabile hemolysin inclusion bodies expressed by Vibrio parahaemolyticus. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* **24**, 995-997

98. **Li Q, Nance MR, Kulikauskas R, Nyberg K, Fehon R, Karplus PA, Bretscher A, Tesmer JJ** (2007) Self-masking in an intact ERM-merlin protein: an active role for the central alpha-helical domain. *J Mol Biol* **365**, 1446-1459

99. **Li W, You L, Cooper J, Schiavon G, Pepe-Caprio A, Zhou L, Ishii R, Giovannini M, Hanemann CO, Long SB, Erdjument-Bromage H, Zhou P, Tempst P, Giancotti FG** (2010) Merlin/NF2 suppresses tumorigenesis by inhibiting the E3 ubiquitin ligase $CRL4^{DCAF1}$ in the nucleus. *Cell* **140**, 477-490

100. **Lopez-Lago MA, Okada T, Murillo MM, Socci N, Giancotti FG** (2009) Loss of the tumor suppressor gene NF2, encoding merlin, constitutively activates integrin-dependent mTORC1 signaling. *Mol Cell Biol* **29**, 4235-4249

101. **Louis DN, Ramesh V, Gusella JF** (1995) Neuropathology and molecular genetics of neurofibromatosis 2 and related tumors. *Brain Pathol* **5**, 163-172

102. **Lozano E, Betson M, Braga VM** (2003) Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion. *Bioessays* **25**, 452-463

103. **MacCollin M, Ramesh V, Jacoby LB, Louis DN, Rubio MP, Pulaski K, Trofatter JA, Short MP, Bove C, Eldridge R** (1994) Mutational analysis of patients with neurofibromatosis 2. *Am J Hum Genet* **55**, 314-320

104. **Maeda M, Matsui T, Imamura M, Tsukita S, Tsukita S** (1999) Expression level, subcellular distribution and Rho-GDI binding affinity of merlin in comparison with ezrin/radixin/moesin proteins. *Oncogene* **18**, 4788-4797

105. **Maitra S, Kulikauskas RM, Gavilan H, Fehon RG** (2006) The tumor suppressors Merlin and Expanded function cooperatively to modulate receptor endocytosis and signaling. *Curr Biol* **16**, 702-709

106. **Majhi PR, Ganta RR, Vanam RP, Seyrek E, Giger K, Dubin PL** (2006) Electrostatically driven protein aggregation: beta-lactoglobulin at low ionic strength. *Langmuir* **22**, 9150-9159

107. **Mani T, Hennigan RF, Foster LA, Conrady DG, Herr AB, Ip W** (2011) FERM domain phosphoinositide binding targets merlin to the membrane and is essential for its growth-suppressive function. *Mol Cell Biol* **31**, 1983-1996

108. **Martin M, Andreoli C, Sahuquet A, Montcourrier P, Algrain M, Mangeat P** (1995) Ezrin NH2-terminal domain inhibits the cell extension activity of the COOH-terminal domain. *J Cell Biol* **128**, 1081-1093

109. **Maruta H** (2011) Effective neurofibromatosis therapeutics blocking the oncogenic kinase PAK1. *Drug Discov Ther* **5**, 266-278

110. **McCartney BM, Fehon RG** (1996) Distinct cellular and subcellular patterns of expression imply distinct functions for the Drosophila homologues of moesin and the neurofibromatosis 2 tumor suppressor, merlin. *J Cell Biol* **133**, 843-852

111. **McClatchey AI, Saotome I, Ramesh V, Gusella JF, Jacks T** (1997) The Nf2 tumor suppressor gene product is essential for extraembryonic development immediately prior to gastrulation. *Genes Dev* **11**, 1253-1265

112. **McClatchey AI, Saotome I, Mercer K, Crowley D, Gusella JF, Bronson RT, Jacks T** (1998) Mice heterozygous for a mutation at the Nf2 tumor suppressor locus develop a range of highly metastatic tumors. *Genes Dev* **12**, 1121-1133

113. **McClatchey AI** (2003) Merlin and ERM proteins: unappreciated roles in cancer development? *Nat Rev Cancer* **3**, 877-883

114. **Meng JJ, Lowrie DJ, Sun H, Dorsey E, Pelton PD, Bashour AM, Groden J, Ratner N, Ip W** (2000) Interaction between two isoforms of the NF2 tumor suppressor protein, merlin, and between merlin and ezrin, suggests modulation of ERM proteins by merlin. *J Neurosci Res* **62**, 491-502

115. **Miki T, Smith CL, Long JE, Eva A, Fleming TP** (1993) Oncogene ect2 is related to regulators of small GTP-binding proteins. *Nature* **362**, 462-465

116. **Minden A, Lin A, Claret FX, Abo A, Karin M** (1995) Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**, 1147-1157

117. **Mori T, Kitano K, Terawaki S, Maesaki R, Hakoshima T** (2007) Crystallographic characterization of the radixin FERM domain bound to the cytoplasmic tail of adhesion molecule CD44. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **63**, 844-847

118. **Morrison H, Sherman LS, Legg J, Banine F, Isacke C, Haipek CA, Gutmann DH, Ponta H, Herrlich P** (2001) The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev* **15**, 968-980

119. **Morrison H, Sperka T, Manent J, Giovannini M, Ponta H, Herrlich P** (2007) Merlin/neurofibromatosis type 2 suppresses growth by inhibiting the activation of Ras and Rac. *Cancer Res* **67**, 520-527

120. **Nguyen R, Reczek D, Bretscher A** (2001) Hierarchy of merlin and ezrin N- and C-terminal domain interactions in homo- and heterotypic associations and their relationship to binding of scaffolding proteins EBP50 and E3KARP. *J Biol Chem* **276**, 7621-7629

121. **Northup JK, Smigel MD, Gilman AG** (1982) The guanine nucleotide activating site of the regulatory component of adenylate cyclase. Identification by ligand binding. *J Biol Chem* **257**, 11416-11423

122. **Novagen** (2004) BugBuster® Protein Extraction Reagent. User Protocol TB245 Rev. E 0304, 1-8

123. **Odat HA, Piccirillo E, Sequino G, Taibah A, Sanna M** (2011) Management strategy of vestibular schwannoma in neurofibromatosis type 2. *Otol Neurotol* **32**, 1163-1170

124. **Ohanian V, Gratzer W** (1984) Preparation of red-cell-membrane cytoskeletal constituents and characterisation of protein 4.1. *Eur J Biochem* **144**, 375-379

125. **Okada T, Lopez-Lago M, Giancotti FG** (2005) Merlin/NF-2 mediates contact inhibition of growth by suppressing recruitment of Rac to the plasma membrane. *J Cell Biol* **171**, 361-371

126. **Okada T, You L, Giancotti FG** (2007) Shedding light on Merlin's wizardry. *Trends Cell Biol* **17**, 222-229

127. **Ota T, Maeda M, Suto S, Tatsuka M** (2004) LyGDI functions in cancer metastasis by anchoring Rho proteins to the cell membrane. *Mol Carcinog* **39**, 206-220

128. **Pan JY, Wessling-Resnick M** (1998) GEF-mediated GDP/GTP exchange by monomeric GTPases: a regulatory role for Mg^{2+}? *Bioessays* **20**, 516-521

129. **Parry DM, Eldridge R, Kaiser-Kupfer MI, Bouzas EA, Pikus A, Patronas N** (1994) Neurofibromatosis 2 (NF2): clinical characteristics of 63 affected individuals and clinical evidence for heterogeneity. *Am J Med Genet* **52**, 450-461

130. **Pearson MA, Reczek D, Bretscher A, Karplus PA** (2000) Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* **101**, 259-270

131. **Pestonjamasp K, Amieva MR, Strassel CP, Nauseef WM, Furthmayr H, Luna EJ** (1995) Moesin, ezrin, and p205 are actin-binding proteins associated with neutrophil plasma membranes. *Mol Biol Cell* **6**, 247-259

132. **Prasad S, Khadatare PB, Roy I** (2011) Effect of chemical chaperones in improving the solubility of recombinant proteins in Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* **77**, 4603-4609

133. **Ramesh V** (2004) Merlin and the ERM proteins in Schwann cells, neurons and growth cones. *Nat Rev Neurosci* **5**, 462-470

134. **Ridley AJ, Hall A** (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-399

135. **Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A** (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-410

136. **Rong R, Surace EI, Haipek CA, Gutmann DH, Ye K** (2004) Serine 518 phosphorylation modulates merlin intramolecular association and binding to critical effectors important for NF2 growth suppression. *Oncogene* **23**, 8447-8454

137. **Rossman KL, Sondek J** (2005) Larger than Dbl: new structural insights into RhoA activation. *Trends Biochem Sci* **30**, 163-165

138. **Roubinet C, Decelle B, Chicanne G, Dorn JF, Payrastre B, Payre F, Carreno S** (2011) Molecular networks linked by Moesin drive remodeling of the cell cortex during mitosis. *J Cell Biol* **195**, 99-112

139. **Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, Marineau C, Hoang-Xuan K, Demczuk S, Desmaze C, Plougastel B** (1993) Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* **363**, 515-521

140. **Ryu CH, Kim SW, Lee KH, Lee JY, Kim H, Lee WK, Choi BH, Lim Y, Kim YH, Lee KH, Hwang TK, Jun TY, Rha HK** (2005) The merlin tumor suppressor interacts with Ral guanine nucleotide dissociation stimulator and inhibits its activity. *Oncogene* **24**, 5355-5364

141. **Saci A, Carpenter CL** (2005) RhoA GTPase regulates B cell receptor signaling. *Mol Cell* **17**, 205-214

142. **Sainio M, Zhao F, Heiska L, Turunen O, den Bakker M, Zwarthoff E, Lutchman M, Rouleau GA, Jääskeläinen J, Vaheri A, Carpén O** (1997) Neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein colocalizes with ezrin and CD44 and associates with actin-containing cytoskeleton. *J Cell Sci* **110**, 2249-2260

143. **Sakikawa C, Taguchi H, Makino Y, Yoshida M** (1999) On the maximum size of proteins to stay and fold in the cavity of GroEL underneath GroES. *J Biol Chem* **274**, 21251-21256

144. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467

145. **Saotome I, Curto M, McClatchey AI** (2004) Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. *Dev Cell* **6**, 855-864

146. **Scheffzek K, Stephan I, Jensen ON, Illenberger D, Gierschik P** (2000) The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. *Nat Struct Biol* **7**, 122-126

147. **Schraml P, Schwerdtfeger G, Burkhalter F, Raggi A, Schmidt D, Ruffalo T, King W, Wilber K, Mihatsch MJ, Moch H** (2003) Combined array comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis suggest PAK1 at 11q13.5-q14 as a critical oncogene target in ovarian carcinoma. *Am J Pathol* **163**, 985-992

148. **Sekido Y** (2011) Inactivation of Merlin in malignant mesothelioma cells and the Hippo signaling cascade dysregulation. *Pathol Int* **61**, 331-344

149. **Seo PS, Quinn BJ, Khan AA, Zeng L, Takoudis CG, Hanada T, Bolis A, Bolino A, Chishti AH** (2009) Identification of erythrocyte p55/MPP1 as a binding partner of NF2 tumor suppressor protein/Merlin. *Exp Biol Med* **234**, 255-262

150. **Shang X, Wang Y, Zhao Q, Wu K, Li X, Ji X, He R, Zhang W** (2012) siRNAs target sites selection of ezrin and the influence of RNA interference on ezrin expression and biological characters of osteosarcoma cells. *Mol Cell Biochem* **364**, 363-371

151. **Shaw RJ, McClatchey AI, Jacks T** (1998) Localization and functional domains of the neurofibromatosis type II tumor suppressor, merlin. *Cell Growth Differ* **9**, 287-296

152. **Shaw RJ, Paez JG, Curto M, Yaktine A, Pruitt WM, Saotome I, O'Bryan JP, Gupta V, Ratner N, Der CJ, Jacks T, McClatchey AI** (2001) The Nf2 tumor suppressor, merlin, functions in Rac-dependent signaling. *Dev Cell* **1**, 63-72

153. **Sher I, Hanemann CO, Karplus PA, Bretscher A** (2012) The tumor suppressor merlin controls growth in its open state, and phosphorylation converts it to a less-active more-closed state. *Dev Cell* **22**, 703-705

154. **Sherman L, Xu HM, Geist RT, Saporito-Irwin S, Howells N, Ponta H, Herrlich P, Gutmann DH** (1997) Interdomain binding mediates tumor growth suppression by the NF2 gene product. *Oncogene* **15**, 2505-2509

155. **Sherman L, Gutmann DH** (2001) Merlin: hanging tumor suppression on the Rac. *Trends Cell Biol* **11**, 442-444

156. **Shimizu T, Ihara K, Maesaki R, Kuroda S, Kaibuchi K, Hakoshima T** (2000) An open conformation of switch I revealed by the crystal structure of a Mg^{2+}-free form of RHOA complexed with GDP. Implications for the GDP/GTP exchange mechanism. *J Biol Chem* **275**, 18311-18317

157. **Shimizu T, Seto A, Maita N, Hamada K, Tsukita S, Tsukita S, Hakoshima T** (2002) Structural basis for neurofibromatosis type 2. Crystal structure of the merlin FERM domain. *J Biol Chem* **277**, 10332-10336

158. **Singh SM, Eshwari AN, Garg LC, Panda AK** (2005) Isolation, solubilization, refolding, and chromatographic purification of human growth hormone from inclusion bodies of Escherichia coli cells: a case study. *Methods Mol Biol* **308**, 163-176

159. **Smith BJ** (1994) SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *Methods Mol Biol* **32**, 23-34

160. **Stamenkovic I, Yu Q** (2010) Merlin, a “magic” linker between the extracellular cues and intracellular signaling pathways that regulate cell motility, proliferation, and survival. *Curr Protein Pept Sci* **11**, 471-484

161. **Strandberg L, Enfors SO** (1991) Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* **57**, 1669-1674

162. **Suda J, Zhu L, Karvar S** (2011) Phosphorylation of radixin regulates cell polarity and Mrp-2 distribution in hepatocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **300**, C416-C424

163. **Surace EI, Haipek CA, Gutmann DH** (2004) Effect of merlin phosphorylation on neurofibromatosis 2 (NF2) gene function. *Oncogene* **23**, 580-587

164. **Takahashi K, Sasaki T, Mammoto A, Hotta I, Takaishi K, Imamura H, Nakano K, Kodama A, Takai Y** (1998) Interaction of radixin with Rho small G protein GDP/GTP exchange protein Dbl. *Oncogene* **16**, 3279-3284

165. **Takahashi K, Sasaki T, Mammoto A, Takaishi K, Kameyama T, Tsukita S, Takai Y** (1997) Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem* **272**, 23371-23375

166. **Takai Y, Kitano K, Terawaki S, Maesaki R, Hakoshima T** (2007) Crystallographic characterization of the radixin FERM domain bound to the cytoplasmic tails of adhesion molecules CD43 and PSGL-1. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **63**, 49-51

167. **Thermo Fisher Scientific, Piercenet** (2013) http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=F3305493-0FBC-93DA-2720-4412D198A9C9 (20.03.2013)

168. **Tikoo A, Varga M, Ramesh V, Gusella J, Maruta H** (1994) An anti-Ras function of neurofibromatosis type 2 gene product (NF2/Merlin). *J Biol Chem* **269**, 23387-23390

169. **Tischer A, Lilie H, Rudolph R, Lange C** (2010) L-arginine hydrochloride increases the solubility of folded and unfolded recombinant plasminogen activator rPA. *Protein Sci* **19**, 1783-1795

170. **Trahey M, McCormick F** (1987) A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* **238**, 542-545

171. **Tran YK, Bogler O, Gorse KM, Wieland I, Green MR, Newsham IF** (1999) A novel member of the NF2/ERM/4.1 superfamily with growth suppressing properties in lung cancer. *Cancer Res* **59**, 35-43

172. **Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrell JR, Duyao MP, Parry DM, Eldridge R, Kley N, Menon AG, Pulaski K** (1993) A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* **75**, 826

173. **Tsumoto K, Umetsu M, Kumagai I, Ejima D, Arakawa T** (2003) Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine. *Biochem Biophys Res Commun* **312**, 1383-1386

174. **Tsumoto K, Umetsu M, Kumagai I, Ejima D, Philo JS, Arakawa T** (2004) Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnol Prog* **20**, 1301-1308

175. **Turunen O, Wahlstrom T, Vaheri A** (1994) Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *J Cell Biol* **126**, 1445-1453

176. **Ueda T, Kikuchi A, Ohga N, Yamamoto J, Takai Y** (1990) Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein. *J Biol Chem* **265**, 9373-9380

177. **Ungewickell E, Bennett PM, Calvert R, Ohanian V, Gratzer WB** (1979) In vitro formation of a complex between cytoskeletal proteins of the human erythrocyte. *Nature* **280**, 811-814

178. **Vallejo LF, Rinas U** (2004) Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb Cell Fact* **3**, 11

179. **Vetter IR, Wittinghofer A** (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299-1304

180. **Waldmann L** (2005) Effect of L-arginine and guanidinium chloride (GdmCl) on the unfolding and refolding of hen egg-white lysozyme (HEWL). Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

181. **Warren C, James LA, Ramsden RT, Wallace A, Baser ME, Varley JM, Evans DG** (2003) Identification of recurrent regions of chromosome loss and gain in vestibular schwannomas using comparative genomic hybridisation. *J Med Genet* **40**, 802-806

182. **Wong HK, Shimizu A, Kirkpatrick ND, Garkavtsev I, Chan AW, di Tomaso E, Klagsbrun M, Jain RK** (2012) Merlin/NF2 regulates angiogenesis in schwannomas through a Rac1/semaphorin 3F-dependent mechanism. *Neoplasia* **14**, 84-94

183. **Wreggett KA, De Léan A** (1984) The ternary complex model. Its properties and application to ligand interactions with the D2-dopamine receptor of the anterior pituitary gland. *Mol Pharmacol* **26**, 214-227

184. **Xiao GH, Beeser A, Chernoff J, Testa JR** (2002) p21-activated kinase links Rac/Cdc42 signaling to merlin. *J Biol Chem* **277**, 883-886

185. **Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R** (1990a) The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* **62**, 599-608

186. **Xu GF, Lin B, Tanaka K, Dunn D, Wood D, Gesteland R, White R, Weiss R, Tamanoi F** (1990b) The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements ira mutants of S. cerevisiae. *Cell* **63**, 835-841

187. **Xu HM, Gutmann DH** (1998) Merlin differentially associates with the microtubule and actin cytoskeleton. *J Neurosci Res* **51**, 403-415

188. **Xu L, Gonzalez-Agosti C, Beauchamp R, Pinney D, Sterner C, Ramesh V** (1998) Analysis of molecular domains of epitope-tagged merlin isoforms in Cos-7 cells and primary rat Schwann cells. *Exp Cell Res* **238**, 231-240

189. **Yan X, Hu S, Guan YX, Yao SJ** (2012) Coexpression of chaperonin GroEL/GroES markedly enhanced soluble and functional expression of recombinant human interferon-gamma in Escherichia coli. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**, 1065-1074

190. **Yang C, Asthagiri AR, Iyer RR, Lu J, Xu DS, Ksendzovsky A, Brady RO, Zhuang Z, Lonser RR** (2011) Missense mutations in the NF2 gene result in the

quantitative loss of merlin protein and minimally affect protein intrinsic function. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 4980-4985

191. **Yokoyama T, Osada H, Murakami H, Tatematsu Y, Taniguchi T, Kondo Y, Yatabe Y, Hasegawa Y, Shimokata K, Horio Y, Hida T, Sekido Y** (2008) YAP1 is involved in mesothelioma development and negatively regulated by Merlin through phosphorylation. *Carcinogenesis* **29**, 2139-2146

192. **Zawawi KH, Kantarci A, Schulze-Spate U, Fujita T, Batista EL, Jr., Amar S, Van Dyke TE** (2010) Moesin-induced signaling in response to lipopolysaccharide in macrophages. *J Periodontal Res* **45**, 589-601

193. **Zhan Y, Chadee DN** (2010) Inhibition of Cdc42-mediated activation of mixed lineage kinase 3 by the tumor suppressor protein merlin. *Small Gtpases* **1**, 183-186

194. **Zwaenepoel I, Naba A, Menezes Lyra DC, Del Maestro L, Formstecher E, Louvard D, Arpin M** (2012) Ezrin regulates microvillus morphogenesis by promoting distinct activities of Eps8 proteins. *Mol Biol Cell* **23**, 1080-1095

8 Publikationen

Abstracts

Fahrer J, Plunien R, Binder U, Langer T, Seliger H, Barth H (2010) Genetically Engineered Clostridial C2 Toxin as a Novel Delivery System for Living Mammalian Cells. *Bioconjug Chem* **21**: 130-139.

Pfreimer M, Vatter P, Langer T, Wieland T, Gierschik P, Moepps B (2012) LARG links histamine-H1-receptor-activated Gq to Rho-GTPase-dependent signaling pathways. *Cell Signal* **24**: 652-663.

Stockmann M, Meyer-Ohlendorf M, Achberger K, Putz S, Demestre M, Yin H, Hendrich C, Linta L, Heinrich J, Brunner C, Proepper C, Kuh GF, Baumann B, Langer T, Schwalenstöcker B, Braunstein KE, von Arnim C, Schneuwly S, Meyer T, Wong PC, Boeckers TM, Ludolph AC, Liebau S (2012) The dynactin p150 subunit: cell biology studies of sequence changes found in ALS/MND and Parkinsonian Syndromes. *J Neural Transm* [Epub ahead of print]

Fahrer J, Schweitzer B, Fiedler K, Langer T, Gierschik P, Barth H (2013) C2-streptavidin mediates the delivery of biotin-conjugated tumor suppressor protein p53 into tumor cells. *Bioconjug Chem* [Epub ahead of print]

9 Danksagung

Mit dieser Arbeit endet ein wichtiger Teil meiner Ausbildung und es erfüllt sich ein Traum, den ich schon seit meiner frühen schulischen Laufbahn hege. Ich möchte mich bei allen Menschen bedanken, die mir diesen Weg ermöglicht und mich auf so vielfältige Weise unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Peter Gierschik für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit, die umfassende wissenschaftliche Betreuung und sein großes Engagement bei der Fertigstellung dieser Arbeit

Herrn Prof. Dr. Thomas Mertens für die Bereitschaft zur Übernahme des Korreferats

Frau PD Dr. Barbara Möpps für die wissenschaftliche Betreuung und ihre große Hilfe bei der Vermittlung neuer Versuchstechniken

Angela Mansard, die für mich in den letzten Jahren eine tolle Kollegin, wertvolle Freundin und manchmal auch Seelsorgerin war

Heiko Krause, mit dem ich den ein oder anderen Kampf gegen das „magische“, aber manchmal leider auch „gehässige“ Merlin ausgefochten habe

Simone Kredel und Zhanhai Su für die angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre

Mariana Pfreimer, Carolin König und Sandra Beier für die ein oder andere anregende und interessante Diskussion

Petra Vatter und Carolin Weiss für die unermüdliche Unterstützung bei technischen und fachlichen Fragen

Claudia Walliser, Anja Bühler und besonders Norbert Zanker, der mir gezeigt hat, dass man auch als Naturwissenschaftler eine Akzeptanz metaphysischer und wissenschaftlich nicht erklärbarer Phänomene aufbringen sollte

Frau Susanne Gierschik für die DNA-Sequenzierungen

allen Mitarbeitern der Abteilung für ihre Hilfe und ihre Kollegialität.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich immer unterstützt hat, in jeder Lebenslage für mich da war und mir dabei geholfen hat, meinen Traum zu verwirklichen.

Meinem Schatz Verena danke ich für ihre Geduld und ihre stetige Aufmunterung, die sie mir besonders am Ende meiner Arbeit entgegengebracht hat.

10 Lebenslauf

29.08.1980	geboren in Siegen
1987-1991	Besuch der Grundschule in Wahlbach
1991-1997	Besuch der Realschule in Burbach
1997-2000	Besuch des Gymnasiums in Wilnsdorf
2000	Abitur
2000-2001	Wehrdienst
2001-2007	Studium der Biologie an der Universität Ulm
2007	Diplom in Biologie
2007-2013	Wissenschaftlicher Angestellter in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie der Universität Ulm
2013	Promotion zum Dr. biol. hum.