

Zellbiologische Untersuchung der Regulatoren der Rho-GTPasen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ulrike Herbrand

aus Duisburg

2003

Gedruckt mit der Genehmigung
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:	Prof. Dr. E. Knust
1. Korreferent:	Prof. Dr. J. F. Ernst
2. Korreferent:	Priv. Doz. Dr. M. R. Ahmadian
Tag der mündlichen Prüfung:	14.05.2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	GTP-bindende Proteine in der Signaltransduktion	1
1.2	GTPasen der Rho-Familie	6
1.3	Regulation der GTPasen der Rho-Familie	9
1.3.1	Struktur, Funktion und Onkogenizität von RhoGEFs	11
1.3.2	Struktur und Funktion von RhoGAPs	15
1.3.3	Effektorproteine der Rho-Familie	17
1.4	Das TGF β -Smad-Netzwerk	20
1.5	Zielsetzung der Arbeit	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Bakterienstämme	25
2.1.2	Nährmedien und Antibiotika	25
2.1.3	Eukaryotische Zelllinien	26
2.1.4	Zellkulturmedien und Zusätze	27
2.1.5	Puffer und Lösungen	27
2.1.6	Antikörper	31
2.1.7	Biochemikalien und Chemikalien	32

2.1.8	Kit-Systeme	35
2.1.9	Vektoren	35
2.1.10	Plasmide	36
2.1.11	Verbrauchsmaterialien	38
2.1.12	Geräte	38
2.1.13	Computer-Software	40
2.2	Molekularbiologische Methoden	41
2.2.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	41
2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i>	41
2.2.3	Kultivierung und Lagerung von Bakterien	42
2.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA	42
2.2.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	43
2.2.6	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	43
2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	44
2.2.8	Isolierung von DNA-Fragmenten	45
2.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten	45
2.2.10	Polymerasekettenreaktion (PCR)	45
2.2.11	DNA-Sequenzierung	48
2.3	Proteinbiochemische Methoden	50

2.3.1	Kultivierung und Expression rekombinanter Plasmide	50
2.3.2	Präparativer Aufschluss von Bakterienzellen	50
2.3.3	Kopplung von GST-Fusionsproteinen an GSH-Sepharose	51
2.3.4	Präparation von Lysaten eukaryotischer Zellen	51
2.3.5	GTPase <i>Pulldown</i> -Assay	52
2.3.6	Immunpräzipitation	54
2.3.7	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	55
2.3.8	<i>Western Blot</i>	57
2.3.9	Immunologischer Nachweis von Proteinen im <i>Western Blot</i> (Immunoblot)	58
2.3.10	Entfernung gebundener Antikörper von PVDF-Membranen (<i>Stripping</i>)	60
2.4	Zellbiologische Methoden	60
2.4.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	60
2.4.2	Auftauen von Zellen	61
2.4.3	Zellpassage	62
2.4.4	Bestimmung der Zellzahl	62
2.4.5	Kryokonservierung von Zellen	62
2.4.6	Transfektionsmethoden	63
2.4.7	Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen	66

2.4.8	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie	67
3	Ergebnisse	70
3.1	Etablierung des GTPase <i>Pulldown</i> -Assays	70
3.2	Sequenzvergleich der Rho-und Rac-Isoformen	71
3.3	Spezifität verschiedener RhoGEFs für die Rho-Isoformen RhoA, RhoB und RhoC	73
3.4	Aktivierung der Rac-Isoformen Rac1, Rac2 und Rac 3 durch den RacGEF Tiam1	75
3.5	Effekt der Rac-Isoformen Rac1, Rac2 und Rac3 auf das Aktinzytoskelett	76
3.6	Unterschiede in der Aktivierung von Rac1 im Vergleich zu Rac1b	77
3.7	Mechanismus der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung	81
3.7.1	Rolle von p120RasGAP	82
3.7.2	Rolle der LMW-PTP	88
3.7.3	Rolle der Src-Kinase	89
3.7.4	Rolle der N-terminalen GTPase-Domäne von p190RhoGAP	93
3.7.5	Rolle des Rac-Effektors Pak	94
3.7.6	Rolle der Rac-Isoformen	97
3.8	Interaktion von Smad4 und Rac3	98

4	Diskussion	104
4.1	Spezifität verschiedener RhoGEFs für die Rho-Isoformen RhoA, RhoB und RhoC	105
4.2	Aktivierung der Rac-Isoformen Rac1, Rac2 und Rac3 durch den RacGEF Tiam1	107
4.3	Unterschiede in der Aktivierung von Rac1 im Vergleich zu Rac1b	110
4.4	Mechanismus der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung	111
4.4.1	Inhibition der p190RhoGAP-p120RasGAP-Komplexbildung	114
4.4.2	Dephosphorylierung von p190RhoGAP durch LMW-PTP	118
4.4.3	Phosphorylierung von p190RhoGAP durch Src-Kinase	119
4.4.4	Rolle der N-terminalen GTPase-Domäne von p190RhoGAP	122
4.4.5	Rolle des Rac-Effektors Pak	124
4.4.6	Rolle der Rac-Isoformen	127
4.5	Interaktion von Smad4 und Rac3	129
5	Zusammenfassung	133
6	Literaturverzeichnis	136

Abkürzungsverzeichnis

A

A	in DNA-Sequenz: Adenin
A	Ampere (Stromstärke)
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ALCAM	<i>activated leukocyte cell adhesion molecule</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxosulfat
Arf	<i>ADP-ribosylation factor</i>
As	Aminosäure(n)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B	
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	
C	in DNA-Sequenz: Cytosin
C1	Proteinkinase C Homologie 1
°C	Temperatur in Grad nach Anders Celsius
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i> (Fadenwurm)

Ca ²⁺	Kalziumion
Cdc42	<i>cell division cycle 42</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
c-fos	<i>FBJ murine osteosarcoma</i> Protoonkogen
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Cytomegalovirus
Cos7	Zellen aus der Niere einer Meerkatze
C-Terminus	Carboxyterminus
Cy-5	Indodicarbocyanin
D	
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> (Fruchtfliege)
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DARPO	<i>donkey anti-rabbit peroxidase</i>
DEAE	Diethylaminoethyl
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
Dotap	N-(1-[2,3-dioleoyloxy]propyl)-N,N,N-trimethylammonium
DTE	1,4-Dithioerythritol

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	verstärkte chemische Lumineszenz (<i>enhanced chemical luminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i> (und Co-Autoren)
etc.	<i>et cetera</i>

F

FCS	fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
fl	<i>full length</i>
Fos	Genprodukt des FBJ <i>murine</i> Osteosarcoma-Virus Protoonkogens

G

g	Gramm
g	Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
G	in DNA-Sequenz: Guanin
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GBD	GTPase-bindende Domäne
GDI	Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor (<i>guanine-nucleotide exchange factor</i>)
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GMP	Guanosin-5'-monophosphat

GppNHp	Guanosin-5'-(β,γ -methylen) triphosphat
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GSH	Glutathion (reduziert)
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
H	
h	<i>hora</i> (Stunde)
HA	<i>hemagglutinin</i>
HBS	HEPES- <i>buffered saline</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethan-sulfon-säure
H-ras	Harvey-ras
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Peroxidase aus Meerrettich)
I	
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
J	
Jun	Genprodukt des avian sarcoma-virus Protoonkogens 17 (jun = japanisch für 17)
K	
K12	<i>E.coli</i> -Sicherheitsstamm
kb	Kilobasen (1000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton (1000 Dalton, Molekulargewicht)
kPa	Kilopascal

K-ras	Kirsten-ras
L	
l	Liter
Laser	<i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LB	Luria Bertani
LPA	<i>lysophosphatidic acid</i>
M	
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
M	molar, Mol pro Liter
mA	Milliampere
mAb	monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i> , Epithel-Zelllinie
MEM	<i>modified Eagle's medium</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MLC	<i>myosin light chain</i>
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i>
mm	Millimeter
mM	Millimolar

mol	1 Mol \cong Stoffmenge von $6,022045 \times 10^{23}$ Teilchen \cong Avogadrosche Zahl $N(X)$
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
N	
NCS	<i>newborn calf serum</i>
ng	Nanogramm
NIH3T3	embryonale Fibroblastenzelllinie der Maus
NLS	<i>nuclear localisation signal</i> (Kernlokalisierungssignal)
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
N-ras	Neuroblastoma-ras
N-Terminus	Aminoterminus
O	
OD	optische Dichte (Extinktion)
P	
p140Sra-1	<i>specific Rac1-associated protein</i>
pAb	polyklonaler Antikörper (<i>polyclonal antibody</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pak	<i>p21-activated protein kinase</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i> (Blutplättchen-Wachstumsfaktor)
PEG	Polyethylenglycol
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>

pH	pH-Wert (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration)
PI3-Kinase	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKC	Proteinkinase C
POR-1	<i>partner of Rac</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Pwo	<i>Pyrococcus woesei</i>
R	
Rab	<i>Ras-like proteins from rat brain</i>
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Rad	<i>Ras associated with diabetes</i>
Rag	<i>ras-related GTP-binding proteins</i>
Ran	<i>Ras related nuclear proteins</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i> , Genprodukt des menschlichen c-H-ras-Protoonkogens
RBD	Ras-bindende Domäne
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
Rho	<i>Ras homology</i>
Rit	<i>Ras-like protein in tissue</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROCK	<i>rho-associated coiled coil kinase</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
S	
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bierhefe)
SDS	Natriumdodecylsulfat

sec	Sekunde
SH2, SH3	<i>src homology</i>
SHAMPO	<i>sheep anti-mouse peroxidase</i>
Src	Genprodukt des Sarcoma-induzierenden Protoonkogens des <i>rous sarcoma virus</i>
srp	<i>signal recognition particle</i>
SV40	<i>Simian virus 40</i>
T	
T	in DNA-Sequenz: Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tiam	T-Zell-Lymphom Invasion und Metastasierung (<i>T-cell lymphoma invasion and metastasis</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
Triton X-100	4-(2',2',4',4'-Tetramethylbutyl)phenyldecaethylenglycol
TSS	<i>transformation and storage solution</i>
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaureat
U	
U	<i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
üN	über Nacht

UV	Ultraviolett
V	
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Verhältnis Volumen/Volumen
W	
w/v	Verhältnis Masse/Volumen
wt	Wildtyp
Z	
z.B.	zum Beispiel

Abkürzungen für Aminosäuren

Die Abkürzungen für Aminosäuren werden im Ein- bzw. Dreibuchstaben-Code angegeben.

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

1 Einleitung

Die kleinste funktionelle Einheit eines Organismus ist die Zelle. Funktion und Leistung einer jeden lebenden Zelle beruhen auf einem komplexen Netzwerk biochemischer Prozesse, in dem viele Einzelreaktionen in geordneter Weise stattfinden. Die Zelle muss ihre intrazellulären Signalwege aufeinander abstimmen, aber auch auf Veränderungen der äußeren Lebensbedingungen reagieren. Physikalische oder chemische Reize, die den allgemeinen Umgebungszustand, das Nährstoffangebot oder den Kontakt zu benachbarten Zellen signalisieren, werden von der Zelle registriert und in intrazelluläre Reaktionen umgesetzt. Die Prozesse, die zwischen der Registrierung eines Signals an der Zelloberfläche und der Reaktion der Zelle auf dieses Signal stattfinden, werden mit dem Begriff Signaltransduktion bezeichnet.

Grundlegende Vorgänge, wie Zellteilung (Proliferation), Differenzierung und programmierter Zelltod (Apoptose) sind zelluläre Reaktionen auf äußere Signale. Treten Veränderungen in den Elementen der Signaltransduktion auf, kann dies zu einem Verlust oder zu einer permanenten Stimulation eines Signalweges führen. Abhängig von dessen Bedeutung werden die Lebensprozesse der Zelle dadurch unterschiedlich stark beeinträchtigt. Extreme Folgen einer Fehlregulation sind ungewollter Zelltod, der zu degenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer, führen kann, oder unkontrollierte Zellteilung, die sich oftmals als Krebs manifestiert.

1.1 GTP-bindende Proteine in der Signaltransduktion

In der intrazellulären Signaltransduktion haben GTP-bindende Proteine als molekulare Schalter eine zentrale Stellung [Bourne *et al.*, 1990; 1991]. Sie können einen aktiven, GTP-gebundenen und einen inaktiven, GDP-gebundenen Zustand einnehmen. Der Wechsel erfolgt unter dem Einfluss regulierender Proteine. Die

Hydrolyse des GTP zu GDP wird durch GAPs (*GTPase activating proteins*) beschleunigt, wobei die GTP-bindenden Proteine selbst nur über eine langsame intrinsische GTPase-Aktivität verfügen, weswegen sie auch als GTPasen bezeichnet werden. Diese intrinsische Hydrolyserate ist in der Regel aufgrund ihrer geringen Geschwindigkeit nicht von biologischer Bedeutung. Die Dissoziation des GDP wird durch GEFs (*Guaninnucleotide exchange factors*) katalysiert, wobei GTP als neues Nukleotid von der GTPase bevorzugt gebunden wird, da es in der Zelle in 100-fach höherer Konzentration als GDP vorliegt. Effektorproteine binden bevorzugt an die GTP-gebundene Form, werden durch die Bindung aktiviert und leiten daraufhin das Signal weiter (Abb.1.1).

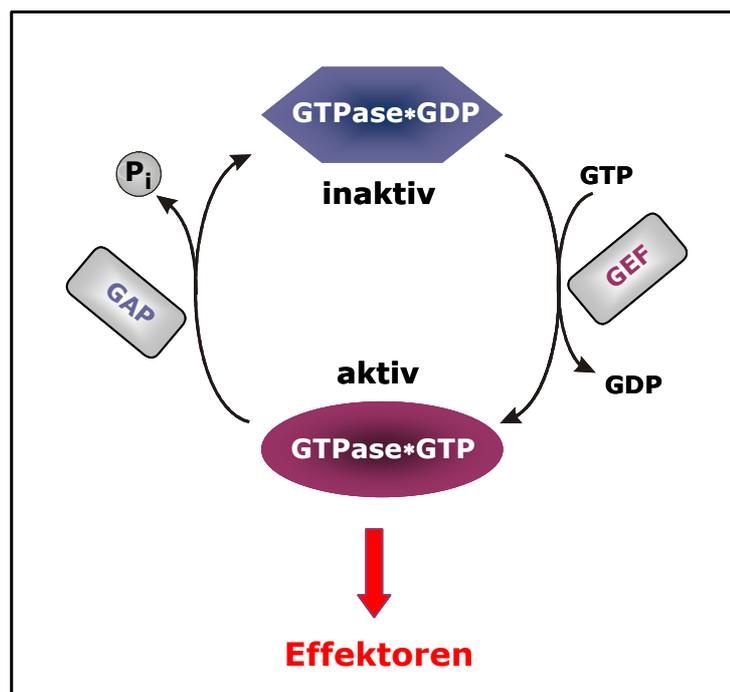


Abb. 1.1: Regulationszyklus der GTPasen. Die Nukleotidbindung der GTPase bestimmt deren Aktivität. Die Überführung in den aktiven Zustand erfolgt durch Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) indem gebundenes GDP gegen GTP ausgetauscht wird. Die Signalweiterleitung erfolgt durch die Bindung von Effektorproteinen. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) katalysieren die Hydrolyse von GTP zu GDP und freiem Phosphat und führen zur Inaktivierung der GTPase.

Vor allem Ras-homologe GTPasen, deren namensgebendes Protein Ras (*rat sarcoma virus*) ist, sind wichtige molekulare Schalter in der intrazellulären Signaltransduktion. Aufgrund des geringen Molekulargewichtes zwischen 20 und 30 kDa bezeichnet man diese Proteine auch als kleine, regulatorische GTPasen [Bourne *et al.*, 1990; 1991].

Die onkogene Wirkung der Ras-Proteine wurde erstmals von Harvey (1964) und Kirsten (1967) beschrieben. Das verantwortliche, virale Onkogenprodukt wurde aber erst 15 Jahre später identifiziert. Es handelt sich dabei um ein 21 kDa großes, GTP-bindendes Protein, das als v-Ras bekannt wurde [Shih *et al.*, 1979; Scolnick *et al.*, 1979]. Das zelluläre Homolog, c-Ras [Langbeheim *et al.*, 1980], ist ein zentrales Schalterprotein verschiedener Signalwege, die Wachstums- und Differenzierungsprozesse regulieren. Insbesondere bei der Weiterleitung von Signalen von der Zellmembran in den Zellkern ist dieses GTP-bindende Protein wichtig. Eine einzige Punktmutation kann über unkontrollierte, konstitutive Ras-Aktivierung zur Onkogenizität führen [Seeburg *et al.*, 1984]. Diese Punktmutationen beeinträchtigen die intrinsische GTPase-Aktivität und verhindern die GAP-vermittelte Hydrolyse von GTP. Durch den Verlust der Hydrolysefunktion kommt es zur Akkumulation von aktivem, GTP-gebundenem Ras-Protein und damit zu einem permanenten wachstumsstimulierenden Signal in der Zelle. Aus diesem Grund zählt Ras zu den Proto-Onkogenen. In 25-40% aller menschlichen Tumore sind Mutationen im ras-Gen nachweisbar, womit es das am häufigsten mutierte zytoplasmatische Protein in Säugertumoren ist [Slamon *et al.*, 1984; Barbacid, 1987; Bos, 1989].

Nach der Entdeckung von Ras wurde eine Vielzahl weiterer GTP-bindender Proteine gefunden, die ebenfalls wichtige Funktionen in der Signaltransduktion erfüllen. Die GTP-bindenden Proteine lassen sich aufgrund struktureller und funktioneller Ähnlichkeiten in fünf Superfamilien unterteilen [Bourne *et al.*, 1990; 1991]. Die erste Superfamilie bilden die G_{α} -Untereinheiten der heterotrimeren G-

Proteine, die an der rezeptorvermittelten Signaltransduktion beteiligt sind. Die kleinen regulatorischen GTPasen der Ras-Superfamilie, die als zytoplasmatische Proteine an vielen Signalprozessen innerhalb der Zelle beteiligt sind, bilden die zweite Superfamilie. Zur dritten Superfamilie gehören die Translationsfaktoren der Proteinbiosynthese, die Aufgaben bei der Initiation, Elongation und Termination erfüllen. Die vierte Superfamilie bilden die Untereinheiten der Signalerkennungspartikel (srp, *signal recognition particle*), die an der kotranslationalen Lokalisation der ribosomalen Proteinsynthese an das Endoplasmatische Retikulum beteiligt sind. Zur fünften Superfamilie gehören die großen GTP-bindenden Proteine mit sehr variablen Funktionen und Eigenschaften.

Allen diesen Proteinen ist die Ras-ähnliche GTP-Bindungsdomäne (GTPase-Domäne) gemeinsam, in der sich hochkonservierte Konsensussequenzen finden, die für die Bindung und Hydrolyse des Nukleotids essentiell sind.

Innerhalb der Ras-Superfamilie lässt sich eine weitere Unterteilung nach funktionellen und strukturellen Gesichtspunkten vornehmen. Durch Vergleiche der Aminosäuresequenz und der Funktion wird die Ras-Superfamilie in neun Unterfamilien eingeteilt [Boguski & McCormick, 1993; Herrmann & Nassar, 1996].

Die Ras-Unterfamilie ist an der Kontrolle der Zellproliferation und Differenzierung sowie der Apoptose beteiligt [Vojtek & Der, 1998; Bos, 1997; Vojtek *et al.*, 1993]. Aufgaben der Rho-Proteine (**Ras homologous**) sind die Reorganisation des Zytoskeletts und die Kontrolle des Zellwachstums und der Genexpression [Mackay & Hall, 1998; Sander & Collard, 1999]. Rab (**ras like proteins from rat brain**)- und Arf (**ADP-ribosylation factor**)- Proteine regulieren den vesikulären Transport [Somsel-Rodman & Wandinger-Ness, 2000; Schimmoller *et al.*, 1998; Moss & Vaughan, 1998], während die Ran (**ras related nuclear transport**)- Proteine am Kerntransport beteiligt sind [Moore, 1998; Gorlich & Kutay, 1999]. Welche Rolle und Funktion Rad (**Ras-associated with diabetes**)-, Rheb (**ras homolog enriched in brain**)-, Rag (**ras-related GTP-binding proteins**)- und Rit (**ras-like expressed in**

many tissues)- Proteine spielen, ist noch weitgehend unbekannt. Rit-Proteine binden an Calmodulin und sind wahrscheinlich an der Ca^{2+} -vermittelten Signaltransduktion beteiligt [Lee *et al.*, 1996].

Mit Ausnahme der Ran- und Rad-Proteine werden alle Mitglieder der Ras-Superfamilie durch kovalente Bindung hydrophober Gruppen an spezifische Aminosäuren der jeweiligen GTPase posttranslational modifiziert. Dazu werden Myristinsäure-, Palmitinsäure-, C_{15} -Farnesyl- oder C_{20} -Geranylgeranylreste durch spezifische Transferasen mit der GTPase verknüpft. Die Lipidmodifikationen vermitteln die Membranlokalisierung der Proteine und sind daher für ihre biologische Funktion essentiell [Brown & Goldstein, 1993]. Die Modifizierung der Ras- und Rheb-Proteine in Form einer Farnesylierung und die Geranylgeranylierung der Rho- und Rit-Proteine erfolgt durch Isoprenylierung eines C-terminalen Cysteinrestes unter Ausbildung einer stabilen Thioetherbindung. Lediglich RhoB wird wie Ras farnesyliert, und stellt somit eine Ausnahme dar [Seabra, 1998]. Als Signal für die posttranslationale Isoprenylierung fungiert das C-terminal lokalisierte CaaX-Motiv (C = Cystein, a = aliphatische Aminosäure, X = beliebige Aminosäure) [Bourne *et al.*, 1991], wobei die letzte Aminosäure die Art der Isoprenylierung determiniert [Goldstein *et al.*, 1991; Marshall, 1993; Moores *et al.*, 1991; Reiss *et al.*, 1991; Seabra *et al.*, 1991; Yokoyama *et al.*, 1991]. Liegt ein Methionin oder Serin vor, so fungiert das Protein als Substrat der Farnesyltransferase, während ein Leucin eine Modifizierung durch die Geranylgeranyltransferase bewirkt. Im Fall der Ras- und Rho-Proteine werden nach erfolgter Modifizierung des Cysteins die drei C-terminalen Aminosäuren (aaX) proteolytisch abgespalten und die Carboxylgruppe des isoprenylierten Cysteins methyliert [Gutierrez *et al.*, 1989; Hancock *et al.*, 1991a]. Häufig werden Proteine mehrfach posttranslational modifiziert. So erfolgt beispielsweise bei H-Ras und N-Ras nach der Farnesylierung zusätzlich eine Palmytylierung zweier N-terminal des CaaX-Motivs gelegener Cysteine [Hancock *et al.*, 1989; Hancock *et al.*, 1990; Hancock *et al.*, 1991b] Dies ist für eine stabile

Insertion der Proteine in der Membran erforderlich [Choy et al., 1999; Magee & Marshall, 1999; Völkert *et al.*, 2001].

1.2 GTPasen der Rho-Familie

Das erste rho-Gen wurde 1985 durch Zufall aus der Nacktschnecke *Aplysia californica* (Seehase) kloniert. Die gleiche Arbeitsgruppe hat kurze Zeit später die humanen Homologe RhoA, RhoB und RhoC identifiziert [Madaule & Axel, 1985].

Bis heute sind 19 verschiedene Proteine der Rho-Familie bei Säugern bekannt, die aufgrund ihrer Primärsequenzhomologien in fünf Gruppen unterteilt werden können [Bishop & Hall, 2000; Ellis & Mellor, 2000; Vignal *et al.*, 2000]:

1. Rho-Gruppe (RhoA, B, C)
2. Rac-Gruppe (Rac1, 1b, 2, 3, RhoG)
3. Cdc42-Gruppe (Cdc42, Rif, TCL, Wrch-1, Chp)
4. RhoD-Gruppe (RhoD, TC10)
5. Rnd-Gruppe (Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7, Rnd3/RhoE/MemB, Rho8, RhoH/TTF).

Cdc42 (*cell division cycle 42*), Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) und RhoA gehören zu den am besten untersuchten Proteinen der Rho-Familie [Hall, 1998].

Im Gegensatz zu den onkogenen Ras-Proteinen, die durch Punktmutationen konstitutiv aktiviert werden und so zur Tumorentstehung beitragen, wurden bisher, bis auf eine Ausnahme, keine mutierten Rho-Proteine in Tumoren entdeckt. Bei multiplen Myeloma und einem non-Hodgkin Lymphom wurde eine Translokation des RhoH/TTF-Gens als Ursache für die Krankheit gefunden [Preudhomme *et al.*,

2000]. Zudem wurde in den letzten Jahren mehrfach von transkriptionellen Überexpressionen bestimmter Rho-Proteine in vielen Arten von Tumoren berichtet [Sahai & Marshall, 2002; Boettner & Van Aelst, 2002]. Da vor allem GEF-Proteine onkogenen Charakter haben und sie Rho-GTPasen aktivieren, kommt den Rho-GTPasen auf diesem Weg eine zentrale Rolle bei der Tumorentstehung und Metastasierung zu. Obwohl in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte bei der Entschlüsselung der Aktivierung und Signalweiterleitung durch Rho-Proteine und ihrer Bedeutung für die Tumorentstehung und Tumorentstehung gemacht wurden, sind noch viele Details weitgehend ungeklärt.

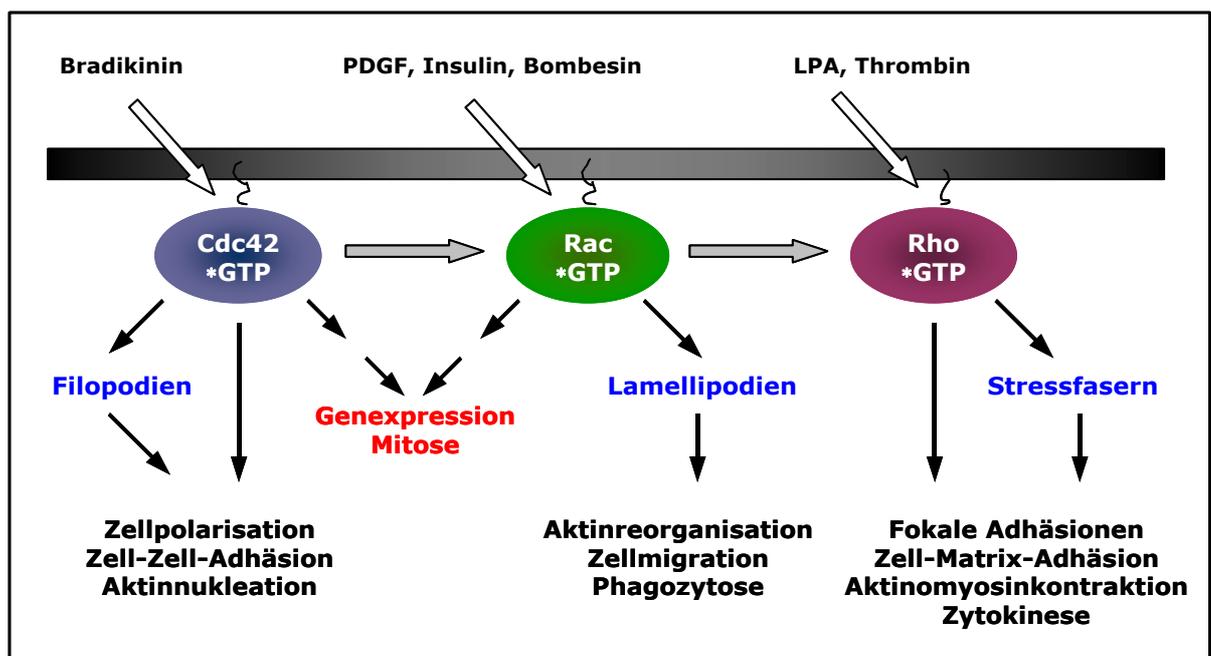


Abb. 1.2: Regulation der Morphogenese, Adhäsion und Migration durch Rho-GTPasen. Die Rho-Proteine sind über eine Isoprenylgruppe (meist Geranylgeranyl-) an der Plasmamembran verankert, wo sie als molekulare Schalter durch eine Vielzahl extrazellulärer Liganden aktiviert werden. In ihrer aktiven GTP-gebundenen Form leiten sie das Signal an verschiedene Effektorproteine weiter, die ihrerseits eine Reihe von biologischen Prozessen, z.B. die Reorganisation des Zytoskeletts oder die Transkription, kontrollieren. Der Synergismus dieser Signalwege schafft die Voraussetzung für einen strikt regulierten Ablauf biologischer Prozesse in der Zelle. Transiente Transfektionsexperimente in Fibroblasten haben gezeigt, dass die Rho-GTPasen auch untereinander wechselwirken. So aktiviert in diesem Fall Cdc42 Rac, welches wiederum Rho reguliert [Ridley *et al.*, 1992; Nobes & Hall, 1995]. Dennoch sind Wechselwirkungen unter den Proteinen der Rho-Familie Zelltyp-abhängig [Sander *et al.*, 1999]. LPA: *lysophosphatidic acid*; PDGF: *platelet-derived growth factor*.

Die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der Rho-Proteine in der Zelle steht in Zusammenhang mit ihren biologischen Funktionen (Abb. 1.2).

Sie sind sowohl an der Regulation der Aktin-Polymerisation an Membranen, als auch an der Kontrolle der Genexpression über Signalkaskaden von der Plasmamembran in den Kern beteiligt [Mackay & Hall, 1998]. Über den membranassoziierten Aufbau des Aktinzytoskeletts werden Prozesse, die durch extrazelluläre Signale, wie Wachstumsfaktoren und Zytokine, angeschaltet werden, kontrolliert. Dazu gehören Morphogenese, Phagozytose, Pinozytose, Zytokinese, Axonwachstum, Zell-Zell-Adhäsion, Zell-Substrat-Adhäsion, Zellpolarität, Zellzyklus und Zellbewegung [Hall, 1998]. Letztere ist von entscheidender Bedeutung für die Embryonalentwicklung, sowie für die Immunantwort, Wundheilung, Tumorbildung und Metastasierung [Horwitz & Parsons, 1999].

RhoA reguliert einerseits die Ausbildung von Aktinomyosinfasern (Stressfasern), die eine wichtige Rolle bei der Zellkontraktion spielen, und andererseits die Entstehung von fokalen Adhäsionen, die für die Zell-Substrat-Adhäsion essentiell sind [Hall, 1998]. Dagegen führt die Cdc42-vermittelte Polymerisation von Aktin zu langen, fingerähnlichen Ausstülpungen der Zellmembran (Filopodien), während Rac1 die Ausbildung netzartiger Membranfortsätze (Lamellipodien) induziert (Abb. 1.3).

Anders als die meisten Proteine der Rho-Familie, die konventionelle GTPasen sind und dementsprechend eine intrinsische GTP-Hydrolyseaktivität besitzen, kann RhoE (auch Rnd3 oder MemB) GTP nicht hydrolysieren [Foster *et al.*, 1996]. Der Grund hierfür sind Aminosäuresubstitutionen an vier Positionen (Aminosäuren Gly12, Gly13, Ala59 oder Gln61 in Ras), die auch in über 30% der menschlichen Tumore im *ras*-Gen mutiert und für die Onkogenizität des Ras-Proteins verantwortlich sind. [Foster *et al.*, 1996; Wittinghofer & Waldmann, 2000]. Die biologischen Wirkmechanismen von RhoE und mögliche Interaktionspartner sind noch unbekannt.

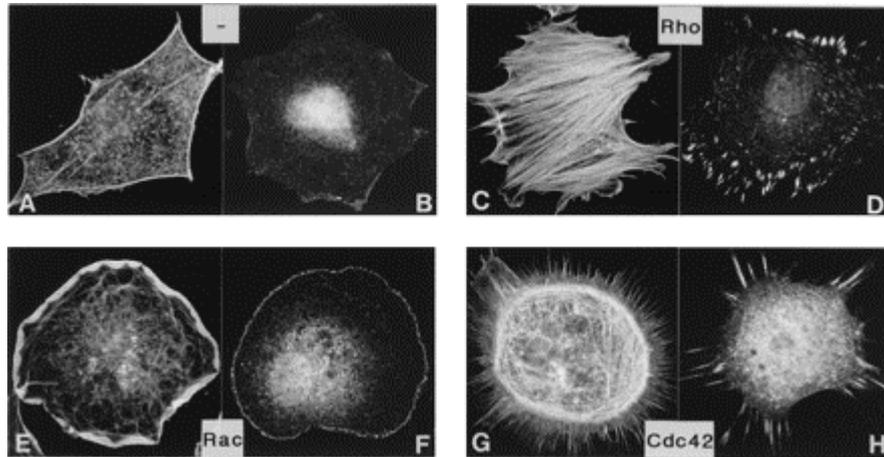


Abb. 1.3: Wirkung der jeweiligen Rho-Proteine auf die Organisation des Zytoskeletts. Rho, Rac, and Cdc42 kontrollieren den Aufbau und die Organisation des Zytoskeletts. Ruhende Swiss 3T3 Fibroblasten unter Serumentzug (-) enthalten sehr wenige organisierte Aktinfilamente (A) oder Vinculin-enthaltende Integrin-Adhäsions-Komplexe (B). Der Effekt von Rho-, Rac-, oder Cdc42-Aktivierung in diesen Zellen kann auf verschiedene Weise beobachtet werden, z.B. durch Zusatz extrazellulärer Wachstumsfaktoren, Mikroinjektion aktivierter GTPasen oder Mikroinjektion von GEFs. Zusatz des Wachstumsfaktors Lysophosphatidylsäure aktiviert Rho, was zur Entstehung von Stressfasern (C) und fokalen Adhäsionen führt (D). Mikroinjektion von konstitutiv aktivem Rac induziert die Bildung von Lamellipodien (E) und assoziierten Adhäsionskomplexen (F). Mikroinjektion von FGD1, einem Austauschfaktor für Cdc42, führt zur Entstehung von Filopodien (G) und assoziierten Adhäsionskomplexen (H). Cdc42 aktiviert Rac; daraus folgt, dass Filopodien mit Lamellipodien assoziiert sind, wie in (G) gezeigt. In (A), (C), (E), and (G), wurden die Aktinfilamente mit Phalloidin-Rhodamin gefärbt; in (B), (D), (F), and (H), wurden die Adhäsionskomplexe mit einem Antikörper gegen Vinculin sichtbar gemacht. Maßstab: 1 cm = 25 μ m. [Abb. Hall, 1998]

1.3 Regulation der GTPasen der Rho-Familie

Die Funktion der Rho-Proteine als molekularer Schalter hängt, wie auch bei allen anderen GTPase-Familien, von ihrem nukleotidgebundenen Zustand ab, und wird in der Zelle durch drei Protein-Familien reguliert (Abb.1.4):

1. Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (*guanine-nucleotide exchange factors*, GEFs) (Cerione & Zheng, 1996; Zheng, 2001)

2. Guanosintriphosphatase-aktivierende Proteine (*GTPase activating proteins, GAPs*) (Lamarche & Hall, 1994)
3. Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (*guanine-nucleotide dissociation inhibitors, GDIs*) (Olofsson, 1999).

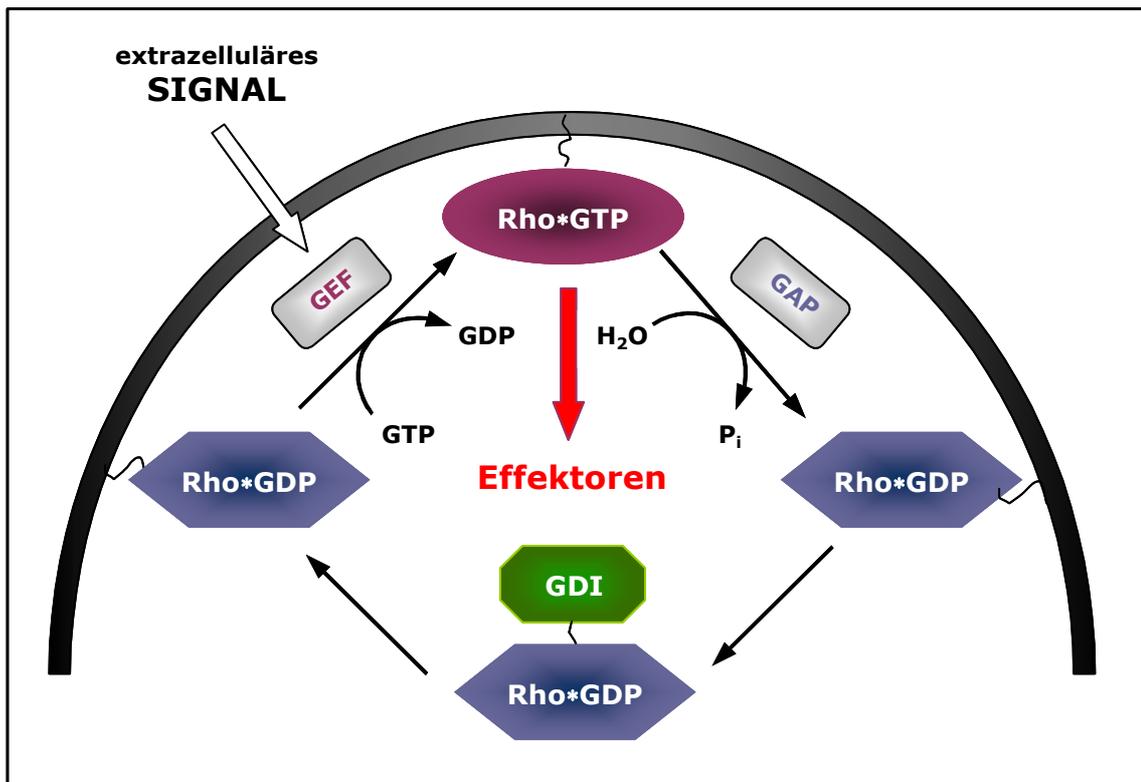


Abb. 1.4: Schematische Übersicht der Regulation von Rho-GTPasen. Die Rho-Proteine zirkulieren zwischen dem aktiven GTP-gebundenen und dem inaktiven GDP-gebundenen Zustand. Dabei wird die Schalterfunktion an der Membran durch GEFs und GAPs reguliert. Durch die Relokalisation von der Membran ins Zytosol verhindern GDIs die Aktivierung durch GEFs, indem sie die Rho-GTPasen vom Ort ihrer Aktivierung und Wirkung entfernen. In der aktivierten Form übertragen die Rho-Proteine das empfangene extrazelluläre Signal auf diverse Effektormoleküle, die das Signal amplifizieren und weiterleiten. Die Zellantwort hängt von Art und Lokalisation des jeweils aktivierten Effektors ab. Verändert nach Etienne-Manneville & Hall, 2002.

Wie bereits beschrieben aktivieren Guaninnukleotid-Austauschfaktoren ihre GTPasen, indem sie die Dissoziation von GDP katalysieren. RhoGEFs (60 Vertreter

sind bekannt) werden durch extrazelluläre Signale aktiviert und/ oder zur Zellmembran rekrutiert, wo sie dann spezifisch den Austausch von GDP zu GTP katalysieren. Nur in der aktiven GTP-gebundenen Form wechselwirken die Rho-Proteine direkt mit ihren Effektoren (90 Vertreter sind bekannt), wodurch diese aktiviert werden und das Signal weiterleiten [Bishop & Hall, 2000; Van Aelst & D'Souza-Schorey, 1997; Schmitz *et al.*, 2000]. Die Beendigung der Signalübertragung wird durch RhoGAPs (70 Vertreter sind bekannt) reguliert, die die sonst sehr langsame GTP-Hydrolyse der Rho-Proteine 10^5 -fach stimulieren [Wittinghofer *et al.*, 1997; Graham *et al.*, 1999]. Anders als Ras-GTPasen unterliegen die Rho-GTPasen zusätzlich einem dritten Regulationsmechanismus durch RhoGDIs (4 Vertreter sind bekannt). Diese binden an den posttranslational C-terminal angefügten Isoprenylrest der GDP-gebundenen Rho-Proteine, maskieren diesen und entfernen damit das Protein von der Plasmamembran [Olofsson, 1999]. Im Zytoplasma ist der Nukleotidaustausch durch die membranassoziierten RhoGEFs nicht mehr möglich (Abb. 1.4).

1.3.1 Struktur, Funktion und Onkogenizität von RhoGEFs

Alle bisher bekannten Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) der Rho-GTPasen gehören zur Dbl-Familie. Diese ist nach dem Protein Dbl (*human diffuse B-cell lymphoma*) benannt, das als Produkt eines Onkogens in diffusen B-Zell-Lymphomen identifiziert werden konnte [Srivastava *et al.*, 1986]. Das Dbl-Protein ist der Prototyp einer Reihe strukturell und funktionell verwandter Proteine, bei denen eine katalytische **Dbl-homologe Domäne (DH)** für die GEF-Aktivität verantwortlich ist [Hart *et al.*, 1994]. Der DH-Domäne folgt C-terminal eine **Pleckstrin-homologe Domäne (PH)** [Haslam *et al.*, 1993; Mayer *et al.*, 1993; Shaw, 1996]. Von dieser wird angenommen, dass sie über eine Bindung an Inositol-Phospholipide und/ oder an die $\beta\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine für die transiente Lokalisation der Proteine an der Plasmamembran verantwortlich ist [Whitehead *et al.*, 1997; Lemmon *et al.*, 1996]. Aus diesem Grund wird die PH-

Domäne als eine membranbindende Domäne betrachtet [Cerione & Zheng, 1996; Irvine, 1998; Lemmon & Ferguson, 2000; Zheng, 2001]. Weitere Möglichkeiten, wie Oligomerisierung und die Bindung anderer Proteinliganden, sind für die PH-Domäne postuliert, aber noch nicht eindeutig bewiesen worden [Lemmon & Ferguson, 2000].

Zusätzliche Domänen der jeweiligen GEFs kontrollieren möglicherweise die Variabilität der intrazellulären Lokalisation [Cerione & Zheng, 1996].

Einige der DH-Proteine weisen onkogene Eigenschaften auf: Bcr (*breakage cluster region*) ist an der Entwicklung von Leukämie und Tiam1 (*T-lymphoma invasion and metastasis*) an der Tumordinvasion und Metastasierung beteiligt. Erhöhte Genexpression oder veränderte subzelluläre Lokalisation dieser Proteine führt zur Fehlregulation und Aktivierung der Rho-Proteine, und anschließend zur veränderten Zellproliferation [Stam & Collard, 1999]. Dies würde auch erklären, warum Rho-Proteine eine erhöhte, abnormale Aktivität in manchen metastasierenden Tumoren aufweisen und zur Tumormetastasierung beitragen [Clark *et al.*, 2000; del Peso *et al.*, 1997]. Details der GEF-katalysierten Nukleotid austauschreaktion bei Rho-Proteinen sind jedoch noch unklar.

Tiam1 ist ein Beispiel für einen sehr gut untersuchten Rac-spezifischen GEF, der 1994 zuerst beschrieben wurde [Habets *et al.*, 1994]. Tiam1 weist eine DH-Domäne und zwei PH-Domänen auf. Des Weiteren enthält das Protein neben einer Ras-bindenden Domäne (RBD) eine *coiled-coil*-Region (CC), eine so genannte EX-Domäne und eine *disc-large-homology*-Region (DHR) (Abb. 1.5).

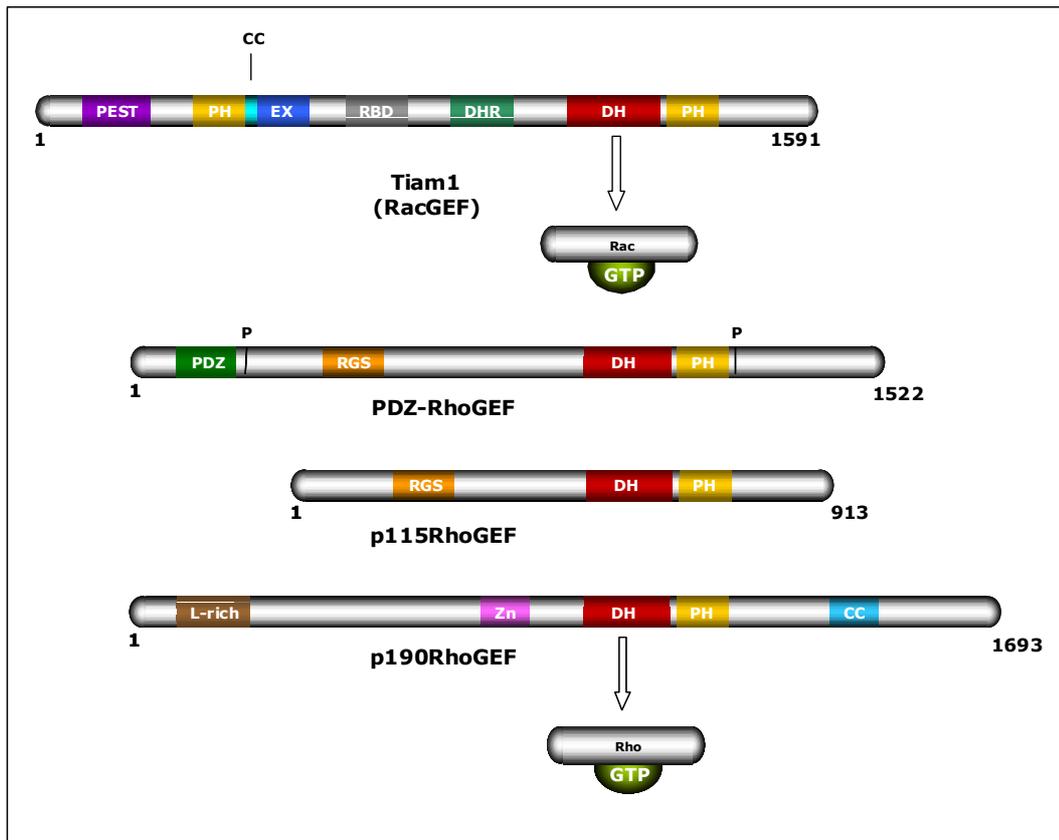


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Domänenstrukturen von Tiam1 (RacGEF; 1591 Aminosäuren), PDZ-RhoGEF (1522 Aminosäuren), p115RhoGEF (913 Aminosäuren) und p190RhoGEF (1693 Aminosäuren). PEST: Motiv reich an Aminosäuren P, E, S, T; PH: Pleckstrin-homologe Domäne; CC: *coiled-coil*-Region; EX: EX-Domäne; RBD: **R**as-**b**indende **D**omäne; DHR: *disc-large-homology*-Region; DH: **D**bl-homologe Domäne; PDZ: *domain present in PSD-95, Dlg, and ZO-1/2*; P: Prolin-reiche Region; RGS: *regulator of G-protein signalling*; L-rich: Leucin-reiche Region; Zn: Zinkfinger-Motiv. Verändert nach Zheng, 2001, Rümenapp *et al.*, 1999, van Horck *et al.*, 2001.

Ursprünglich wurde Tiam1 dafür verantwortlich gemacht, das invasive Potential der normalerweise nicht-invasiven Lymphom-Zelllinie BW5147 zu steigern [Habets *et al.*, 1994]. Nach der Transfektion mit Tiam1 sind diese Zellen in der Lage, Fibroblasten-Monolayer zu infiltrieren und, nach Injektion in CH3-Nacktmäusen, zu metastasieren. Im Gegensatz zu den in Lymphom-Zellen beobachteten Effekten kann Tiam1 aber auch als Tumorsuppressor in Epithelzellen fungieren [Hordijk *et al.*, 1997]. In MDCK-Zellen (*Madin-Darby canine kidney*) erhöht Tiam1 die E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion und die Aktin-Polymerisation an Zell-Zell-

Kontakten [Engers *et al.*, 2001]. In Ras-transformierten MDCK-Zellen führt die Expression von Tiam1 zu einer Reversion des transformierten Phänotyps und zu einem Verlust der Invasivität.

p115RhoGEF [Hart *et al.*, 1996] und PDZ-RhoGEF (auch KIAA0380; *domain present in PSD-95, Dlg, and ZO-1/2*) [Rümenapp *et al.*, 1999] sind Beispiele für Rho-spezifische GEFs, die allerdings bei weitem nicht so gut erforscht sind wie Tiam1. PDZ-RhoGEF und p115RhoGEF (Abb. 1.5) weisen ebenfalls eine Tandem-DH/PH-Domäne auf, die für die GEF-Aktivität verantwortlich ist. Außerdem haben beide eine RGS-homologe Domäne (*regulator of G protein signalling*), die zuerst für p115RhoGEF beschrieben wurde [Kozasa *et al.*, 1998]. PDZ-RhoGEF und p115RhoGEF sind spezifisch in unterschiedlichen Geweben nachweisbar und haben eine entscheidende doppelte Funktion bei der Lysophosphatidsäure-induzierten RhoA-Aktivierung: die Inaktivierung von G α 13 durch die RGS-Domäne, eine GAP-Funktion, und gleichzeitig die Rho-Aktivierung durch die DH-Domäne [Fukuhara *et al.*, 1999; Rümenapp *et al.*, 1999; Hart *et al.*, 1998]. Auf diese Weise verbindet die RGS-Domäne G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit der RhoA-Aktivierung. Die PDZ-Domäne, die nur in PDZ-RhoGEF vorhanden ist, hat wie die DHR-Domäne in Tiam1 eine Funktion bei der intrazellulären Lokalisation und Protein-Interaktion. Die Rekrutierung zur Zellmembran durch aktiviertes G α 13 ist wichtig für die Aktivierung des Rho-Signalweges durch p115RhoGEF [Bhattacharyya & Wedegaertner, 2000] und vermutlich auch durch andere RhoGEFs mit RGS-Domäne.

Ein erst kürzlich beschriebener und charakterisierter RhoA-spezifischer GEF ist p190RhoGEF. Überexpression dieses GEFs in neuronalen Zellen führt zu Zellabrundung und hemmt das Wachstum von Neuriten [van Horck *et al.*, 2001; Gebbink *et al.*, 1997]. Der GEF ist ubiquitär in allen Geweben nachweisbar. Neben der für RhoGEFs typischen Tandem-DH/PH-Domäne, die für die GEF-Aktivität verantwortlich ist, enthält p190RhoGEF verschiedene potentiell regulatorische

Motive. Dies sind im Einzelnen eine N-terminale Leucin-reiche Region, eine Cystein-reiche Zinkfingerdomäne und eine C-terminale Region, die ein α -helikales *coiled-coil* ausbilden könnte. Über die C-terminale Region interagiert p190RhoGEF mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett. p190RhoGEF weist im Gegensatz zu p115RhoGEF und PDZ-RhoGEF keine RGS-Domäne zur Interaktion mit G α -Proteinen auf [van Horck *et al.*, 2001] (Abb. 1.5).

1.3.2 Struktur und Funktion von RhoGAPs

Die Beendigung der Signalübertragung wird, wie bereits erwähnt, durch RhoGAPs reguliert. Über den Mechanismus der GAP-katalysierten GTP-Hydrolyse wurde lange spekuliert. Anhand der Kristallstruktur des p120RasGAP-Komplexes in Anwesenheit von Aluminiumfluorid [Scheffzek *et al.*, 1997] und biochemischer Charakterisierung des Einflusses einzelner Aminosäuren [Ahmadian *et al.*, 1997] konnte gezeigt werden, dass das GAP direkt an der GTP-Hydrolyse beteiligt ist, und dass der sogenannte Argininfinger dabei durch Stabilisierung des Übergangszustandes eine entscheidende Rolle spielt [Ahmadian *et al.*, 1997; Scheffzek *et al.*, 1997]. Der Mechanismus der GAP-stimulierten Hydrolyse konnte auch für die Rho-Proteine bestätigt werden [Hoffmann *et al.*, 1998; Rittinger *et al.*, 1997].

Rho-GAPs sind wie auch Rho-GEFs und Rho-Effektoren an vielfältigen Prozessen beteiligt. Sie spielen unter anderem eine wichtige Rolle in der neuronalen Morphogenese [Billuart *et al.*, 1998], bei Zellwachstum und Differenzierung sowie bei der Endozytose [Moon & Zheng, 2003]. Für einige Rho-GAPs wird eine Funktion als Tumorsuppressor angenommen, da eine erhöhte Rho-GTPase-Aktivität oder Expression für viele menschliche Tumore nachgewiesen werden konnte. Es ist deshalb naheliegend, dass Rho-GAPs als negative Regulatoren der Rho-GTPasen bei Tumorwachstum und Tumorprogression eine Rolle spielen. So ist beispielsweise das Gen für das RhoGAP DLC1 (*deleted in liver cancer*) in 44% der primären Leberkarzinome deletiert [Yuan *et al.*, 1998].

Ein wichtiges für Rho spezifisches GAP ist p190RhoGAP. Es wurde zuerst als ein Tyrosin-phosphoryliertes Protein entdeckt, das mit p120RasGAP in v-Src-transformierten Zellen assoziiert ist [Ellis *et al.*, 1990; Bouton *et al.*, 1991]. p190RhoGAP besteht aus einer N-terminalen, GTP-bindenden Domäne, der eine Rolle bei der Signaltransduktion zugeschrieben wird, einer Mitteldomäne, die für die Bindung an p120RasGAP wichtig ist, und einer C-terminalen GAP-Domäne, die spezifisch für Rho ist, nicht aber für die anderen GTPasen der Rho-Familie [Settleman *et al.*, 1992; Ridley *et al.*, 1993; Foster *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1995; Hu & Settleman, 1997; Tatsis *et al.*, 1998] (Abb. 1.6). p190RhoGAP spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Rho-vermittelten Reorganisation des Aktinzytoskeletts [Ridley *et al.*, 1993, Chang *et al.*, 1995]. Diverse Studien haben gezeigt, dass die Tyrosine Y1087 und Y1105 in der Mitteldomäne von p190RhoGAP für die Bindung an die beiden SH2-Domänen von p120RasGAP wichtig sind, wobei *in vivo* Y1105 die wichtigere Rolle spielt [McGlade *et al.*, 1993; Bryant *et al.*, 1995; Hu & Settleman, 1997; Roof *et al.*, 1998]. Die Phosphorylierung erfolgt durch die Src-Kinase (*sarcoma*), es scheinen aber auch Phosphotyrosin-unabhängige Mechanismen für die Interaktion von p190RasGAP und p120RasGAP eine Rolle zu spielen, da für p190RhoGAP auch ein hohes Serin-Phosphorylierungsniveau nachgewiesen werden konnte [Roof *et al.*, 1998]. Weitere, bisher nicht aufgeklärte Regulationsmechanismen, beispielsweise über Rezeptoren von Wachstumsfaktoren, werden vermutet [Haskell *et al.*, 2001]. Die Assoziation von p190RhoGAP an p120RasGAP scheint eine Verbindung zwischen den Ras- und Rho-Signalwegen zu sein, da sie zu einer verminderten Aktivität von Ras-GAP führt, was den Ras-GTP-Level in der Zelle und damit mitogene Signale erhöht [Wilson *et al.*, 1989; Moran *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1993]. Der Effekt des Komplexes auf die p190RhoGAP-Aktivität ist noch unklar, jedoch wird vermutet, dass der N-Terminus von p120RasGAP Rho über die Kontrolle der Rho-GAP-Aktivität reguliert [McGlade *et al.*, 1993].

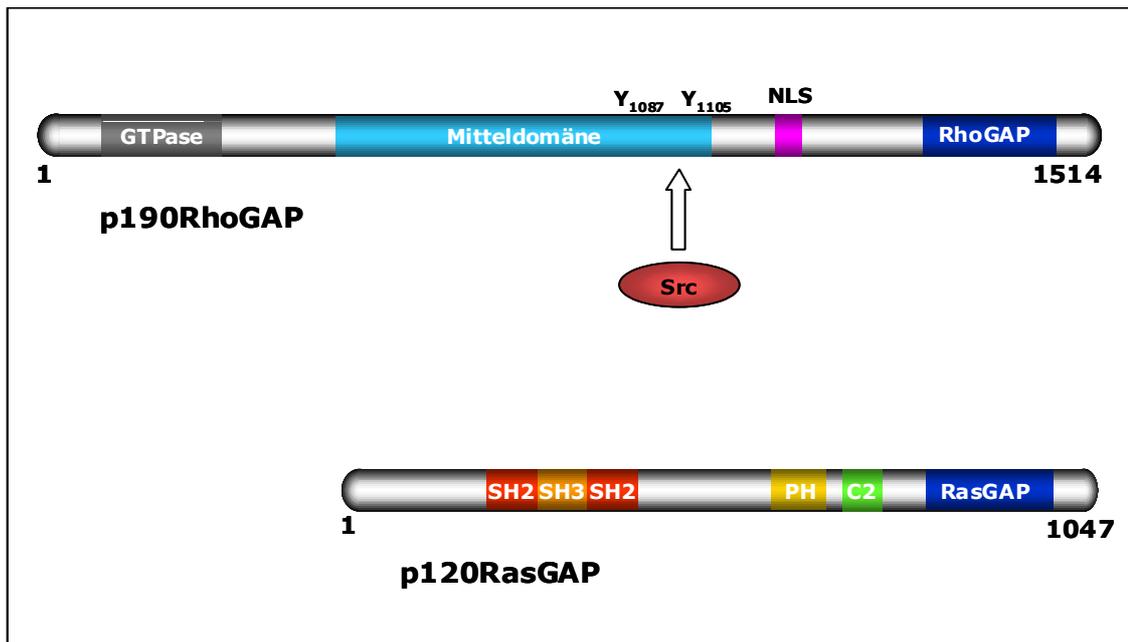


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Domänenstrukturen von p190RhoGAP (1514 Aminosäuren) und p120RasGAP (1047 Aminosäuren). GTPase: GTP-bindende Domäne (GTPase-homolog), der Domäne wird eine Rolle bei der Signaltransduktion zugeschrieben; Mitteldomäne: vermittelt die Interaktion von p190RhoGAP mit p120RasGAP, die Bindung von p190RhoGAP an die SH2-Domänen von p120RasGAP erfolgt nach Phosphorylierung der Tyrosine Y1087 und Y1105; NLS: *nuclear localization sequence*, Kernimportsequenz; GAP: *GTPase activating protein*, notwendig für die Inaktivierung der GTPase; SH2: *Src-homology2*, bindet tyrosinphosphorylierte Proteine; SH3: *Src-homology3*, bindet an Polyprolinsegmente (PP); PH: *Pleckstrin-homologe Domäne*, Rolle bei der Membranlokalisation; C2: *protein kinase C conserved region 2 domain*, ebenfalls Rolle bei der Membranlokalisation. Verändert nach Roof *et al.*, 2000; Yaffe, 2002.

Einige bakterielle Proteine, die entweder als GEF- oder GAP- vergleichbare Regulatoren wirken, greifen zum Teil gezielt Rho-Proteine an, oder wirken als Toxine, die Rho-Proteine durch ADP-Ribosylierung, Glukosylierung oder Desaminierung kovalent modifizieren [Hardt *et al.*, 1998; Goehring *et al.*, 1999; Aktories *et al.*, 2000].

1.3.3 Effektorproteine der Rho-Familie

Effektorproteine zeichnen sich dadurch aus, dass sie zwischen der inaktiven, GDP-gebundenen und der aktiven, GTP-gebundenen Form der Rho-Proteine

unterscheiden können, und nur mit letzterer interagieren, wobei sie selbst aktiviert werden und das Signal ihrerseits auf nachgeschaltete Moleküle der Signalkette übertragen. Durch die GTP-Bindung finden vor allem in der Schalter I-Region (Aminosäuren 26-45, Rac/Cdc42-Numerierung) und der Schalter II-Region (Aminosäuren 59-74, Rac/Cdc42-Numerierung) der Rho-Proteine konformationelle Änderungen statt [Ihara *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 1997]. Effektorproteine erkennen bestimmte, für sie spezifische, Regionen in der Tertiärstruktur der GTPasen und binden an diese. Mutationsstudien weisen darauf hin, dass neben Schalter I und Schalter II auch eine für Rho-Proteine spezifische, helikale Insertion (Aminosäuren 123-135, Rac/Cdc42-Numerierung) an der Effektorbindung oder Aktivierung beteiligt ist [Maesaki *et al.*, 1999; Sahai *et al.*, 1998; Fujisawa *et al.*, 1998, Lamarche *et al.*, 1996; Joneson *et al.*, 1996].

Die wichtigsten im Augenblick bekannten Effektoren für Rho sind Citron-Kinase, ROCK (*rho-associated coiled coil kinase*), mDia, Rhotekin, Rhophilin und PKN, die mit Ausnahme ihrer Rho-bindenden Domänen nur sehr wenig Homologie in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen [Reid *et al.*, 1996].

Im Gegensatz zu Rho-Effektoren enthalten viele, wenn auch nicht alle, Effektorproteine von Rac und Cdc42 eine konservierte GTPase-bindende Consensus-Sequenz, das CRIB (*Cdc42/Rac-interactive binding*)-Motiv [Burbelo *et al.*, 1995].

Anhand von NMR-Studien von Cdc42 im Komplex mit α Pak (*p21-activated kinase*), WASP (*Wiskott-Aldrich-syndrome protein*), bzw. ACK (*activated Cdc42-associated tyrosine kinase*) [Mott *et al.*, 1999; Morreale *et al.*, 2000] konnte gezeigt werden, dass alle G-Protein-bindenden Domänen (GBD) der drei Effektoren an dieselben Regionen von Cdc42, nämlich die Schalterregionen I und II, sowie die Helices $\alpha 1$ und $\alpha 5$ und die Faltblattstruktur $\beta 2$, binden. Der N-Terminus von jeder der GBDs, an dem das CRIB-Motiv lokalisiert ist, zeigt die größte Homologie in der Sequenz der Effektorproteine.

Für das Verständnis der Funktion von Rho-GTPasen ist es wichtig, nicht nur die Interaktion der GTPase selbst mit dem Effektor zu verstehen, sondern auch, in welcher Form das aktivierte Effektorprotein das Signal weiterleitet und welche der zahlreichen Rho-Funktionen es speziell vermittelt.

Die Rho-Effektoren (PKN, Rhotekin, Rhoophilin, Citron, mDia und ROCK) kontrollieren verschiedene aktinomyosinvermittelte zelluläre Prozesse. Zur Ausbildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionen durch RhoA scheint die Aktivierung von mindestens zwei Rho-Effektoren (mDia und ROCK) erforderlich zu sein. p140mDia induziert Aktinpolymerisation durch die Aktivierung von Profilin, einem Austauschfaktor für Aktin [Watanabe *et al.*, 1999]. Die Serin/Threonin-Proteinkinase p160ROCK inaktiviert Cofilin und Myosin-Phosphatase, und stabilisiert dadurch die Aktinfilamente durch Verstärkung der aktinomyosinbasierten Kontraktilität [Maekawa *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 1996; Kawano *et al.*, 1999]. Weiterhin spielt ROCK eine wichtige Rolle bei der Tumordinvasion [Itoh *et al.*, 1999]. Der Effektor Citron beeinflusst die Kontraktion während der Zytokinese [Madaule *et al.*, 1998], während die biologischen Funktionen von PKN, Rhotekin und Rhoophilin noch unklar sind. Ebenso ist noch unbekannt, welche dieser Effektoren jeweils durch RhoA, RhoB und/ oder RhoC aktiviert werden.

Die Ser/Thr-Proteinkinasen der Pak-Familie (Pak 1-6) gehören zu den am besten untersuchten Rac-Effektoren, die unter anderem eine entscheidende Rolle bei der Aktindynamik und Zelladhäsion spielen [Bagrodia & Cerione, 1999; Jaffer & Chernoff, 2002]. Entgegen der Aktivität von ROCK führt Pak-Aktivierung zur Inaktivierung von MLCK (*myosin light chain kinase*), wodurch der Level von phosphorylierter MLC in der Zelle abnimmt. Dies führt zum Abbau sowohl von Stressfasern, als auch von fokalen Adhäsionen und fördert dadurch die Zellmobilität [Sanders *et al.*, 1999]. Außerdem aktiviert Pak eine Kinasekaskade, die zur Transaktivierung von Transkriptionsfaktoren führt [Mackay & Hall, 1998].

Die Entdeckung der GTPase-bindenden Domänen der Effektoren mit ihrer hohen Spezifität für das zugehörige, aktive Rho-Protein ermöglichte die Entwicklung des GTPase *Pulldown*-Assays, mit dem der Level des GTP-gebundenen Rho, Rac und Cdc42 aus lysierten Zellen bestimmt werden kann [Sander *et al.*, 1998; Sander *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 1999]. Die rekombinanten Bindungsdomänen der Zielproteine (Pak für Rac und Cdc42, Rhotekin für Rho) werden an Sepharose-Kügelchen gekoppelt und damit die GTP-Form der GTPase gezielt aus den Lysaten gebunden. Die inaktive, GDP-gebundene Form verbleibt in den Lysaten. Diese Methode hat zur Bestimmung der Profile der GTPase-Aktivierung schnell an Bedeutung gewonnen [Ridley, 2001].

1.4 Das TGF β -Smad-Netzwerk

TGF β -Smad- Signalwege bilden ein komplexes genregulatorisches Netzwerk. Die TGF β -Superfamilie (*transforming growth factor- β*) umfasst wichtige interzelluläre Signalmoleküle, inklusive TGF β , BMP (*bone morphogenetic protein*) und Aktivin. Mitglieder der TGF β -Familie der sekretierten Polypeptid-Wachstumsfaktoren kontrollieren Wachstum, Differenzierung, Migration und Apoptose von Zellen und haben wichtige Funktionen bei der Embryonalentwicklung [Derynck *et al.*, 2001; Massagué & Chen, 2000; Whitman, 1998]. In normalem Gewebe dominieren die Tumorsuppressoreigenschaften von TGF β , während sich bei der Entstehung eines Tumors die Expression von TGF β und die zellulären Antworten in Richtung von onkogenen Aktivitäten verändern [Wakefield & Roberts, 2002]. Von TGF β aktivierte Signalkaskaden aktivieren Transkriptionsfaktoren der Smad-Familie (*Sma* and *MAD*), die daraufhin die Transkription ihrer Zielgene regulieren [Derynck *et al.*, 1996]. Der erste identifizierte Mediator des TGF β -Signalweges war MAD (*Mothers against Decapentaplegic* aus *Drosophila*) [Sekelsky *et al.*, 1995], danach wurden die Proteine Sma2-4 (*Small* aus *Caenorhabditis elegans*), gefunden [Savage *et al.*, 1996]. Bei Vertebraten war das erste beschriebene Homolog der Tumorsuppressor DPC4 (*deleted in pancreatic carcinoma, locus 4*), der in der

Hälfte aller menschlichen Pankreaskarzinome somatisch deletiert oder mutiert ist [Hahn *et al.*, 1996]. Mutationen von Smad4/DPC4 sind auch schon bei Brustkrebs beobachtet worden [Schutte *et al.*, 1996]. Inaktivierende Mutationen von Smad2 spielen eine Rolle bei Darm- und Lungenkrebs [Eppert *et al.*, 1996; Uchida *et al.*, 1996]. Außer an der Entstehung von Krebs sind fehlregulierte TGF β -Signalwege auch an der Entstehung von Fibrosen und Autoimmunerkrankungen beteiligt [Massagué, 1998].

Anhand ihrer Struktur und Funktion können die neun bei Vertebraten bekannten Smads in drei Klassen unterteilt werden [Massagué, 1998]. Die R-Smads (*receptor-activated* Smads, Smad1-3, 5, 8) werden durch TypI-Rezeptoren am C-Terminus phosphoryliert und aktiviert, die von ihrem spezifischen Liganden der TGF β -Familie aktiviert wurden [Miyazono, 2000]. Der Mechanismus ist folgender: durch Bindung des Ligandendimers bildet sich ein tetramerer Rezeptorkomplex aus TypI- und TypII-Serin-Threonin-Rezeptorkinasen. Der Rezeptor TypII autophosphoryliert und phosphoryliert den Rezeptor TypI, der daraufhin die R-Smads phosphoryliert und aktiviert [Souchelnytskyi *et al.*, 1997]. Smad2 und Smad3 sind die TGF β -regulierten R-Smads. Die Co-Smads (*common mediator* Smads, Smad4) bilden heterooligomere Komplexe mit phosphorylierten R-Smads. Sie binden selber weder an TypI-Rezeptoren, noch werden sie von diesen phosphoryliert [Kawabata *et al.*, 1998]. Komplexe aus Co-Smads und R-Smads gelangen in den Zellkern, wo sie die Transkription der Zielgene zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren regulieren. Die antagonistischen I-Smads (*inhibitory* Smads, Smad6, 7) sind negative Regulatoren dieses Signalweges, indem sie die rezeptorvermittelte Phosphorylierung der R-Smads oder die Bildung eines funktionalen Komplexes zwischen R-Smads und Co-Smads verhindern [Miyazono, 2000] (Abb. 1.7).

Die Inaktivierung der Smad-Komplexe erfolgt durch Ubiquitinierung der R-Smads und anschließende Degradation durch Proteasomen [Zhang *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2000; Lo & Massagué, 1999].

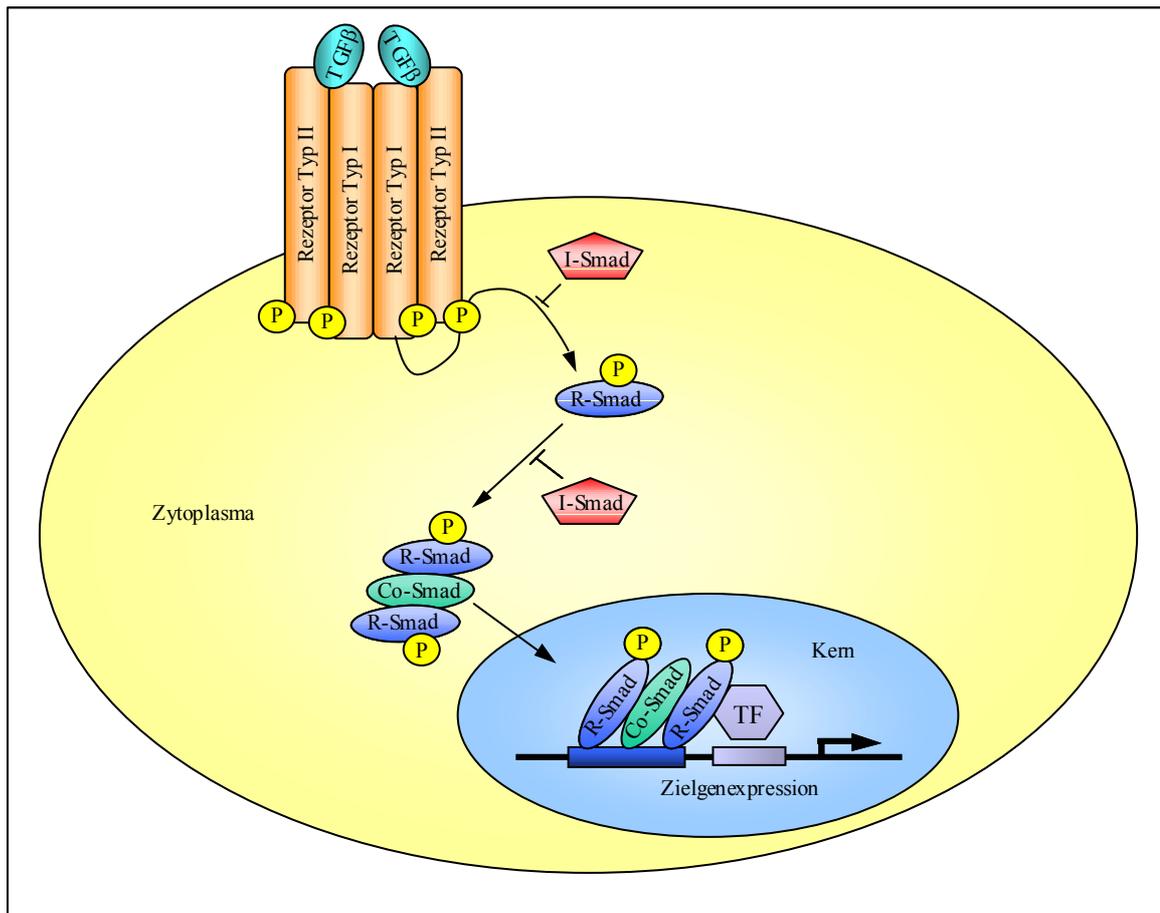


Abb. 1.7: Vereinfachte Darstellung des TGFβ-Signalweges. Ein Komplex aus TypI- und TypII-Rezeptoren wird durch die Bindung des Liganden TGFβ aktiviert und die Smad-Transkriptionsfaktoren werden von diesem Komplex durch Phosphorylierung direkt aktiviert. Der R-Smad-Co-Smad-Komplex gelangt in den Kern, wo er die Expression der Zielgene kooperativ mit einer Reihe Transkriptionsfaktoren (TF) reguliert. Verändert nach Kloos *et al.*, 2002.

Neben dem Smad-Signalweg sind auch andere über den aktivierten TGFβ-Rezeptorkomplex vermittelte Signalkaskaden bekannt, zum Beispiel über MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) unter Beteiligung von Ras und über PI3K (*phosphoinositol-3 kinase*) unter Beteiligung von Rho [Massagué *et al.*, 2000; Bakin *et al.*, 2000].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Es ist bekannt, dass in der Regulation der Rho-GTPasen die Aktivierung von Rac zur Inaktivierung von Rho führt. Der molekulare Mechanismus dieser Signalübertragung ist jedoch weitgehend unbekannt. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag daher auf der zellbiologischen Untersuchung des Mechanismus der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung. Dieser schnelle Prozess wird wahrscheinlich durch Rho-spezifische GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) reguliert. Im Rahmen dieser Arbeitshypothese sollte überprüft werden, ob das gut bekannte p190RhoGAP eine zentrale Rolle bei der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung spielt. Hierzu sollte die Aktivierung von p190RhoGAP an drei Stellen unterbunden werden. Zum einen sollte die Komplexierung mit der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP untersucht werden, und zum anderen sollte die Rolle der Phosphorylierung von p190RhoGAP mittels Blockierung der Src-Kinase und Dephosphorylierung durch LMW-PTP charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang war es außerdem von Interesse, welche Rac-Isoform für die induzierte Rho-Inaktivierung verantwortlich ist, und welche Rolle dem Rac-Effektor Pak zukommt.

Für diese Studien sollten zunächst die notwendigen zellbiologischen Techniken etabliert und optimiert werden. Es handelte sich hierbei um transiente Transfektion in Cos7-, NIH3T3-, MDCK- und HeLa-Zellen, GTPase *Pulldown*-Assays zum Nachweis der aktivierten kleinen GTPasen der Rho-Familie (Rho, Rac und Cdc42), Immunpräzipitationen zum Nachweis der Protein-Protein-Interaktionen und konfokale Laser-Raster-Mikroskopie für morphologische Studien.

Des Weiteren sind in der wachsenden Familie der Rho-GTPasen auch diverse Isoformen (z.B. RhoA, RhoB und RhoC sowie Rac1, Rac2, Rac3 und Rac1b) und viele verschiedene Austauschfaktoren (GEFs) beschrieben worden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Spezifität von p115-, p190- und PDZ-RhoGEF für die

Isoformen von Rho, sowie des RacGEFsTiam1 für die Isoformen von Rac untersucht werden.

Zudem sollte auf zellbiologischer Ebene gezeigt werden, welche Unterschiede zwischen Rac1 und seiner in Tumoren gefundenen *Splice*-Variante Rac1b bestehen, die sich durch eine Insertion von 19 Aminosäuren in Rac1b unterscheiden.

Da Studien mit dem Hefe-2-Hybrid-System gezeigt haben, dass Rac3 und Smad4 miteinander interagieren [Kooperation mit Dr. S. Hahn, Ruhr-Universität, Bochum], ist anzunehmen, dass ein Zusammenhang zwischen der Regulation der Rho-GTPasen und dem TGF β -Smad-Signalweg besteht. Daher sollten einige Aspekte des TGF β -Signalweges mit dem Schwerpunkt der Interaktion von Smad4 und Rac3 mit Hilfe der oben genannten Techniken näher charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Referenz
TG1	<i>supE, hsdΔ5, thi, Δ(lac-proAB),</i> F ^c [<i>traD36, proAB</i> ⁺ , <i>lacI^q, lacZΔM15</i>]	Gibson, 1984
BL21(DE3)	<i>ompT, hsdS (rB-,mB-), gal(λcI_{ts}857,</i> <i>ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gene1),</i> dcm (DE3)	Studier & Moffat, 1986

Tab. 2.1: Bakterienstämme.

2.1.2 Nährmedien und Antibiotika

2.1.2.1 Nährmedien

<i>Luria Bertani</i> (LB) Voll-Medium (1 l)	10 g Bacto-Tryptone 10 g NaCl 5 g Hefe-Extrakt 0,25% (v/v) 2 M NaOH
LB-Platten-Agar	LB-Medium 1,6% (w/v) Bacto-Agar

TB Voll-Medium (1 l)	12 g Bacto-Tryptone 24 g Hefe-Extrakt 4 ml Glycerin 2,31 g KH ₂ PO ₄ 12,54 g K ₂ HPO ₄
----------------------	--

2.1.2.2 Antibiotika

Ampicillin	100 µg/ml Medium
Chloramphenicol	25 µg/ml Medium
Kanamycin	25 µg/ml Medium

2.1.3 Eukaryotische Zelllinien

Cos7 (Y. Gluzman; ATCC: CRL-1651)

Nierenepithelzellen eines afrikanischen Grünaffens (*Cerocopithecus aethiops*), ursprüngliche Zelllinie (CV-1) transfiziert mit SV40-Virus mit defektem Replikationsursprung, dadurch episomale Expression von Vektoren mit SV40-Replikationsstartpunkt möglich; (*CV-1-cells with origin of SV40 replication*)

MDCK (NBL-2) (S. Madin, N.B. Darby; ATCC: CCL-34)

Nierenepithelzellen eines Cockerspaniel-Weibchens (*Canis familiaris*); (*Madine Darby canine kidney*)

NIH/3T3 (S.A. Aaronson; ATCC: CRL-1658)

kontaktinhibierte embryonale Mausfibroblastenzellen (*Mus musculus*)

HeLa (ATCC: CCL-2)

Epithelzellen eines Cervix-Karzinoms der 1952 verstorbenen Patientin **Henrietta Lacks**

2.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Trypsin/EDTA

Fötale Kälberserum (FCS)

Neugeborenen-Kälberserum (NCS)

Penicillin/Streptomycin (10000 units/ml PenicillinG, 10000µg/ml Streptomycinsulfat)

Alle Zellkulturmedien und Zusätze wurden von der Firma Invitrogen (Paisley, Scotland) bezogen.

2.1.5 Puffer und Lösungen

Acrylamidlösung 30% (w/v) Acrylamid
0,8% (w/v) Bisacrylamid

Anodenpuffer für *Semi dry* Blot 300 mM Tris
100 mM Tricin, pH 8,8

Blockierungslösung 4% (w/v) fettfreies Magermilchpulver in TBST

DEAE-Dextran-Stocklösung 10 mg/ml DEAE-Dextran (MW 500.000) in PBS

DEAE-Dextran-Lösung	0,5 mg/ml DEAE-Dextran (MW 500.000) in PBS
6x DNA-Probenpuffer	30% (v/v) Glycerin 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol
Entfärbelösung für PVDF-Membran	40% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure
Färbelösung für PVDF-Membran	0,075% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 in Methanol
GST- <i>Fish</i> -Puffer	10% (v/v) Glycerin 100 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 1% Igepal CA-630 (w/v) 50 mM Tris/HCl, pH 7,4
Kathodenpuffer für <i>Semi dry</i> Blot	300 mM Capronsäure 30 mM Tris, pH 8,7
Lysepuffer für Immunpräzipitation	150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% Triton-X 100 50 mM Tris/HCl pH 7,4

PBS (<i>phosphate-buffered saline</i>)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,2 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
PBS ⁺⁺	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,2 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 0,5 mM CaCl ₂ 0,25 mM MgCl ₂ in PBS
RIPA-Puffer	150 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5% Triton-X 100 0,1% SDS 20 mM Tris/HCl, pH 7,5
4x SDS-Probenpuffer	33% (v/v) Glycerin 300 mM DTE 6,7% (w/v) SDS 0,01% (w/v) Bromphenolblau 80 mM Tris/HCl, pH 6,8
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 2% (w/v) SDS
SDS-Sammelgelpuffer	4% (w/v) SDS 500 mM Tris/H ₃ PO ₄ , pH 6,8

SDS-Trenngelpuffer	4% (w/v) SDS 1,5 M Tris/H ₃ PO ₄ , pH 6,8
Standardpuffer	5 mM MgCl ₂ 3 mM DTE 30 mM Tris/HCl, pH 7,5
<i>Stripping</i> -Puffer für PVDF-Membran	100 mM Mercaptoethanol 2% (w/v) SDS 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,7
50x TAE-Puffer	50 mM EDTA 2 M Tris/Acetat, pH 8,5
10x TBST-Waschpuffer	1,5 M NaCl 1% Tween 20 200 mM Tris/HCl, pH 7,4
TBS-Waschpuffer für Immunpräzipitation	50 mM Tris/HCl, pH 7, 4
TSS (<i>transformation and storage solution</i>)	85% LB-Medium (ohne NaOH) 10% (w/v) PEG 8000 5% (v/v) DMSO 50 mM MgCl ₂ , pH 6,5

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Puffer und Lösungen in *Aqua bidest* angesetzt.

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung, Spezifität	Organismus, Typ	Firma
anti- <i>human</i> RhoA	Maus mAB IgG ₁ Klon 26C4	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
anti- <i>human</i> RhoB	Kaninchen pAb IgG	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
anti- <i>human</i> RhoC	Ziege pAb IgG	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
anti- <i>human</i> Rac	Maus mAB IgG _{2b} Klon 23A8	Upstate Biotechnologies (Lake Placid NY, USA)
anti- <i>human</i> Cdc42	Maus mAB IgG ₁ Klon 44	BD Transduction Laboratories (Heidelberg)
anti- <i>human</i> p190RhoGAP	Maus mAB IgG ₁ Klon 30	BD Transduction Laboratories (Heidelberg)
anti-Tubulin	Kaninchen pAb IgG	ICN Biomedicals Inc. (Eschwege)
anti-FLAG	Maus mAB IgG ₁ Klon M2	Sigma (Deisenhofen)
anti-HA	Maus mAB IgG ₁ Klon 12CA5	Roche Diagnostics (Mannheim)
anti-myc	Maus mAB IgG ₁ Klon 9E10	Roche Diagnostics (Mannheim)

Tab. 2.2: Primäre Antikörper.

Wenn nicht ausdrücklich anders vermerkt, wurde in Western Blots zum Nachweis von Rho immer Klon 26C4-Antikörper eingesetzt.

2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Spezifität, Organismus	Konjugat	Firma
Ziege anti-Maus IgG	Alexa Fluor [®] 488	Molecular Probes (Göttingen)
Ziege anti-Kaninchen IgG	Alexa Fluor [®] 488	Molecular Probes (Göttingen)
Ziege anti-Maus IgG	Cy-5	Dianova (Hamburg)
Ziege anti-Kaninchen IgG	FITC	Jackson Immuno Research Lab. (West Grove PA, USA)
Schaf anti-Maus IgG (SHAMPO)	Meerrettich-Peroxidase	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Esel anti-Kaninchen IgG (DARPO)	Meerrettich-Peroxidase	Amersham Pharmacia (Freiburg)

Tab. 2.3: Sekundäre Antikörper.

Zum Nachweis von F-Aktin im konfokalen Laser-Raster-Mikroskop wurde mit TRITC gekoppeltes Phalloidin der Firma Sigma eingesetzt.

2.1.7 Biochemikalien und Chemikalien

2.1.7.1 Enzyme und Proteine

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Beverly MA, USA)
Pwo-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics (Mannheim)
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene (Amsterdam)
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen (Hilden)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Beverly MA, USA)
BSA (Fraktion V)	Sigma (Deisenhofen)

2.1.7.2 Protein- und Nukleinsäurestandards

Proteinstandard:	SDS 7 mit 66 / 45 / 36 / 29 / 24 / 20 / 14,2 kDa	Sigma (Deisenhofen)
	SDS 6H mit 205 / 116 / 97 / 66 / 45 / 29 kDa	Sigma (Deisenhofen)
Nukleinsäurestandard:	λ -DNA, BstEII hydrolysiert (AGS) mit 8453 - 702 bp	MBBL (Bielefeld)

2.1.7.3 Proteinase-Inhibitoren

Aprotinin	(2 mg/ml)	Merck (Darmstadt)
Benzamidin	(78 mg/ml)	Merck (Darmstadt)
Leupeptin	(1 mg/ml)	Merck (Darmstadt)
Pepstatin	(0,7 mg/ml)	Merck (Darmstadt)
Pefabloc	(5 mg/ml)	ICN Biochemicals (Eschwege)

2.1.7.4 Chemikalien

Agarose	Life Technologies (Karlsruhe)
anti-FLAG M2 affinity gel (Agarose)	Sigma (Deisenhofen)
Chloroquin	Sigma (Deisenhofen)
DEAE-Dextran	Sigma (Deisenhofen)
DMSO	Serva (Heidelberg)
DTE	GERBU Biotechnik GmbH (Gaiberg)
Entwickler für Röntgenfilme	Agfa (Mortsel, Belgien)
Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg)

Fixierer für Röntgenfilme	Agfa (Mortsel, Belgien)
Formaldehyd	Roth (Karlsruhe)
γ -bind Sepharose [™]	Amersham Pharmacia (Piscataway NJ, USA)
Glutathione Sepharose [™] 4B	Amersham Pharmacia (Piscataway NJ, USA)
Immersionsöl für Mikroskopie	Leica Microsystems (Wetzlar)
IPTG	Gerbu Biotechnik (Gaiberg)
Igepal CA-630	Sigma (Deisenhofen)
Mowiol 4-88	Calbiochem (Hamburg)
Phalloidin aus <i>Amanita phalloides</i>	Sigma (Deisenhofen)
PP1 (Src-Inhibitor)	Alexis Biochemicals (Heidelberg)
SDS-b	GERBU Biotechnik GmbH (Gaiberg)
Triton-X 100	Serva (Heidelberg)

Alle weiteren Chemikalien wurden im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.1.8 Kit-Systeme

Dye-Deoxy-Terminator-Mix	Perkin Elmer (Überlingen)
ECL Chemiluminiszenz-Kit (West Pico)	Perbio Science (Bonn)
LipofectAMINE PLUS™ Reagent	Life Technologies / Gibco BRL (Eggenstein)
Western Breeze Kit <i>α-goat</i>	NOVEX (San Diego, USA)
Effectene Transfection Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)

2.1.9 Vektoren

pCan-mycZ	Invitrogen (Paisley, Scotland)
pcDNA3 Flag	Invitrogen (Paisley, Scotland)
pcMV5	Invitrogen (Paisley, Scotland)
pcMV6M	Invitrogen (Paisley, Scotland)
pEGFP-N1/-C1	Clontech (Heidelberg)
pGEX 4T1, pGEX 4T2	Amersham Pharmacia (Freiburg)
pKR5	Stratagene (La Jolla CA, USA)
pMT2sm-HA	bereitgestellt von Dr. M.R. Ahmadian
pRcCMV	Invitrogen (Paisley, Scotland)

2.1.10 Plasmide

Plasmid	Vektor	Organismus	Fragment	tag	kloniert über
RhoA wt	pcDNA3	<i>human</i>	fl	N-Flag	BamHI/XbaI
RhoB wt	pcDNA3	<i>human</i>	fl	N-Flag	BamHI/XbaI
RhoC wt	pcDNA3	<i>human</i>	fl	N-Flag	BamHI/XbaI
Rac1 wt	pcDNA3	<i>human</i>	fl	N-Flag	BamHI/EcoRI
Rac1 (G12V)	pcDNA3	<i>human</i>	fl	N-Flag	BamHI/EcoRI
Rac2 wt	pcDNA3	<i>human</i>	fl	N-Flag	BamHI/EcoRI
Rac2 (G12V)	pcDNA3	<i>human</i>	fl	N-Flag	BamHI/EcoRI
Rac3 wt	pcDNA3	<i>human</i>	fl	N-Flag	BamHI/EcoRI
Rac3 (G12V)	pcDNA3	<i>human</i>	fl	N-Flag	BamHI/EcoRI
Rac3 (T17N)	pcDNA3	<i>human</i>	fl	N-Flag	BamHI/EcoRI
Rac1b wt	pcDNA3	<i>human</i>	fl	N-myc	BamHI/EcoRI
PDZ-RhoGEF	pKR5	<i>human</i>	fl	N-myc	Rümenapp <i>et al.</i> , 1999
PDZ-RhoGEF DH/PH	pcDNA3	<i>human</i>	As 637-1522	N-Flag	EcoRI/NotI
p115RhoGEF	pCan-mycZ	<i>human</i>	fl	N-myc	Hart <i>et al.</i> , 1996
p190RhoGEF	pMT2sm	<i>human</i>	fl	N-HA	van Horck <i>et al.</i> , 2001
Tiam1 C1199	pEGFP-N1	<i>mouse</i>	As 392-1591	C-GFP	Michiels <i>et al.</i> , 1997

p120RasGAP SH2N	pMT2sm	<i>human</i>	As 177-275	N-HA	SalI/XbaI
p190RhoGAP p226 wt	pMT2sm	<i>human</i>	As 1-226	N-HA	EcoRI/XbaI
p190RhoGAP p226 (S36N)	pMT2sm	<i>human</i>	As 1-226	N-HA	EcoRI/XbaI
v-Src	pMT2sm	<i>human</i>	fl	/	SalI/KpNI
c-Src	pMT2sm	<i>human</i>	fl	/	SalI/KpNI
LMW-PTP	pRcCMV	<i>human</i>	fl	/	HindIII/XbaI
Pak1 PBD	pcDNA3	<i>human</i>	As 69-150	N-Flag	BamHI/XhoI
Pak1 PID	pcDNA3	<i>human</i>	As 83-149	N-Flag	BamHI/XhoI
Pak1 KD	pMT2sm	<i>human</i>	As 241-553	N-HA	SmaI/XhoI
Pak2 KD	pMT2sm	<i>human</i>	As 241-553	N-HA	SmaI/XhoI
Pak3 KD	pMT2sm	<i>human</i>	As 232-564	N-HA	SmaI/XhoI
Pak1 (H83L/H86L)	pcMV6M	<i>human</i>	fl	N-myc	Sells <i>et al.</i> , 1997
Pak1 (T423E)	pcMV6M	<i>human</i>	fl	N-myc	Sells <i>et al.</i> , 1997
Smad2	pcMV5	<i>human</i>	fl	N-HA	EcoRI/HindIII
Smad4	pcMV5	<i>human</i>	fl	N-HA	HindIII/BamHI
TGFβRI (T204D)	pcMV5	<i>human</i>	fl	N-HA	HindIII/BamHI
TGFβRII (K277R)	pcMV5	<i>human</i>	fl	N-HA	KpNI/BamHI

Tab. 2.4: Plasmide. As: Aminosäuren; fl: *full length* (Volllängenkonstrukt).

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen 21 × 26 mm	Menzel (Braunschweig)
Kryogefäße	Nalgene (Rochester NY, USA)
Mikropipettenspitzen, Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Multiwellplatten (Falcon)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Objekträger (Super Frost Color)	Menzel (Braunschweig)
Pipettenspitzen, Zentrifugenröhrchen und Kulturröhrchen (Falcon)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Plastik-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
PVDF Membran	Roche Diagnostics (Mannheim)
Röntgenfilme	Kodak (New Haven, USA)
Sterile Einmal-Pipetten	Becton Dickinson (Heidelberg)
Sterilfilter	Schleicher & Schuell (Dassel)
Whatman 3 MM Papier	Schleicher & Schuell (Dassel)
Zellkulturflaschen und -schalen (Falcon)	Becton Dickinson (Heidelberg)

2.1.12 Geräte

Analysenwaage	Sartorius (Göttingen)
Begasungsbrutschrank	Nuaire (Plymouth, UK)
DNA-Gelelektrophoresekammern	Werkstatt MPI Dortmund
Fast-Blot-Apparatur (Power Pack P25)	Biometra (Göttingen)
Fluidizer	Microfluidics Corp. (Newton MA, USA)
Gelkammern Hoefer	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Inkubator HAT	Infors GmbH (Übach Palenberg)

Inverses Mikroskop AXIOVERT 135TV	Zeiss (Obercochem)
Konfokales Mikroskop (TCS-SP2)	Leica Microsystems GmbH (Heidelberg)
kühlbare Tischzentrifuge (5417R)	Eppendorf (Hamburg)
Leuchttisch (NU-72)	Faust (Schaffhausen, CH)
Lichtmikroskop (Labovert)	Ernst Leitz GmbH (Wetzlar)
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik
Neubauer-Zählkammer	Brand (Melsungen)
PAGE-Kammern	cti (Idstein)
PCR-Gerät MiniCycler	MJ Research (Watertown, USA)
pH-Meter (PerpHect LogRmeter model 320)	Orion Research (Boston MA, USA)
Pipetten	Gilson (Abimed, Langenfeld)
Rotoren (JA 10 - 17, 30.50)	Beckman (München)
Spannungsquellen (Power Pac 300)	BioRad (München)
Sterile Werkbank	Nuaire (Plymouth, UK)
Thermomixer (5436)	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge (Biofuge 13)	Kendro (Hanau)
Tischzentrifuge, kühlbar (5427R)	Eppendorf (Hamburg)
UV / VIS-Spektralphotometer UVIKON 933	Kontron (Neufahrn)
Zentrifugen (J2-HC, J2-HS und Avanti30)	Beckman (München)

2.1.13 Computer-Software

Office 2000	Microsoft Corporation® (Redmond, USA)
Acrobate Reader® 5.0	Adobe Systems Inc. (San Jose, USA)
Photoshop® 6.0	Adobe Systems Inc. (San Jose, USA)
Corel Draw 7™	Corel Corporation (Ottawa, Ontario, Kanada)
Reference Manager 9.5	ISI ResearchSoft (Berkeley, USA)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA bei der Transformation werden *E. coli* TG1- oder BL21(DE3)-Bakterien kompetent gemacht (Methode modifiziert nach Chung *et al.*, 1989). Dazu wird eine 5 ml Vorkultur mit einem Einzelklon beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden 200 ml LB-Medium (ohne NaOH, pH 6,5) mit 2 ml der Vorkultur beimpft und bei 37°C unter Schütteln mit 180 rpm kultiviert. Sobald eine bei 600 nm gemessene optische Dichte von 0,4 erreicht ist, wird die Zellsuspension für 20 min auf Eis inkubiert und nach 10 min Zentrifugation bei $1200 \times g$ und 4°C in 1/10 des Ausgangsvolumens (20 ml) eiskaltem TSS resuspendiert. Die kompetenten Zellen werden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

2.2.2 Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli* Zellen werden schonend auf Eis aufgetaut. Zur Transformation werden 110 µl Bakterien mit 0,1 µg Plasmid-DNA zunächst 30 min auf Eis, dann 2 min bei 42°C (Hitzeschock) im Heizblock inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wird die Bakterien-Suspension zur Ausbildung der Antibiotika-Resistenzen für 1 h bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Daraufhin werden die Zellen 1 min bei 8000 rpm abzentrifugiert, der größte Teil des Überstands abgenommen und die Zellen vorsichtig im Restüberstand resuspendiert. Anschließend wird die Suspension auf einer vorgewärmten LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37°C.

2.2.3 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Ein Einzelklon transformierter *E. coli* Bakterien wird von einer LB-Agarplatte gepickt und in 5 ml LB-Medium über Nacht im Schüttelinkubator mit 180 rpm bei 37°C als Minikultur inkubiert. Zur Selektion wird dem Medium abhängig von Vektor und Bakterienstamm bzw. Zusatzplasmid Ampicillin, Kanamycin oder Chloramphenicol bzw. eine Kombination dieser drei zugesetzt. Zur Lagerung als Glycerinstock werden 500 µl der Kultursuspension unter sterilen Bedingungen mit 500 µl Glycerin (50% v/v) gemischt und bei –80°C aufbewahrt.

2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus 5 ml- Schüttelkulturen von *E. coli* wird mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Das Reinigungsprinzip basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterien, anschließender Neutralisation sowie dem Einstellen von Hochsalzbedingungen und nachfolgender selektiver Adsorption der Plasmid-DNA an eine DEAE-gekoppelte Silicagel-Matrix.

Es werden 4 ml einer 5 ml-Übernachtskultur von *E. coli* bei 13000 rpm für 30 sec abzentrifugiert, das Pellet in 250 µl Puffer P1 (enthält RNase A) resuspendiert und durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 (enthält NaOH/SDS) lysiert. Das SDS dient hierbei der Solubilisierung von Phospholipiden und Proteinen der Zellmembran und damit der Freisetzung des Zellinhalts, während die alkalischen Bedingungen zur Hydrolyse der RNA und zur Denaturierung von DNA und Proteinen führen. Durch Zugabe von 350 µl Puffer N3 wird die Suspension neutralisiert und gleichzeitig werden Hochsalzbedingungen geschaffen, wodurch denaturierte Proteine, chromosomale DNA und Zellfragmente präzipitieren. Die verhältnismäßig kurze Plasmid-DNA kann hingegen renaturieren und bleibt daher in Lösung. Die Suspension wird für 10 min bei 13000 rpm sedimentiert, der klare Überstand auf eine *QIAprep Spin* Säule gegeben und für 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Die

negativ geladene Plasmid-DNA adsorbiert dabei an die positiv geladenen DEAE-Gruppen der Silicagel-Matrix. Nach Waschen mit 500 μl Puffer PB und 750 μl Puffer PE wird mit 50 μl sterilem *Aqua bidest* eluiert.

Die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus einer 500 ml-Übernachtskultur von *E. coli* wird mit dem *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Diese Methode entspricht der Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA, jedoch erfolgt hier die Elution der Plasmid-DNA unter Hochsalzbedingungen. Zudem muss die eluierte Plasmid-DNA durch Isopropanol-Präzipitation entsalzt, mit 70% Ethanol gewaschen und aufkonzentriert werden. Das Pellet wird luftgetrocknet und in 300 - 500 μl Puffer TE oder *Aqua bidest* aufgenommen.

2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgt photometrisch durch Bestimmung der Extinktion der DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm. Als Referenz dient Wasser. Das Ausmaß der Verunreinigung der Probe mit ebenfalls zur Absorption beitragenden Proteinen wird durch die Bestimmung des Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Der Quotient sollte im Bereich von 1,7 - 2 liegen. Eine Extinktionseinheit von 1 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA. Die DNA-Lösung wird nach der Messung auf eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt und bei -20°C gelagert.

2.2.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die gezielte Spaltung doppelsträngiger DNA für analytische oder präparative Zwecke (Überprüfung des Klonierungserfolgs oder Erzeugung kompatibler Enden für Ligationen) erfolgt mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen, die spezifisch in palindromischen DNA-Sequenzen schneiden. Bei der Wahl der Pufferbedingungen, Inkubationstemperaturen und Inkubationszeiten werden die Angaben des Herstellers berücksichtigt. Die Enzyme werden nach der Reaktion für 15 min bei 65°C

hitzeinaktiviert. Bei einigen Enzymen ist die Hitzeinaktivierung nicht möglich. In diesen Fällen erfolgt eine Alkoholfällung.

Die resultierenden Fragmente werden mittels DNA-Agarose-Gelelektrophorese (2.2.7) aufgetrennt und anhand der Größe identifiziert.

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente werden mit Hilfe der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese anhand ihrer Größe aufgetrennt [McDonnell *et al.*, 1977]. Als Trennprinzip greift hierbei wie bei der SDS-PAGE (2.3.6) im Wesentlichen der Molekularsiebeffekt des Gels, das aus zwei galaktosehaltigen Polymeren, Agarose und Agaropektin, besteht.

Um eine optimale Auftrennung zu erreichen, werden entsprechend den Längen der zu untersuchenden DNA-Fragmente 0,8%ige Agarosegele verwendet, da sie in dieser Konsistenz einen hohen Wassergehalt, eine stark geordnete Struktur (die die Diffusion gut unterdrückt), große Porengrößen und einen geringen Reibungswiderstand aufweisen.

Die Agarose wird hierzu mit TAE-Puffer bis zum vollständigen Auflösen aufgeköcht, nach Abkühlung auf ca. 50°C mit Ethidiumbromid (0,75 µg/ml) versetzt und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach Überschichten des erhärteten Gels mit TAE-Puffer werden die Proben mit 1/5 Volumen 6x DNA-Probenpuffer versetzt und zusammen mit einem Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei einer konstanten Spannung von 8 V/cm Gellänge durchgeführt. Die Identifizierung der DNA-Fragmente erfolgt durch Detektion des mit der DNA komplexierten Ethidiumbromids bei 312 nm auf dem UV-Transilluminator. Gegebenenfalls wird die gewünschte DNA-Fragmentbande für präparative Zwecke aus dem Gel isoliert (2.2.8).

2.2.8 Isolierung von DNA-Fragmenten

Auf dem Transilluminator wird die gewünschte DNA-Bande mittels eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Das Prinzip ähnelt im Wesentlichen dem des *QIAprep Spin Miniprep Kits*. Die Agarosematrix wird aber zuvor in einer 6 M Natriumiodidlösung (Puffer QG) bei 50°C aufgelöst. Die freigesetzte DNA wird wiederum an eine DEAE-gekoppelte Silicagel-Matrix (*Spincolumn*) gebunden, von Verunreinigungen befreit und eluiert.

2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wird 20ng vollkommen restringierte Plasmid-DNA auf komplementär restringiertes Insert (5- bis 8-facher Überschuss) zusammen mit 1/10 Volumen des 10-fach konzentrierten Ligationspuffers (66 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTE, 1 mM ATP) gegeben und auf ein Gesamtvolumen von 25 µl verdünnt. Dem Ansatz wird ein 1µl T4-DNA-Ligase (entspricht 3 *Units*) zugesetzt. Danach wird der Ansatz halbiert und eine Hälfte wird über Nacht bei 4°C inkubiert. Alternativ wird die zweite Hälfte für 2 Stunden bei Raumtemperatur ligiert und dann zur Transformation eingesetzt. Als Kontrolle dient ein Ansatz, in dem das Insert durch Wasser ersetzt wird. Hierdurch wird überprüft, inwieweit eine Selbstligation des Vektors stattfindet.

2.2.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) dient der selektiven Vervielfältigung von DNA-Sequenzen unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase sowie zweier Oligonukleotide als *Primer*, die die zu amplifizierende DNA-Sequenz flankieren und zu je einem kurzen Abschnitt der beiden DNA-Stränge komplementär sind [Mullis *et al.*, 1992]. Das Prinzip beruht auf Trennung des Matrizenstrangs (*Template*) durch thermische Denaturierung (*Denaturing*) und nachfolgender Anlagerung (*Annealing*) von kurzen, synthetisch

hergestellten Oligonukleotiden (*Primer*) an die Einzelstränge. Unter Einsatz eines Polymerase-Enzyms werden im dritten Schritt die Primer durch Anlagerung von dNTPs verlängert (*Elongation*). Voraussetzung für die Methode ist, dass die Sequenz am Beginn und am Ende des Templates bekannt ist, damit die Primer passend konstruiert werden können.

Bei der Durchführung einer PCR ist die sorgfältige Auswahl der Annealing-Temperatur für die Anlagerung der Primer erforderlich, da es bei zu hoher Temperatur zu keiner Hybridisierung, bei zu niedriger hingegen zu einer unspezifischen Bindung an eine unerwünschte Position in der Template-Sequenz kommen kann. Die Annealing-Temperatur ist im Wesentlichen abhängig von der Länge und vom G/C-Gehalt des Oligonukleotids und kann mit Hilfe der Wallace-Formel [Sambrook *et al.*, 1989] grob berechnet werden:

$$T_s = 2 \cdot (N_A + N_T) + 4 \cdot (N_G + N_C) \text{ [}^\circ\text{C]}$$

N_x ist die Anzahl der Base X in der Primer-Sequenz.

Die PCR findet Anwendung seit der Verfügbarkeit von hitzestabilen DNA-Polymerasen mit einem hohen Temperaturoptimum, die einen kontinuierlichen Ablauf der Amplifikationszyklen erlauben. Für analytische Zwecke („*Fast-PCR*“, 2.2.10.1) wird die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet. Dient die Vervielfältigung der DNA zum weiteren Klonieren, so werden die Pwo-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* oder die Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* eingesetzt, die über eine Korrekturlesefunktion (3'-5'-Exonukleaseaktivität) verfügen, und daher niedrigere Fehlerraten aufweisen. Bei dieser Methode werden durch die Wahl geeigneter Oligonukleotide neue Schnittstellen generiert und/ oder Stopcodons eingefügt (nicht-komplementärer 3'- bzw. 5'-Überhang). Um der unspezifischen Bildung von Sekundärstrukturen entgegenzuwirken, wird bei der Klonierung rekombinanter Sequenzen mit Pfu-Polymerase 10 % DMSO zugesetzt.

Es werden Reaktionsansätze mit einem Volumen von 100 μ l auf Eis angesetzt, z.B.:

10x Pfu-Puffer	10 μ l
dNTP-Mix 2mM	10 μ l
25 mM MgCl ₂	10 μ l
DMSO	10 μ l
Template-DNA	100 ng
5' Primer	100 pmol
3' Primer	100 pmol
Pfu-DNA-Polymerase	2,5 U
<i>Aqua bidest</i>	ad 100 μ l.

Nach Zugabe der DNA-Polymerase zum gekühlten Reaktionsgemisch wird folgendes PCR-Programm ausgeführt:

	2 min	94°C	Denaturierung
30x	}	1 min	92°C Denaturierung
		1 min	60°C Annealing
		90 sec	72°C Elongation
		5 min	72°C Extension
	∞	4°C	
			Ende.

Die Proben werden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (2.2.7), das PCR-Produkt wird aus der Agarose zurückgewonnen (2.2.8) und gegebenenfalls mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten (2.2.6), um die gewünschten Enden zu erhalten.

2.2.10.1 Analytische Schnell-PCR zur Bestimmung positiver Klone

Für die *Fast-PCR* (verkürzte Zeiten und weniger Zyklen) zur schnellen Analyse positiver Klone werden 10 µl Reaktionsansätze verwendet. Dazu wird eine Minikultur mit einem Einzelklon angeimpft und der sterile Zahnstocher, mit dem der Klon gepickt wurde, vorher in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß abgestreift. Folgender Reaktionsansatz wird hinzupipettiert:

10x Taq-Puffer	1 µl
Q-Solution	2 µl
dNTPs 2 mM	0,5 µl
5'-Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
3'-Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,5 µl
<i>Aqua bidest</i>	ad 10 µl.

2.2.11 DNA-Sequenzierung

Plasmid-DNA wird durch DNA-Synthese mit einer temperaturstabilen Polymerase im PCR-Gerät unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden mit dem ABI PRISM™ *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* der Firma Perkin Elmer (Überlingen) nach der Kettenabbruchmethode [Sanger *et al.*, 1977] sequenziert. Die PCR-Ansätze enthalten 4 µl Terminator-Mix, 1 µg Plasmid-DNA und 20 pmol des vektorspezifischen Sequenzierprimers in einem Volumen von 20 µl. Der eingesetzte Terminator-Mix enthält die Polymerase Amplitaq®FS, dNTPS und fluorophormarkierte ddNTPs. Dabei trägt jedes kettenabbrechende ddNTP einen basenspezifischen Fluoreszenzmarker. Die amplifizierte DNA kann daher auf einem Polyacrylamidgel analysiert werden. Die Analyse erfolgt mittels

eines Lasers, der die jeweiligen Farbstoffe und damit die Basen an ihren Emissionscharakteristika erkennt.

Folgende PCR-Bedingungen werden gewählt:

	2 min	96°C	
25x	{	30 sec	96°C
		15 sec	50°C
		4 min	60°C
		∞	4°C
		Ende.	

Nach der Amplifikation werden 18 µl des PCR-Ansatzes mit 10 µl 3 M Natriumacetat versetzt (ca. 1/10 Gesamtvolumen) und mit absolutem Ethanol p.a. auf 120 µl (etwa 3 Volumen) zur Fällung der DNA aufgefüllt. Zur Detektion des Pellets wird dem Fällansatz 1 µl Dextranblau zugefügt (10 µg/µl in Wasser), da der Farbstoff die DNA durch Bindung markiert. Es wird 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und die gefällte DNA mit 450 µl Ethanol (70% v/v) gewaschen und erneut für 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die flüssige Phase wird abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Die anschließende Polyacrylamidgelelektrophorese und die Auswertung des Bandenmusters mit Hilfe des ABIMED-Sequenzers (Langenfeld) wird von der zentralen Einrichtung „Synthese und Sequenzierung“ des MPI Dortmund durchgeführt.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Kultivierung und Expression rekombinanter Plasmide

Zur rekombinanten Genexpression werden 10 l TB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer 100 ml über Nacht -Vorkultur (Verhältnis 1:100) angeimpft und im Schüttler bei 37°C und 160 rpm bis zu einer OD von 0,6 – 0,8 angezogen. Die Induktion der Genexpression erfolgt durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Die Temperatur wird anschließend auf 30°C abgesenkt. Die Expression erfolgt über Nacht. Nach Abschluss der Inkubation werden die Zellen 30 min bei 5000 rpm in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor abzentrifugiert und die Pellets in 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) resuspendiert und vereinigt. Nach erneutem Abzentrifugieren werden die Zellen in 3ml Standard-Puffer pro Gramm Zellpellet aufgenommen und bei –20°C eingefroren.

2.3.2 Präparativer Aufschluss von Bakterienzellen

Zum Aufschluss werden die Zellen über Nacht bei 4°C aufgetaut und die Suspension unter Rühren mit Proteinase-Inhibitoren im Verhältnis 1:1000 versetzt. Der Aufschluss erfolgt mit Hilfe des Microfluidizers (*Microfluidizer Inc.*). Hierbei werden die Zellen mit etwa 600 kPa durch eine Kapillare gepresst, wobei sie aufgrund der hohen Scherkräfte aufbrechen. Dieser Vorgang wird einmal wiederholt, um einen möglichst vollständigen Aufschluss zu gewährleisten. Anschließend wird 1 Stunde bei 30000 rpm (entspricht 100000 × g) und 4°C zentrifugiert. Der das Protein enthaltene Überstand wird direkt im Anschluss abgenommen, aliquotiert und nach dem Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei –80°C gelagert.

2.3.3 Kopplung von GST-Fusionsproteinen an GSH-Sepharose

Mit GST (Glutathion S-Transferase) fusionierte GTPase-bindende Domänen von Effektormolekülen können an GSH-Sepharose-Material (Firma Amersham Pharmacia, Durchmesser 45-165 μm , 100 μl Sepharose-Material pro Ansatz) gebunden werden. Verwendet wird GST-fusioniertes C21, die Rho-bindende Domäne des Rho-Effektors Rhotekin (Aminosäuren 1 - 95), und Pak-CRIB (*p21 activated kinase CDC42/Rac-interactive binding domain*, Aminosäuren 56 - 141), die Rac- und Cdc42-bindende Domäne des Rac- und Cdc42-Effektors Pak1b.

Für die Kopplung wird die in Ethanol gelagerte GSH-Sepharose zunächst dreimal mit Standard-Puffer (versetzt mit Proteinase-Inhibitoren im Verhältnis 1:1000) gewaschen und anschließend mit der jeweiligen Lösung der GST-Fusionsproteine versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation auf einem Rotator bei 4°C wird der Überstand abgenommen und das Sepharose-Material erneut dreimal mit Standard-Puffer gewaschen. Die Lagerung sollte bis zur Verwendung für den GTPase *Pulldown*-Assay (2.3.5) bei 4°C und nicht länger als 3 Tage erfolgen.

2.3.4 Präparation von Lysaten eukaryotischer Zellen

Die eukaryotischen Zellen (Cos7) werden zunächst auf Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm angezogen. Hierzu werden jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Schale ausgesetzt und der Layer bis zu einer Konfluenz von ca. 80 - 90% wachsen gelassen, oder bei etwa 70% Konfluenz am Tag nach dem Umsetzen nach der DEAE-Dextran-Methode transfiziert (2.4.6.2) Zur Lyse der Zellen bei optimaler Dichte oder 48 Stunden nach der Transfektion werden die Schalen auf Eis gelagert, das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen, um Medien-Reste zu entfernen. Anschließend werden 0,8 – 1 ml mit Proteinase-Inhibitoren versetzter GST-*Fish*-Puffer (für den GTPase *Pulldown*-Assay) oder Lysepuffer für die Immunpräzipitation pro Ansatz auf die Zellen gegeben. Die

Zellen werden mit einem Gummispatel von der Schale abgelöst und die Suspension in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Um Membrantrümmer zu entfernen, wird 5 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, anschließend wird der Überstand (Gesamtlysat) in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben. Hiervon werden 50µl mit 20 µl 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 Minuten auf 95°C erhitzt, der Rest wird für den GTPase *Pulldown*-Assay oder die Immunpräzipitation (2.3.5 und 2.3.6) verwendet.

2.3.5 GTPase *Pulldown*-Assay

Die GTPase-bindende Domäne (GBD) von Effektor-Molekülen bindet mit sehr hoher Affinität an die zugehörige aktive GTPase. Diese Eigenschaft kann man sich im GTPase *Pulldown*-Assay zunutze machen, um direkt und selektiv den Aktivierungsgrad von kleinen GTPasen zu überprüfen (Abb. 2.1). Die GTP-gebundenen Formen von GTPasen können durch Inkubation mit ihren GST-fusionierten und hierüber an GSH-Sepharose gebundenen GBDs spezifisch aus Zelllysaten isoliert werden.

Hierzu wird zunächst die GBD eines Effektors an GSH-Sepharose gekoppelt (2.3.3). Anschließend werden 110 µl GSH-Sepharose mit präpariertem Zelllysat (2.2.4) versetzt, von dem zuvor 50 µl zur Kontrolle des Gesamtproteins im LySAT einbehalten wurden. Die GSH-Sepharose mit dem daran gekoppelten Effektor wird 30 min bei 4°C und 165 rpm auf einem Rotator mit dem Zelllysat inkubiert, um die GTP-beladene GTPase aus dem LySAT zu absorbieren. Danach wird die GSH-Sepharose dreimal mit GST-Fish-Puffer (versetzt mit Proteinase-Inhibitoren im Verhältnis 1:1000) gewaschen und anschließend mit einer Spritze mit feiner Kanüle trockengesaugt. Nach Zugabe von 20 µl 2x SDS-Probenpuffer wird der Ansatz zur Denaturierung gebundener Proteine 5 min auf 95°C erhitzt und abschließend per SDS-PAGE (2.3.7), Western Blot (2.3.8) und Antikörper-Reaktion (2.3.9)

analysiert. Die Auftragung der Gesamtlysate stellt hierbei eine Kontrolle dar: erscheinen die Banden der Gesamtlysate zu vergleichender Ansätze nach der ECLTM-Reaktion unterschiedlich dick, so kann man nicht von einer einheitlichen Menge des zu untersuchenden Proteins unabhängig vom Aktivierungsstatus in den verschiedenen Ansätzen ausgehen.

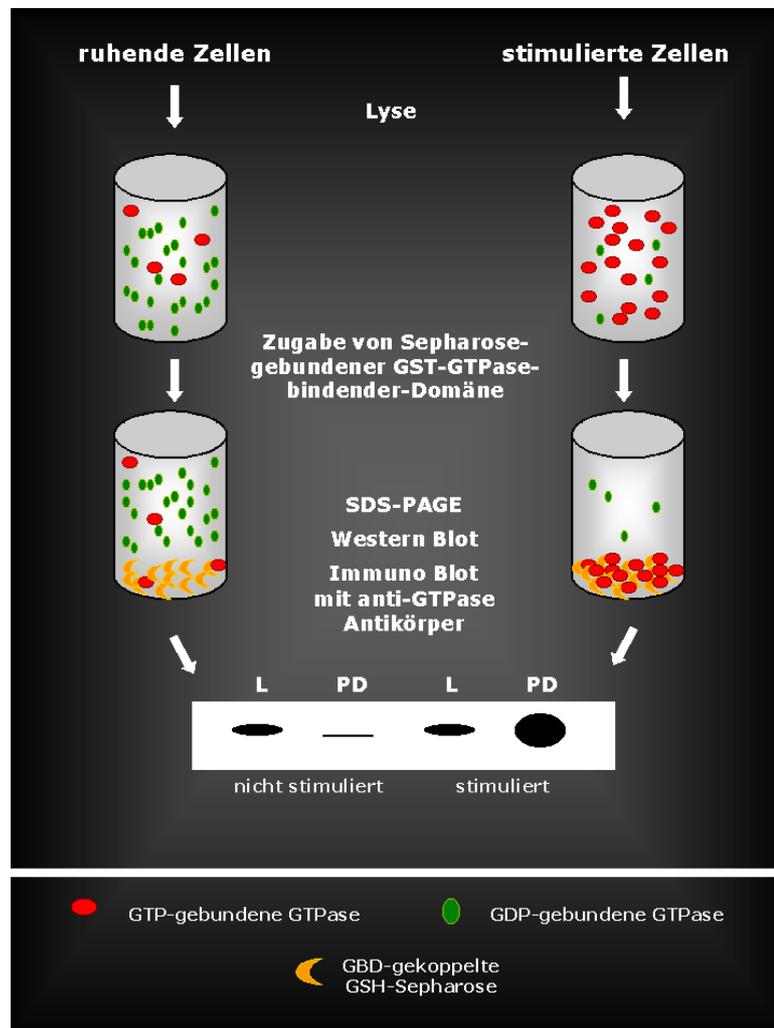


Abb. 2.1: Prinzip des GTPase *Pull-down*-Assays. Einzelne Schritte sind vereinfacht hintereinander dargestellt. L: Lysat, Auftragung des Gesamtlysats; PD: *Pull-down*, Auftragung der an GSH-Sepharose gebundenen aktiven Form der GTPase.

2.3.6 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ist eine Methode zum Nachweis der Interaktion zweier Proteine. Mit Hilfe eines immobilisierten Antikörpers gegen das eine Protein werden die Proteinkomplexe aus der Lösung präzipitiert und die Bindung des zweiten Proteins wird in einem Immunoblot mit einem spezifischen Antikörper gegen das zweite Protein gezeigt.

Für die Immunpräzipitation wird entweder kommerziell erhältliche Protein-Agarose verwendet, an die bereits der entsprechende Antikörper (beispielsweise α -Flag-Antikörper) kovalent gebunden ist, oder der Antikörper, der zur Präzipitation genutzt werden soll, wird auf γ -bind-Sepharose immobilisiert. In beiden Fällen werden die *beads* dreimal mit TBS-Waschpuffer gewaschen. Die bereits mit Antikörper gekoppelten *beads* können danach direkt zur Präzipitation genutzt werden, während an die anderen erst noch der gewünschte Antikörper gebunden werden muss. Pro Ansatz von etwa 1ml Zellysate werden 25 μ l der γ -bind-Sepharose-Suspension benötigt, was 12,5 μ l der reinen *beads* entspricht. 25 μ l γ -bind-Sepharose -Suspension vermögen 25 μ g Antikörper zu binden. Die Bindung erfolgt in TBS-Waschpuffer auf einem Rotator bei 4°C und 15rpm für eine Stunde. Anschließend wird nochmals dreimal mit TBS-Waschpuffer gewaschen. Wichtig für alle, besonders aber für die nachfolgenden Schritte ist eine durchgehende Kühlung. Die *beads* werden auf die Anzahl der Ansätze verteilt und die geklärten Zellysate (2.3.4) zugegeben. Nach einstündiger Inkubation auf dem Rotator bei 4°C und 15rpm werden die *beads* fünfmal mit Lysepuffer für die Immunpräzipitation gewaschen und anschließend mit einer Spritze mit einer feinen Kanüle trockengesaugt. Nach Zugabe von 20 μ l SDS-Probenpuffer werden die *beads* zur Denaturierung gebundener Proteine 5 min auf 95°C erhitzt und abschließend per SDS-PAGE (2.3.7), *Western Blot* (2.3.8) und Antikörper-Reaktion (Immunoblot) (2.3.9) analysiert. Die Auftragung der Gesamtlysate stellt hierbei wie für den GTPase *Pulldown*-Assay beschrieben (2.3.5) eine Kontrolle dar.

2.3.7 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts wird die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) [Laemmli, 1970; Shapiro *et al.*, 1967] benutzt. Dabei findet eine modifizierte Methode mit diskontinuierlichem Puffersystem Verwendung.

Durch den Probenpuffer werden denaturierende Bedingungen garantiert, die dazu führen, dass sämtliche Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine aufgebrochen sind und diese als ellipsoide Strukturen vorliegen. Das im Puffer enthaltene Detergens SDS bindet an die Proteine (ca. ein Molekül SDS pro zwei Aminosäure-Reste) und erzwingt die Auftrennung der intra- und intermolekularen Wechselwirkungen, wogegen β -Mercaptoethanol zur reduktiven Spaltung der Disulfidbindungen führt. Das SDS maskiert mit seinen negativ geladenen Kopfgruppen zudem die Eigenladung der Proteine. Dadurch werden Formunterschiede verschiedener Proteine vernachlässigbar, da Anionen mit einem nahezu konstanten Verhältnis von Gesamtladung zu Molekulargewicht entstehen. Trägt man die Probe auf ein Polyacrylamidgel mit definierter Porengröße auf, so sind die relativen Mobilitäten der Proteine aufgrund der Molekularsiebeigenschaft des Gels umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts.

Um scharfe Proteinbanden zu erhalten, wird dem Trenngel ein grobporigeres Sammelgel vorgeschaltet (sogenannte diskontinuierliche SDS-PAGE). Das Prinzip der Bandenschärfung beruht hierbei auf der Anwesenheit von Folge- und Leitonen in der Probe [Pingoud & Urbanke, 1997]. Als Folgeion dient das negativ geladene Glycinat, das aufgrund des niedrigeren pH-Werts 6,8 im Gleichgewicht mit Glycin liegt, das als Zwitterion keine Nettoladung trägt, und demzufolge eine geringe Mobilität aufweist. Als Leitton läuft Chlorid an der Probenfront, dicht gefolgt von den SDS-Proteinkomplexen entsprechend ihrer Mobilitäten. Zwischen den getrennten Folge- und Leitonen erhöht sich die lokale Feldstärke, was dazu führt, dass die SDS-Proteinkomplexe beschleunigt werden und dicht hinter der

Leitonenfront als scharfe, konzentrierte Bande laufen. Wird das Trenngel erreicht, können die Folgeionen die SDS-Proteine überholen, da nun das Glycin bei dem vorherrschenden höheren pH-Wert vollständig als negativ geladenes Glycinat vorliegt.

Polyacrylamidgele entstehen durch Kopolymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylen-Bisacrylamid. Es handelt sich hierbei um eine radikalische Kettenreaktion, die durch Ammoniumperoxosulfat (APS) als Radikalstarter und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Radikalstabilisator initiiert wird.

Trenn- und Sammelgel werden entsprechend den Tabellenangaben hergestellt (Tab. 2.5). Das Trenngel wird zwischen zwei Glasplatten mit Plastikspacern gegossen und mit Ethanol überschichtet, um die Ausbildung eines Meniskus zu verhindern und Luftausschluss zu gewährleisten. Nach Abgießen des Alkohols wird das auspolymerisierte Gel mit dem Sammelgel überschichtet. Zur Ausformung der Probenaschen wird ein Teflonkamm zwischen die Glasplatten in das Sammelgel gesteckt. Zum Gießen der Gele werden Kammern des *Hoefler*-Systems verwendet, die es erlauben, relativ dünne (Vorteil beim *Western Blot*, 2.3.8) und lange Gele (bessere Auftrennung) herzustellen.

Die mit SDS-Probenpuffer versetzten Proben werden vor dem Auftragen für 5 min bei 95°C vollständig denaturiert. Die Elektrophorese erfolgt bei 38 mA pro Gel und wird während des Laufs mehrfach reguliert, so dass die Spannung nicht über 200 V hinausgeht. Nach der Elektrophorese wird das Gel direkt für ein *Western Blot* (2.3.8) eingesetzt.

	3,9% Sammelgel	7,5% Trenngel	12,5% Trenngel
H ₂ O	2,1 ml	2,5 ml	1,65 ml
Acrylamidlösung 30 %	0,45 ml	1,25 ml	2,1 ml
Trenngelpuffer	-	1,25 ml	1,25 ml
Sammelgelpuffer	0,84 ml	-	-
10% (w/v) APS	4 µl	4 µl	4 µl
TEMED	70 µl	70 µl	70 µl

Tab. 2.5: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel in der diskontinuierlichen SDS-PAGE.

2.3.8 Western Blot

Unter *Blotting* versteht man den elektrophoretischen Transfer von Makromolekülen aus einem Gel auf eine Membran. Der Transfer von zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen wird Western Blot genannt [Renart *et al.*, 1979] und erlaubt spezifische Nachweisreaktionen von auf der Membran immobilisierten Proteinen.

Der Transfer wird nach dem Elektrot blot-Verfahren in einer Halbtrockenzelle (*semi-dry*-Apparatur) durchgeführt. Auf die Anodenplatte werden zunächst zwei in Anodenpuffer getränkte Whatman-Papiere gelegt. Darauf wird dann die in Methanol getränkte, auf Gelgröße geschnittene PVDF-Membran, das Gel und zwei in Kathodenpuffer getränkte Whatman-Papiere geschichtet. Die abschließende Kathodenplatte wird während des Elektrotransfers mit Eis gekühlt. Pro cm² Gel wird eine Stromstärke von 5 mA eingestellt (Tab. 2.6). Zur Anfärbung der Proteinbanden wird die Membran für 20 Sekunden in Färbelösung geschwenkt und anschließend ca. 5 min mit Entfärbelösung gewaschen, bis klare Proteinbanden sichtbar werden. Nach Video-Dokumentation der gefärbten Membran werden die

Marker-Banden und die einzelnen Spuren mit Kugelschreiber auf der Membran markiert, und die Membran anschließend mit TBST entfärbt.

	1 Gel	2 Gele	3 Gele	4 Gele
Stromstärke	300 mA	450 mA	450 mA	600 mA
Transferzeit	15 min	20 min	25 min	30 min

Tab. 2.6: Parameter beim Blotting eines oder mehrerer SDS-Gele.

2.3.9 Immunologischer Nachweis von Proteinen im *Western Blot* (Immunoblot)

Nach dem Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran können diese selektiv durch Antigen-spezifische Antikörper immunologisch nachgewiesen werden.

2.3.9.1 ECL™-System

Der spezifische Nachweis rekombinanter Proteine auf der PVDF-Membran erfolgt mit Hilfe von Antikörpern, die gegen ein Epitop der entsprechenden Proteine gerichtet sind. Für die ECL™-Detektion wird der primäre Antikörper von einem sekundären Antikörper gebunden, der kovalent an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Das Vorhandensein eines bestimmten Proteins auf der Membran wird also letztendlich indirekt durch den Nachweis der Enzymaktivität der Peroxidase sichtbar gemacht.

Zunächst werden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation mit Blockierungslösung (4% Magermilchpulver in TBST-Puffer) für mindestens eine Stunde, besser über Nacht, bei Raumtemperatur abgesättigt. Alle Inkubationen

werden unter leichtem Schütteln durchgeführt. Es folgt die Bindung des ersten Antikörpers für 60 min bei Raumtemperatur. Die Antikörper werden in verschiedenen Konzentrationen (Tab. 2.7) verdünnt in TBST mit 0,4% (w/v) Magermilchpulver eingesetzt. Die Membran wird danach dreimal für 15 Minuten mit TBST gewaschen und anschließend mit den sekundären Antikörpern SHAMPO (anti-Maus) oder DARPO (anti-Kaninchen) für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wird die Membran erneut dreimal für 20 min mit TBST gewaschen.

Zur Visualisierung der Proteinbanden wird das ECLTM Chemilumineszenz-Substrat benutzt. Dabei wird ein zyklisches Diacylhydrazid (Luminol) mit Wasserstoffperoxid durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert. Das Reaktionsprodukt befindet sich in einem elektronisch angeregten Zustand und gibt seine Energie durch Aussendung von Licht wieder ab. Die Chemilumineszenz wird dabei durch die Anwesenheit von so genannten *Enhancern* noch verstärkt. Das Maximum der Lichtemission liegt bei 428 nm, welche somit mit kurzen Expositionszeiten (wenige Sekunden bis einige Minuten) zur Belichtung hochsensitiver Röntgenfilme benutzt werden kann.

2.3.9.2 Western Breeze® Kit

Für die Immundetektion membrangebundener Proteine kann auch der Western Breeze® Kit genutzt werden. Die Vorgehensweise entspricht grundsätzlich der bereits für das ECL-System beschriebenen (2.3.9.1), wobei hier jedoch die im Lieferumfang enthaltenen Blockierungs-, Wasch- und Zweitantikörper- Lösungen nach den Angaben des Herstellers verwendet werden. Der Zweitantikörper dieses Detektionssystems ist an alkalische Phosphatase gekoppelt. Alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse von Phosphatestern. Das im Lieferumfang enthaltene nicht fluoreszierende Substrat *CDP-Star* wird gespalten, wodurch es zu einem intensiv fluoreszierenden Produkt umgewandelt wird. Das Maximum der Lichtemission liegt bei 461-466 nm.

Im Rahmen dieser Arbeit ist dieses System nur zum Nachweis von RhoC verwendet worden.

Antikörper	Verdünnung
α -RhoA	1:250
α -RhoB	1:200
α -RhoC	1:200
α -Rac	1:1000
α -Cdc42	1:500
α -p190RhoGAP	1:400
α -Flag	1:500
α -HA	1:500
α -myc	1:100
SHAMPO	1:1000
DARPO	1:3000

} primär
} sekundär

Tab. 2.7: Verdünnung der Antikörper beim Einsatz im Immunoblot.

2.3.10 Entfernung gebundener Antikörper von PVDF-Membranen (*Stripping*)

Zum Nachweis eines weiteren Proteins auf einer PVDF-Membran nach einem Immunoblot muss zunächst der bereits gebundene Antikörper heruntergewaschen werden. Dazu wird die PVDF-Membran aus TBST-Puffer in einen kleinen, geschlossenen Plastikbehälter mit Stripping Puffer überführt und 30 min bei 60°C unter gelegentlichem Schwenken im Wasserbad inkubiert. Anschließend wird die Membran dreimal in TBST-Puffer gewaschen und nach erneuter Blockierung mit 4% (w/v) Magermilchpulver in TBST-Puffer (Blockierlösung) kann ein neuer Immunoblot durchgeführt werden.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die folgende Tabelle (2.8) gibt einen Überblick über die Kulturbedingungen der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Medium	Serum	Antibiotikum	Passage	Verdünnung
NIH3T3	DMEM	10% NCS	Pen./Strep. 1:100	alle 3-4 Tage	1:3-1:5
MDCK	DMEM	10% FCS	Pen./Strep. 1:100	alle 2-3 Tage	1:6-1:10
HeLa	DMEM	10% FCS	Pen./Strep. 1:100	alle 3-4 Tage	1:10-1:15
Cos7	DMEM	10% FCS	Pen./Strep. 1:100	alle 2-3 Tage	1:6-1:10

Tabelle 2.8: Kulturbedingungen verschiedener Zelllinien.

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in 75 cm² Gewebekulturflaschen mit Penicillin (1000 U/ml)/Streptomycin (1000µg/ml) bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90% und einem CO₂-Gehalt von 7,5%.

2.4.2 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen werden auf Eis transportiert. Nach zügigem Auftauen bei 37°C im Wasserbad werden die Zellen in ein steriles Kulturröhrchen mit 1 ml eiskaltem Medium überführt und nach 1 min mit weiteren 8 ml Medium verdünnt. Nach Zentrifugation bei 800 × g für 5 min bei Raumtemperatur wird der Medienüberstand größtenteils abgenommen und das Zellsediment durch vorsichtiges Reiben des Kulturröhrchens an einem perforierten Gitter resuspendiert. Anschließend werden die Zellen vorsichtig in eine bereits mit Medium gefüllte 25 cm² oder 75 cm² Kulturflasche überführt (6 ml bzw. 15-20 ml Gesamtvolumen).

2.4.3 Zellpassage

Die Zellen werden mit PBS gewaschen und daraufhin mit 2 ml Trypsin/EDTA bis zur Ablösung vom Boden im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden die Zellen in 8 ml frischem Medium resuspendiert und aneinanderhaftende Zellen durch so genanntes Tritturieren vereinzelt. Hierzu wird die Pipettenspitze auf den Boden der Kulturflasche gesetzt und die Zellsuspension herausgedrückt. Abschließend wird die Zellsuspension in eine neue Kulturflasche mit frischem Medium oder für verschiedene Experimente auf Deckgläschen in 6-Well-Platten bzw. auf Gewebekulturschalen mit 6 cm oder 10 cm Durchmesser überführt.

2.4.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wird mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Abb. 2.2) bestimmt. Hierzu wird ein Tropfen der Zellsuspension unter ein Deckgläschen pipettiert, das zuvor auf der Zählkammer positioniert wurde. Es werden die vier äußeren der neun großen Quadrate des Zählnetzes ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Zellzahl/ml ergibt sich aus dem Mittelwert multipliziert mit dem Faktor 10^4 .

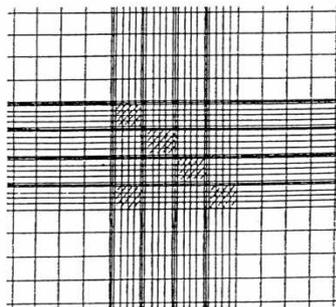


Abb. 2.2: Zählnetz der Neubauer-Zählkammer.

2.4.5 Kryokonservierung von Zellen

Nach Bestimmung der Zellzahl/ml werden jeweils 2×10^6 Zellen pro Kryogefäß eingefroren. Hierzu werden die Zellen in einem Falcon-Röhrchen zunächst bei

800 × g für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Medienüberstand wird abgenommen und die Zellen werden vorsichtig im Restüberstand resuspendiert. Anschließend werden pro 2×10^6 Zellen 0,5 ml DMEM mit 50% FCS und 0,5 ml DMEM mit 11% DMSO (beides ohne Antibiotika) zugetropft und vermischt. Jeweils 1 ml der Zellsuspension werden in ein Kryogefäß überführt und in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox für drei Tage bei -80°C eingefroren. In der Box ist ein kontinuierliches Abkühlen der Zellen um $1^\circ\text{C}/\text{min}$ gewährleistet. Abschließend werden die Kryogefäße auf Trockeneis transportiert, und in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert.

2.4.6 Transfektionsmethoden

Zur Expression rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen werden diese mit Plasmiden transient transfiziert. Die Wahl der Transfektionsmethode ist dabei von der Zelllinie abhängig. Als Standardmedium für die Zellen wird (wenn nicht anders angegeben) DMEM mit 10% FCS (10% NCS bei NIH3T3-Zellen) und Penicillin/Streptomycin verwendet. Inkubationen erfolgen immer im CO_2 -Inkubator bei 37°C , 7,5% CO_2 und 90% relativer Luftfeuchtigkeit.

2.4.6.1 Transiente Transfektion durch Lipofektion

Die Verwendung kationischer Lipide, die mit der DNA komplexiert werden, stellt eine sehr effiziente und reproduzierbare Methode zum DNA-Transfer in eukaryotische Zellen dar [Felgner *et al.*, 1987]. Die kationischen Lipide aggregieren mit DNA durch ionische Wechselwirkungen und bilden Partikel mit überschüssigen positiven Ladungen, die sich an die negativ geladene Zelloberfläche anlagern. Diese Komplexe werden vermutlich durch Endozytose in die Zelle aufgenommen [Zabner *et al.*, 1995].

Zahlreiche Parameter bestimmen wie bei jeder Transfektionsmethode die Effizienz der Transfektion. Dies sind vor allem die eingesetzte DNA-Menge, die Zelldichte, die Inkubationszeit und das Verhältnis von *LipofectAMINE PLUS*[™] Reagenz (Invitrogen) zu DNA.

Die Transfektion wird nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es ist aber möglich, je nach Zelllinie verschiedene Parameter zu variieren und damit die Transfektionseffizienz zu optimieren.

Für NIH3T3- und HeLa- Zellen werden $8 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ Zellen pro Ansatz in einer 6-Well-Platte auf Deckgläschen in 4 ml Medium ausgesät und über Nacht inkubiert. Für die Transfektion werden 0,4 µg Plasmid-DNA und 6 µl Plus-Reagenz (Invitrogen) in 100 µl DMEM ohne Zusätze nach gründlichem Mischen für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu werden weitere 100 µl DMEM ohne Zusätze und 4 µl Lipofectamin (Invitrogen) gegeben, die Lösung wird gemischt und erneut 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischenzeitlich wird das Medium von den Zellen abgesaugt, und diese mit 2 ml Medium ohne Zusätze gewaschen. Zur Transfektion werden die Zellen mit 800 µl DMEM ohne Zusätze versetzt und dann die 200 µl Transfektionslösung unter Schwenken zugetropft. Die Zellen werden nun für 3 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wird der Transfektionskomplex abgenommen und die Zellen für 16-24 Stunden in Medium mit allen Zusätzen inkubiert.

Für MDCK-Zellen wird zur Lipofektion die Effectene-Methode nach Angaben des Herstellers (Qiagen) angewendet, die ebenfalls mit einem Enhancer arbeitet. Hierzu werden 8×10^4 MDCK-Zellen pro Ansatz in einer 6-Well-Platte auf Deckgläschen in 4 ml Medium ausgesät und über Nacht inkubiert. Für die Transfektion werden 0,4 µg Plasmid-DNA und 3,2 µl Enhancer (Qiagen, wichtig ist der achtfache Überschuss) in 100 µl Puffer EC (Qiagen) gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Lösung scharf abzentrifugiert (10000 g, 10 sec), mit 10 µl Effectene (Qiagen) versetzt, gemischt und 15 min bei

Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wird das Medium von den Zellen abgenommen, mit PBS gewaschen und 1,6 ml neues Medium zugegeben. Die Transfektionslösung wird nun mit 600 µl Medium versetzt und sofort unter Schwenken auf die Zellen getropft. Nach 6 Stunden Inkubation wird das Medium abgenommen und mit PBS gewaschen. Die Zellen werden anschließend in 4 ml Medium für 16-24 Stunden inkubiert.

Das Transfektionsergebnis beider Methoden wird nach Fixierung und Immunfärbung (2.4.7) mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie (2.4.8) analysiert.

2.4.6.2 Transiente Transfektion nach der DEAE-Dextran-Methode

Bezüglich des Mechanismus der DNA-Aufnahme bei dieser Methode wird davon ausgegangen, dass die negativ geladene DNA von den positiven geladenen DEAE-Gruppen des DEAE-Dextrans zu größeren Aggregaten komplexiert wird, die sich dann an die negativ geladene Zelloberfläche anlagern und durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. Durch DMSO-Schock kann dabei die Effizienz der DNA-Aufnahme weiter gesteigert werden. Die Anwesenheit von positiv geladenem Chloroquin hemmt zudem die Verschmelzung der Transportvesikel mit Lysosomen und dadurch die vorzeitige Degradierung der aufgenommenen DNA [Sussman & Milman, 1984].

$1,5 \times 10^6$ Zellen werden mindestens 20 Stunden vor der Transfektion auf Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät. Zur Transfektion werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 5 µg Plasmid-DNA (bei einer Kotransfektion 5 µg je Plasmid) in 2 ml PBS/ DEAE-Dextran (0,5 mg/ml, sterilfiltriert) versetzt. Nach Inkubation im Brutschrank für 30 - 45 min bis zum Ablösen der Zellen werden 10 ml Medium mit 80 µmol Chloroquin zugegeben. Nach Inkubation für 2,5 h wird der Überstand von den nun wieder adhären Zellen abgesaugt. Nach Zugabe von 5 ml Medium mit 10% DMSO und Inkubation für 2,5 min wird der Überstand erneut abgesaugt und Medium

zugegeben. Die Zellen werden für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit erfolgt die Expression des transfizierten Plasmids.

Anschließend werden die Zellen lysiert (2.3.4) und der Effekt der Transfektion im GTPase *Pulldown*-Assay (2.3.5) oder in der Immunpräzipitation (2.3.6) getestet.

2.4.7 Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen

Die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen werden zunächst mit PBS gewaschen und dann für 10 min mit 3,7% Formaldehyd in PBS fixiert. Danach wird dreimal kurz mit PBS gewaschen. Es folgt eine Inkubation mit 0,1% Triton-X 100 in PBS für 10 min zur Permeabilisierung der Zellmembranen. Nach anschließendem Waschen mit PBS wird für 1 Stunde mit 2% (w/v) BSA in PBS abgesättigt, um die unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden. Zur Inkubation mit dem primären Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur werden die Deckgläschen aus den Vertiefungen der 6-Well-Platte entnommen, durch Tupfen mit der Kante auf einem Stück Zellstoff von überschüssigem PBS befreit und in eine saubere 6-Well-Platte überführt. Anschließend werden 100 - 150 µl der Antikörperlösung vorsichtig mit einer Pipette aufgetropft. Nach der Inkubation wurden die Deckgläschen dreimal kurz, sowie dreimal für 20 Minuten mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper erfolgt für 1 Stunde bei Raumtemperatur wie oben beschrieben. Alle Antikörper und Zusatzfarbstoffe werden in 2% BSA (w/v)-haltigem PBS gelöst. Die eingesetzten Konzentrationen sind der Tabelle 2.9 zu entnehmen. Die Zweitantikörperlösung enthält außerdem den Aktin-spezifischen Farbstoff Phalloidin aus *Amanita phalloides* (0,1 mg in Methanol), um Stressfasern sichtbar zu machen.

Nach gründlichem Waschen mit PBS (mindestens viermal für 20 Minuten) werden die Deckgläschen abschließend mit einem luftblasenfreien Tropfen Mowiol (ca. 30 µl) auf Objektträgern eingebettet und über Nacht abgedunkelt an der Luft

getrocknet. Während der gesamten Arbeitsgangs werden die Zellen vor Lichteinfall geschützt. Die Immunfluoreszenz wird mit einem Konfokalmikroskop (Leica TCS-SP2) ausgewertet.

Antikörper	Verdünnung	
α -Tubulin	1:200	} primär
α -HA	1:100	
α -Flag	1:200	
α -myc	1:10	
α -Maus Alexa 488	1:2000	} sekundär
α -Kaninchen Alexa 488	1:3000	
α -Maus Cy-5	1:100	
α -Kaninchen FITC	1:100	} Farbstoff
Phalloidin TRITC (0,1 mg/ml)	1:100	
DAPI	1:20000	

Tab. 2.9: Verdünnung der Antikörper und Farbstoffe beim Einsatz in der Immunfluoreszenz.

2.4.8 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (LSCM, *Laser Scanning Confocal Microscopy*) zeichnet sich gegenüber der Durchlicht- und der Epifluoreszenzmikroskopie durch eine deutlich erhöhte optische Auflösung aus. Letztere ist in der optischen Auflösung dadurch limitiert, dass sie das Objektfeld als ganzes ausleuchtet und damit zur Unschärfe beitragende Bildinformationen von oberhalb und unterhalb der Fokusebene in die Abbildung integriert.

Eine schematische Darstellung des Prinzips der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie ist in Abbildung 2.3 gezeigt.

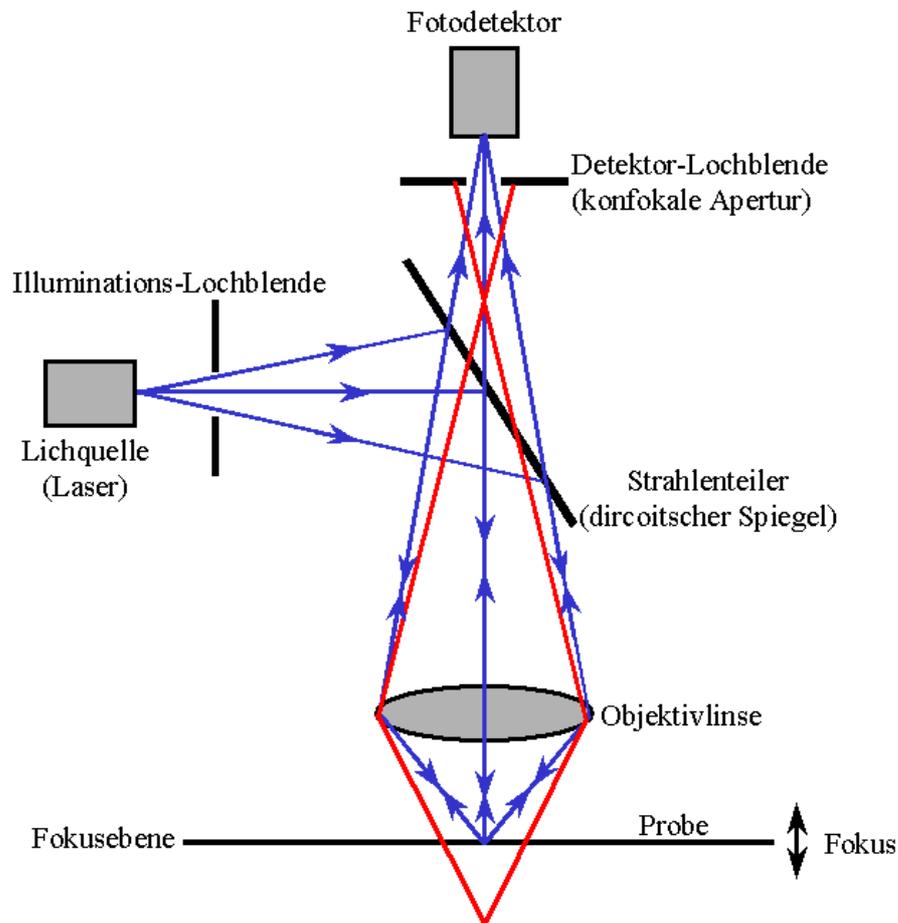


Abb. 2.3: Prinzip der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie. Laserlicht passiert die Illuminationslochblende und wird von einem dichroitischen Spiegel in die Objektivlinse gelenkt, die das Licht auf einen punktförmigen Bereich in der Probe fokussiert. Emittiertes Licht wird über die Objektivlinse auf den Spiegel zurückgeworfen, kann diesen aufgrund der vom Laserlicht abweichenden, größeren Wellenlänge durchqueren und trifft auf die Ebene der zweiten Lochblende. Emittiertes Licht, das exakt aus der fokalen Ebene stammt, kann fokussiert die Lochblende passieren, Licht von außerhalb dieser Ebene wird somit selektiv vom Detektor ausgeschlossen.

Das Einbringen einer in ihrem Durchmesser veränderbaren Lochblende in die *aufnehmende* Optik bewirkt, dass Licht aus tieferen und höheren Objektebenen als der Fokusebene nicht zum Photodetektor gelangt. Durch Verwendung einer (weiteren) Illuminationslochblende in der *beleuchtenden* Optik, die in die selbe Objektebene fokussiert wie die aufnehmende Optik (Prinzip der Konfokalität), wird

ein nur schmaler, scheibenförmiger Objektbereich beleuchtet. Dies führt zu minimalem Streulicht aus benachbarten Objektbereichen und erhöht somit die Schärfe und den Kontrast des resultierenden Bilds. Zudem wird das Ausbleichen der Probe reduziert. Die Minimierung des beleuchteten Objektfelds macht es jedoch erforderlich, dass die Probe in der Fokusebene Punkt für Punkt und Zeile für Zeile abgerastert werden muss, damit ein Gesamtbild erzeugt wird. Das analoge Lichtsignal wird anschließend zu einem digitalen Signal konvertiert, wodurch umfangreiche Bildbearbeitungsmöglichkeiten gegeben sind. Es stehen bis zu drei verschiedene Kanäle zur Verfügung, so dass mehrere Fluoreszenzsignale (Doppel- oder sogar Dreifachmarkierungen) im identischen Präparat simultan oder sequentiell abgerastert und anschließend digital zu einem Bild rekonstruiert werden können.

Als Lichtquelle wird ein Laser verwendet, der sich aufgrund seines linienförmigen Spektrums besonders zur Bereitstellung einer für ein gegebenes Fluorophor benötigten Anregungswellenlänge eignet.

Für diese Arbeit wurden Argon- und Krypton-Laser sowie Argon-Krypton- und Helium-Neon-Mischgaslaser eingesetzt, deren Hauptemissionslinien bei 488 nm, 568 nm und 647 nm liegen.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des GTPase *Pulldown*-Assays

Für die späteren Experimente zur Aktivität der untersuchten Rho-GTPasen war es von großer Bedeutung, dass die für den GTPase *Pulldown*-Assay eingesetzten rekombinanten GTPase-bindenden Domänen (GBD) der Effektoren Pak für Rac und Cdc42 (CRIB-Domäne) und Rhotekin für Rho (C21-Domäne) tatsächlich mit hoher Spezifität an die GTP-gebundenen und damit aktiven Formen der GTPasen, nicht aber an die inaktiven, GDP-gebundenen Formen binden. Des weiteren mussten die eingesetzten Effektordomänen spezifisch für die jeweilige GTPase sein und durften nicht mit aktivierten Formen anderer GTPasen interagieren. Aus diesem Grund wurde das System mit rekombinanten Rho-Proteinen mit unterschiedlicher Nukleotidbindung getestet.

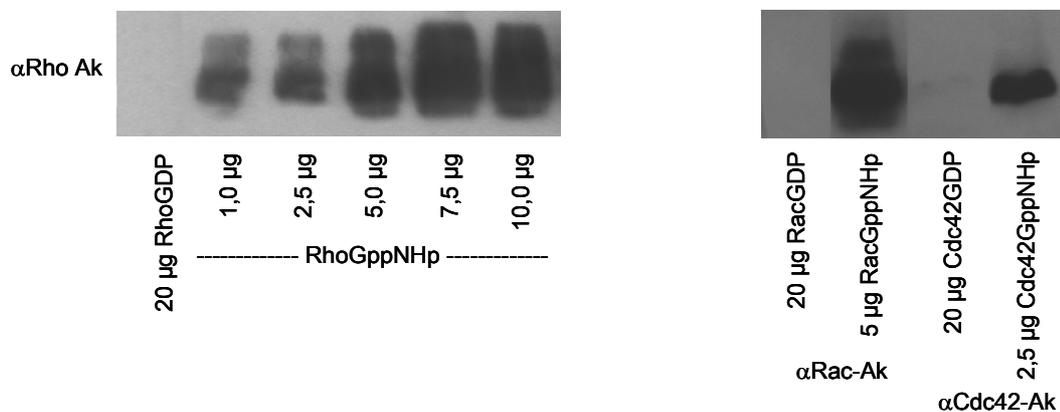


Abb.3.1: GTPase *Pulldown*-Assays zum Nachweis der Spezifität der eingesetzten Effektor-GBDs für die aktive Form der zugehörigen GTPase. Das linke Bild zeigt das Ergebnis eines Rho-GTPase *Pulldown*-Assays mit der Rho-bindenden Domäne C21 des Effektors Rhotekin mit rekombinantom Rho-Protein mit unterschiedlicher Nukleotidbindung. Das rechte Bild zeigt das Ergebnis eines Rac- und eines Cdc42-GTPase *Pulldown*-Assays mit der GTPase-bindenden Domäne des Effektors Pak1 (Pak1-CRIB-Domäne) mit rekombinanten Rac- und Cdc42-Proteinen mit unterschiedlicher Nukleotidbindung. Anstelle von GTP wurden die GTPasen mit GppNHp beladen, einem hydrolyseresistenten GTP-Analog.

Die GTPase *Pulldown*-Assays mit gereinigten Proteinen im aktiven GppNHp-gebundenen Zustand und im inaktiven GDP-gebundenen Zustand haben ergeben, dass die GTPase-bindende Domäne C21 des Rho-Effektors Rhotekin Rho-GDP auch in hoher Konzentration nicht bindet, wohl aber Rho-GppNHp. Die GTPase-bindende Domäne des Rac- und Cdc42-Effektors Pak1 (Pak1-CRIB-Domäne) bindet ebenfalls spezifisch das aktive GppNHp-gebundene Rac und Cdc42, nicht aber inaktives GDP-gebundenes Rac und Cdc42 (Abb. 3.1). Weitere Experimente (nicht gezeigt) haben ergeben, dass die Rho-bindenden Domänen der in den GTPase *Pulldown*-Assays eingesetzten Effektoren tatsächlich spezifisch Rho im Fall von Rhotekin und Rac und Cdc42 im Fall von Pak, nicht aber die jeweils anderen Rho-GTPasen oder weitere getestete GTPasen der Ras- und Rho-Familie binden.

Somit war dieser Assay zur Untersuchung der spezifischen Aktivität der GTPasen Rho, Rac und Cdc42 geeignet und konnte für die nachfolgenden Experimente eingesetzt werden.

Im Folgenden werden die Assays zu Vereinfachung nur noch Rho- und Rac-Assays genannt.

3.2 Sequenzvergleich der Rho-und Rac-Isoformen

Viele Experimente dieser Arbeit befassten sich mit Unterschieden der Rho- und Rac-Isoformen in ihren morphologischen Effekten, ihrer Interaktion mit GEFs und in ihrer biologischen Aktivität. Daher wurden die Sequenzen der humanen Isoformen von Rho und Rac miteinander verglichen (Abb. 3.2).

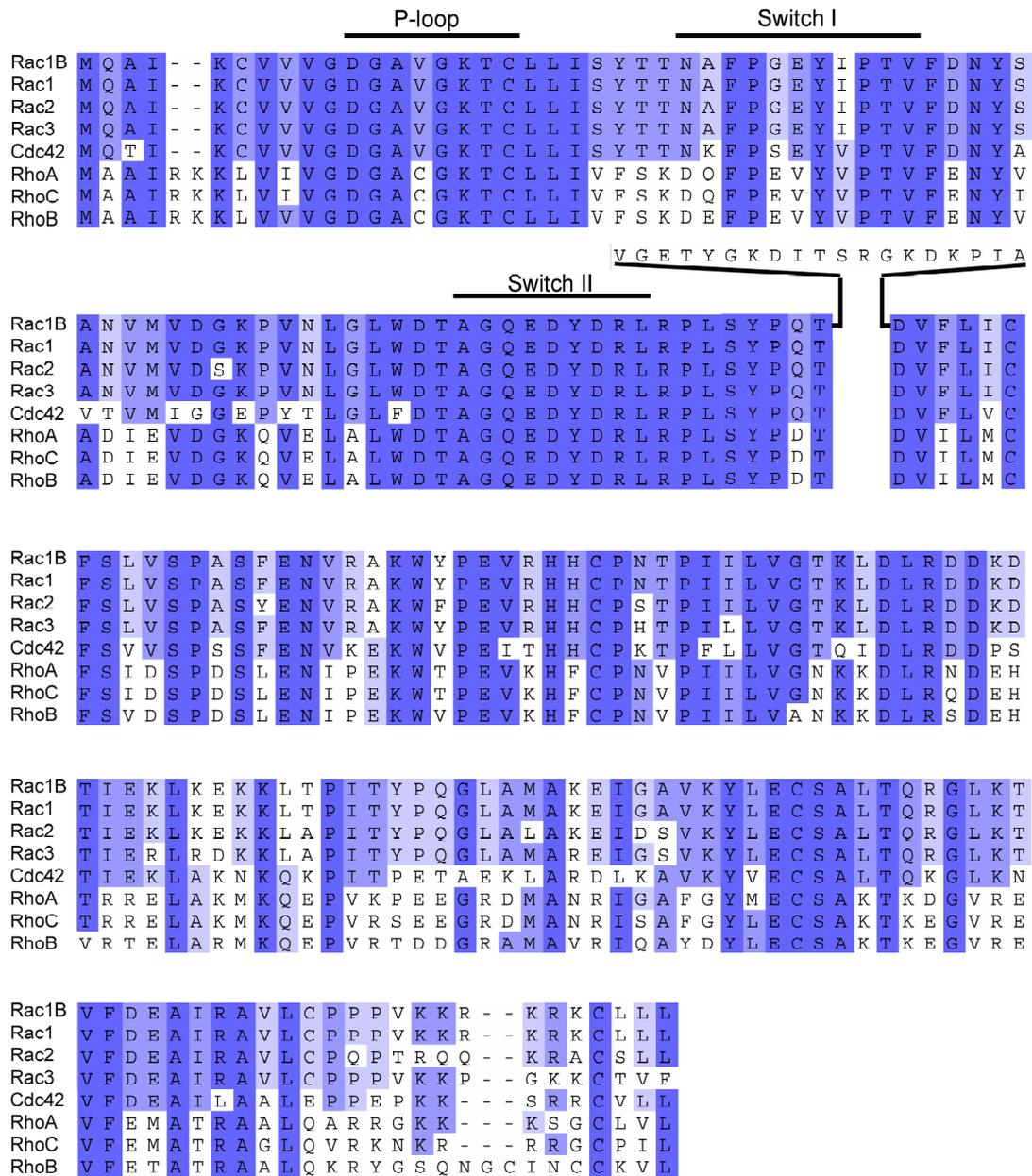


Abb. 3.2: Sequenzvergleich der Isoformen von Rho und Rac. Der Grad der Konservierung wird absteigend durch verschiedene Blautöne wiedergegeben, wobei der dunkelste Ton für Identität steht. Auffällig ist ein sehr hoher Identitätsgrad innerhalb einzelner Untergruppen der Rho-Familie. Rac1b weist nahe der Schalter II-Region eine Insertion von 19 Aminosäuren auf.

Der Sequenzvergleich zeigt, dass alle Isoformen in ihren für die Effektorinteraktion wichtigen Schalter I- und Schalter II- Regionen ein sehr hohes Maß an Identität

aufweisen, vor allem innerhalb der Isoformen von Rho und der Isoformen von Rac. Die größten Unterschiede sind in der C-terminalen Region der Proteine zu finden, die für die Lokalisation der Proteine in der Zelle von Bedeutung ist.

3.3 Spezifität verschiedener RhoGEFs für die Rho-Isoformen RhoA, RhoB und RhoC

Nach der erfolgreichen Etablierung des *Pulldown*-Assay-Systems sollte dieser als erstes zum Test der Spezifität der RhoGEFs p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF und p190RhoGEF für die Rho-Isoformen RhoA, RhoB und RhoC eingesetzt werden. Dazu wurde jeweils die Rho-Isoform in der Wildtyp-Form alleine und mit den Volllängenkonstrukten der drei verschiedenen GEFs transient mittels der DEAE-Dextran-Methode in Cos7-Zellen transfiziert, die Lysate in einen Rho-Assay eingesetzt, und nach dem Western Blot ein Immunoblot mit kommerziell erhältlichen spezifischen Antikörpern gegen die jeweilige Rho-Isoform durchgeführt (Abb. 3.3a).

Zur Kontrolle der Expression der Rho-GEFs wurden die Lysate nach SDS-PAGE und Western Blot in Immunoblots mit kommerziell erhältlichen, spezifischen Antikörpern gegen die *tags* eingesetzt (Abb. 3.3b).

Die Experimente haben gezeigt, dass p115RhoGEF für alle drei Isoformen gleichermaßen eine starke GEF-Funktion hat, da er alle drei Rho-Isoformen gleichermaßen stark aktiviert. PDZ-RhoGEF hat eine vergleichbare GEF-Funktion für RhoA und RhoB, aber nur in geringerem Ausmaß für RhoC. p190RhoGEF hat in diesem Assay keine nachweisbare GEF-Funktion auf RhoA, RhoB und RhoC. Die Expression der Rho-GEFs wurde in den Lysaten mittels Immunoblot gegen die *tags* bestätigt (Abb. 3.3b).

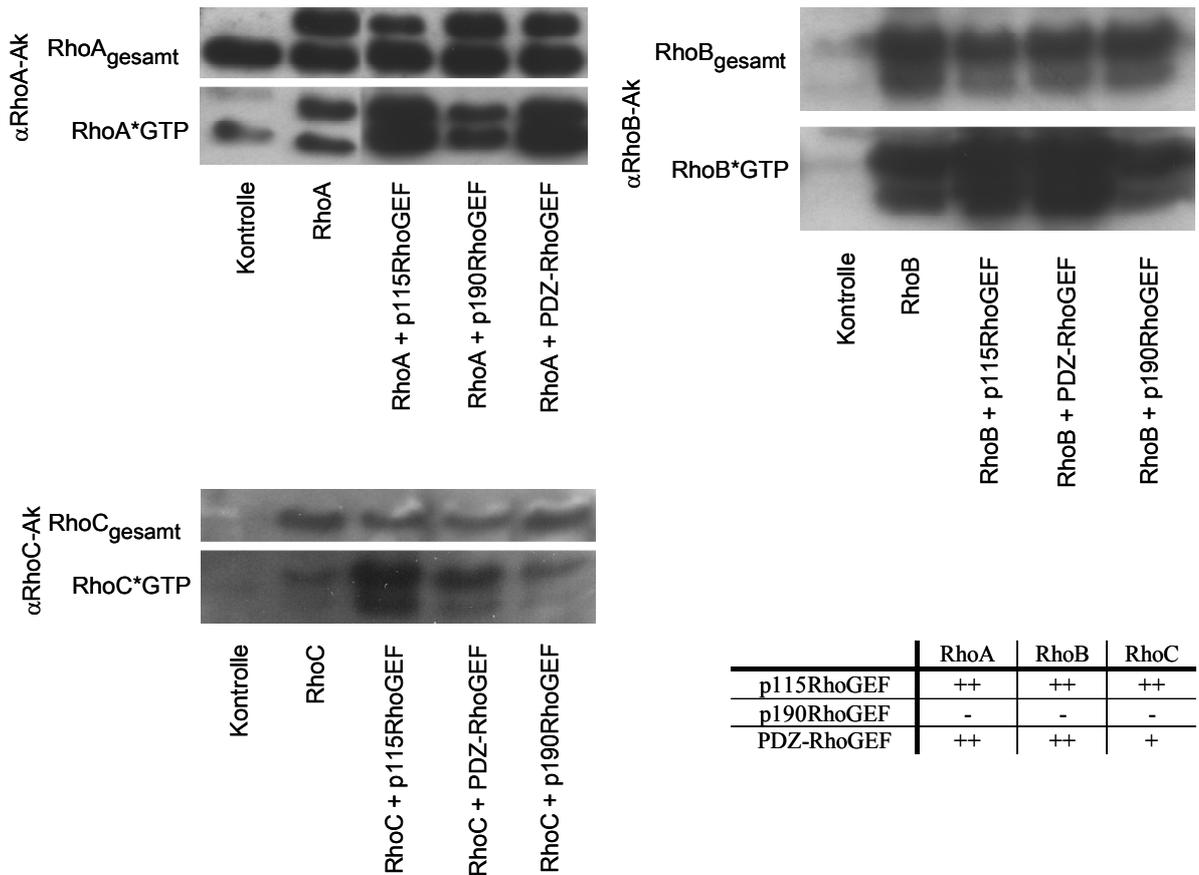


Abb. 3.3a: Spezifität von RhoGEFs für die Isoformen von Rho. Cos7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden (alle Wildtyp) transient transfiziert, ein Rho-Assay durchgeführt, und anschließend der Level an GTP-gebundener Rho-Isoform im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die jeweils unteren Banden zeigen das endogene Rho in den Zellen, während die jeweils oberen Banden das zusätzlich transfizierte Rho, das durch den Flag-tag größer ist, zeigen. Die Ergebnisse der Assays sind in der Tabelle zusammengefasst.

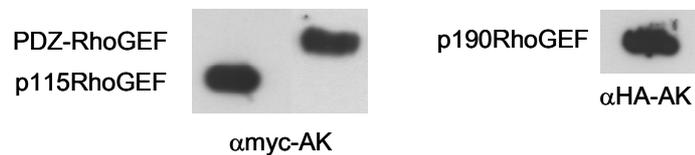


Abb. 3.3b: Nachweis der Expression der Rho-GEFs mittels Immunoblot gegen die tags. Die Expression wurde in den Lysaten mit spezifischen Antikörpern gegen die HA- und myc-tags nachgewiesen.

3.4 Aktivierung der Rac-Isoformen Rac1, Rac2 und Rac 3 durch den RacGEF Tiam1

Als nächstes sollte die Frage beantwortet werden, welche der Rac-Isoformen Rac1, Rac2 und Rac3 durch den RacGEF Tiam1 aktiviert werden. Dazu wurden die jeweiligen Rac-Isoformen in der Wildtypform allein und zusammen mit dem C1199-Konstrukt des RacGEFs Tiam1, im Folgenden nur noch C1199 genannt, mittels der DEAE-Dextran-Methode transient in Cos7-Zellen transfiziert, die Lysate in einen Rac-Assay eingesetzt, und nach dem Western Blot ein Immunoblot mit einem Rac-spezifischen Antikörper durchgeführt (Abb.3.4).

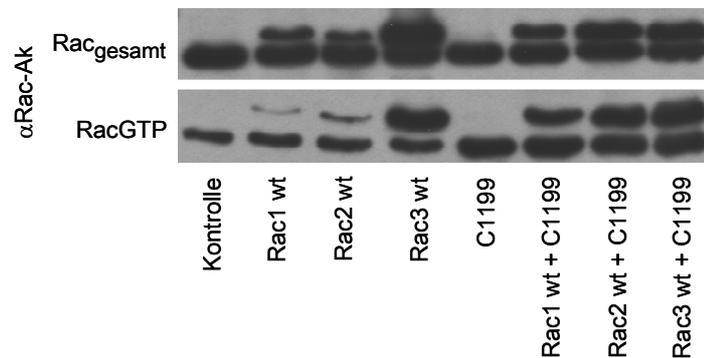


Abb. 3.4: Aktivierung der Rac-Isoformen Rac1, Rac2 und Rac3 durch den RacGEF Tiam1. Cos7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden (C1199 von RacGEF Tiam1) transient transfiziert, ein Rac-Assay durchgeführt, und anschließend der Level an Rac in GTP-gebundener, aktiver Form im Immunoblot mit spezifischem α Rac-Antikörper nachgewiesen. Die jeweils unteren Banden zeigen das endogene Rac in den Zellen, während die jeweils oberen Banden das zusätzlich transfizierte Rac, das durch den Flag-tag größer ist, zeigen.

Der Rac-Assay zeigt, dass die Rac Isoformen Rac1 und Rac2 durch den RacGEF Tiam1 deutlich aktiviert werden, während Rac3 nicht weiter aktiviert wird. Auffallend ist, dass Rac3 im Gegensatz zu den anderen beiden Rac-Isoformen

bereits ohne die Aktivierung durch einen exogenen GEF in hohem Maß in der GTP-Form und damit aktiv vorliegt. Erwartungsgemäß hat der RacGEF Tiam1 bei alleiniger Transfektion auch eine GEF-Aktivität auf das endogene Rac in den Zellen.

3.5 Effekt der Rac-Isoformen Rac1, Rac2 und Rac3 auf das Aktinzytoskelett

Um festzustellen, ob sich der Phänotyp von Rac3-exprimierenden Zellen von dem Rac1- oder Rac2-exprimierender Zellen unterscheidet, wurden NIH3T3-Zellen mittels Lipofektion transient mit den Rac-Isoformen mit der konstitutiv aktiven Mutation (G12V) transfiziert. Danach wurden sie fixiert, permeabilisiert, mit Antikörpern angefärbt und im konfokalen Lasermikroskop ausgewertet (Abb. 3.5).

Im Gegensatz zu Rac1(G12V), das in der Zelle die Rac-typischen Lamellipodien induziert, die mit F-Aktin kolokalisiert sind, lassen sich bei der Transfektion mit Rac2 (G12V) keine typischen Lamellipodienstrukturen nachweisen. Sowohl Rac1 (G12V) als auch Rac2 (G12V) sind außerdem in perinukleären und vesikulären Kompartimenten lokalisiert. Am bemerkenswertesten ist die Tatsache, dass Rac3 (G12V) die deutlichste Lamellipodienstruktur und die stärkste Spreizung in den Fibroblasten induziert und dass die Zellen eine hohe Motilität aufweisen. Sie lösen sich von ihrem Substrat ab, falten sich auf sich selbst zurück und dadurch entstehen sogenannte *“ruffles”*. Der Phänotyp der Rac1 (G12V)- und Rac3(G12V)-transfizierten NIH3T3-Zellen ist eher epitheliell, während der von Rac2 (G12V)-transfizierten Zellen eher dem ursprünglichen, fibroblastoiden Phänotyp ähnelt.

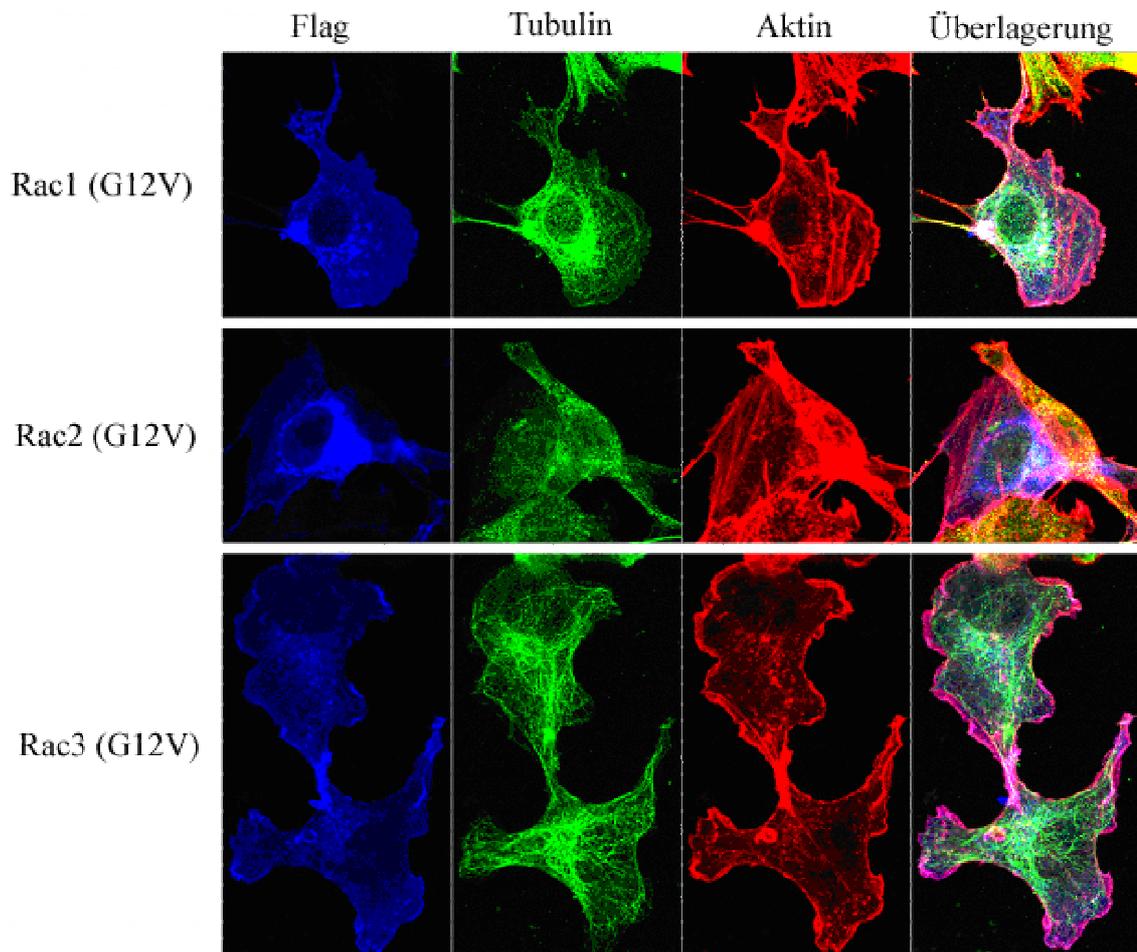


Abb. 3.5: Effekt der Rac-Isoformen Rac1, Rac2 und Rac3 auf das Aktinzytoskelett. Konfokale Bilder von NIH3T3-Zellen nach transienter Transfektion der Rac-Isoformen mit der konstitutiv aktiven Mutation (G12V) und mit Flag-tag. Die transfizierten Konstrukte sind links und die angefärbten Proteine über den Bildern vermerkt. Der Flag-tag wurde mit einem α Flag-Antikörper und Cy5-Zweitantikörper sichtbar gemacht, Tubulin mit einem α Tubulin-Antikörper und FITC-markiertem Zweitantikörper und die Aktinzytoskelettstruktur wurde mit TRITC-markiertem Phalloidin angefärbt. Überlagerungen von grün und rot sind gelb dargestellt, Überlagerungen von blau und rot in pink.

3.6 Unterschiede in der Aktivierung von Rac1 im Vergleich zu Rac1b

Rac1b weist im Gegensatz zu Rac1 eine Insertion von 19 Aminosäuren nahe der Switch II-Region auf [Schnelzer *et al.*, 2000] (Abb. 3.2), es war jedoch bisher nicht bekannt, ob sich diese beiden Isoformen in ihrer biologischen Aktivität im

zellulären System voneinander unterscheiden. Um dies zu ermitteln, wurden Cos7-Zellen mit der DEAE-Dextran-Methode transient mit Rac1 Wildtyp, Rac1 (G12V) und Rac1b Wildtyp transfiziert. Danach wurde ein Teil der Zellen auf Hungermedium (0,5%FCS) gesetzt, während der andere Teil der Zellen normal in Vollmedium (10%FCS) kultiviert wurde. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Lysate in einen Rac-Assay eingesetzt, und nach dem Western Blot ein Immunoblot mit einem Rac-spezifischen Antikörper durchgeführt (Abb.3.6).

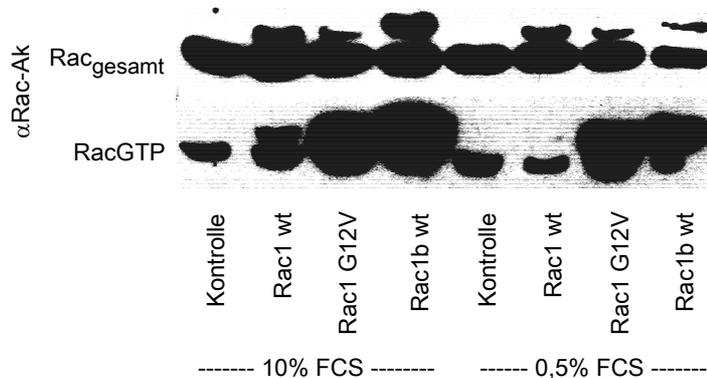


Abb. 3.6: Effekt von Serum auf aktives Rac1b Wildtyp im Vergleich zu Rac1 Wildtyp und Rac1 (G12V). Cos7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transient transfiziert, zum Teil auf Hungermedium gesetzt, ein Rac-Assay durchgeführt, und anschließend der Level an Rac in GTP-gebundener, aktiver Form im Immunoblot mit spezifischem α Rac-Antikörper nachgewiesen. Die jeweils unteren Banden zeigen das endogene Rac in den Zellen, während die jeweils oberen Banden das zusätzlich transfizierte Rac, das durch den Flag-tag oder den myc-tag größer ist, zeigen.

Bei den Rac1 Wildtyp-Zellen, die im Hungermedium kultiviert wurden, ist ein gegenüber in Vollmedium kultivierten Zellen deutlich erniedrigter Rac-GTP-Level nachweisbar. Dieser Effekt ist bei Rac1 (G12V)- und Rac1b Wildtyp-transfizierten Zellen wesentlich weniger stark zu beobachten. Auf die Menge an aktivem Rac1 (G12V) und Rac1b Wildtyp hat das Hungermedium sehr geringen Einfluss, und interessanterweise liegt fast kein Unterschied zum Vollmedium vor.

Da Rac1b in den Cos7-Zellen eine ähnliche Aktivierungsgrad wie Rac1(G12V) zeigt, war es von großer Bedeutung, den Einfluss von Rac1b auf das Aktinzytoskelett im direktem Vergleich zu Rac1 Wildtyp und Rac1(G12V) zu untersuchen. Rac1b wurde ursprünglich in Epithel-Tumoren der Brust nachgewiesen wurde [Schnelzer *et al.*, 2000], daher wurden dazu MDCK-Zellen per Lipofektion mit Rac1 Wildtyp, der dominant aktiven Mutante Rac1 (G12V) und mit Rac1b Wildtyp transient transfiziert. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit Antikörpern gegen die jeweiligen *tags* und TRITC-markiertem Phalloidin zur Visualisierung von F-Aktin gefärbt, und am Laser-Raster-Mikroskop ausgewertet (Abb. 3.7).

Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass Rac1 Wildtyp an der Membran und perinukleär lokalisiert ist, wobei das Aktinzytoskelett nicht besonders stark ausgeprägt ist. Die Lokalisation ändert sich im Hungermedium nicht, die Zellen sind lediglich etwas abgerundeter und das Aktinzytoskelett an den Zellkontakten ist ausgeprägter. Rac1 (G12V) führt zu einer ausgeprägten Spreizung der Zellen, ist über die gesamte Zelle, verstärkt aber in Bereichen der Zellkontakte, lokalisiert, und das Aktinzytoskelett ist über die gesamte Zelle verdickt sichtbar. Dieser Effekt ist im Hungermedium wesentlich schwächer und die Lokalisation ähnelt eher der von Rac1 Wildtyp. Rac1b Wildtyp ist im Vollmedium diffus über die gesamte Zelle lokalisiert, die Zellen wirken gespreizt und das Aktinzytoskelett ist deutlich verdickt. Im Hungermedium ändert sich die Lokalisation von Rac1b Wildtyp nicht, lediglich das Aktinzytoskelett ist weniger stark ausgeprägt.

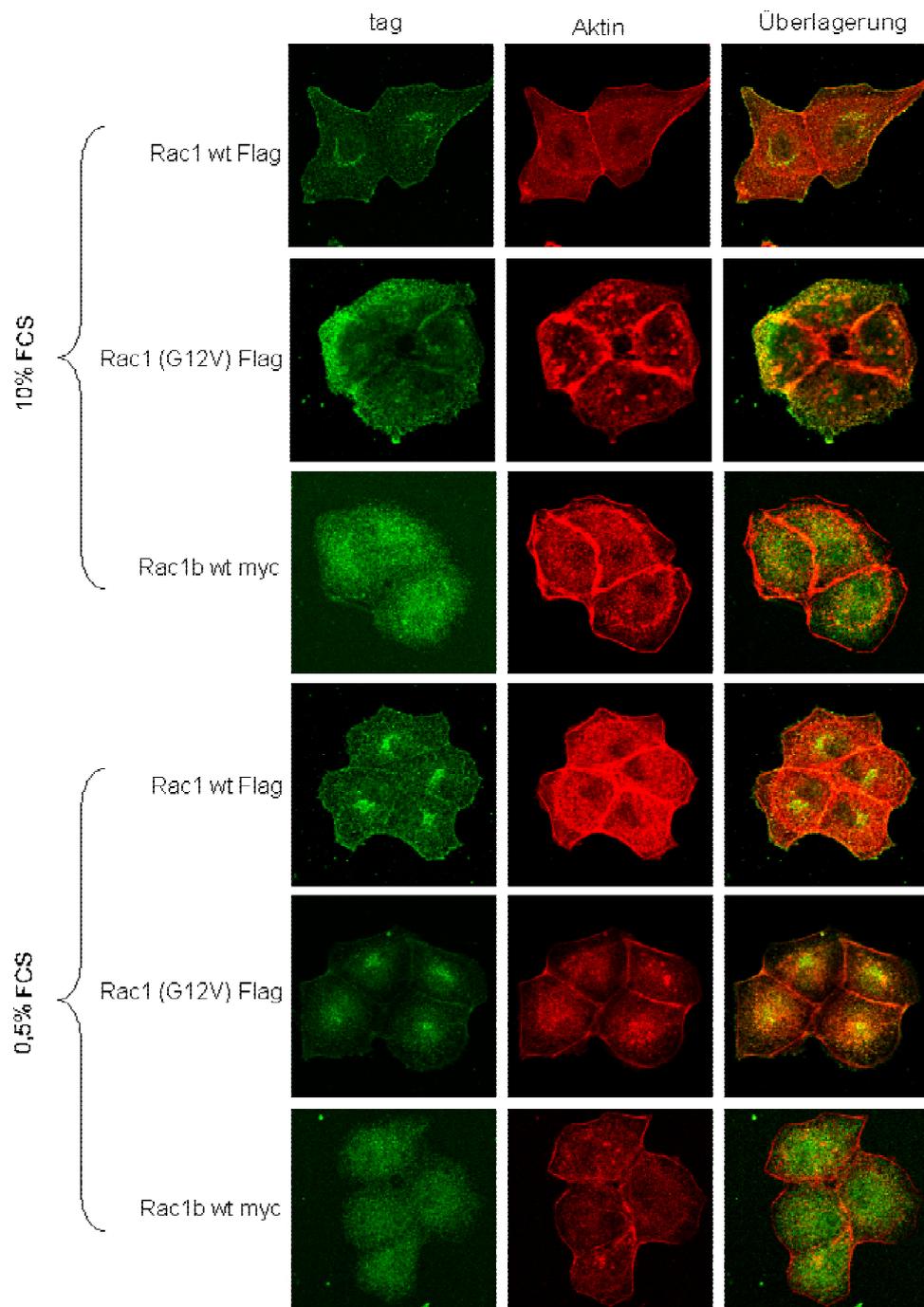


Abb. 3.7: Unterschiedliche Effekte von Rac1 und Rac 1b auf das Aktinzytoskelett. Konfokale Bilder von MDCK-Zellen nach transienter Transfektion mit den genannten Konstrukten. Die Zellen wurden zum Teil auf Hungermedium (0,5% FCS) gesetzt. Rac1b wt-myc wurde mit einem α myc-Antikörper, Rac1 wt-Flag und Rac1 (G12V)-Flag mit einem α Flag-Antikörper und beide mit einem Alexa488-markierten Zweitantikörper gefärbt. Die transfizierten Konstrukte sind links und die angefärbten Proteine über den Bildern vermerkt. Die Aktinzytoskelettstruktur wurde mit TRITC-markiertem Phalloidin angefärbt. Überlagerungen von grün und rot sind gelb dargestellt.

3.7 Mechanismus der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung

Frühere Studien zur Aktivität und Interaktion von Rho und Rac in Zellen haben gezeigt, dass der Rac-Signalweg oberhalb des Rho-Signalweges liegt, und dass die Aktivierung von Rac zur Inaktivierung von Rho führt [Sander *et al.*, 1999]. Der Mechanismus der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung und die am Signalweg beteiligten Moleküle waren bisher nicht bekannt.

Um eine Inaktivierung von Rho in Zellen nachweisen zu können, ist zunächst eine Aktivierung nötig, da der endogene Rho-GTP-Gehalt in der Zelle relativ gering ist. Aus diesem Grund wurde zunächst p115RhoGEF, der sich in vorherigen Experimenten als sehr aktiver GEF für Rho im Rho-Assay erwiesen hat (Abb. 3.3) gewählt, und im Rho- und Rac-Assay getestet, ob sich dieser GEF auch für Experimente zur Inaktivierung von Rho eignet. Dazu wurden Cos7-Zellen mit der DEAE-Dextran-Methode transient mit p115RhoGEF und C1199 transfiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Lysate in einen Rho- und einen Rac-Assay eingesetzt, und nach dem Western Blot ein Immunoblot mit kommerziell erhältlichen spezifischen Antikörpern gegen Rho und Rac durchgeführt (Abb.3.8).

Die *Pulldown*-Assays haben ergeben, dass p115RhoGEF keinen Einfluss auf den Rac-GTP-Level in der Zelle und auf die Aktivierung von Rac durch den RacGEF Tiam1 hat, und außerdem Rho deutlich aktiviert. Jedoch ist entgegen der Erwartung keine Verringerung des Signals bei gleichzeitiger Transfektion mit C1199 zu beobachten. Damit eignete sich p115RhoGEF nicht für Studien zur Inaktivierung von Rho in Zellen.

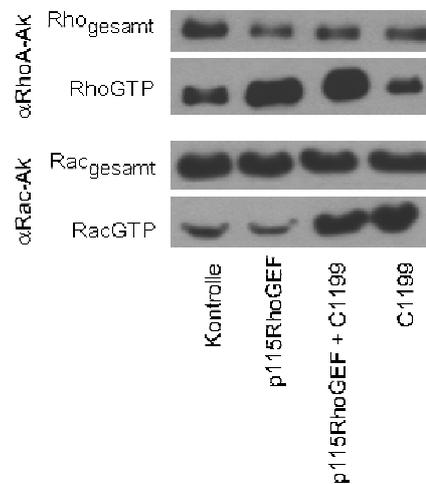


Abb.3.8: Eignung von p115RhoGEF zur Aktivierung von Rho. Cos7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden (C1199 von RacGEF Tiam1, p115RhoGEF) transient transfiziert, ein Rho- und ein Rac-Assay durchgeführt, und anschließend der Level an Rho und Rac in GTP-gebundener, aktiver Form im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Alternativ wurde daraufhin PDZ-RhoGEF im selben Ansatz als Vollängenkonstrukt und nur mit der aktivierenden DH/PH-Domäne eingesetzt, die ebenfalls keinerlei Einfluss auf die Rac-Aktivität aufwiesen und Rho deutlich aktivierten, aber bei gleichzeitiger Transfektion mit dem Tiam1-Konstrukt C1199 den RhoGTP-Level erwartungsgemäß nicht auf hohem Niveau halten konnten. Damit eignete sich PDZRhoGEF zur Aktivierung von Rho für nachfolgende Inaktivierungsstudien, und aufgrund der geringeren Größe und damit verbesserten Transfizierbarkeit wurde das DH/PH-Konstrukt für weitere Experimente ausgewählt (Abb. 3.10).

3.7.1 Rolle von p120RasGAP

Es ist bereits länger bekannt, dass p120RasGAP in Verbindung mit p190RhoGAP eine Rolle bei der Inaktivierung von Rho spielt, und es wurde *in vitro* gezeigt, dass der N-Terminus von p120RasGAP für die Interaktion entscheidend ist [Hu &

Settleman, 1997]. Inzwischen ist auch bekannt, dass die Phosphorylierung von Tyrosinen in der Mitteldomäne von p190RhoGAP wichtig ist für die GAP-Aktivität [Roof *et al.*, 1998].

SH2-Domänen binden spezifisch an Tyrosin-phosphorylierte Proteine, daher sollte zunächst mit Hilfe einer Immunpräzipitation die Bindung der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP an phosphoryliertes p190RhoGAP nachgewiesen werden. Dazu wurden Cos7-Zellen mit der DEAE-Dextran-Methode mit der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP, mit C1199, Rac1 (G12V) und mit viraler Src-Kinase transient transfiziert. Die Immunpräzipitation aus den Lysaten erfolgte mit an γ -bind-Sepharose gebundenem α HA-Antikörper, an den die SH2-Domäne von p120RasGAP mit ihrem HA-tag gebunden hat, und daran gebundenes phosphoryliertes p190RhoGAP wurde nach einem Western Blot im Immunoblot mit einem für p190RhoGAP spezifischen Antikörper nachgewiesen (Abb. 3.9).

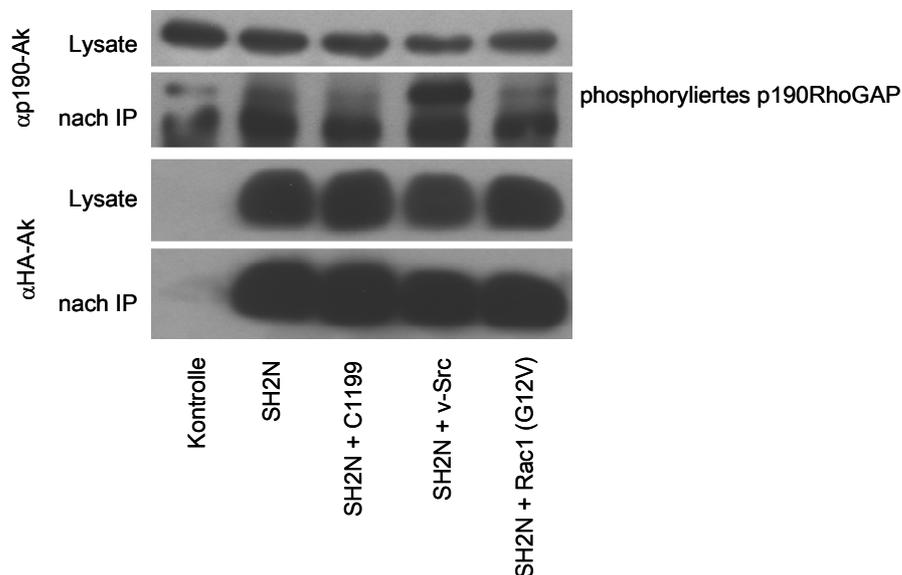


Abb. 3.9: Immunpräzipitation zum Nachweis der Bindung von p120RasGAP an phosphoryliertes p190RhoGAP. Cos7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden (N-terminale SH2-Domäne von p120RasGAP, C1199-Konstrukt des RacGEFs Tiam1, v-Src, Rac1 (G12V)) transient transfiziert. Aus den Lysaten wurde phosphoryliertes p190RhoGAP mit der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP präzipitiert, die an den an γ -bind-Sepharose gebundenen α HA-Antikörper gebunden hat. Die obere Bande im Immunoblot gegen p190RhoGAP nach Immunpräzipitation zeigt phosphoryliertes p190RhoGAP. Die untere Bande ist unspezifisch.

Die Immunpräzipitation hat gezeigt, dass die N-terminale SH2-Domäne von p120RasGAP in der Lage ist, phosphoryliertes p190RhoGAP zu binden, wobei die Menge an phosphoryliertem p190RhoGAP durch virale Src-Kinase, die konstitutiv aktiv ist, deutlich erhöht ist. Interessanterweise war auch ohne Aktivierung durch zusätzliche Tyrosinkinase zu einem geringen Maß phosphoryliertes p190RhoGAP präzipitierbar. Die Kotransfektion von C1199 und Rac1 (G12V) mit der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP zeigte unscharfe, schwache Banden, die auf eine Degradation von phosphoryliertem p190RhoGAP hindeuten. Die Tatsache, dass auch in der Kontrolle p190RhoGAP präzipitiert wurde, ist vermutlich auf zu wenig stringente Waschbedingungen und unspezifische Bindung an den Antikörper oder die Sepharose zurückzuführen. Das dort erhaltene Signal muss zur Auswertung von den anderen Signalen abgezogen werden.

Die Immunpräzipitation hat gezeigt, dass die N-terminale SH2-Domäne von p120RasGAP tatsächlich phosphoryliertes p190RhoGAP bindet. Daher war es naheliegend, im Rho-Assay zu testen, ob die N-terminale SH2-Domäne von p120RasGAP durch Bindung an phosphoryliertes p190RhoGAP in der Zelle in der Lage ist, die Inaktivierung von Rho durch Rac, das von Rac-GEF aktiviert wurde, zu verhindern. Zu diesem Zweck wurden Cos7-Zellen mittels der DEAE-Dextran-Methode mit der DH/PH-Domäne von PDZ-RhoGEF, im Folgenden nur noch DH/PH genannt, C1199 und der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP transient transfiziert und die Lysate in einen Rho-Assay und einen Rac-Assay eingesetzt. Der Rac-Assay diente hierbei zur Kontrolle des Effekts der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP auf die Aktivität von Rac. Der Immunoblot nach dem Western Blot wurde mit kommerziell erhältlichen spezifischen Antikörpern gegen Rho und Rac durchgeführt (Abb.3.10).

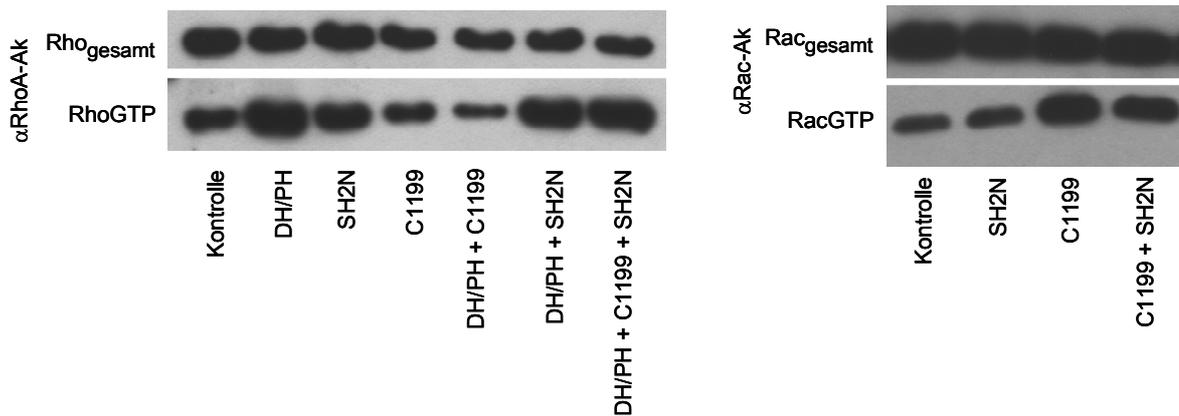


Abb. 3.10: Blockierung der über RacGEF und Rac induzierten Rho-Inaktivierung durch die N-terminale SH2-Domäne von p120RasGAP. Cos7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden (C1199-Konstrukt des RacGEFs Tiam1, DH/PH von PDZ-RhoGEF und SH2N von p120RasGAP) transient transfiziert, ein Rho -Assay und ein Rac-Assay durchgeführt, und anschließend der Level an Rho und Rac in GTP-gebundener, aktiver Form im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Der Rho-Assay hat gezeigt, dass C1199 bei Kotransfektion mit DH/PH tatsächlich den Rho-GTP-Level gegenüber der Transfektion mit DH/PH alleine deutlich reduziert, hier also im Gegensatz zu den *Pulldown*-Experimenten mit p15RhoGEF (Abb. 3.8) eine Inaktivierung von Rho über den Rac-Signalweg stattfindet. Des weiteren zeigt die Kotransfektion von DH/PH und C1199 zusammen mit der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP, dass diese Domäne die über Tiam1 und Rac induzierte Rho-Inaktivierung inhibiert, indem es mit p120RasGAP um die Bindung an p190RhoGAP konkurriert. C1199 allein hat keinen wesentlichen Einfluss auf den Rho-GTP-Gehalt der Zellen.

Die gleichen Resultate wurden mit der weiter C- terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP erzielt (nicht gezeigt).

Aus dem Rac-Assay lässt sich entnehmen, dass die N-terminale SH2-Domäne von p120RasGAP keinen Effekt auf die Aktivität von Rac in den Zellen hat, auch nicht, wenn die Zellen durch C1199 eine erhöhte Rac-Aktivität aufweisen.

Die Untersuchung der Morphologie von HeLa-Zellen nach der transienten Lipofektion mit DH/PH, C1199 und der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP sollte die Effekte auf das Aktinzytoskelett zeigen. Dazu wurden die Zellen nach der Transfektion fixiert, permeabilisiert und, außer im Fall von C1199, das einen GFP-*tag* hat, mit Antikörpern gegen die jeweiligen *tags* und TRITC-markiertem Phalloidin zur Anfärbung von F-Aktin gefärbt, und am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop ausgewertet (Abb. 3.11).

Durch Transfektion mit DH/PH zeigen die Zellen den typischen Phänotyp einer Rho-aktivierten Zelle. Sie weisen viele Stressfasern auf, sind relativ gestreckt und in hohem Maß adhärent. Die Transfektion von C1199 hingegen bewirkt, dass die Zellen sich deutlich abrunden und an der Oberfläche die für Rac-aktivierte Zellen typische *ruffle*-Struktur aufweisen. Aktin-Stressfasern sind nicht mehr nachweisbar. Des Weiteren weisen diese Rac-aktivierten Zellen deutliche Zell-Zell-Adhäsionen auf, die in der Überlagerung gelb dargestellt sind. Bei Transfektion der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP ist zu beobachten, dass das Konstrukt in hohem Maß im Kern vorliegt, was allerdings wahrscheinlich an der geringen Größe (ca. 10 kDa) liegt. Außerdem verursacht es Stressfasern, die stark auf die Aktivierung von Rho hindeuten. Durch die Kotransfektion aller drei Konstrukte werden die Zellen gegenüber der Transfektion mit C1199 allein oder der Kotransfektion von RacGEF und RhoGEF (nicht gezeigt) wieder adhärenter und zeigen deutlich ausgeprägte Stressfasern, die auf Rho-Aktivität hinweisen. Die untere linke Zelle in der Abbildung zur Kotransfektion ist vermutlich nicht mit der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP transfiziert, da sie keine Stressfasern aufweist, wohl aber *ruffles*, was auf Rac-Aktivität hindeutet, und außerdem ist die für aktives Rac bereits in den Tiam1-transfizierten Zellen beobachtete Zelladhäsion zur Nachbarzelle nachweisbar.

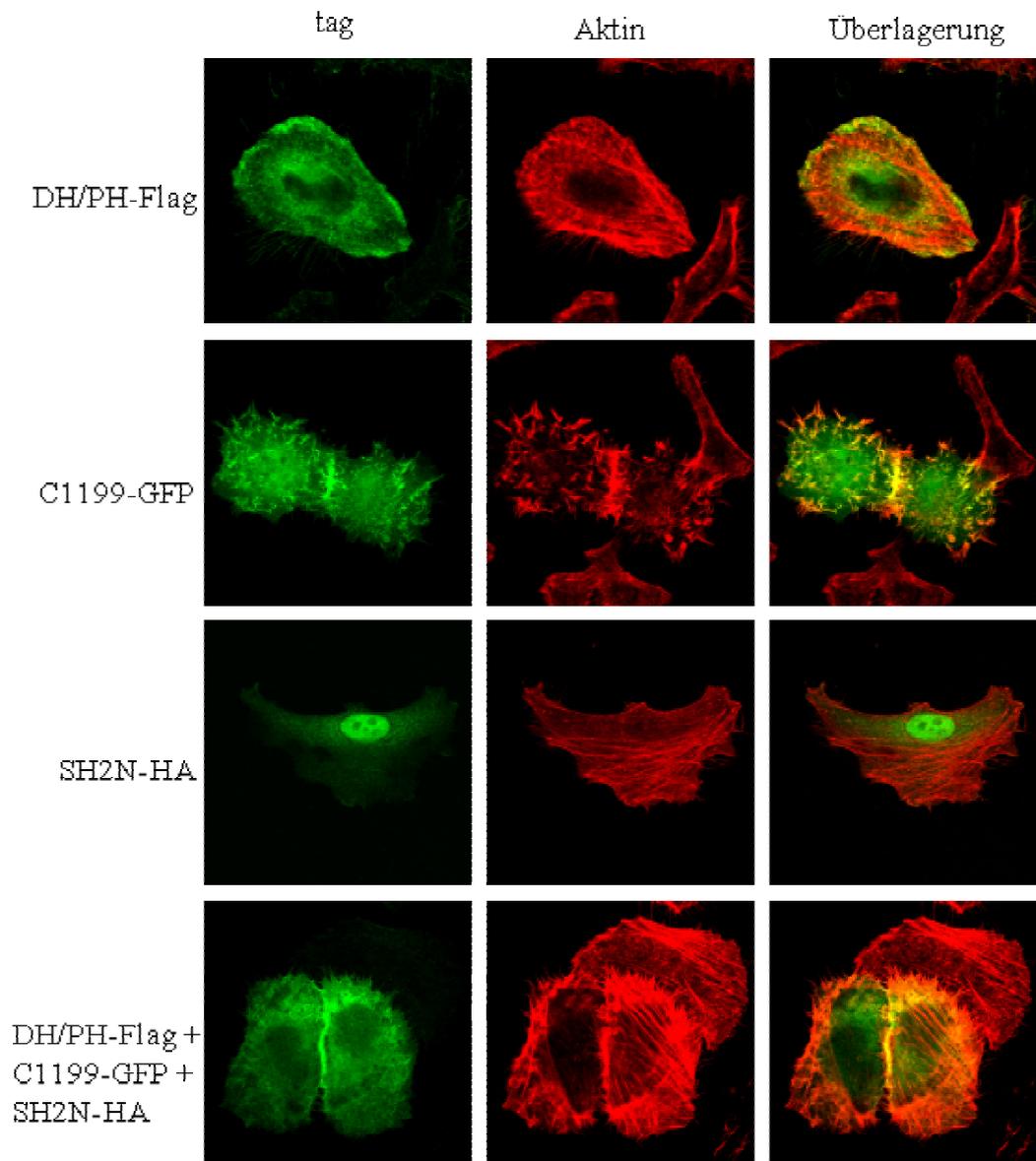


Abb. 3.11: Effekt von DH/PH, C1199 und SH2N-p120RasGAP auf das Aktinzytoskelett. Konfokale Bilder von HeLa-Zellen nach transienter Transfektion mit den genannten Konstrukten (DH/PH-Domäne von PDZ-RhoGEF, C1199 von RacGEF Tiam1 und N-terminale SH2-Domäne von p120RasGAP). SH2N-HA wurde mit einem α HA-Antikörper, DH/PH-Flag mit einem α Flag-Antikörper und beide mit einem Alexa488-markierten Zweitantikörper gefärbt. Die transfizierten Konstrukte sind links und die angefärbten Proteine über den Bildern vermerkt. Die Aktinzytoskelettstruktur wurde mit TRITC-markiertem Phalloidin angefärbt. Überlagerungen von grün und rot sind gelb dargestellt.

3.7.2 Rolle der LMW-PTP

Da die Phosphorylierung von p190RhoGAP für die p190RhoGAP-p120RasGAP-Dimerisierung und für die GAP-Aktivität von p190RhoGAP offensichtlich eine entscheidende Rolle spielt, sollte als nächstes untersucht werden, ob eine spezifische Dephosphorylierung von p190RhoGAP durch LMW-PTP (*low molecular weight protein-tyrosine phosphatase*) die über Tiam1 und Rac induzierte Rho-Inaktivierung blockiert. p190RhoGAP ist als Substrat für diese Phosphatase beschrieben [Chiarugi *et al.*, 2000]. Zu diesem Zweck wurden mittels der DEAE-Dextran-Methode Cos7-Zellen transient mit DH/PH, C1199 und LMW-PTP transfiziert. Die Lysate wurden in einen Rho-Assay eingesetzt. Der Immunoblot nach dem Western Blot wurde mit einem kommerziell erhältlichen spezifischen Antikörper gegen Rho durchgeführt (Abb.3.12).

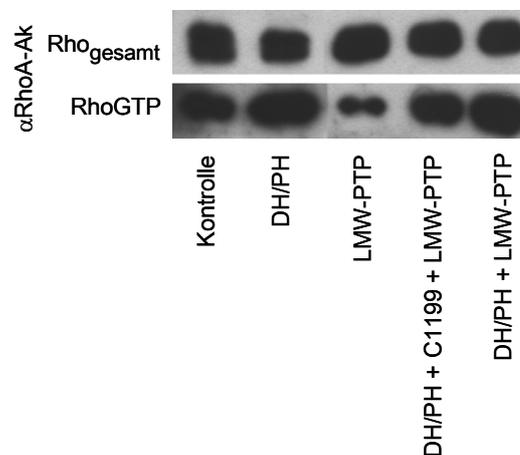


Abb. 3.12: Blockierung der über Rac-GEF und Rac induzierten Rho-Inaktivierung durch LMW-PTP. Cos7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden (C1199 von RacGEF Tiam1, DH/PH von PDZ-RhoGEF und LMW-PTP) transient transfiziert, ein Rho-Assay durchgeführt, und anschließend der Level an Rho in GTP-gebundener, aktiver Form im Immunoblot mit Rho-spezifischem Antikörper nachgewiesen.

Der Rho-Assay hat gezeigt, dass LMW-PTP die über den Rac-GEF Tiam1 (C1199-Konstrukt) und Rac induzierte Rho-Inaktivierung blockiert, aber keinen Einfluss auf die durch DH/PH gesteigerte Rho-Aktivität hat. LMW-PTP alleine reduziert den Level an aktivem Rho gegenüber der Kontrolle geringfügig. Auf die Aktivität von Rac hat LMW-PTP keinen Einfluss (Abb. 3.16).

3.7.3 Rolle der Src-Kinase

Es ist bekannt, dass für die Phosphorylierung von p190RhoGAP, die notwendig für die GAP-Aktivität ist, Src-Kinase verantwortlich ist [Roof *et al.*, 1998]. GTPase *Pulldown*-Assays sollten zeigen, ob dieser Weg auch wichtig ist für die über RacGEF und Rac induzierte Rho-Inaktivierung, an der p190RhoGAP beteiligt ist.

Zunächst sollte im Rho-Assay gezeigt werden, dass Src-Kinase an der durch RacGEF und Rac induzierten Rho-Inaktivierung beteiligt ist. Dazu wurden Cos7-Zellen mit DH/PH und C1199 mittels der DEAE-Dextran-Methode transient transfiziert, und anschließend vor der Lyse mit dem spezifischen Src-Kinase-Inhibitor PP1 (4-Amino-5(4-methylphenyl)-7(t-butyl)pyrazolo[3,4d]-pyrimidine) in einer Konzentration von 50 μ M für 30 Minuten behandelt. Die Lysate wurden in einen Rho-Assay eingesetzt. Der Immunoblot nach dem Western Blot wurde mit einem kommerziell erhältlichen spezifischen Antikörper gegen Rho durchgeführt (Abb. 3.13).

Dieser Rho-Assay hat gezeigt, dass Src-Kinase bei der durch Tiam1 und Rac ausgelösten Inaktivierung von Rho eine Rolle spielt, da PP1, der spezifische Src-Kinase-Inhibitor, die Inaktivierung blockiert.

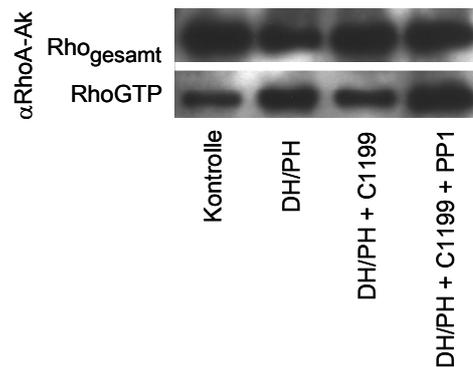


Abb. 3.13: Beteiligung von Src-Kinase an der durch RacGEF und Rac induzierten Inaktivierung von Rho. Cos7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden (C1199 von RacGEF Tiam1, DH/PH von PDZ-RhoGEF) transient transfiziert, zum Teil mit dem Src-Kinase-Inhibitor PP1 behandelt, ein Rho-Assay durchgeführt, und anschließend der Level an Rho in GTP-gebundener, aktiver Form im Immunoblot mit Rho-spezifischem Antikörper nachgewiesen.

Danach wurden Rho-Assays nach transienter DEAE-Dextran-Transfektion von Cos7-Zellen mit DH/PH und C1199 sowie c-Src und v-Src und anschließender Lyse der Zellen durchgeführt. Zelluläre Src-Kinase ist autoinhibiert und von Faktoren wie etwa EGF (*epidermal growth factor*) und PDGF (*platelet derived growth factor*) abhängig, um aktiviert zu werden. Virale Src-Kinase ist konstitutiv aktiv und unabhängig von der Aktivierung durch Faktoren [Bishop, 1991]. Diese Experimente sollten zeigen, welchen Effekt Src-Kinase auf den Basallevel an aktiviertem Rho in den Zellen hat und ob sie die Rho-Aktivierung durch PDZ-RhoGEF ebenso blockiert, wie es bei der gleichzeitigen Expression von PDZ-RhoGEF mit dem RacGEF Tiam1 zu sehen ist. Der Immunoblot nach dem Western Blot wurde mit einem kommerziell erhältlichen spezifischen Antikörper gegen Rho durchgeführt (Abb. 3.14).

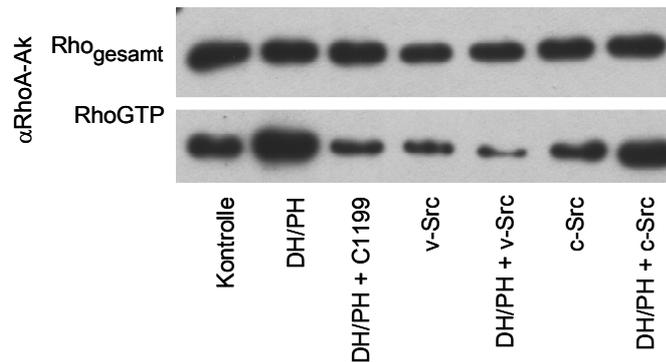


Abb. 3.14: Inaktivierung von Rho durch Src-Kinase. Cos7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden (C1199 von RacGEF Tiam1, DH/PH von PDZ-RhoGEF, c-Src und v-Src) transient transfiziert, ein Rho-Assay durchgeführt, und anschließend der Level an Rho in GTP-gebundener, aktiver Form im Immunoblot mit Rho-spezifischem Antikörper nachgewiesen.

Der Rho-Assay hat gezeigt, dass virale Src-Kinase im Gegensatz zu zellulärer Src-Kinase den Basalgehalt an aktivem, GTP-gebundenen Rho in der Zelle reduziert. Außerdem blockiert virale Src-Kinase die Aktivierung von Rho durch DH/PH sogar stärker als dies bei C1199 der Fall ist, während zelluläre Src-Kinase nur einen sehr schwachen blockierenden Effekt hat.

Als nächstes war es von Interesse zu klären, ob die N-terminale SH2-Domäne von p120RasGAP die Inaktivierung von Rho durch Src-Kinase nach der Aktivierung durch DH/PH ebenso blockiert, wie dies bei der Inaktivierung durch C1199 der Fall ist (Abb. 3.10). Zu diesem Zweck wurde ein Rho-Assay nach transienter DEAE-Dextran-Transfektion von Cos7-Zellen mit DH/PH, viraler Src-Kinase und der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP durchgeführt. Der Immunoblot nach dem Western Blot erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen spezifischen Antikörper gegen Rho (Abb. 3.15).

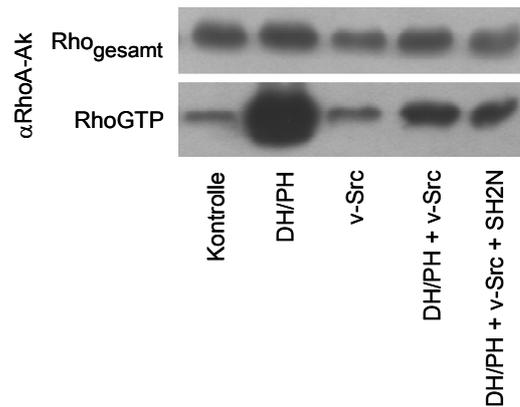


Abb. 3.15: Effekt von SH2N-p120RasGAP auf die Rho-Inaktivierung durch v-Src. Cos7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden (DH/PH von PDZ-RhoGEF, SH2N von p120RasGAP und v-Src) transient transfiziert, ein Rho-Assay durchgeführt, und anschließend der Level an Rho in GTP-gebundener, aktiver Form im Immunoblot mit Rho-spezifischem Antikörper nachgewiesen.

Die N-terminale SH2-Domäne von p120RasGAP blockiert die Inaktivierung von Rho durch virale Src-Kinase im Rho-Assay nicht, was auf einen parallelen Signalweg hindeutet.

Es musste außerdem geklärt werden, welche Effekte Src-Kinase im *Pulldown*-Assay-System auf die Aktivität von Rac und Cdc42 hat. Dazu wurden Cos7-Zellen über die DEAE-Dextran-Methode mit DH/PH, C1199, viraler und zellulärer Src-Kinase transient transfiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Lysate in einen Rac- und Cdc42-Assay eingesetzt, und nach dem Western Blot ein Immunoblot mit Rac- und Cdc42-spezifischen Antikörpern durchgeführt (Abb. 3.16).

Die Rac- und Cdc42-Assays haben ergeben, dass zelluläre Src-Kinase keinen Einfluss auf die Aktivität von Rac und Cdc42 hat, während virale Src-Kinase einen schwachen inhibierenden Effekt hat.

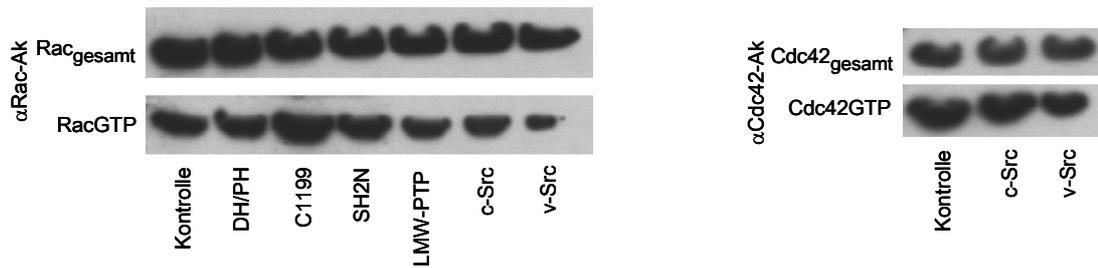


Abb. 3.16: Effekt von Src-Kinase auf die Aktivität von Rac und Cdc42. Cos7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden (C1199 von RacGEF Tiam1, DH/PH von PDZ-RhoGEF, c-Src, v-Src, SH2N-Domäne von p120RasGAP und LMW-PTP) transient transfiziert, ein Rac- und Cdc42-Assay durchgeführt, und anschließend die Level an Rac und Cdc42 in GTP-gebundener, aktiver Form im Immunoblot mit spezifischen α Rac- und α Cdc42-Antikörpern nachgewiesen.

3.7.4 Rolle der N-terminalen GTPase-Domäne von p190RhoGAP

Die N-terminale Domäne von p190RhoGAP ist GTP-bindend, und ihr wird eine generelle Rolle bei der Signaltransduktion zugesprochen. Es konnte gezeigt werden, dass die dominant negative Mutation (S36N) der GTPase-Domäne die GAP-Aktivität von p190RhoGAP *in vivo* blockiert [Tatsis *et al.*, 1998]. Daher sollte mit Hilfe des GTPase *Pulldown*-Assay-Systems geprüft werden, ob dieser Domäne auch eine Rolle bei der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung zukommt. Dazu wurden Cos7-Zellen mit DH/PH, C1199 und der N-terminalen Domäne von p190RhoGAP (p226) in der Wildtypform und mit der dominant negativen Mutation (S36N) (analog zu (S17N) bei Ras) mittels der DEAE-Dextran-Methode transient transfiziert. Die Lysate wurden in einen Rho-Assay eingesetzt. Der Immunoblot nach dem Western Blot wurde mit einem kommerziell erhältlichen spezifischen Antikörper gegen Rho durchgeführt (Abb. 3.17).

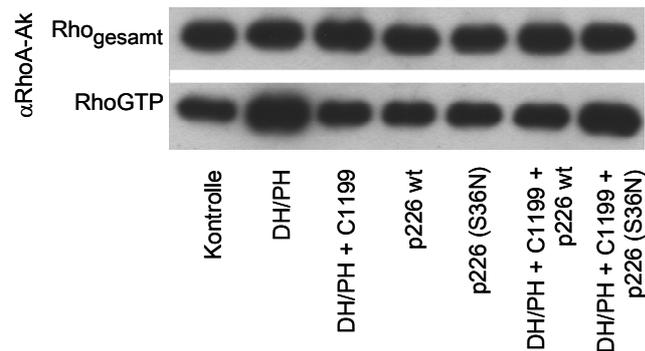


Abb. 3.17: Effekt der N-terminalen GTPase-Domäne von p190RhoGAP auf die Rac-induzierte Rho-Inaktivierung. Cos7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden (DH/PH-Domäne von PDZ-RhoGEF, C1199-Konstrukt des RacGEFs Tiam1 und N-terminale Domäne von p190RhoGAP (p226) in der Wildtypform und mit der dominant negativen Mutation (S36N)) transient transfiziert, ein Rho-Assay durchgeführt, und anschließend der Level an Rho in GTP-gebundener, aktiver Form im Immunoblot mit Rho-spezifischem Antikörper nachgewiesen.

Der Rho-Assay hat gezeigt, dass die GTPase-Domäne von p190RhoGAP mit der dominant negativen Mutation (S36N) die über den RacGEF Tiam1 und Rac induzierte Rho-Inaktivierung blockiert, während die Domäne in der Wildtypform diesen Effekt nicht hat.

3.7.5 Rolle des Rac-Effektors Pak

Pak ist ein wichtiger Effektor von Rac, der nach Aktivierung durch Bindung an GTP-gebundenes Rac neben vielen anderen Funktionen auch über verschiedene Signalkaskaden einen Einfluss auf die Aktindynamik, die Zelladhäsion und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren hat [Bagrodia & Cerione, 1999; Mackay & Hall, 1998]. Rac-Effektoren spielen wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle bei der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung. Daher sollte mit zwei Konstrukten aus humanem Pak1, Pak-PBD (*Pak binding domain*, Aminosäuren 69-150) und Pak-PID (*Pak inhibitory domain*, Aminosäuren 83-149) [Mira *et al.*, 2000] getestet werden, ob die Inhibition des Pak-Signalweges im Rho-Assay einen Einfluss auf die Aktivität von Rho hat. Pak-PBD verhindert als GBD die Bindung von Pak an

aktives Rac, während Pak-PID die Weiterleitung des Signals vom aktivierten Effektor Pak zu den nachfolgenden Signalmolekülen in der Signalkaskade verhindert. Cos7-Zellen wurden mit DH/PH und den Pak1-Konstrukten Pak-PBD und Pak-PID mittels der DEAE-Dextran-Methode transient transfiziert. Die Lysate wurden in einen Rho-Assay eingesetzt. Der Immunoblot nach dem Western Blot wurde mit einem kommerziell erhältlichen spezifischen Antikörper gegen Rho durchgeführt (Abb. 3.18).

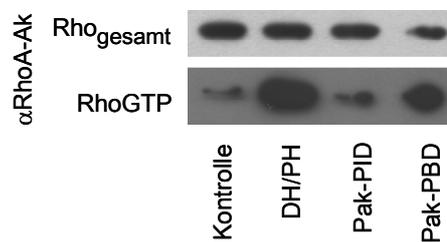


Abb. 3.18: Einfluss der Inhibition von Pak auf die Aktivität von Rho. Cos7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden (DH/PH-Domäne von PDZ-RhoGEF, Pak-PBD und Pak-PID) transient transfiziert, ein Rho-Assay durchgeführt, und anschließend der Level an Rho in GTP-gebundener, aktiver Form im Immunoblot mit Rho-spezifischem Antikörper nachgewiesen.

Dem Ergebnis des Rho-Assays nach zu urteilen, kann die Pak-PBD-Domäne, die bereits die Bindung von Pak an aktives Rac verhindert, die Rho-Inaktivierung inhibieren. Die Pak-PID-Domäne, die die Signalweiterleitung zu Pak nachgeschalteten Signalmolekülen verhindert, hat diesen Effekt nicht.

Zusätzlich zu den Experimenten mit den PBD- und PID-Domänen von Pak1 wurden auch die Kinasedomänen von Pak1, Pak2 und Pak3, die *in vitro* in der Lage sind, ihre Substrate zu phosphorylieren und damit zu aktivieren, auf ihren Einfluss auf die Aktivität von Rho im *Pulldown*-Assay-System getestet. Dazu wurden Cos7-Zellen mit DH/PH und den Kinasedomänen (KD) von Pak1, Pak2 und Pak3 mittels der DEAE-Dextran-Methode transient transfiziert. Die Lysate wurden in einen Rho-Assay eingesetzt. Der Immunoblot nach dem Western Blot wurde mit einem

kommerziell erhältlichen spezifischen Antikörper gegen Rho durchgeführt (Abb. 3.19).

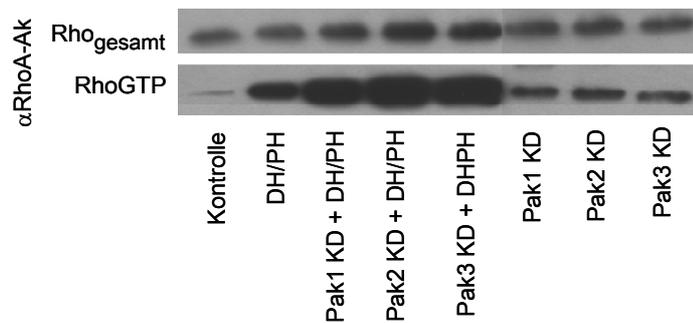


Abb. 3.19: Einfluss der Kinasedomänen von Pak auf die Aktivität von Rho. Cos7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden (DH/PH-Domäne von PDZ-RhoGEF, Kinasedomänen von Pak1, Pak2 und Pak3) transient transfiziert, ein Rho-Assay durchgeführt, und anschließend der Level an Rho in GTP-gebundener, aktiver Form im Immunoblot mit Rho-spezifischem Antikörper nachgewiesen.

Der Rho-Assay zeigt, dass die Kinasedomänen von Pak1, Pak2 und Pak3 allein einen schwach aktivierenden Effekt auf Rho haben, und bei einer Kotransfektion mit DH/PH wird die Aktivität von Rho gegenüber der alleinigen Transfektion mit DH/PH sogar noch gesteigert. Die Kinasedomänen von Pak1, Pak2 und Pak3 waren also entgegen der Erwartung nicht dazu geeignet, eine Inaktivierung von Rho zu vermitteln.

Zur Klärung der Rolle von Pak in der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung wurden daher als nächstes zwei Vollängenkonstrukte von Pak1 mit konstitutiver Aktivität im Rho-Assay getestet. Pak1 (T423E) hat *in vivo* eine starke konstitutive Kinaseaktivität und ist in der Lage Rac und Cdc42 zu binden, während Pak1 (H83L/H86L) eine schwächere konstitutive Kinaseaktivität aufweist, und nicht in der Lage ist, Rac und Cdc42 zu binden [Sells *et al.*, 1997; 1999]. Die konstitutive Kinaseaktivität dieser Mutante ist auf die Aufhebung der Autoinhibition von Pak

zurückzuführen [Zhao *et al.*, 1998]. Cos7-Zellen wurden mit den beiden Pak-Mutanten sowie DH/PH mittels der DEAE-Dextran-Methode transient transfiziert. Die Lysate wurden in einen Rho-Assay eingesetzt. Der Immunoblot nach dem Western Blot wurde mit einem kommerziell erhältlichen spezifischen Antikörper gegen Rho durchgeführt (Abb. 3.20).

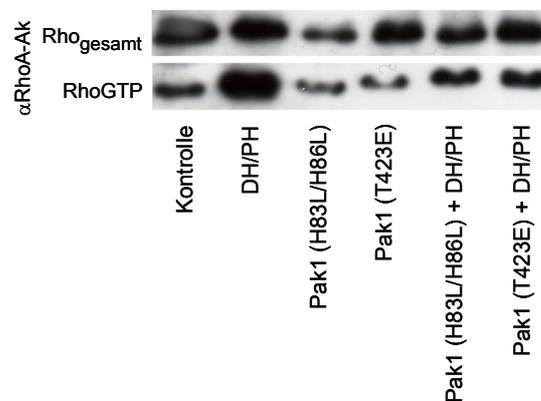


Abb. 3.20: Inhibition von Rho durch konstitutiv aktives Pak1. Cos7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden (DH/PH-Domäne von PDZ-RhoGEF, Pak1 (H83L/H86L), Pak1 (T423E)) transient transfiziert, ein Rho-Assay durchgeführt, und anschließend der Level an Rho in GTP-gebundener, aktiver Form im Immunoblot mit Rho-spezifischem Antikörper nachgewiesen.

Konstitutiv aktives Pak1 vermittelt, wie der Rho-Assay zeigt, eine Inhibition der Aktivität von Rho.

3.7.6 Rolle der Rac-Isoformen

Die drei Rac-Isoformen Rac1, Rac2 und Rac3 unterscheiden sich in erster Linie in ihren C-terminalen Regionen (Abb. 3.2). Generell ist die Frage von Interesse, welche Rac-Isoform überhaupt für die Rac-induzierte Rho-Inaktivierung verantwortlich ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Cos7-Zellen mit DH/PH und den Vollängenkonstrukten von Rac1, Rac2 und Rac3 mit der konstitutiv

aktiven Mutation (G12V) mittels der DEAE-Dextran-Methode transient transfiziert. Die Lysate wurden in einen Rho-Assay eingesetzt. Der Immunoblot nach dem Western Blot wurde mit einem kommerziell erhältlichen spezifischen Antikörper gegen Rho durchgeführt (Abb. 3.21).

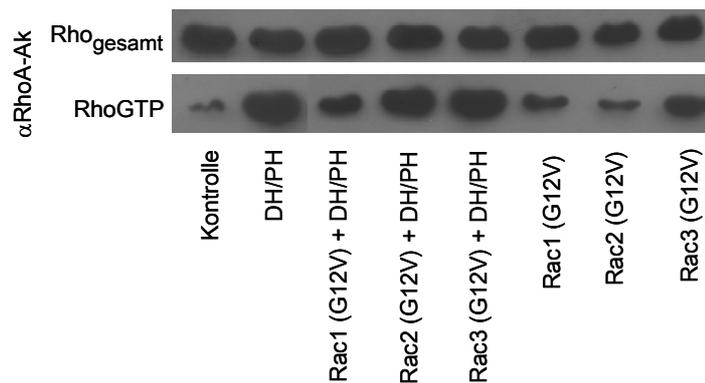


Abb. 3.21: Rac-Isoformen in der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung. Cos7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden (DH/PH-Domäne von PDZ-RhoGEF, Rac1-3 (G12V)) transient transfiziert, ein Rho-Assay durchgeführt, und anschließend der Level an Rho in GTP-gebundener, aktiver Form im Immunoblot mit Rho-spezifischem Antikörper nachgewiesen.

Im Rho-Assay bewirkt nur Rac1, nicht aber Rac2 oder Rac3 die Inaktivierung von Rho bei gleichzeitiger Transfektion mit DH/PH.

3.8 Interaktion von Smad4 und Rac3

Mit dem Hefe-2-Hybrid-System wurde in Kooperation mit Dr. S. Hahn (Ruhr-Universität Bochum) die Interaktion von Rac3 mit dem Co-Smad Smad4 nachgewiesen.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurden Immunpräzipitationen nach transients DEAE-Dextran-Transfektion von Cos7-Zellen mit Smad4 Wildtyp mit HA-tag und der dominant aktiven Mutante Rac3 (G12V) mit Flag-tag durchgeführt. Die Immunpräzipitation aus den Lysaten erfolgte mit an Agarose gebundenem α Flag-Antikörper, und daran gebundene Proteine wurden nach einem Western Blot im Immunoblot mit für die tags spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abb. 3.22).

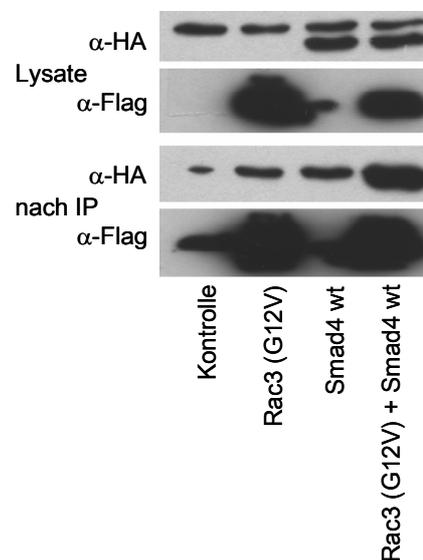


Abb. 3.22: Immunpräzipitation zum Nachweis der Bindung von Smad4 an Rac3. Cos7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden (Smad4 wt mit HA-tag und Rac3 (G12V) mit Flag-tag), transient transfiziert. Aus den Lysaten wurde mittels α Flag-Agarose Rac3 (G12V) präzipitiert und nach einem Western Blot im Immunoblot mittels eines α HA-Antikörpers die Bindung von Smad4 an Rac3 nachgewiesen. Die obere Bande in den Lysaten im Immunoblot gegen den HA-tag ist unspezifisch.

Das Ergebnis der Immunpräzipitation stützt die Daten aus dem Hefe-2-Hybrid-System, da Smad4 mit dominant aktivem Rac3 präzipitierbar ist. Die schwachen Banden, die im α HA-Immunoblot nach der Immunpräzipitation auch in der Kontrolle und bei den Einzeltransfektionen auftreten, kommen durch zu wenig stringentes Waschen und daher unspezifische Bindung an das Agarosematerial

und/oder den daran gebundenen α Flag-Antikörper zustande, und müssen daher von der in der Kotransfektion sichtbaren Bande abgezogen werden.

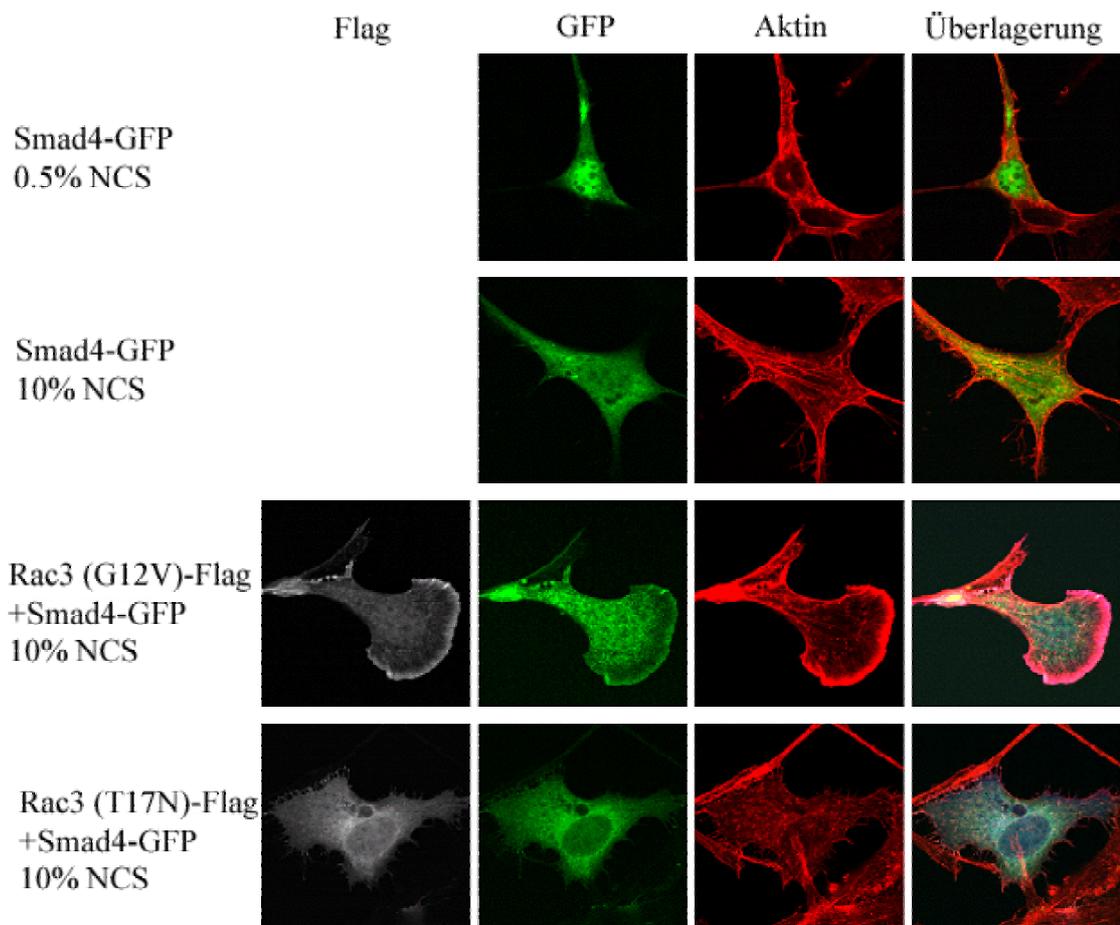


Abb. 3.23: Lokalisation von Smad4 in der Zelle. Konfokale Bilder von NIH3T3-Zellen nach transients Transfektion mit Smad4 (GFP-tag) allein in Vollmedium und in Hungermedium sowie nach Kotransfektion von Smad4 mit Rac3 (G12V) und Rac3 (T17N) (beide Flag-tag). Die transfizierten Konstrukte sind links und die angefärbten Proteine über den Bildern vermerkt. Der Flag-tag wurde mit einem α Flag-Antikörper und Cy5-Zweitantikörper sichtbar gemacht, und die Aktinzytoskelettstruktur wurde mit TRITC-markiertem Phalloidin angefärbt. Überlagerungen von grün und rot sind gelb dargestellt, Überlagerungen von weiß und rot in pink.

Zur Unterstützung der Daten aus dem Hefe-2-Hybrid-System und aus der Immunpräzipitation wurden morphologische Studien zur Lokalisation von Smad4 in

Vollmedium (10% NCS) und in Hungermedium (0,5% NCS), sowie zur Lokalisation von Smad4 bei der Kotransfektion mit konstitutiv aktivem Rac3 (G12V) und dominant inaktivem Rac3 (T17N) durchgeführt. NIH3T3-Zellen wurden mittels Lipofektion transient mit den gerade genannten Plasmiden transfiziert. Danach wurden sie fixiert, permeabilisiert, mit Antikörpern angefärbt, und die Präparate im konfokalen Lasermikroskop ausgewertet (Abb. 3.23).

Unter Serummangel-Bedingungen ist Smad4 in den NIH3T3-Fibroblasten hauptsächlich im Kern lokalisiert, während es in Anwesenheit von Serum hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist. Interessanterweise bewirkt die Koexpression von Smad4 mit konstitutiv aktivem Rac3, dass ein Großteil des Smad4 zur Membran rekrutiert wird, wo es mit Rac3 in den sich ausstülpenden Lamellipodien der transfizierten Zelle kolokalisiert ist. Diese Zellen scheinen gegenüber den nur mit Smad4 oder zusammen mit dominant negativem Rac3 transfizierten Zellen wesentlich beweglicher.

Im Folgenden sollte getestet werden, ob Smad2, Smad4 und die TGF β -Rezeptoren, die in der Signalkaskade oberhalb von Smad von Bedeutung sind, einen Einfluss auf die Aktivität von Rac und Rho haben. Um dies zu testen, wurden Cos7-Zellen mit der DEAE-Dextran-Methode transient mit Smad2, Smad4, der konstitutiv aktiven Mutante vom TGF β RI (T204D) und der dominant inaktiven Mutante von TGF β RII (K227R) transfiziert. Als Kontrollen, ob das *Pulldown*-System funktioniert, wurden transiente Transfektionen mit DH/PH und C1199 durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Lysate in einen Rho-Assay und einen Rac-Assay eingesetzt, und nach dem Western Blot ein Immunoblot mit kommerziell erhältlichen spezifischen Antikörpern gegen Rho und Rac durchgeführt (Abb.3.24).

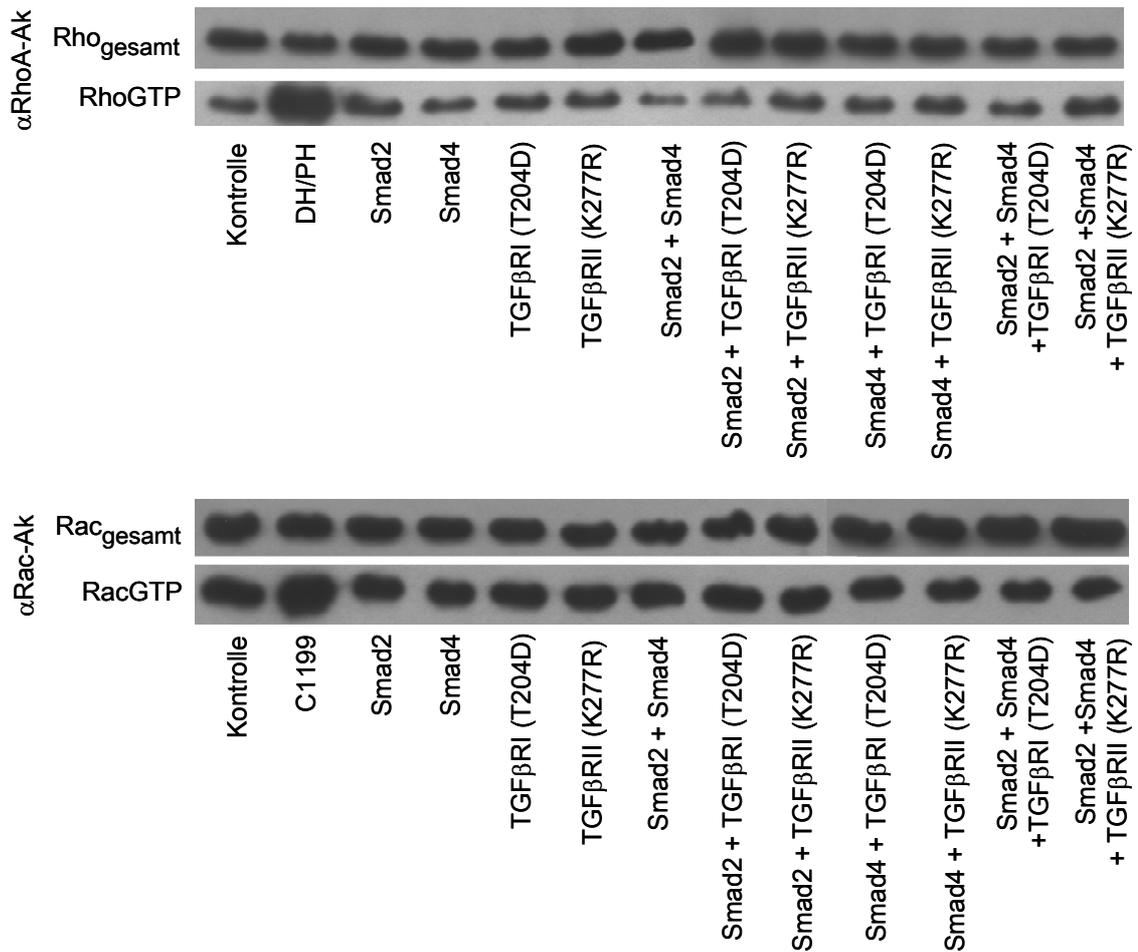


Abb.3.24: Einfluss von Smad2, Smad4 und TGFβ-Rezeptor auf die Aktivität von Rho und Rac. Cos7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden (C1199 von RacGEF Tiam1, DH/PH von PDZ-RhoGEF, Smad2, Smad4, TGFβRI (T204D) und TGFβRII (K227R)) transient transfiziert, ein Rho-Assay und ein Rac-Assay durchgeführt, und anschließend der Level an Rho und Rac in GTP-gebundener, aktiver Form im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Weder die Smad- noch die TGFβ-Rezeptor-Konstrukte allein oder in Kombination hatten einen Einfluss auf die Aktivität von Rac. Smad4 hatte in diesem Assay einen leicht inhibierenden Effekt auf die Aktivität von Rho. Im übrigen war in der Transfektion mit dem R-Smad Smad2 und der Koftransfektion von Smad2 mit TGFβ-Rezeptor mit der konstitutiv aktiven Mutation (T204D) eine Reduktion der Rho-Aktivität gegenüber der Kontrolle zu beobachten. Das gleiche gilt auch für die

Kotransfektion von Smad2, Smad4 und TGF β -Rezeptor mit der konstitutiv aktiven Mutation (T204D) im Rho-Assay. Diese Effekte sind jedoch nicht besonders deutlich. Die Transfektionen mit den GEFs zeigen, dass die Assays funktioniert haben.

4 Diskussion

Thema dieser Arbeit war die zellbiologische Untersuchung der Regulatoren der Rho-GTPasen. In diesem Rahmen sollte vor allem der Mechanismus der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung charakterisiert werden. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf den Unterschieden zwischen den Isoformen RhoA, RhoB und RhoC sowie Rac1, Rac2, Rac3 und Rac1b.

Für diese Aufgabenstellung waren verschiedene Techniken notwendig, die während dieser Arbeit erfolgreich etabliert wurden. Die transiente Transfektion von Cos7-Zellen erfolgte mittels der DEAE-Dextran-Methode, die aufgrund ihrer hohen Effizienz von über 95% transfizierten Zellen sehr gut für anschließende biochemische Studien geeignet ist [Levesque *et al.*, 1991]. Zum Nachweis der Interaktion zweier Proteine wurde die Immunpräzipitation etabliert, und zum Nachweis der Aktivierung der kleinen GTPasen Rho, Rac und Cdc42 der GTPase *Pulldown*-Assay mit der Rho-bindenden Domäne von Rhotekin für Rho, und der Rac- und Cdc42-bindenden Domäne von Pak für Rac und Cdc42. Die Spezifität der rekombinanten Effektor-domänen für die GTP-gebundene und damit aktive Form der GTPase, nicht aber für die GDP-gebundene inaktive Form, konnte mit rekombinanten Rho-, Rac- und Cdc42-Proteinen mit unterschiedlicher Nukleotidbeladung gezeigt werden. Für morphologische Studien sind NIH3T3-, MDCK- und HeLa-Zellen mit verschiedenen Lipofektionsmethoden transient transfiziert worden und nach Fixierung, Permeabilisierung und Immunfärbung am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop ausgewertet worden.

4.1 Spezifität verschiedener RhoGEFs für die Rho-Isoformen RhoA, RhoB und RhoC

Die Sequenzanalyse der Rho-Proteine zeigt, dass sich die Rho-Isoformen RhoA, RhoB und RhoC vor allem in ihren C-terminalen Regionen unterscheiden. Dieser Bereich ist in erster Linie wichtig für die Lokalisation der Proteine in der Zelle, hat aber keinen Einfluss auf die Bindung der Austauschfaktoren.

RhoA hat vor allem eine wichtige Rolle in der Reorganisation des Aktinzytoskeletts und der Ausbildung von Fokaladhäsionen und ist nahezu ubiquitär in allen Geweben nachweisbar [Ridley & Hall, 1992]. RhoB wird eine mögliche Rolle in der Neurogenese und beim Transport von zellulären Oberflächenrezeptoren zugeschrieben [Renaudin *et al.*, 1999; Prendergast, 2001], und es ist mit dem Mikrotubuli-Netzwerk assoziiert [Laplante *et al.*, 2001]. Frühere Studien haben zudem gezeigt, dass RhoB im Gegensatz zu RhoA und RhoC sowohl farnesyliert als auch geranylgeranyliert werden kann und mit späten Endosomen kolokalisiert ist [Adamson *et al.*, 1992a, 1992b]. Die biologische Bedeutung dieser Lokalisation ist unbekannt. RhoA und RhoB sind außerdem an der Regulation des endosomalen Transports beteiligt [Lamaze *et al.*, 1996; Leung *et al.*, 1999; Gampel *et al.*, 1999]. RhoC ist wichtig für die Tumorzellinvasion [Clark *et al.*, 2000].

Obwohl die hypervariable Region festlegt, in welchem Membrankompartiment jede Rho-Isoform lokalisiert ist, ist der Transport dorthin im Fall von RhoA durch Bindung an Rho-GDI reguliert, nicht aber im Fall von RhoB. Dies konnte durch *in vivo*-Fluoreszenzassays und Immunopräzipitationen für verschiedene Zelllinien gezeigt werden [Michaelson *et al.*, 2001].

Der Rho-Assay hat gezeigt, dass p115RhoGEF ein gleichermaßen aktiver GEF für alle drei Rho-Isoformen ist, während PDZ-RhoGEF RhoC weniger effektiv aktiviert

als RhoA und RhoB. p190RhoGEF zeigte im *Pulldown*-Assay-System keinerlei Austauschaktivität auf die drei untersuchten Rho-Isoformen. Die Expression in den Zellen konnte mittels Immunoblot gegen den HA-tag des Konstruktes zweifelsfrei nachgewiesen werden. Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass p190RhoGEF in intakten Zellen Austauschaktivität auf RhoA hat, und zu einer Reorganisation des Aktinzytoskelettes beiträgt [van Horck *et al.*, 2001]. In denselben Studien wurde jedoch keine GEF-Aktivität für isoliertes p190RhoGEF *in vitro* gezeigt. Es wurde vorgeschlagen, dass p190RhoGEF eine intrinsische, autoinhibitorische Domäne enthält, die möglicherweise durch die Interaktion mit einem unbekanntem Bindungspartner in der Zelle inaktiviert werden kann. Eventuell haben die verwendeten Cos7-Zellen diese unbekanntem Bindungspartner nicht oder nicht in ausreichender Menge um die Austauschaktivität zu aktivieren. Eine weitere Erklärung ist, dass ein möglicher extrazellulärer Faktor (Wachstumsfaktor, Zytokin, etc.) in dem verwendeten serumhaltigen Medium fehlte, um den Signalweg zur Aktivierung von p190RhoGEF anzuschalten.

p115RhoGEF und PDZ-RhoGEF werden durch Protein-Protein-Interaktion, nicht aber durch autoinhibitorische Sequenzen reguliert [Hart *et al.*, 1998; Kozasa *et al.*, 1998; Rümenapp *et al.*, 1999]. Durch Stimulation der Zellen, beispielsweise mit der Serumkomponente LPA, wird die aktivierte, GTP-gebundene $G\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins G13 freigesetzt, die an die N-terminale RGS-Domäne der GEFs bindet [Hart *et al.*, 1998; Kozasa *et al.*, 1998]. Die RGS-Domäne wirkt als ein GAP und stimuliert die GTPase-Reaktion von $G\alpha$ 13, wodurch dann die GEF-Funktion von p115RhoGEF und PDZ-RhoGEF aktiviert wird [Hart *et al.*, 1998; Kozasa *et al.*, 1998; Rümenapp *et al.*, 1999]. Es wurde deshalb postuliert, dass die RGS-Domäne dieser Proteine mit der DH-Domäne interagiert und dadurch die DH-vermittelte GEF-Aktivität steigert [Wells *et al.*, 2002]. Da die Interaktion mit $G\alpha$ 13 für PDZ-RhoGEF und p115RhoGEF gleichermaßen wichtig ist, ist dies jedoch keine Erklärung für die unterschiedliche GEF-Aktivität auf RhoC. Vielmehr wird für den beobachteten Unterschied eine unterschiedliche Lokalisation beider GEFs

nach der Aktivierung durch $G\alpha_{13}$ verantwortlich sein. Für p115RhoGEF ist beschrieben, dass die Bindung von $G\alpha_{13}$ zu einer Rekrutierung aus dem Zytoplasma an die Plasmamembran führt [Bhattacharyya & Wedegaertner, 2000]. Die PDZ-Domäne, die nur in PDZ-RhoGEF, nicht aber in p115RhoGEF vorhanden ist, spielt ebenfalls eine Rolle bei der intrazellulären Lokalisation und vermutlich ist die geringere GEF-Aktivität von PDZ-RhoGEF auf RhoC auf die unterschiedliche Lokalisation beider Proteine an der Plasmamembran der Zelle zurückzuführen. Möglicherweise sind RhoC und PDZ-RhoGEF in anderen Zelltypen kolokalisiert, oder PDZ-RhoGEF und p115RhoGEF werden unterschiedlich aktiviert, so dass in anderen Zelltypen eventuell eine volle Aktivierung von RhoC durch PDZ-RhoGEF möglich ist.

4.2 Aktivierung der Rac-Isoformen Rac1, Rac2 und Rac3 durch den RacGEF Tiam1

Ähnlich wie bei den Rho-Isoformen unterscheiden sich die Rac-Isoformen Rac1, Rac2 und Rac3 in erster Linie in ihren C-terminalen Regionen, nicht aber in Bereichen, die für die Effektorinteraktion von Bedeutung sind. Auch im Fall der Rac-Isoformen liegt also der Hauptunterschied in der unterschiedlichen Lokalisation der Isoformen. Außerdem ist der C-Terminus für die Bindung von spezifischen zellulären Regulatoren von Bedeutung.

Rac1 und Rac3 sind in nahezu allen Geweben nachweisbar, während Rac2 spezifisch für Gewebe hämatopoetischer Abstammung ist [Didsbury *et al.*, 1989; Haataja *et al.*, 1997; Matos *et al.*, 2000].

Bisher wurde gezeigt, dass Tiam1 ein GEF für die Rac-Isoform Rac1 ist [Buchanan *et al.*, 2000; Fleming *et al.*, 2000]. Welche Rolle Tiam1 bei den anderen Rac-

Isoformen spielt, ist nicht bekannt. Frühere Experimente haben gezeigt, dass Tiam1 durch Phosphorylierung aktiviert werden kann [Fleming *et al.*, 1999], und dass die Bindung von Liganden an die PH-Domäne möglicherweise die Austauschaktivität reguliert [Crompton *et al.*, 2000].

Im Rac-Assay hat der RacGEF Tiam1 Rac1 und Rac2 deutlich aktiviert, nicht aber Rac3, wobei Rac3 aus nicht geklärten Gründen bereits ohne die Aktivierung durch Tiam1 in hohem Maß in der GTP-gebundenen Form vorlag. Daher ist es schwer zu beurteilen, ob Tiam1 nicht nur deshalb keinen Effekt auf Rac3 hatte, weil Rac3 bereits komplett in der GTP-gebundenen Form in der Zelle vorlag. Rac3 und Tiam1 sind in Lamellipodien kolokalisiert, wie morphologische Studien mit konfokaler Lasermikroskopie gezeigt haben. Also kommt die unterschiedliche Lokalisation in der Plasmamembran als Erklärung für die unterschiedliche Aktivierung nicht in Frage. Für die Translokation zur Plasmamembran benötigt Tiam1 das Protein-Fragment aus der N-terminalen PH-Domäne, der CC-Region und der EX-Domäne [Stam *et al.*, 1997]. Kinetische *in vitro*-Studien mit der DH/PH-Domäne von Tiam1 haben ergeben, dass Tiam1 die Nukleotidaustauschreaktion von Rac2 zehnfach schneller beschleunigt, als die von Rac1 und Rac3, was darauf hindeutet, dass Tiam1 in erster Linie ein Rac2-spezifischer GEF ist [Haeusler, L.C., 2001]. Dieses Ergebnis haben die *Pulldown*-Experimente nicht bestätigt, da die Aktivierung von Rac1 und Rac2 durch das C1199-Konstrukt von Tiam1, das die zur Bindung des Liganden und zur Translokation zur Plasmamembran notwendigen Domänen enthält, annähernd gleich war.

Zur Klärung der morphologischen Unterschiede und der Unterschiede in der subzellulären Lokalisation zwischen den Rac-Isoformen Rac1, Rac2 und Rac3 wurden transiente Transfektionsexperimente mit NIH3T3-Zellen durchgeführt und am konfokalen Lasermikroskop ausgewertet. Erwartet wurde hierbei die für Rac beschriebene typische Lamellipodienstruktur der Zellen [Nobes & Hall, 1995]. Dabei stellte sich heraus, dass konstitutiv aktives Rac2 im Gegensatz zu konstitutiv

aktivem Rac1 nicht die Rac-typischen Lamellipodien in den Zellen induziert, die mit F-Aktin kolokalisiert sind. Konstitutiv aktives Rac3 zeigte den stärksten Effekt auf das Zytoskelett mit deutlich hervortretenden, großen Lamellipodien. Möglicherweise sind diese Unterschiede auf die Interaktion mit verschiedenen Rac-Effektoren zurückzuführen. Im übrigen stehen diese Beobachtungen der unterschiedlichen Morphologie der Rac-Isoformen Rac1 und Rac2 im Einklang mit Ergebnissen zur Funktion von Rac2 in der Zelle. Während Rac1 in der Zelle eine wichtige Bedeutung bei der Reorganisation des Aktinzytoskeletts und der Zellmigration zukommt [Hall, 1998, Matos *et al.*, 2000], spielt Rac2 eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Immunantwort, indem sie die NADPH-Oxidase-Aktivität in Phagozyten und anderen für das Immunsystem wichtigen Zellen reguliert [Diebold & Bokoch, 2001]. NADPH-Oxidase erzeugt ROS (*reactive oxygen species*) in den Zellen, die am Schutz der Zellen vor Krankheitserregern und der Inflammation beteiligt sind, aber auch bei der intrazellulären Signalweiterleitung und der Transkription eine Rolle spielen [Finkel, 1999; Babior, 1999]. Rac1 ist außerdem an der Regulation des endosomalen Transportes beteiligt [Lamaze *et al.*, 1996; Jou *et al.*, 2000]. Für Rac1 und Rac2 konnte gezeigt werden, dass der Transport in das durch die hypervariable Region festgelegte Membrankompartiment durch Bindung an RhoGDI reguliert wird [Michaelson *et al.*, 2001].

Andere Studien haben gezeigt, dass Rac3 im Gegensatz zu Rac1 sowohl in der GTP- als auch in der GDP-Form an der Plasmamembran lokalisiert ist, und eine wichtige Rolle bei der Proliferation von Brustkrebszellen hat. Rac3 ist in diesen Zellen anhaltend aktiviert und wirkt mit dem Effektor Pak auf die DNA-Synthese ein [Mira *et al.*, 2000].

4.3 Unterschiede in der Aktivierung von Rac1 im Vergleich zu Rac1b

Rac1b wurde zuerst als eine neue Rac-Isoform in Brustkrebs- und Darmkrebs-Gewebe beschrieben, die eine Insertion von 19 Aminosäuren nahe der SwitchII-Region zwischen den Aminosäuren 75 und 76 aufweist, und durch alternatives *Splicing* entsteht [Jordan *et al.*, 1999; Schnelzer *et al.*, 2000]. Um den Einfluss der 19 Aminosäuren-Insertion auf die zelluläre Aktivität von Rac1 zu untersuchen, wurden Rac-Assays mit transient transfizierten Cos7-Zellen unter normalen Mediumbedingungen und unter Serummangelbedingungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass Rac1b Wildtyp unter normalen Mediumbedingungen (10% FCS) hauptsächlich in der aktiven, GTP-gebundenen Form vorliegt. Interessanterweise lag der Level an aktivem, GTP-gebundenem Rac1b Wildtyp unter Serummangelbedingungen sogar höher, als im Fall von konstitutiv aktivem Rac1 (G12V). Diese Daten stehen im Einklang mit biochemischen Messungen, die zeigen, dass Rac1b *in vitro* eine stark erhöhte GEF-unabhängige intrinsische Dissoziationsrate besitzt [Haeusler, L.C., persönliche Mitteilung]. Dies erklärt, dass unter Serummangelbedingungen Rac1b im Gegensatz zu Rac1 keine extrazellulären Signale benötigt, und dass die Aktivierung von Rac1b unter physiologisch hoher GTP-Konzentration ohne GEF-Aktivität stattfindet.

Da Rac1b in epithelielem Gewebe entdeckt wurde, wurden für morphologische Studien zur Lokalisation von Rac1b Wildtyp im Vergleich mit Rac1 Wildtyp und Rac1 mit der konstitutiv aktiven Mutation (G12V) unter normalen Mediumbedingungen und unter Serummangelbedingungen MDCK-Zellen transient transfiziert. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Lasermikroskop. Es zeigte sich, dass Rac1b gegenüber dem membranassoziierten Rac1 unabhängig von den Mediumbedingungen diffus in der gesamten Zelle verteilt vorliegt. Dies steht im Einklang mit den biochemischen *in vitro*-Daten, denn wenn Rac1b unabhängig von

der Aktivierung durch GEFs ist, ist auch keine Membranlokalisation zur Aktivierung erforderlich. Bei konstitutiv aktivem Rac1 (G12V) ist gegenüber Rac1 Wildtyp in Vollmedium eine verstärkte Lokalisation an den Zellkontakten und eine deutliche Kolo­kalisierung mit dem Aktinzytoskelett zu beobachten, die unter Serum­mangelbedingungen deutlich abnimmt. Das lässt darauf schließen, dass für die Signalweiterleitung im Falle von Rac1 auch bei einer konstitutiv aktiven Mutation Faktoren aus dem Medium nötig sind, für Rac1b Wildtyp jedoch nicht.

4.4 Mechanismus der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung

Die verschiedenen Rho-GTPasen wirken gemeinsam auf die Organisation des Aktinzytoskeletts in der Zelle ein. Dazu ist die Aktivierung von Rezeptoren durch Wachstumsfaktoren notwendig. In den meisten älteren Studien wurde die Aktivität der GTPasen Rho, Rac und Cdc42 anhand spezifischer Zytoskelettveränderungen in der Zelle bestimmt. Während Stressfasern die Aktivität von Rho anzeigen, sind Lamellipodien typisch für aktives Rac und Zellen mit aktivem Cdc42 zeigen Filopodien [Ridley & Hall 1992; Nobes & Hall 1995]. Durch biochemische GTPase *Pulldown*-Assays konnte mit Hilfe der Effektor­domäne C21 des Rho-Effektors Rhotekin und des CRIB-Motivs des Rac- und Cdc42-Effektors Pak1 gleichzeitig spezifisch der Aktivierungsstatus der GTPasen Rho, Rac und Cdc42 aus lysierten Zellen bestimmt werden [Sander *et al.*, 1998; Sander *et al.*, 1999; van Leeuwen *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 1999]. Dies ermöglichte Rückschlüsse auf die Regulation der Rac- und Rho-abhängigen Signalwege. Wie *Pulldown*-Experimente gezeigt haben, bewirken konstitutiv aktives Cdc42 und Rac wie auch der Wachstumsfaktor PDGF (*platelet derived growth factor*), der Rac aktiviert, die Inaktivierung des endogenen Rho-Proteins in NIH3T3-Fibroblasten [Sander *et al.*, 1999]. Während Rac-Aktivierung zur Inaktivierung von Rho führt, hat die LPA-vermittelte oder

anhaltende Aktivierung von Rho keinen Effekt auf die Aktivität von Rac [Sander *et al.*, 1999]. Ähnliche Studien in MDCK-Zellen und anderen Zelllinien bestätigten, dass die Inaktivierung von Rho durch Rac ein generelles Phänomen ist, das in verschiedenen Zelltypen auftritt [Zondag *et al.*, 2000; Noren *et al.*, 2000; Noren *et al.*, 2001]. Rac- und Rho-Aktivierung kann folglich durch rezeptorvermittelte Signale wie auch Signale von Rac zu Rho reguliert werden [Sander *et al.*, 1999].

Der Mechanismus der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung und die daran beteiligten Signalmoleküle waren bisher nicht bekannt. Da die Rac-induzierte Rho-Inaktivierung einer strengen Regulation unterliegt, handelt es sich wahrscheinlich um einen Prozess auf Proteinebene. Rho-spezifische GTPase-aktivierende Proteine sind geeignete Kandidaten, die Rho inaktivieren, und in Folge einer Rac-induzierten Signalübertragung aktiviert und zur Membran rekrutiert werden können. Daher lag der Schwerpunkt der vorgelegten Arbeit auf der Rolle von p190RhoGAP in diesem Signalweg.

p190RhoGAP, ein besonders gut untersuchtes RhoGAP, spielt eine wichtige Rolle bei der Rho-vermittelten Reorganisation des Aktinzytoskeletts [Ridley *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1995]. In Swiss3T3-Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass p190RhoGAP für die Mehrheit der RhoGAP-Aktivitäten verantwortlich ist [Vincent & Settleman, 1999]. Die Aktivität von p190RhoGAP wird durch Phosphorylierung von zwei Tyrosinen in der Mitteldomäne durch aktivierte Src-Kinase gesteuert (Y1087 und Y1105) [Roof *et al.*, 1998; Hu & Settleman, 1997]. *In vivo* ist die Phosphorylierung von Y1105 von größerer Bedeutung. Nach erfolgter Phosphorylierung binden die SH2-Domänen von p120RasGAP an Tyrosin-phosphoryliertes p190RhoGAP [McGlade *et al.*, 1993; Bryant *et al.*, 1995; Hu & Settleman, 1997; Roof *et al.*, 1998]. Der Effekt des Komplexes auf die p190RhoGAP-Aktivität war lange unklar, jedoch wurde vermutet, dass der N-Terminus von p120RasGAP Rho über die Kontrolle der Rho-GAP-Aktivität reguliert [McGlade *et al.*, 1993]. Neuere Studien haben gezeigt, dass die Bildung

des p190RhoGAP-p120RasGAP-Komplexes effektiv die GAP-Aktivität von p190RhoGAP aktiviert, was sich im Abbau von Stressfasern und der Verringerung fokaler Kontakte zeigt [Haskell *et al.*, 2001a]. Ein von Src-Kinase unabhängiges Signal, das von Wachstumsfaktorrezeptoren ausgeht, könnte ebenfalls nötig sein für die volle Aktivierung von p190RhoGAP [Haskell *et al.*, 2001a].

Generell ist die endogene Aktivität von Rho in Zellen relativ gering. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Basallevel an endogenem GTP-gebundenem und damit aktivem Rac in der Zelle ausreicht, um Rho zu inaktivieren. Deshalb war zunächst eine Aktivierung von Rho nötig, um im Folgenden die Inaktivierung im *Pulldown*-Assay-System nachweisen zu können. Zunächst wurde daher p115RhoGEF zur Aktivierung von Rho ausgewählt, der sich in vorherigen Experimenten bereits als sehr guter GEF für alle drei Rho-Isoformen erwiesen hatte. Erwartungsgemäß hatte p115RhoGEF im *Pulldown*-Assay keinen Einfluss auf die Aktivität auf Rac, jedoch verhinderte er die über den Rac-GEF Tiam1 und Rac induzierte Rho-Inaktivierung. Offensichtlich ist das Rho-aktivierende Signal von p115RhoGEF dominant gegenüber dem Rho-inaktivierenden Signal von dem Rac-GEF Tiam1. Somit eignete sich p115RhoGEF nicht für Studien zur Rho-Inaktivierung.

Dagegen zeigte die DH/PH-Domäne von PDZ-RhoGEF wie auch das Volllängenkonstrukt die gewünschte Rho-Aktivierung, die jedoch in Gegenwart des C1199-Konstruktes des Rac-GEFs Tiam1 inaktiviert wurde. Diese Resultate zeigen, dass die Signalübertragung von Tiam1 und Rac zur Rho-Inaktivierung gegenüber dem PDZ-RhoGEF-Signal dominant ist. Deshalb wurde die DH/PH-Domäne von PDZ-RhoGEF im folgenden für die Experimente zur Rac-induzierten Rho-Inaktivierung eingesetzt.

Die zentrale Rolle von p190RhoGAP in der Vermittlung der Inaktivierung von Rho durch Rac konnte durch die Unterbrechung des Signalweges an drei Punkten

gezeigt werden: erstens durch die kompetitive Inhibition der p190RhoGAP-p120RasGAP-Komplexbildung mit Hilfe einer Überexpression der SH2-Domänen von p120RasGAP, zweitens mittels Dephosphorylierung von p190RhoGAP durch LMW-PTP und drittens durch die Inhibition der Phosphorylierung von p190RhoGAP durch Src-Kinase.

4.4.1 Inhibition der p190RhoGAP-p120RasGAP-Komplexbildung

Es ist sehr wahrscheinlich, dass p120RasGAP durch die Interaktion mit p190RhoGAP über die SH2-Domänen an der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung beteiligt ist. Daher wurde in dieser Arbeit zunächst mit Hilfe der Immunpräzipitation nachgewiesen, dass das verwendete Konstrukt der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP spezifisch an phosphoryliertes p190RhoGAP bindet. Konstitutiv aktive virale Src-Kinase konnte dabei erwartungsgemäß die Menge des präzipitierten phosphorylierten p190RhoGAPs erheblich steigern. Es konnte jedoch auch ohne zusätzliche Aktivierung durch eine aktive Kinase in geringem Maß die Präzipitation von phosphoryliertem p190RhoGAP nachgewiesen werden. Diese Beobachtung stützt die oben beschriebene Vermutung, dass an der Aktivierung von p190RhoGAP auch andere Signale in der Zelle beteiligt sind [Haskell *et al.*, 2001a].

Im Rho-Assay konnte die N-terminale SH2-Domäne von p120RasGAP bei Kotransfektion mit der DH/PH-Domäne des PDZ-RhoGEFs und dem C1199-Konstrukt des RacGEFs Tiam1 die über den RacGEF und Rac induzierte Rho-Inaktivierung blockieren (Abb. 4.1). Dies zeigt zum einen, dass p190RhoGAP zusammen mit p120RasGAP tatsächlich an der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung beteiligt ist, und zum anderen, dass die N-terminale SH2-Domäne von p120RasGAP allein nicht in der Lage ist, im Komplex mit p190RhoGAP die Inaktivierung von Rho zu vermitteln. Offensichtlich sind zur Funktionalität des p190RhoGAP-p120RasGAP-Komplexes noch weitere Domänen von p120RasGAP

erforderlich. Die N-terminale SH2-Domäne von p120RasGAP bindet an phosphoryliertes p190RhoGAP, kann es aber nicht zur Membran rekrutieren. Für die Rekrutierung des aktiven p190RhoGAP-p120RasGAP-Komplexes zur Membran können verschiedene funktionelle Domänen von p120RasGAP verantwortlich sein. Es könnte beispielsweise die Interaktion der RasGAP-Domäne mit RasGTP [Kulkarni *et al.*, 2000; Moran *et al.*, 1991], oder die Bindung einer der SH2-Domänen von p120RasGAP an Tyrosin-phosphorylierte Wachstumsfaktorrezeptoren wie EGF- oder PDGF-Rezeptor beteiligt sein [Kazlauskas *et al.*, 1990; Koch *et al.*, 1991]. Auch die Interaktion von p120RasGAP mit anderen Proteinen über die SH3-Domäne, die an prolinreiche Sequenzen bindet, die PH-Domäne, die Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen eingeht, oder die CaLB-Domäne (C2), die Kalzium-abhängig Lipide bindet, ist eine Möglichkeit [Soncini *et al.*, 2001; Koehler & Moran, 2001; Drugan *et al.*, 2000; Chow *et al.*, 1999].

Auf die Aktivität von Rac hat die N-terminale Domäne von p120RasGAP keinen Einfluss, auch nicht, wenn die Zellen durch Expression des C1199-Konstrukts des RacGEFs Tiam1 eine erhöhte Rac-Aktivität aufweisen. Dies steht im Einklang mit früheren Studien, die zeigen, dass p190RhoGAP *in vivo* spezifisch für Rho ist [Ridley *et al.*, 1993].

Mit der weiter C-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP, die nicht vollständig identisch mit der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP ist, wurden die gleichen Ergebnisse erzielt.

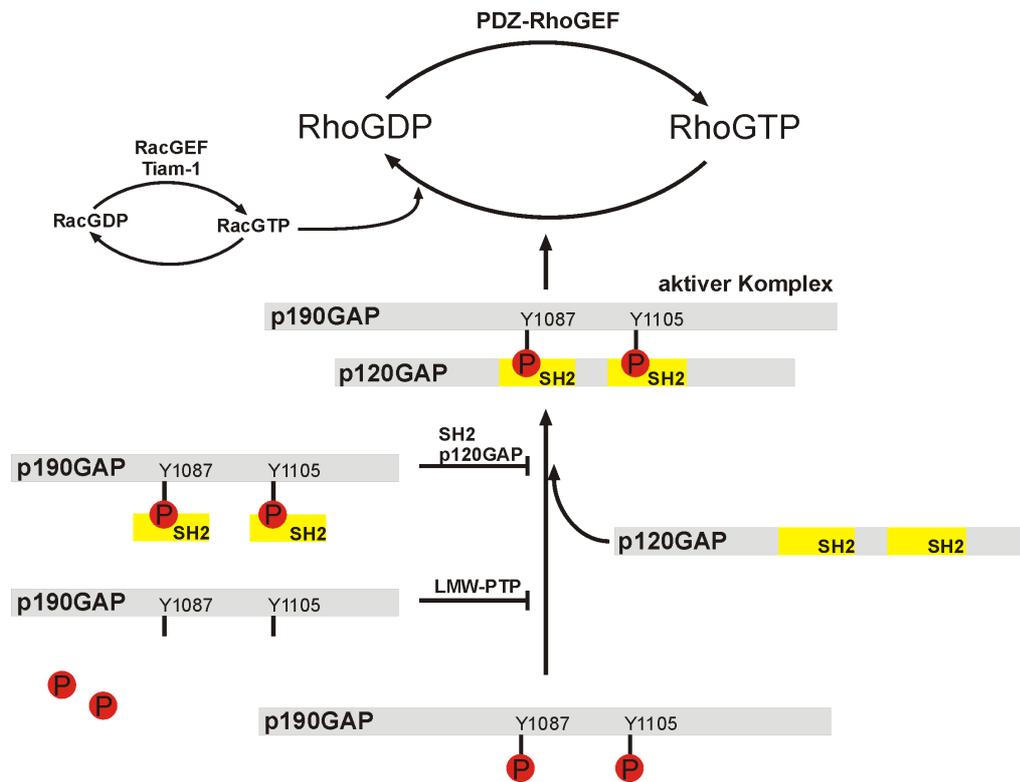


Abb. 4.1: Modell der Inhibition der Rac-induzierten Inaktivierung von Rho durch die N-terminale SH2-Domäne von p120RasGAP und LMW-PTP. p120RasGAP bindet mit seinen SH2-Domänen an phosphoryliertes p190RhoGAP und bildet so den zur Inaktivierung von Rho nötigen Komplex. Überexpression der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP führt ebenso zu einer Blockierung der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung wie Überexpression der Phosphatase LMW-PTP, die p190RhoGAP dephosphoryliert.

Morphologische Studien am konfokalen Lasermikroskop nach transienter Transfektion von HeLa-Zellen mit der DH/PH-Domäne von PDZ-RhoGEF, dem C1199-Konstrukt des RacGEFs Tiam1 und der N-terminalen Domäne von p120RasGAP haben gezeigt, dass die DH/PH-Domäne von PDZ-RhoGEF zu der typischen Morphologie Rho-aktivierter Zellen mit Stressfasern, leicht gestreckter Zellform und verstärkter Matrix-Adhäsion führt [Ridley & Hall, 1992; Nobes & Hall 1995]. Durch Expression des C1199-Konstruktes des RacGEFs Tiam1 wurden die Zellen beweglicher, rundeten sich ab und wiesen an der Oberfläche die für Rac-

aktivierte Zellen typischen *ruffles* auf. Außerdem war eine verstärkte Adhäsion zu benachbarten Zellen zu beobachten, die darauf hinweist, dass die in den meisten Epithel-Zelllinien verlorengegangene Zell-Zell-Adhäsion durch Tiam1 wieder hergestellt wurde. Sowohl die beobachtete Ausbildung von *ruffles* [Ridley *et al.*, 1992] als auch die Herstellung der Zelladhäsion stehen im Einklang mit früheren Studien, die zeigen, dass in MDCK-Zellen Tiam1 und konstitutiv aktives Rac die E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion fördern. Die Zelladhäsion ist dabei abhängig von PI3-Kinase (*phosphatidylinositol 3-kinase*), die im Signalweg oberhalb von Tiam1 und Rac agiert [Sander *et al.*, 1998]. Die N-terminale SH2-Domäne von p120RasGAP liegt aufgrund ihrer geringen Größe vor allem im Zellkern vor und verursacht in den Zellen ausgeprägte Stressfasern, die stark auf eine Aktivierung von Rho hinweisen. Dies ist im Vergleich zu früheren Studien eher überraschend. Es wurde gezeigt, dass die N-terminale Domäne von p120RasGAP, die beide SH2- und die SH3-Domänen umfasst, in Rat-2-Zellen die Aktin-Stressfasern zerstört und fokale Kontakte reduziert [McGlade *et al.*, 1993]. Zu erklären ist dieser Unterschied in den Effekten auf das Aktinzytoskelett durch die unterschiedliche Wahl der Konstrukte. Die SH3-Domäne, die in der erwähnten Studie als Tandem mit den beiden SH2-Domänen von p120RasGAP eingesetzt wurde, vermittelt nämlich bei einer großen Anzahl von Proteinen eine hochaffine Interaktion mit prolinreichen Sequenzen [Ren *et al.*, 1993]. Spätere Studien haben außerdem gezeigt, dass p190RhoGAP im RasGAP-Signalkomplex die Funktion hat, eine Konformationsänderung von p120RasGAP auszulösen, die die normalerweise unzugängliche Bindungs-Oberfläche der SH3-Domäne für weitere Protein-Interaktionen zugänglich macht [Hu & Settleman, 1997]. Die in der früheren Studie beobachtete Änderung des Aktinzytoskeletts weg vom Rho-Phänotyp ist also auf weitere Interaktionen mit anderen Proteinen über die SH3-Domäne zurückzuführen, während der im Rahmen dieser Arbeit von der SH2N-Domäne von p120RasGAP induzierte Rho-Phänotyp darauf zurückzuführen ist, dass die N-terminale SH2-Domäne die Bindung von in der Zelle enthaltenem p120RasGAP an p190RhoGAP verhindert und damit die Inaktivierung von Rho blockiert. Diese Erklärung wird

durch die Beobachtung gestützt, dass im Rho-Assay die alleinige Expression der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP die Aktivität von Rho gegenüber der Kontrolle leicht erhöht. Auch das Ergebnis der Kotransfektion der DH/PH-Domäne von PDZ-RhoGEF, des C1199-Konstrukts des Rac-GEFs Tiam1 und der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP in HeLa-Zellen, stimmt mit den Beobachtungen im Rho-Assay überein, dass die Rac-induzierte Rho-Inaktivierung durch die N-terminale SH2-Domäne von p120RasGAP blockiert wird. Die Zellen weisen deutliche Rho-typische Stressfasern auf und sind auch morphologisch eher den Zellen mit hoher Rho-Aktivität zuzuordnen. Die untere linke der drei gezeigten Zellen in der Kotransfektion (Abb. 3.11) ist offensichtlich nicht mit der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP transfiziert, da sie keine Stressfasern, wohl aber *ruffles*, aufweist, was auf die Aktivität von Rac hindeutet. Außerdem weist sie die bereits für die Zellen nach Transfektion mit dem C1199-Konstrukt des Rac-GEFs Tiam1 beschriebene gesteigerte Adhäsion zur Nachbarzelle auf.

4.4.2 Dephosphorylierung von p190RhoGAP durch LMW-PTP

Die Phosphorylierung von p190RhoGAP ist ein wichtiger Schritt zur Inaktivierung von Rho durch dieses GAP. Die Phosphatase LMW-PTP wurde bereits in früheren Studien als ein zentraler Bestandteil der PDGF-Rezeptor-Signalwege beschrieben, der die Funktion von p190RhoGAP negativ reguliert [Bucciantini *et al.*, 1999; Chiarugi *et al.*, 2000].

Rho-GTPase *Pulldown*-Experimente mit gleichzeitiger Transfektion der DH/PH-Domäne von PDZ-RhoGEF, des C1199-Konstrukts des RacGEFs Tiam1 und LMW-PTP haben gezeigt, dass Rho tatsächlich nicht inaktiviert wird. LMW-PTP hat also erwartungsgemäß die über Rac-GEF und Rac induzierte Rho-Inaktivierung blockiert (Abb. 4.1) und hatte keinen Einfluss auf die durch die DH/PH-Domäne von PDZ-RhoGEF gesteigerte Rho-Aktivität. Somit konnte der zur Rho-Inaktivierung notwendige Komplex von p190RhoGAP mit p120RasGAP nicht

gebildet werden. Folglich ist die Phosphorylierung von p190RhoGAP ebenfalls entscheidend für die Rac-induzierte Rho-Inaktivierung.

4.4.3 Phosphorylierung von p190RhoGAP durch Src-Kinase

Wie bereits beschrieben führt die Aktivierung von Src-Kinase in Zellen zur Phosphorylierung von zwei Tyrosinen in der Mitteldomäne von p190RhoGAP. Src-Kinase vermittelt dabei den Transfer des γ -Phosphats von ATP an das Substratprotein [Roof *et al.*, 1998; Hu & Settleman, 1997]. p190RhoGAP wurde bereits als Substrat von c-Src identifiziert [Chang *et al.*, 1993; 1995]. Die SH2-Domänen von p120RasGAP binden an phosphoryliertes p190RhoGAP. Dies führt zur Inaktivierung von Rho, was sich im Abbau der Stressfasern und der Verringerung fokaler Kontakte morphologisch äußert [Haskell *et al.*, 2001a]. Des weiteren wird vermutet, dass ein Src-Kinase-unabhängiges Signal über Wachstumsfaktorrezeptoren zusätzlich für die volle Aktivierung von p190RhoGAP notwendig ist [Haskell *et al.*, 2001a]. GTPase *Pulldown*-Assays sollten zeigen, ob Src-Kinase auch bei der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung eine zentrale Rolle spielt. Da die über RacGEF und Rac induzierte Rho-Inaktivierung durch den Src-Kinase-spezifischen Inhibitor PP1 im Rho-Assay vollständig blockiert wurde, ist Src-Kinase auf jeden Fall an der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung über phosphoryliertes p190RhoGAP beteiligt (Abb. 4.2).

c-Src ist die zelluläre, nicht-transformierende Form von v-Src, einem Onkoprotein, das vom *Rous Sarcoma Virus*, einem Retrovirus aus dem Huhn, kodiert wird [Thomas & Brugge, 1997; Brown & Cooper, 1996]. c-Src ist an der Plasmamembran, den Membranen von Endosomen und sekretorischen Vesikeln und am Aktinzytoskelett lokalisiert [Parsons & Creutz, 1986; Kaplan *et al.*, 1992; Resh, 1994]. Die Membranlokalisation von c-Src ist notwendig für die Weiterleitung von Wachstumsfaktor-Rezeptor-vermittelten Signalen in normalen Zellen [Wilson *et al.*, 1989] und im Fall von v-Src für die maligne Transformation von Zellen [Parsons & Weber, 1989]. c-Src kann zur Aktivierung an einem Tyrosin in seiner nahe dem C-

Terminus gelegenen Kinase-Domäne phosphoryliert werden [Hanks *et al.*, 1988], jedoch ist diese Phosphorylierung nicht zwingend erforderlich für die katalytische Aktivität [Thomas & Brugge, 1997; Brown & Cooper, 1996]. v-Src fehlt gegenüber c-Src die C-terminale regulatorische Domäne, was zu einem konstitutiv aktiven Protein führt, das Zielproteine in unregulierter Weise phosphoryliert und dementsprechend zelluläre Transformation und Onkogenese verursacht [Cartwright *et al.*, 1987; Kmiecik & Shalloway, 1987; Piwnica-Worms *et al.*, 1987; Reynolds *et al.*, 1987]. Die Aktivierung von c-Src erfolgt durch Wachstumsfaktorsignale. Dabei wird entweder das C-terminale Tyrosin in der regulatorischen Domäne dephosphoryliert oder Signalproteine binden an die N-terminalen Domänen des Proteins oder eine Kombination aus beidem erfolgt. Durch erneute Phosphorylierung des Tyrosins in der C-terminalen regulatorischen Domäne oder durch Ablösen der Signalproteine wird die Aktivierung gestoppt [Haskell *et al.*, 2001b].

Im Rho-Assay hat virale Src-Kinase im Gegensatz zu zellulärer Src-Kinase den Basalgehalt an aktivem, GTP-gebundenem, Rho in der Zelle reduziert. Außerdem hat virale Src-Kinase die Aktivierung von Rho durch die DH/PH-Domäne von PDZ-RhoGEF sogar stärker blockiert, als dies durch das C1199-Konstrukt des Rac-GEFs Tiam1 der Fall war, während zelluläre Src-Kinase nur einen sehr schwachen blockierenden Effekt hatte. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den bereits oben erwähnten Erkenntnissen zur Regulation der Src-Kinasen. Während virale Src-Kinase konstitutiv aktiv ist, benötigt zelluläre Src-Kinase zusätzliche Signale zur Aktivierung, die in den getesteten Zellen nicht in ausreichender Menge zur vollen Aktivierung zur Verfügung standen, oder es erfolgte die Phosphorylierung in der C-terminalen regulatorischen Domäne, die die zelluläre Src-Kinase inhibiert. Des Weiteren haben neuere Studien gezeigt, dass die Phosphorylierung von p190RhoGAP durch zelluläre Src-Kinase notwendig, aber nicht allein ausreichend ist um morphologische Effekte wie den Abbau von Aktinstressfasern auszulösen. Zusätzlich benötigt die Zelle ein Signal vom EGF-Rezeptor [Haskell *et al.*, 2001a].

Interessanterweise blockierte die N-terminale SH2-Domäne von p120RasGAP die durch virale Src-Kinase ausgelöste Inaktivierung von Rho nicht. Dies lässt vermuten, dass an der Inaktivierung von Rho über den Rac- Signalweg zwar, wie die vorangegangenen Experimente gezeigt haben, Src-Kinase zur Phosphorylierung von p190RhoGAP beteiligt ist, Src-Kinase aber offensichtlich Rho auch noch auf einem anderen, von p190RhoGAP unabhängigen Signalweg inaktivieren kann (Abb. 4.2).

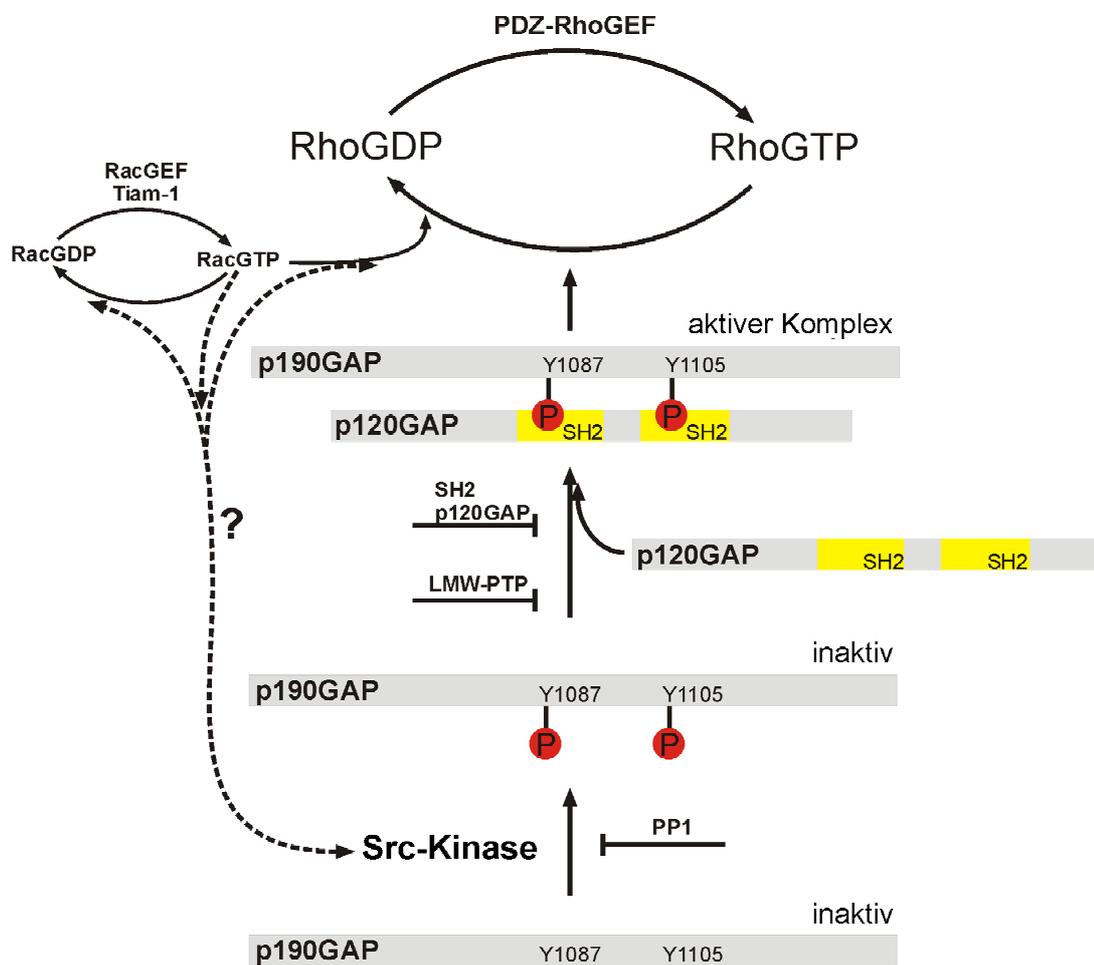


Abb. 4.2: Modell der Rolle von Src-Kinase in der Rac-induzierten Inaktivierung von Rho. Der spezifische Src-Kinase-Inhibitor PP1 blockiert die Kinase-Aktivität von Src-Kinase auf p190RhoGAP, so dass p190RhoGAP nicht mehr phosphoryliert wird, p120RasGAP nicht mehr binden kann, und die Rac-induzierte Inaktivierung von Rho blockiert ist. Aktive Src-Kinase kann aber auch auf einem von p190RhoGAP unabhängigen Signalweg Rho inaktivieren und im Fall der konstitutiv aktiven viralen Src-Kinase ist ein inhibierender Effekt auf die Aktivität von Rac festzustellen.

Die Tatsache, dass virale Src-Kinase gegenüber zellulärer Src-Kinase einen leichten inhibierenden Effekt auf die Aktivität von endogenem Rac und Cdc42 in *Pulldown*-Assays zeigt, ist ebenfalls damit zu begründen, dass virale Src-Kinase konstitutiv aktiv ist. Obwohl prinzipiell anzunehmen ist, dass zumindest für die Rac-induzierte Rho-Inaktivierung Src im Signalweg unterhalb von Rac steht, sind *feedback*-Schleifen oder andere Signalwege, die dazu führen, dass konstitutiv aktive Src-Kinase die Aktivität von Rac und Cdc42 in der Zelle negativ reguliert, wahrscheinlich.

Kürzlich ist ein Modell zur Regulation der Aktivität von p190RhoGAP veröffentlicht worden [Moon & Zheng, 2003]. Das Modell basiert auf der interessanten Beobachtung, dass LMW-PTP nicht nur als Phosphatase einen regulierenden Einfluss auf die Aktivität von p190RhoGAP hat, sondern auch selber von zellulärer Src-Kinase phosphoryliert wird [Bucciantini *et al.*, 1999; Chiarugi *et al.*, 2000]. Die Phosphorylierung von LMW-PTP durch Src-Kinase steigert deutlich die Phosphatase-Aktivität von LMW-PTP und reduziert die Src-Kinase-abhängige Phosphorylierung von p190RhoGAP. Das daraus entwickelte Modell besagt, dass zelluläre Src-Kinase durch ein Signal von Wachstumsfaktorrezeptoren aktiviert wird, und daraufhin p190RhoGAP durch direkte Phosphorylierung aktiviert. Das positive Signal zu p190RhoGAP wird durch LMW-PTP oder andere Phosphatase-abhängige Mechanismen unter Kontrolle gehalten, die ihrerseits durch Phosphorylierung über zelluläre Src-Kinase reguliert werden, wodurch eine reversible, strikte Regulation erreicht wird [Moon & Zheng, 2003].

4.4.4 Rolle der N-terminalen GTPase-Domäne von p190RhoGAP

Der N-Terminus von p190RhoGAP enthält eine außergewöhnliche GTP-bindende Domäne, der eine Rolle bei der Signaltransduktion zugeschrieben wird. Wie frühere Studien gezeigt haben, inhibiert die dominant negative Mutation in der GTP-bindenden Domäne (S36N) die GAP-Aktivität von p190RhoGAP. Dies lässt

vermuten, dass komplexe intra- und intermolekulare Interaktionen zur Regulation der C-terminalen RhoGAP-Domäne von p190RhoGAP beitragen könnten [Tatsis *et al.*, 1998]. Von der dominant negativen Mutation in Ras (S17N) ist bekannt, dass sie eine schwache Affinität für das Guanin-Nukleotid und eine hohe Affinität für den Austauschfaktor besitzt. Die Anwesenheit einer solchen Mutation in der Zelle führt zum Abfangen des Austauschfaktors und folglich zur Blockade seiner Funktion [Feig & Buchsbaum, 2002].

Rho-Assays mit der N-terminalen GTPase-Domäne von p190RhoGAP haben gezeigt, dass die GTPase-Domäne von p190RhoGAP mit der dominant negativen Mutation (S36N) die über den RacGEF Tiam1 und Rac induzierte Rho-Inaktivierung blockiert, während die Domäne in der Wildtypform diesen Effekt nicht hat. Die GTPase-Domäne spielt folglich auch eine Rolle bei der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung über p190RhoGAP. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Rac nicht nur über Src-Kinase auf die Phosphorylierung von p190RhoGAP einen regulierenden Einfluss hat, sondern auch eine Rolle bei der Aktivierung der GTPase-Domäne von p190RhoGAP spielen könnte.

Passend zu einer regulatorischen Rolle des N-Terminus von p190RhoGAP zeigt eine Veröffentlichung, dass zelluläre Src-Kinase die GTPase-Domäne von p190RhoGAP phosphoryliert, wodurch die GTP-Bindung an p190RhoGAP zerstört wird [Roof *et al.*, 2000]. Diese Beobachtung unterstützt die Möglichkeit, dass Src-Kinase auf p190RhoGAP zum Teil durch Modulation der GTP-bindenden Domäne wirkt [Moon & Zheng, 2003].

Zusätzlich zur Tyrosin-Phosphorylierung durch Src-Kinase wird p190RhoGAP durch PKC (*protein kinase C*) auch an Serin- und Threonin-Resten phosphoryliert [Brouns *et al.*, 2000]. Die Aktivierung von PKC steht in Beziehung zu der Phosphorylierung von p190RhoGAP und der Translokation von p190RhoGAP vom Zytosol zu *ruffles* in der Membran. Dieser Mechanismus könnte ein weiterer Weg der Regulation von p190RhoGAP sein.

4.4.5 Rolle des Rac-Effektors Pak

Die Serin-/Threonin-Kinasen der Pak-Familie sind Effektorproteine für Rac und Cdc42, die an der Genexpression und Zellmigration beteiligt sind [Knaus & Bokoch, 1998]. Pak1 und Pak 3 sind hauptsächlich im Gehirn nachweisbar, jedoch mit unterschiedlicher Lokalisation, während Pak2 in allen Geweben vorkommt [Knaus & Bokoch, 1998]. Aktives, GTP-gebundenes Rac und Cdc42 binden an das CRIB-Motiv in der katalytischen Domäne von Pak und fördern die Autophosphorylierung von Pak, die für die Signalweiterleitung wichtig ist [Knaus & Bokoch, 1998].

Pak-Proteine sind in der Zelle an der Regulation des MAP-Kinase-Signalweges (*mitogen activated protein kinase*), an Apoptose- und Zellzyklus-Regulation, an der Bildung reaktiven Sauerstoffs in phagozytischen Zellen, und an der Regulation der Zytoskelettdynamik beteiligt [Mackay & Hall, 1998; Bagrodia & Cerione, 1999]. In einem beschriebenen Signalweg wirkt Pak antagonistisch zu dem Rho-Effektor ROCK (*rho-associated coiled coil kinase*), indem die MLCK (*myosin light chain kinase*) inaktiviert wird, wodurch der Level an phosphorylierter MLC in der Zelle abnimmt, was zum Abbau von Stressfasern und fokalen Adhäsionen und zu gesteigerter Zellmobilität führt [Sanders *et al.*, 1999].

Rho-Assays zur Klärung der Rolle von Pak in der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung haben gezeigt, dass die Kinasedomänen von Pak1, Pak2 und Pak3 entgegen der Erwartung allein einen leicht aktivierenden Effekt auf die Rho-Aktivität haben, und die durch die DH/PH-Domäne von PDZ-RhoGEF gesteigerte Rho-Aktivität durch Koexpression mit den Kinasedomänen von Pak1, Pak2 und Pak3 sogar noch gesteigert wird. Bei Transfektion mit Pak1-PID (*Pak inhibitory domain*), das die Weiterleitung des Signals vom aktivierten Pak zu nachfolgenden Signalmolekülen verhindert, wurde keine gesteigerte Aktivität von Rho erzielt. Es ist also anzunehmen, dass die endogene Aktivität von Rac hoch genug war, um die Rho-Aktivität niedrig zu halten. Durch die Expression von Pak1-PBD (*Pak binding*

domain), das die Weiterleitung des Signals von aktivem Rac zu Pak verhindert, wurde die Rho-Aktivität hingegen deutlich gesteigert, da Rho nicht inaktiviert werden kann.

Die Experimente zur Rho-Inaktivierung mit Hilfe der isolierten Pak-Kinase-Domänen waren vermutlich deshalb nicht erfolgreich, weil Pak für seine Funktionalität *in vivo* weitere Domänen innerhalb des Moleküls benötigt. So ist beispielsweise beschrieben, dass für die Aktivität von Pak die Lokalisation an der Membran erforderlich ist, die über Proteininteraktion in Prolin-reichen Regionen am N-Terminus von Pak mit SH3-Domänen der Bindungspartner erfolgt [Lu *et al.*, 1997]. Andere Studien auf morphologischer Ebene haben ebenfalls gezeigt, dass die Regulation des Zytoskeletts durch Pak-Proteine komplex ist, und sowohl die C-terminale Kinase-Domäne als auch N-terminale regulatorische Protein-Protein-Interaktionen erfordert [Manser *et al.*, 1997; Sells *et al.*, 1997].

Welche genaue Rolle Pak-Proteinen bei der Reorganisation des Aktinzytotokeletts zukommt ist nach wie vor unklar, zumal die Ergebnisse verschiedener Studien sehr widersprüchlich sind [Bagrodia & Cerione, 1999]. Einerseits wurde gezeigt, dass Rac und Cdc42 mit Mutationen, die die Bindung an den Effektor Pak verhindern, immer noch die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien in Zellen bewirken, was vermuten lässt, dass Pak nicht an diesen Effekten beteiligt ist [Lamarche *et al.*, 1995; Joneson *et al.*, 1997]. Andererseits hat eine andere Gruppe gezeigt, dass aktiviertes Pak1 mit einer Mutation, die die Bindung an Rac oder Cdc42 verhindert, immer noch die Bildung von polarisierten *ruffles* in der Membran und vinculinhaltigen Fokaladhäsionen in Swiss3T3-Fibroblasten fördert [Sells *et al.*, 1997].

Pak-Proteine sind, wie die erwähnten Studien zeigen, offensichtlich in der Lage auf das Zytoskelett einzuwirken und können dementsprechend an der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung beteiligt sein. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, reicht die Kinase-Domäne von Pak allein nicht aus, um das von Rac-

übermittelte Signal weiterzuleiten. Das funktionelle Pak-Protein benötigt offensichtlich die N-terminalen modularen Strukturen, um subzellulär korrekt lokalisiert zu sein und mit anderen Proteinen interagieren zu können. Experimente mit konstitutiv aktivem Vollängen-Pak1 haben diese Vermutung bestätigt, da im Rho-Assay mit diesen Konstrukten eine Inaktivierung von Rho nachweisbar war. Dieses Ergebnis macht es sehr wahrscheinlich, dass Pak tatsächlich das Bindeglied zwischen aktivem Rac und der Aktivierung der Src-Kinase in der Rac-induzierten Inaktivierung von Rho ist (Abb. 4.3). Um dieses Ergebnis zu bestätigen sind jedoch weitere Experimente nötig. So wäre zum Beispiel der Nachweis einer Aufhebung der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung durch Kotransfektion der konstitutiv aktiven Pak1-Mutanten mit PDZ-RhoGEF sowie der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP oder LMW-PTP ein guter Hinweis darauf, dass Pak die Phosphorylierung der Src-Kinase in diesem Signalweg vermittelt. Des Weiteren muss die enzymatische Reaktion der Src-Phosphorylierung durch Pak nachgewiesen werden.

Im Augenblick sind nur wenige Rac-spezifische Effektoren beschrieben, die an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts beteiligt sind. POR-1 (*partner of Rac*) ist an der Rac-induzierten Lamellipodienformation beteiligt, wobei verkürzte Konstrukte dominant negative Eigenschaften aufweisen [van Aelst *et al.*, 1996; D'Souza-Schorey *et al.*, 1997]. p140Sra-1 (*specific Rac1-associated protein*) ist zusammen mit F-Aktin sedimentierbar, was auf eine Rolle bei der Rac-induzierten Reorganisation des Zytoskeletts hindeutet [Kobayashi *et al.*, 1998]. Diese beiden Effektoren, die im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet wurden, sind neben Pak Kandidaten für die Vermittlung der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung.

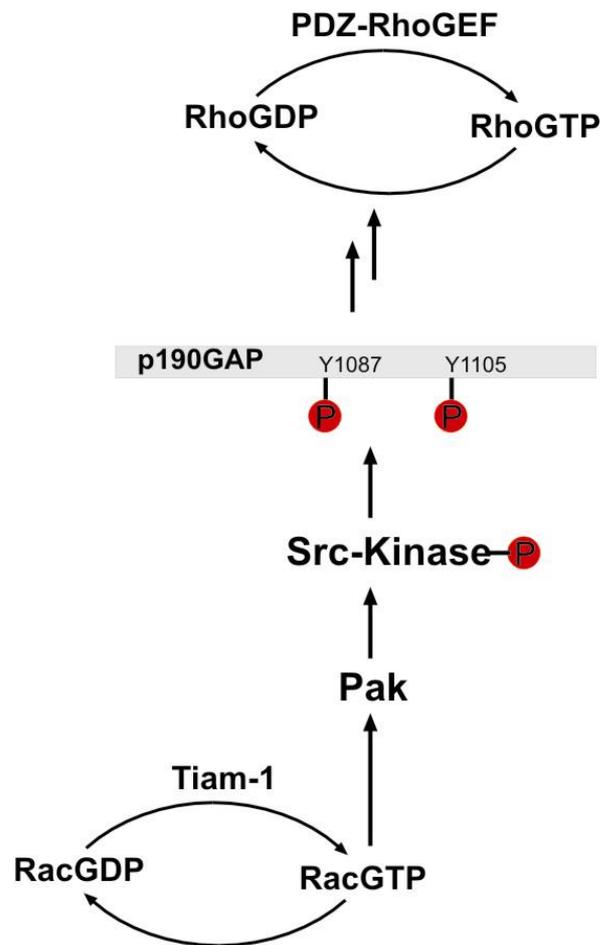


Abb. 4.3 Modell der Rolle des Rac-Effektors Pak in der Rac-induzierten Inaktivierung von Rho. Pak ist wahrscheinlich an der Rac-induzierten Inaktivierung von Rho beteiligt, indem die Kinasedomäne von Pak nach der Aktivierung durch aktives Rac zelluläre Src-Kinase phosphoryliert und damit aktiviert, die daraufhin p190RhoGAP phosphoryliert.

4.4.6 Rolle der Rac-Isoformen

Im Sequenzvergleich der Rac-Isoformen Rac1, Rac2 und Rac3 wird deutlich, dass der Hauptunterschied in den C-terminalen Regionen liegt, was bedeutet, dass sich die Isoformen in ihrer Lokalisation in der Zelle unterscheiden.

Rho-Assays haben gezeigt, dass bei gleichzeitiger Expression der Rac-Isoformen mit der konstitutiv aktiven Mutation (G12V) mit der DH/PH-Domäne von PDZ-RhoGEF nur Rac1 Rho inaktiviert. Dies lässt darauf schließen, dass für die Rac-induzierte Inaktivierung von Rho nur Rac1 verantwortlich ist. Offensichtlich ist also auch für die Inaktivierung von Rho die Membranlokalisation entscheidend. Im übrigen steht dieses Ergebnis in Einklang mit bisherigen Studien zur Funktion der Rac-Isoformen in der Zelle. Rac1 ist wichtig für die Reorganisation des Aktinzytoskeletts und die Zellmigration [Hall, 1998, Matos *et al.*, 2000], während Rac2 eine Funktion bei der Regulation der Immunantwort zukommt. Rac2 reguliert die NADPH-Oxidase-Aktivität in Phagozyten, aber auch anderen für das Immunsystem wichtigen Zellen [Diebold & Bokoch, 2001]. Rac3 hat eine wichtige Rolle bei der Proliferation und wirkt mit dem Effektor Pak auf die DNA-Synthese ein [Mira *et al.*, 2000].

Aus den gewonnenen Daten zur Rac-induzierten Inaktivierung von Rho lässt sich zusammenfassend ableiten, dass durch einen RacGEF, beispielsweise Tiam1, aktiviertes Rac über einen Effektor, bei dem es sich wahrscheinlich um Pak handelt, Src-Kinase phosphoryliert und damit aktiviert, die daraufhin p190RhoGAP durch Phosphorylierung aktiviert. Dieser Schritt kann durch den Src-Kinase-spezifischen Inhibitor PP1 blockiert werden. p120RasGAP bindet mit seinen SH2-Domänen an phosphoryliertes p190RhoGAP und in diesem Komplex erfolgt die Inaktivierung von beispielsweise durch PDZ-RhoGEF aktiviertem Rho. Dieser Schritt kann durch die Phosphatase LMW-PTP, die p190RhoGAP dephosphoryliert und damit die Bindung von p120RasGAP blockiert, oder durch Überexpression der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP, die die Bildung des aktiven Komplexes von p190RhoGAP mit p120RasGAP verhindert, blockiert werden. Die GTPase-Domäne von p190RhoGAP scheint eine Rolle in der Rac-induzierten Inaktivierung von Rho zu spielen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Rac nicht nur einen kontrollierenden

Effekt auf die Phosphorylierung von p190RhoGAP über Src-Kinase hat, sondern auch eine Rolle bei der Aktivierung der GTPase-Domäne von p190RhoGAP spielen könnte (Abb. 4.4).

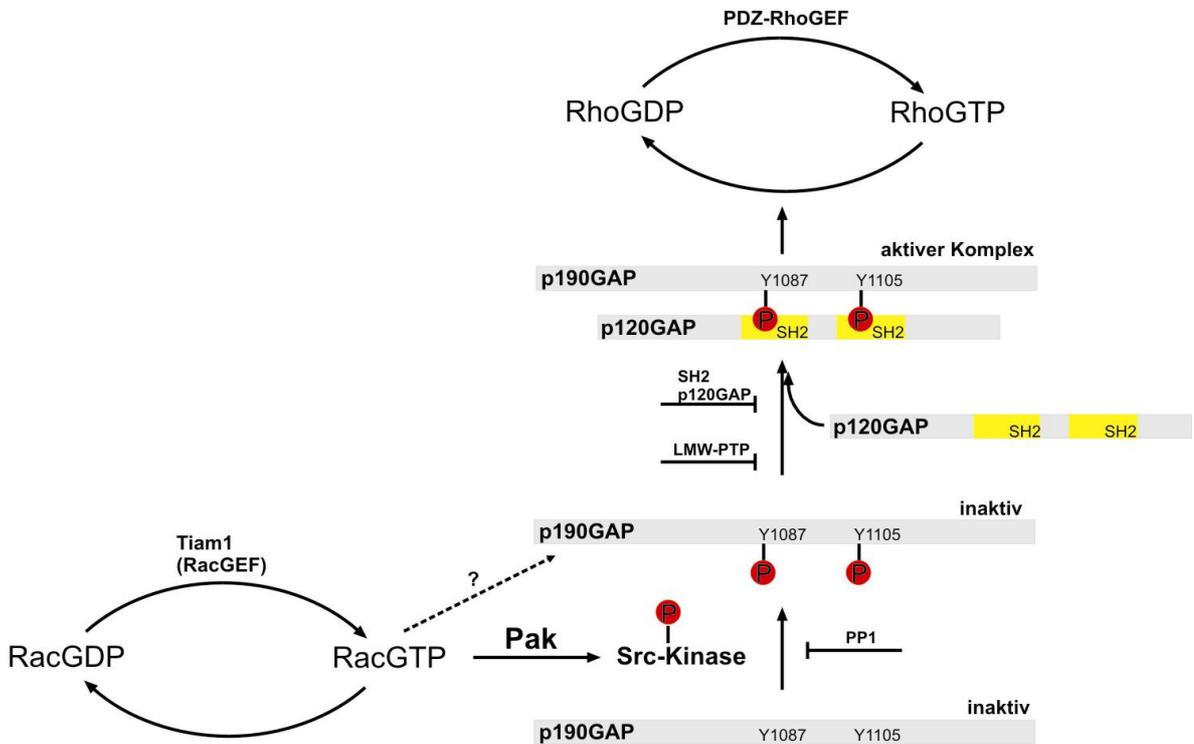


Abb. 4.4: Modell der Rac-induzierten Inaktivierung von Rho.

4.5 Interaktion von Smad4 und Rac3

Smad-Tumorsuppressor-Proteine sind wichtige Transkriptionsfaktoren und Effektoren des TGF β -Signalweges. TGF β hat einen regulierenden Effekt auf Wachstum, Differenzierung, Migration, Apoptose und Embryonalentwicklung [Derynck *et al.*, 1996; 2001]. Der durch TGF β aktivierte TGF β -Rezeptor phosphoryliert und aktiviert die R-Smads Smad2 und Smad3, die daraufhin mit dem Co-Smad Smad4 heterooligomere Komplexe bilden, die in den Zellkern gelangen

und dort zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren die Transkription der Zielgene regulieren [Souchelnytskyi *et al.*, 1997; Kawabata *et al.*, 1998] (Abb. 1.7).

Mit dem Hefe-2-Hybrid-System wurde in Kooperation mit Dr. S. Hahn (Ruhr-Universität Bochum) die Interaktion von Rac3 mit dem Co-Smad Smad4 nachgewiesen. Die Ergebnisse der durchgeführten Immunpräzipitationen bestätigen die Interaktion von Smad4 und Rac3 auch im biochemischen Ansatz nach der Transfektion von Cos7-Zellen.

Morphologische Studien an NIH3T3-Zellen mit konfokaler Lasermikroskopie haben gezeigt, dass Smad4 unter Serummangel-Bedingungen hauptsächlich im Kern lokalisiert ist, während es in Anwesenheit von Serum hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass im Kern lokalisiertes Smad4 in nicht stimulierten NIH3T3-Zellen transkriptionell inaktiv ist [Pierreux *et al.*, 2000]. Interessanterweise bewirkte die Koexpression von Smad4 mit konstitutiv aktivem Rac3, dass ein Großteil des Smad4 zur Membran rekrutiert wird, wo es mit Rac3 in den sich ausstülpenden Lamellipodien der transfizierten Zelle kolokalisiert ist. Diese Zellen scheinen gegenüber den nur mit Smad4 oder zusammen mit dominant negativem Rac3 transfizierten Zellen wesentlich beweglicher. Dies zeigt, dass die Assoziation von Smad4 zu den Lamellipodien von der Aktivierung von Rac3 abhängig ist. Da Rac3 direkt mit Smad4 interagiert, reguliert Rac3 möglicherweise die subzelluläre Lokalisation von Smad4. Es sind jedoch weitere Experimente nötig, um die biologischen Konsequenzen der Rac3-vermittelten Rekrutierung von Smad4 in die Lamellipodien zu klären. Bisher konnte bereits gezeigt werden, dass Filamin, ein Aktin-vernetzendes Protein, das eine wichtige Rolle bei der Zellmigration spielt [Flanagan *et al.*, 2001], den TGF β -Smad-Signalweg durch direkte Bindung an Smad-Proteine positiv reguliert [Sasaki *et al.*, 2001]. Eine andere Studie hat gezeigt, dass Smad2, Smad3 und Smad4 auch an zytoplasmatischen Mikrotubuli lokalisiert sind, was einen alternativen

Mechanismus der negativen Regulation des TGF β -Signalweges darstellen könnte [Dong *et al.*, 2000].

Die beobachtete Rekrutierung von Smad4 in Lamellipodien durch aktives Rac3 deutet darauf hin, dass Smad4 unabhängig von der Effektoraktivität im TGF β -Signalweg weitere zelluläre Funktionen haben könnte. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass Smad4 im Zellkern mit einer Reihe aktivierender und inhibierender Moleküle interagiert und Komplexe mit Transkriptionsfaktoren im Kern bildet. Smad4 könnte deshalb eine Schlüsselkomponente diverser Signalwege sein [ten Dijke *et al.*, 2000]. Auch die Tatsache, dass Filamin und Smad2-Proteine aneinander binden [Sasaki *et al.*, 2001] zusammen mit der Beobachtung, dass Filamin mit den kleinen GTPasen der Ras- und Rho-Familie interagiert [Ueda *et al.*, 1992; Ohta *et al.*, 1999], ist ein Hinweis darauf, dass die Funktion von Smad4 nicht auf den TGF β -Signalweg beschränkt ist. Smad4 könnte beispielsweise neben der Funktion im TGF β -Signalweg [Sasaki *et al.*, 2001] auch eine Rolle bei der von Rac und Rho kontrollierten Zellmigration haben.

Eine aktuelle Studie an menschlichen PC-3U Prostata-Karzinom-Zellen hat gezeigt, dass TGF β auch direkten Einfluss auf das Zytoskelett hat. In der Kurzzeit-Aktinreorganisation innerhalb weniger Minuten nach Behandlung der Zellen mit TGF β werden über den TGF β -Rezeptor Cdc42 oder RhoA aktiviert, was sich nach Signalweiterleitung über die Effektoren p38-MAPK oder ROCK1 in *ruffles* in der Membran oder Aktin-Stressfasern äußert, während bei der Langzeit-Aktinreorganisation nach anhaltender Behandlung der Zellen mit TGF β über den TGF β -Rezeptor und Smads vermittelt Stressfasern auftreten [Edlund *et al.*, 2002].

Der direkte Einfluss der am TGF β -Smad-Signalweg beteiligten Moleküle auf die Aktivität der GTPasen Rho und Rac wurde mit Hilfe von *Pulldown*-Assays überprüft. Dabei zeigte der TGF β -Rezeptor mit der konstitutiv aktiven Mutation (T204D) keinen Effekt auf die Aktivität von Rac und Rho. Genauso wenig hatte die

Transfektion mit TGF β -Rezeptor mit der dominant negativen Mutation (K277R) einen Effekt, und auch für die Transfektionen mit Smads und verschiedene Kotransfektionen von TGF β -Rezeptoren und Smads konnte kein Effekt in Rac-Assays gezeigt werden. Lediglich in Rho-Assays hatten die Transfektionen mit dem R-Smad Smad2 und die Koexpression von Smad2 mit konstitutiv aktivem TGF β -Rezeptor (T204D) unabhängig von Smad4 eine leichte Reduktion der Rho-Aktivität gegenüber der Kontrolle zur Folge. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der oben beschriebenen Studie zur Aktinreorganisation nach Langzeitbehandlung von Zellen mit TGF β . Außerdem lassen diese Ergebnisse vermuten, dass Smads eventuell an der Inaktivierung von Rho über einen anderen Signalweg als über Rac beteiligt sind, dazu aber vermutlich weitere, bisher unbekannte, Signale erforderlich sind.

In einer anderen kürzlich beschriebenen Studie wurde für die Maus-Epithelzelllinie NMuMG gezeigt, dass TGF β 3 zu einer rapiden Aktivierung des RhoA-Rho-Kinase-Signalweges, gefolgt von einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts, führt. Diese Veränderungen scheinen für die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung, die beispielsweise bei der Organentstehung, in der Entwicklung und bei der Steigerung der Invasivität in späten Stadien der Tumorentstehung wichtig ist, von Bedeutung zu sein [Kaartinen *et al.*, 2002]. Die in dieser Studie beobachtete Aktivierung von Rho durch TGF β 3 steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der *Pulldown*-Assays, die auf eine reduzierte Aktivität von Rho durch Komponenten des TGF β -Signalweges hindeuten.

Weitere Informationen zur Rolle von Rac3 im TGF β -Signalweg könnten Reporter-gen-Assays nach Kotransfektion von Smad2, Smad4, TGF β -Rezeptor und Rac3 mit konstitutiv aktiven und dominant negativen Mutationen liefern.

5 Zusammenfassung

Die GTPasen der Rho-Familie übernehmen als molekulare Schalter eine zentrale Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion. Sie haben Einfluss auf die Organisation des Aktinzytoskeletts, die Regulation von Zellwachstum und Differenzierung und die Genexpression. Die Regulation der Aktivität der Rho-Proteine erfolgt durch GEFs, GAPs und GDIs, und die Signale aktivierter Rho-Proteine werden durch spezifische Effektoren weitergeleitet. Aber auch untereinander unterliegen die Rho-Proteine einer strengen Hierarchie. So wird beispielsweise durch Rac-Aktivierung Rho inaktiviert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Regulation der Rho-GTPasen mit zellbiologischen Methoden näher charakterisiert werden. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Klärung des Mechanismus der Rac-induzierten Rho-Inaktivierung.

Nach erfolgreicher Etablierung der erforderlichen zellbiologischen Methoden, vor allem des GTPase *Pulldown*-Assays, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass p190RhoGAP als ein zentrales Bindeglied des Rac-vermittelten Signalweges für die Inaktivierung von Rho verantwortlich ist. Die Regulation von p190RhoGAP und die darauf folgende Rho-Inaktivierung erfolgt schrittweise über Src-Kinase-abhängige Tyrosin-Phosphorylierung (Aktivierung) und über die Interaktion mit den SH2-Domänen von p120RasGAP (Rekrutierung zur Membran). Die Rac-induzierte Rho-Inaktivierung konnte durch den Eingriff in die p190RhoGAP-Regulation an drei Punkten erfolgreich unterbunden werden: 1. Inhibition der p190-Phosphorylierung durch den spezifischen Src-Kinase-Inhibitor PP1, 2. Dephosphorylierung von p190RhoGAP durch die Phosphatase LMW-PTP, 3. Inhibition der p190RhoGAP-p120RasGAP-Komplexbildung durch die Überexpression der N-terminalen SH2-Domäne von p120RasGAP. Zudem scheint die N-terminale GTPase-Domäne von p190RhoGAP aktiv an der Rac-induzierten

p190-stimulierten Rho-Inaktivierung beteiligt zu sein, da die Überexpression dieser Domäne mit der dominant negative Mutation (S36N) die Inaktivierung von Rho über den Tiam1/ Rac-Signalweg inhibiert. Die Inaktivierung von Rho wird lediglich von Rac1, nicht aber von Rac2 und Rac3 vermittelt. Hierbei scheint der Rac1-/Pak-Signalweg ein wesentlicher Bestandteil zur Rac-induzierten Rho-Inaktivierung zu sein, der möglicherweise die Aktivierung von Src-Kinase herbeiführt.

Mittels konfokaler Lasermikroskopie nach transienter Transfektion konnte gezeigt werden, dass die Rac-Isoformen sich in ihren morphologischen Effekten auf NIH3T3-Fibroblasten deutlich unterscheiden. Im Gegensatz zu konstitutiv aktivem Rac1 und Rac3 induziert konstitutiv aktives Rac2 nicht die für Rac typische Ausbildung von Lamellipodien, die mit dem Aktin-Zytoskelett kolokalisiert sind, was mit den bereits beschriebenen Funktionen der Rac-Isoformen in Zellen korreliert ist. Der Rac-GEF Tiam1 aktiviert Rac1 und Rac2, nicht aber Rac3, was damit zu erklären ist, dass Rac3 bereits ohne zusätzliche Aktivierung durch einen GEF in hohem Maß in der aktiven, GTP-gebundenen Form vorliegt. Rac1b, das im Gegensatz zu den anderen Rac-Isoformen eine Insertion von 19 Aminosäuren aufweist, und zuerst in Tumorgewebe gefunden wurde, ist im GTPase *Pulldown*-Assay im Gegensatz zu Rac1 unabhängig von den Serumbedingungen konstitutiv aktiv. Diese Beobachtung wird durch die Untersuchung der Morphologie von MDCK-Zellen mittels konfokaler Lasermikroskopie nach transienter Transfektion bestätigt.

Von den getesteten RhoGEFs ist lediglich p115RhoGEF in der Lage die Rho-Isoformen RhoA, RhoB und RhoC gleichermaßen stark zu aktivieren. PDZ-RhoGEF hat eine schwächere GEF-Funktion auf RhoC als auf RhoA und RhoB, wohingegen für p190RhoGEF im *Pulldown*-Assay-System keine GEF-Aktivität auf eine der Rho-Isoformen nachgewiesen werden konnte. Der Unterschied zwischen p115RhoGEF und PDZ-RhoGEF ist wahrscheinlich auf unterschiedliche Lokalisation an der Plasmamembran zurückzuführen, während im Fall von

p190RhoGEF vermutlich Bindungspartner zur Inaktivierung der autoinhibitorischen Domäne fehlten.

Immunpräzipitationen zur Bindung von Smad4 an Rac3 bestätigen die vorher im Hefe-2-Hybrid-System gefundene Interaktion beider Partner. Morphologische Studien mit konfokaler Lasermikroskopie zeigen, dass die Rekrutierung von Smad4 zur Plasmamembran abhängig von der Aktivierung von Rac3 ist. Es ist also denkbar, dass Rac3 die subzelluläre Lokalisation von Smad4 reguliert. Es sind jedoch weitere Experimente nötig um die Rolle der Rac3-Smad-Interaktion besser zu verstehen.

6 Literaturverzeichnis

- Adamson, P., Paterson, H.F., Hall, A. (1992a) Intracellular localization of P21rho proteins. *Journal of Cell Biology*, **119**, 617-627.
- Adamson, P., Marshall, C.J., Hall, A., Tilbrook, P.A. (1992b) Post-translational modifications of p21rho proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 20033-20038.
- Ahmadian, M.R., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Bischoff, F.R., Wittinghofer, A. (1996) Structural differences in the minimal catalytic domains of the GTPase-activating proteins p120GAP and neurofibromin. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 16409-16415.
- Ahmadian, M.R., Hoffmann, U., Goody, R.S., Wittinghofer, A. (1997) Individual rate constants for the interaction of Ras proteins with GTPase-activating proteins determined by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry (Mosc)*, **36**, 4535-4541.
- Aktories, K., Schmidt, G. and Hofmann, F. (2000) GTPases targetted by bacterial toxins. In *GTPases* (Hall, A., ed.), 311–331, Oxford University Press, Oxford.
- Babior, B.M. (1999) NADPH-oxidase: an update. *Blood*, **93**, 1464-1476.
- Bagrodia, S. & Cerione, R.A. (1999) Pak to the future. *Trends in Cell Biology*, **9**, 350-355.
- Bakin, A.V., Tomlinson, A.K., Bhowmick, N.A., Moses, H.L., Arteaga, C.L. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 36803-36810.
- Barbacid, M. (1987) ras genes. *Annual Review of Biochemistry*, **56**, 779-827.
- Bhattacharyya, R. & Wedegaertner, P.B. (2000) G α_{13} requires palmitoylation for plasma membrane localization, Rho-dependent signalling, and promotion of p115-RhoGEF membrane binding. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 14992-14999.

- Billuart, P., Bienvenu, T., Ronce, N., des Portes, V., Vinet, N.C., Zemni, R., Roest Crollius, H., Carrié, A., Fauchereau, F., Cherry, M., Briault, S., Hamel, B., Fryns, J.-P., Beldjord, C., Kahn, A., Moraine, C., Chelly, J. (1998) Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature*, **392**, 923-926.
- Bishop, J.M. (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, **64**, 235-248.
- Bishop, A.L., Hall, A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochemical Journal*, **348**, 241-55.
- Boettner, B., Van Aelst, L. (2002) The role of RhoGTPases in disease development. *Gene*, **286**, 155-174
- Boguski, M.S. & McCormick, F. (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*, **366**, 643-654.
- Bos, J.L. (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Research*, **49**, 4682-4689. [published erratum appears in *Cancer Research* (1990), **50**, 1352].
- Bos, J.L. (1997) Ras-like GTPases. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1333**, M19-M31.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, **348**, 125-131.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. und McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, **349**, 117-127.
- Bouton, A.H., Kanner, S.B., Vines, R.R., Wang, H.C., Gibbs, J.B., Parsons, J.T. (1991) Transformation by pp60src or stimulation of cells with epidermal growth factor induces the stable association of tyrosine-phosphorylated cellular proteins with GTPase-activating protein. *Molecular and Cellular Biology*, **11**, 945-953.
- Brouns, M.R., Matheson, S.F., Hu, K.Q., Delalle, I., Caviness, V.S., Silver, J., Bronson, R.T., Settleman, J. (2000) The adhesion signalling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development*, **127**, 4891-4903.
- Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1993) Protein prenylation. Mad bet for Rab. *Nature*, **366**, 14-15.

- Brown, M.T. & Cooper, J.A. (1996) Regulation, substrates and functions of src. *Biochimica and Biophysica Acta*, **1287**, 121-149.
- Bryant, S.S., Briggs, S., Smithgall, T.E., Martin, G.A., McCormick, F., Chang, J.H., Parsons, S.J., Jove, R. (1995) Two SH2 domains of p120 Ras GTPase-activating protein bind synergistically to tyrosine phosphorylated p190 Rho GTPase-activating protein. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 17947-17952.
- Bucciantini, M., Chiarugi, P., Cirri, P., Taddei, L., Stefani, M., Raugei, G., Nordlund, P., Ramponi, G. (1999) The low M_r phosphotyrosine protein phosphatase behaves differently when phosphorylated at Tyr¹³¹ or Tyr¹³² by Src kinase. *FEBS Letters*, **456**, 73-78.
- Buchanan, F.G., Elliot, C.M., Gibbs, M., Exton, J.H. (2000) Translocation of the Rac1 guanine nucleotide exchange factor Tiam1 induced by platelet-derived growth factor and lysophosphatidic acid. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 9742-9748.
- Burbelo, P.D., Drechsel, D., Hall, A. (1995) A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 29071-29074.
- Cartwright, C.A., Eckhart, W., Simon, S., Kaplan, P.L. (1987) Cell transformation by pp60c-src mutated in the carboxy-terminal regulatory domain. *Cell*, **49**, 83-91.
- Cerione, R.A. and Zheng, Y. (1996) The Dbl family of oncogenes. *Current Opinion in Cellular Biology*, **8**, 216-222.
- Chang, J.H., Wilson, L.K., Moyers, J.S., Zhang, K., Parsons, S.J. (1993) Increased levels of p21ras-GTP and enhanced DNA synthesis accompany elevated tyrosyl phosphorylation of GAP-associated proteins, p190 and p62, in c-src overexpressors. *Oncogene*, **8**, 959-967.
- Chang, J.H., Gill, S., Settleman, J., Parsons, S.J. (1995) c-Src regulates the simultaneous rearrangement of actin cytoskeleton, p190RhoGAP, and p120RasGAP following epidermal growth factor stimulation. *Journal of Cell Biology*, **130**, 355-368.
- Chiarugi, P., Cirri, P., Taddei, L., Giannoni, E., Camici, G., Manao, G., Raugei, G., Ramponi, G. (2000) The low M_r protein-tyrosine phosphatase is involved in Rho-mediated cytoskeleton rearrangement after integrin and platelet-derived growth factor stimulation. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 4640-4646.

- Chow, A., Davis, A.J., Gawler, D.J. (1999) Investigating the role played by protein-lipid and protein-protein interactions in the membrane association of the p120GAP CaLB domain. *Cell Signalling*, **11**, 443-451.
- Choy, E., Chiu, V.K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I.E., Philips, M.R. (1999) Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell*, **98**, 69-80.
- Chung, C.T., Niemela, S.L. and Miller, R.H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 2172-2175.
- Clark, E.A., Golub, T.R., Lander, E.S., Hynes, R.O. (2000) Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature*, **406**, 532-535.
- Crompton, A.M., Foley, L.H., Wood, A., Roscoe, W., Stokoe, D., McCormick, F., Symons, M., Bollag, G. (2000) Regulation of Tiam1 nucleotide exchange activity by pleckstrin domain binding ligands. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 25751-25759.
- Del Peso, L., Hernandez-Alcoceba, R., Embade, N., Carnero, A., Esteve, P., Paje, C. and Lacal, J.C. (1997) Rho proteins induce metastatic properties in vivo. *Oncogene*, **15**, 3047-3057.
- Derynck, R., Gelbart, W.M., Harland, R.M., Heldin, C.H., Kern, S.E., Massagué, J., Melton, D.A., Mlodzik, M., Padgett, R.W., Roberts, A.B., Smith, J., Thomsen, G.H., Vogelstein, B., Wang, X.F. (1996) Nomenclature: vertebrate mediators of TGF β family signals. *Cell*, **87**, 173.
- Derynck, R., Akhurst, R.J., Balmain, A. (2001) TGF- β signalling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genetics*, **29**, 117-129.
- Didsbury, J., Weber, R.F., Bokoch, G.M., Evans, T., Snyderman, R. (1989) Rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 16378-16382.
- Diebold, B.A. & Bokoch, G.M (2001) Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nature Immunology*, **2**, 211-215.
- Donavan, S., Shannon, K., Bollag, G. (2002) GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signalling. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1602**, 23-45.

- Dong, C., Li, Z., Alvarez, R. Jr., Feng, X.H., Goldschmidt-Clermont, P.J. (2000) Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity. *Molecular Cell*, **5**, 27-34.
- Drugan J.K., Rogers-Graham K., Gilmer T., Campbell S., Clark G.J. (2000) The Ras/p120 GTPase-activating protein (GAP) interaction is regulated by the p120 GAP pleckstrin homology domain. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 35021-35027.
- D'Souza-Schorey, C., Boshans, R.L., McDonough, M., Stahl, P.D., van Aelst, L. (1997) A role for POR1, a Rac1-interacting protein in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *EMBO Journal*, **16**, 5445-5454.
- Edlund, S., Landström, M., Heldin, C.-H., Aspenström, P. (2002) Transforming growth factor- β -induced mobilization of actin cytoskeleton requires signalling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Molecular Biology of the Cell*, **13**, 902-914.
- Ellis, C., Moran, M., McCormick, F., Pawson, T. (1990) Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature*, **343**, 377-381.
- Ellis, S. and Mellor, H. (2000) The novel rho-family GTPase rif regulates coordinated actin-based membrane rearrangements. *Current Biology*, **10**, 1387-1390.
- Engers, R., Springer, E., Michiels, F., Collard, J.G. and Gabbert, H.E. (2001) Rac affects invasion of human renal cell carcinomas by up-regulating tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 expression. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 41889-41897.
- Eppert, K. Scherer, S.W., Ozcelik, H., Pirone, R., Hoodless, P., Kim, H., Tsui, L.C., Bapat, B., Gallinger, S., Andrulis, I.L., Thomsen, G.H., Wrana, J.L., Attisano, L. (1996) MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGF β -regulated protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell*, **86**, 543-552.
- Etienne-Manneville, S. & Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **420**, 629-635.
- Feig, L.A. & Buchsbaum, R.J. (2002) Cell signaling: life or death decisions of ras proteins. *Current Biology*, **12**, 253-265.

- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. and Danielsen, M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 7413-7417.
- Finkel, T. (1999) Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, **65**, 337-340.
- Flanagan, L.A., Chou, J., Falet, H., Neujahr, R., Hartwig, J.H., Stossel, T.P. (2001) Filamin A, the Arp2/3 complex, and the morphology and function of cortical actin filaments in human melanoma cells. *Journal of Cell Biology*, **155**, 511-518.
- Fleming, I.N., Elliott C.M., Buchanan, F.G., Downes, C.P., Exton, J.H. (1999) Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II regulates Tiam1 by reversible protein phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 12753-12758.
- Fleming, I.N., Gray, A., Downes, C.P. (2000) Regulation of the Rac1-specific exchange factor Tiam1 involves both phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent components. *Biochemical Journal*, **351**, 173-182.
- Foster, R., Hu, K.Q., Shaywitz, D.A., Settleman, J. (1994) p190RhoGAP, the major RasGAP-associated protein, binds GTP directly. *Molecular and Cellular Biology*, **14**, 7173-7181.
- Foster, R., Hu, K.Q., Lu, Y., Nolan, K.M., Thissen, J. and Settleman, J. (1996) Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and *in vivo* farnesylation. *Molecular and Cellular Biology*, **16**, 2689-2699.
- Fujisawa, K., Madaule P., Ishizaki T., Watanabe G., Bito H., Saito Y., Hall A., Narumiya S. (1998) Different regions of Rho determine Rho-selective binding of different classes of Rho target molecules. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 18943-18949.
- Fukuhara, S., Murga, C., Zohar, M., Igishi, T., Gutkind, J.S. (1999) A novel PDZ-domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 5868-5879.
- Gampel, A., Parker, P.J., Mellor, H. (1999) Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB. *Current Biology*, **9**, 955-958.

- Gebbink, M.F., Kranenburg, O., Poland, M., van Horck, F.P., Houssa, B., Moolenaar, W.H. (1997) Identification of a novel, putative Rho-specific GDP/GTP exchange factor and a RhoA-binding protein: control of neuronal morphology. *Journal of Cell Biology*, **137**, 1603-1613.
- Gibson, T.J. (1984) Studies on the Epstein-Barr virus genome. Dissertation, Cambridge University, England.
- Goehring, U.M., Schmidt, G., Pederson, K.J., Aktories, K. & Barbieri, J.T. (1999) The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 36369-36372.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., Stradley, S.J., Reiss, Y., Gierasch, L.M. (1991) Nonfarnesylated tetrapeptide inhibitors of protein farnesyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 15575-15578.
- Gorlich, D. & Kutay, U. (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*, **15**, 607-660.
- Graham, D.L., Eccleston, J.F. and Lowe, P.N. (1999) The conserved arginine in Rho-GTPase-activating protein is essential for efficient catalysis but not for complex formation with Rho GDP and aluminium fluoride. *Biochemistry*, **38**, 985-991.
- Gutierrez, L., Magee, A.I., Marshall, C.J., Hancock, J.F. (1989) Post-translational processing of p21ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis. *EMBO Journal*, **8**, 1093-1098.
- Haataja, L., Groffen, J., Heisterkamp, N. (1997) Characterization of Rac3, a novel member of the Rho family. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 20384-20388.
- Habets, G.G., Scholtes, E.H., Zuydgeest, D., van der Kammen, R.A., Stam, J.C., Berns, A. and Collard, J.G. (1994) Identification of an invasion inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell*, **77**, 537-549.
- Haeusler, L.C. (2001) Aktivierung von GTPasen der Rho-Familie. Diplomarbeit.
- Hahn, S.A., Schutte, M., Hoque, A.T.M.S., Moskaluk, C.A., da Costa, L.T., Rozenblum, E., Weinstein, C.L., Fischer, A., Yeo, C.J., Hruban, R.H., Kern, S.E. (1996) DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science*, **271**, 350-353.

- Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**, 509–514.
- Hancock, J.F., Magee, A.I., Childs, J.E., Marshall, C.J. (1989) All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*, **57**, 1167-1177.
- Hancock, J.F., Paterson, H., Marshall, C.J. (1990) A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell*, **63**, 133-139.
- Hancock, J.F., Cadwallader, K., Marshall, C.J. (1991a) Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21K-ras(B). *EMBO Journal*, **10**, 641-646.
- Hancock, J.F., Cadwallader, K., Paterson, H., Marshall, C.J. (1991b) A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. *EMBO Journal*, **10**, 4033-4039.
- Hanks, S.J., Quinn, A.M., Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, **241**, 42-52.
- Hardt, W.D., Chen, L.M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R. & Galan, J.E. (1998) S. typhimurium encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell*, **93**, 815-826.
- Hart, M.J., Eva, A., Zangrilli, D., Aaronson, S.A., Evans, T., Cerione, R.A. and Zheng, Y. (1994) Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 62-65.
- Hart, M.J., Sharma, S., el Masry, N., Qiu, R.G., McCabe, P., Polakis, P., and Bollag, G. (1996) Identification of a novel guanine nucleotide exchange factor for the RhoGTPase. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 25452-25458.
- Hart, M.J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W.D., Gilman, A.G., Sternweis, P.C., Bollag, G. (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. *Science*, **280**, 2112-2114.
- Harvey, J.J. (1964) An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature*, **204**, 1104-1105.

- Haskell, M.D., Nickles, A.L., Agati, J.M., Su, L., Dukes, B.D., Parsons, S.J. (2001a) Phosphorylation of p190 on Tyr1105 by c-Src is necessary but not sufficient for EGF-induced actin disassembly in C3H10T1/2 fibroblasts. *Journal of Cell Science*, **114**, 1699-1708.
- Haskell, M.D., Slack, J.K., Parsons, J.T., Parsons, S.J. (2001b) c-Src tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, p190RhoGAP, and focal adhesion kinase regulates diverse cellular processes. *Chemical Reviews*, **101**, 2425-2440.
- Haslam, R.J., Koide, H.B. and Hemmings, B.A. (1993) Pleckstrin domain homology. *Nature*, **363**, 309-310.
- Herrmann, C. & Nassar, N. (1996) Ras and its effectors. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, **66**, 1-41.
- Hoffman, G.R., Nassar, N., Oswald, R.E., Cerione, R.A. (1998) Fluoride activation of the Rho family GTP binding protein Cdc42Hs. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 4392-4399.
- Hordijk, P.L., ten Klooster, J.P., van der Kammen, R.A., Michiels, F., Oomen, L.C. and Collard, J.G. (1997) Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science*, **278**, 1464-1466.
- Horwitz, A.R. and Parsons, J.T. (1999) Cell migration-movin' on. *Science* **286**, 1102-1103.
- Hu, K.Q. & Settleman, J. (1997) Tandem SH2 binding sites mediate the RasGAP-RhoGAP interaction: a conformational mechanism for SH3 domain regulation. *EMBO Journal*, **16**, 473-483.
- Ihara, K., Muraguchi S., Kato M., Shimizu T., Shirakawa M., Kuroda S., Kaibuchi K., Hakoshima T. (1998) Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 9656-9666.
- Irvine, R. (1998) Inositol phospholipids: translocation, translocation, translocation. *Current Biology*, **13**, R557-559.
- Itoh, K., Yoshioka, K., Akedo, H., Uehata, M., Ishizaki, T., Narumiya, S. (1999) An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nature Medicine*, **5**, 221-225.

- Jaffer, Z.M. & Chernoff, J. (2002) p21-Activated kinases: three more join the Pak. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **34**, 713-717.
- Joneson, T., McDonough, M., Bar-Sagi, D. & Van Aelst, L. (1996) RAC regulation of actin polymerization and proliferation by a pathway distinct from Jun kinase. *Science* **274**, 1374-1376.
- Jordan, P., Brazao, R., Boavida, M.G., Gespach, C., Chastre, E. (1999) Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene*, **18**, 6835-6839.
- Jou, T.S., Leung, S.M., Fung, L.M., Ruiz, W.G., Nelson, W.J., Apodaca, G. (2000) Selective alterations in biosynthetic and endocytic protein traffic in Madin-Darby canine kidney epithelial cells expressing mutants of the small GTPase Rac1. *Molecular Biology of the Cell*, **11**, 287-304.
- Kaartinen, V., Haataja, L., Nagy, A., Heisterkamp, N., Groffen, J. (2002) TGFbeta3-induced activation of RhoA/Rho-kinase pathway is necessary but not sufficient for epithelio-mesenchymal transdifferentiation: implications for palatogenesis. *International Journal of Molecular Medicine*, **9**, 563-570.
- Kaplan, K.B., Swedlow, J.R., Varmus, H.E., Morgan D.O.J. (1992) Association of p60c-src with endosomal membranes in mammalian fibroblasts. *Journal of Cell Biology*, **118**, 321-333.
- Kawabata, M., Inoue, H., Hanyu, A., Imamura, T., Miyazono, K. (1998) Smad proteins exist as monomers *in vivo* and undergo homo- and heterooligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors. *EMBO Journal*, **17**, 4056-4065.
- Kawano, Y., Fukata, Y., Oshiro, N., Amano, M., Nakamura, T., Ito, M., Matsumura, F., Inagaki, M., Kaibuchi, K. (1999) Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase *in vivo*. *Journal of Cell Biology*, **147**, 1023-1038.
- Kazlauskas, A., Ellis, C., Pawson, T., Cooper, J.A. (1990) Binding of GAP to activated PDGF receptors. *Science*, **247**, 1578-1581.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, K., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, **273**, 245-248.

- Kirsten, W.H. & Mayer, L.A. (1967) Morphologic responses to murine erythroblastosis virus. *Journal of the National Cancer Institute*, **39**, 311-335.
- Kloos, D.U., Choi, C., Wingender, E. (2002) The TGF- β -Smad network introducing bioinformatic tools. *Trends in Genetics*, **18**, 96-103.
- Kmiecik, T.E. (1987) Activation and suppression of pp60c-src transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation. *Cell*, **49**, 65-73.
- Knaus, U.G. & Bokoch, G.M. (1998) The p21Rac/Cdc42-activated kinases (PAKs) *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **30**, 857-862.
- Kobayashi, K., Kuroda, S., Fukata, M., Nakamura, T., Nagase, T., Nomura, N., Matsuura, Y., Yoshida-Kobomura, N., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. (1998) p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 291-295.
- Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F., Ellis, C., Pawson, T. (1991) SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*, **252**, 668-674.
- Koehler, J.A. & Moran, M.F. (2001) Regulation of extracellular signal-regulated kinase activity by p120 RasGAP does not involve its pleckstrin homology or calcium-dependent lipid binding domains but does require these domains to regulate cell proliferation. *Cell Growth and Differentiation*, **12**, 551-561.
- Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M.J., Sternweis, P.M., Singer, W.D., Gilman, A.G., Bollag, G., Sternweis, P.C. (1998) p115 RhoGEF, a GTPase Activating Protein for G α_{12} and G α_{13} . *Science*, **280**, 2109-2111.
- Kulkarni, S.V., Gish, G., van der Geer, P., Henkemeyer, M., Pawson, T. (2000) Role of p120RasGAP in directed cell movement. *Journal of Cell Biology*, **149**, 457-470.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lamarche, N., Tapon, N., Stowers, L., Burbelo, P.D., Aspenström, P., Bridges, T., Chant, J., Hall, A. (1996) Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell*, **87**, 519-529.

- Lamaze, C., Chuang, T.H., Terlecky, L.J., Bokoch, G.M., Schmid, S.L. (1996) Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature*, **382**, 177–179.
- Langbeheim, H., Shih, T.Y., and Scolnick, E.M. (1980) Identification of a normal vertebrate cell protein related to the p21 src of Harvey murine sarcoma virus. *Virology*, **106**, 292-300.
- Laplante, I., Paquin, J., Béliveau, R. (2001) RhoB expression is induced after the transient upregulation of RhoA and Cdc42 during neuronal differentiation and influenced by culture substratum and microtubule integrity. *Developmental Brain Research*, **129**, 157-168.
- Lee, C.H.J., Della, N.G., Chew, C.E., Zack, D.J. (1996) Rin, a neuron-specific and calmodulin-binding small G-protein, and Rit define a novel subfamily of ras proteins. *Journal of Neuroscience*, **16**, 6784-6794.
- Lemmon, M.A., Ferguson, K.M. and Schlessinger, J. (1996) PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell*, **85**, 621-624.
- Lemmon, M.A. and Ferguson, K.M. (2000) Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochemical Journal*, **350**, 1-18.
- Leung, S.M., Rojas, R., Maples, C., Flynn, C., Ruiz, W.G., Jou, T.S., Apodaca, G. (1999) Modulation of endocytic traffic in polarized Madin-Darby canine kidney cells by the small GTPase RhoA. *Molecular Biology of the Cell*, **10**, 4369–4384.
- Levesque, J.P., Sansilvestri, P., Hatzfeld, A., Hatzfeld, J. (1991) DNA transfection in COS cells: a low-cost serum-free method compared to lipofection. *Biotechniques*, **11**, 316-318.
- Lin, X., Liang, M., Feng, X.H. (2000) Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor- β signalling. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 36818-36822.
- Lo, R.S. & Massagué, J. (1999) Ubiquitin-dependent degradation of TGF- β -activated Smad2. *Nature Cell Biology*, **1**, 472-478.
- Lu, W., Katz, S., Gupta, R., Mayer, B.J. (1997) Activation of Pak by membrane localization mediated by an SH3 domain from the adaptor protein Nck. *Current Biology*, **7**, 85-94.

- Mackay, D.J. & Hall, A. (1998) Rho GTPases. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 20685-20688.
- Madaule, P. & Axel, R. (1985) A novel ras-related gene family. *Cell*, **41**, 31-40.
- Madaule, P., Eda, M., Watanabe, N., Fujisawa, K., Matsuoka, T., Bito, H., Ishizaki, T., Narumiya, S. (1998) Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature*, **394**, 491-494.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Narumiya, S. (1999) Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* **285**, 895-898.
- Maesaki, R., Ihara, K., Shimizu, T., Kuroda, S., Kaibuchi, K., Hakoshima, T. (1999) The structural basis of Rho effector recognition revealed by the crystal structure of human RhoA complexed with the effector domain of PKN/PRK1. *Molecular Cell* **4**, 793-803.
- Maesaki, R., Shimizu, T., Ihara, K., Kuroda, S., Kaibuchi, K., Hakoshima, T. (1999) Biochemical and crystallographic characterization of a Rho effector domain of the protein serine/threonine kinase N in a complex with RhoA. *Journal of Structural Biology*, **126**, 166-170.
- Magee, T. & Marshall, C.J. (1999) New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane. *Cell*, **98**, 9-12.
- Manser, E., Huang, H.-Y., Lim, L. (1997) Expression of constitutively active α -Pak reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Molecular and Cellular Biology*, **17**, 1129-1143.
- Marshall, C.J. (1993) Protein prenylation: a mediator of protein-protein-interactions. *Science*, **259**, 1865-1866.
- Massagué, J. (1998) TGF- β signal transduction. *Annual Reviews in Biochemistry*, **67**, 753-791.
- Massagué, J., Blain, S.W., Lo, R.S. (2000) TGF β signalling in growth control, cancer and heritable disorders. *Cell*, **103**, 295-309.
- Massagué, J. & Chen, Y.G. (2000) Controlling TGF- β signalling. *Genes and Development*, **14**, 627-644.

- Matos, P., Skaug, J., Marques, B., Beck, S., Veríssimo, F., Gespach, C., Guida Boavida, M., Scherer, S.W., Jordan, P. (2000) Small GTPase Rac1: structure, localization and expression of the human gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **277**, 741-751.
- Mayer, B.J., Ren, R., Clark, K.L. and Baltimore, D. (1993) A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell*, **73**, 629-630.
- McDonnell, M.W., Simon, M.N. and Studier, F.W. (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *Journal of Molecular Biology*, **110**, 119-146.
- McGlade, J., Brunkhorst, B., Anderson, D., Mbamalu, G., Settleman, J., Dedhar, G., Rozakis-Adcock, M., Chen, L.B., Pawson, T. (1993) The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. *EMBO Journal*, **12**, 3073-3081.
- Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M., Philips, M.R. (2001) Differential Localization of Rho GTPases in Live Cells: Regulation by Hypervariable Regions and RhoGDI Binding. *Journal of Cell Biology*, **152**, 111-126.
- Michiels, F., Stam, J.C., Hordijk, P.L., van der Kammen, R.A., Ruuls-Van Stalle, L., Feltkamp, C.A. and Collard, J.G. (1997) Regulated membrane localization of Tiam1, mediated by the NH₂-terminal pleckstrin homology domain, is required for Rac-dependent membrane ruffling and C-Jun NH₂-terminal Kinase activation. *Journal of Cell Biology*, **137**, 387-398.
- Mira, J.P., Benard, V., Groffen, J., Sanders, L.C., Knaus, U.G. (2000) Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 185-189.
- Miyazono, K. (2000) Positive and negative regulation of TGF-beta signalling. *Journal of Cell Sciences*, **113**, 1101-1109.
- Moon, S.Y. & Zheng, Y. (2003) RhoGTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends in Cell Biology*, **13**, 13-22.
- Moore, M.S. (1998) Ran and nuclear transport. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 22857-22860.

- Moores, S.L., Schaber, M.D., Mosser, S.D., Rands, E., O'Hara, M.B., Garsky, V.M., Marshall, M.S., Pompliano, D.L., Gibbs, J.B. (1991) Sequence dependence of protein isoprenylation. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 14603-14610.
- Moran, M.F., Polakis, P.L., McCormick, F., Pawson, T., Ellis, C. (1991) Protein-tyrosine kinases regulate the phosphorylation, protein interactions, subcellular distribution, and activity of p21ras GTPase-activating protein. *Molecular and Cellular Biology*, **11**, 1804-1812.
- Morreale, A., Venkatesan, M., Mott, H.R., Owen, D., Nietlispach, D., Lowe, P.N., Laue, E.D. (2000) Structure of Cdc42 bound to the GTPase binding domain of PAK. *Nature Structural Biology*, **7**, 384-388.
- Moss, J. & Vaughan, M. (1998) Molecules in the ARF orbit. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 21431-21434.
- Mott, H.R., Owen, D., Nietlispach, D., Lowe, P.N., Manser, E., Lim, L., Laue, E.D. (1999) Structure of the small G protein Cdc42 bound to the GTPase-binding domain of ACK. *Nature*, **399**, 384-388.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology*, **24**, 17-27.
- Nobes, C.D. and Hall, A. (1995) Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, **81**, 53-62.
- Noren, N.K., Liu, B.P., Burridge, K., Kreft, B. (2000) p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *Journal of Cell Biology*, **150**, 567-580.
- Noren, N.K., Niessen, C.M., Gumbiner, B.M., Burridge, K. (2001) Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 33305-33308.
- Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J.H., Stossel, T.P. (1999) The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 2122-2128.
- Olofsson, B. (1999) Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signalling*, **11**, 545-554.

- Parsons, S.J. & Creutz, C.E. (1986) p60c-src activity detected in the chromaffin granule membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **134**, 736-742.
- Parsons, J.T. & Weber, M.J. (1989) Genetics of src: structure and functional organization of a protein tyrosine kinase. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **147**, 79-127.
- Pierreux, C.E., Nicolás, F.J., Hill, C.S. (2000) Transforming growth factor β -independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus. *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 9041-9054.
- Pingoud, A. and Urbanke, C. (1997) Elektrophorese. Arbeitsmethoden der Biochemie (ed. by A. Pingoud & C. Urbanke). Walter de Gruyter, Berlin, New York, pp. 101-131.
- Piwnica-Worms, H., Saunders, K.B., Roberts, T.M., Smith, A.E., Cheng, S.H. (1987) Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of pp60c-src. *Cell*, **49**, 75-82.
- Ponting, C.P. and Phillips, C. (1995) DHR domains in syntrophins, neuronal NO synthases and other intracellular proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, **20**, 102-103.
- Prendergast, G.C. (2001) Farnesyltransferase inhibitors define a role for RhoB in controlling neoplastic pathophysiology. *Histology and Histopathology*, **16**, 269-275.
- Preudhomme, C., Roumier, C., Hildebrand, M.P., Dallery-Prudhomme, E., Lantoine, D., Lai, J.L., Daudignon, A., Adenis, C., Bauters, F., Fenaux, P., Kerckaert, J.P., Galiegue-Zouitina, S. (2000) Nonrandom 4p13 rearrangement of the RhoH/TTF gene, encoding a GTP-binding protein, in non-Hodgkins' lymphoma and multiple myeloma. *Oncogene*, **19**, 2023-2032.
- Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Morii, N., Madaule, P., Narumiya, S. (1996) Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and raphilin in the rho-binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 13556-13560.
- Reiss, Y., Stradley, S.J., Gierasch, L.M., Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1991) Sequence requirement for peptide recognition by rat brain p21ras protein

- farnesyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 732-736.
- Ren, R., Mayer, B.J., Cicchetti, P., Baltimore D. (1993) Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science*, **259**, 1157-1161.
- Ren, X.D., Kiosses, W.B., Schwartz, M.A. (1999) Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO Journal*, **18**, 578-585.
- Renart, J., Reiser, J. and Stark, G.R. (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzylmethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**, 3116-3120.
- Renaudin, A., Lehmann, M., Girault, J.-A., McKerracher, L. (1999) Organization of point contacts in neuronal growth cones. *Journal of Neuroscience Research*, **55**, 458-471.
- Resh, M.D. (1994) Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell*, **11**, 411-413.
- Reynolds, A.B., Vila, J., Lansing, T.J., Potts, W.M., Weber, M.J., Parsons, J.T. (1987) Activation of the oncogenic potential of the avian cellular src protein by specific structural alteration of the carboxy terminus. *EMBO Journal*, **6**, 2359-2364.
- Ridley, A.J. & 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.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, **70**, 401-410.
- Ridley, A.J., Self, A.J., Kasmi, F., Paterson, H.F., Hall, A., Marshall, C.J., Ellis, C. (1993) rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities *in vitro* and *in vivo*. *EMBO Journal*, **12**, 5151-5160.
- Ridley, A.J. (2001) Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends in Cell Biology*, **11**, 471-477.

- Rittinger, K., Walker, P. A., Eccleston, J. F., Nurmahomed, K., Owen, D., Laue, E., Gamblin, S. J. and Smerdon, S. J. (1997) Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature*, **388**, 693–697.
- Rittinger, K., Walker, P. A., Eccleston, J. F., Smerdon, S. J. and Gamblin, S. J. (1997) Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature*, **389**, 758–762.
- Roof, R.W., Haskell, M.D., Dukes, B.D., Sherman, N., Kinter, M., Parsons, S.J. (1998) Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120RasGAP interaction: Tyr 1105 of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation. *Molecular and Cellular Biology*, **18**, 7052-7063.
- Roof, R.W., Dukes, B.D., Chang, J.H., Parsons, S.J. (2000) Phosphorylation of the p190 Rho GAP N-terminal domain by c-Src results in a loss of GTP binding activity. *FEBS Letters*, **472**, 117-121.
- Rümenapp, U., Blomquist, A., Schwörer, G., Schablowski, H., Psoma, A., Jakobs, K.H. (1999) Rho-specific binding and guanine nucleotide exchange catalysis by KIAA0380, a Dbl family member. *FEBS Letters*, **459**, 313-318. [published erratum appears in *FEBS Letters* (2000), **467**, 134-135.]
- Sahai, E., Alberts, A.S., Treisman, R. (1998) RhoA effector mutants reveal distinct effector pathways for cytoskeletal reorganization, SRF activation and transformation. *EMBO Journal*, **17**, 1350-1361.
- Sahai, E., Marshall, C.J. (2002) Rho-GTPases and Cancer. *Nature Reviews Cancer*, **2**, 133-141.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sander, E.E., van Delft, S., ten Klooster, J.P., Reid, T., van der Kammen, R.A., Michiels, F. and Collard, J.G. (1998) Matrix-dependent Tiam1/Rac signalling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Cell Biology*, **143**, 1385-1398.
- Sander, E.E., ten Klooster, J.P., van Delft, S., van der Kammen, R.A. and Collard, J.G. (1999) Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both

- GTPases determines cellular morphology and migratory behaviour. *Journal of Cell Biology*, **147**, 1009-1021.
- Sander, E.E. & Collard, J.G. (1999) Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. *European Journal of Cancer*, **35**, 1905-1911.
- Sanders, L.C., Matsumura, F., Bokoch, G.M., de Lanerolle, P. (1999) Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science*, **283**, 2083-2085.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 5463-5467.
- Sasaki, A., Masuda, Y., Ohta, Y., Ikeda, K., Watanabe, K. (2001) Filamin associates with Smads and regulates transforming growth factor-beta signaling. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 17871-17877.
- Savage, C., Das, P., Finelli, A.L., Townsend, S.R., Sun, C.Y., Baird, S.E., Padgett, R.W. (1996) *Caenorhabditis elegans* genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 790-792.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., and Wittinghofer A. (1997) The Ras-RasGAP complex – structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*, **276**, 333-338.
- Schimmoller, F., Simon, I., & Pfeffer, S.R. (1998) Rab GTPases, directors of vesicle docking. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 22161-22166.
- Schmitz, A.A., Govek, E.E., Bottner, B. and Van Aelst, L. (2000) Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Experimental Cell Research*, **261**, 1-12.
- Schnelzer, A., Prechtel, D., Knaus, U., Dehne, K., Gerhard, M., Graeff, H., Harbeck, N., Schmitt, M., Lengyel, E. (2000) Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform; Rac1b. *Oncogene*, **19**, 3013-3020.
- Schutte, M., Hruban, R.H., Hedrick, L., Cho, K.R., Nadasdy, G.M., Weinstein, C.L., Bova, G.S., Isaacs, W.B., Cairns, P., Nawroz, H., Sidransky, P., Casero, R.A. Jr, Meltzer, P.S., Hahn S.A., Kern, S.E. (1996) DPc4 gene in various tumor types. *Cancer Research*, **56**, 2527-2530.

- Scolnick, E.M., Papageorge, A.G., Shih, T.Y. (1979) Guanine nucleotide-binding activity as an assay for src protein of rat-derived murine sarcoma viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**, 5355-5359.
- Seabra, M.C., Reiss, Y., Casey, P.J., Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1991) Protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase share a common α subunit. *Cell*, **65**, 429-434.
- Seabra, M.C. (1998) Rho/Rac proteins: Prenylation, membrane association and targeting. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 5289-5292.
- Seeburg, P.H., Colby, W.W., Capon, D.J., Goeddel, D.V. and Levinson, A.D. (1984) Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12. *Nature*, **312**, 71-75.
- Sekelsky, J.J., Newfeld, S.J., Raftery, L.A., Chartoff, E.H., Gelbart, W.M. (1995) Genetic characterization and cloning of mothers against *dpp*, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **139**, 1347-1358.
- Sells, M.A., Knaus, U.G., Ambrose, D., Bagrodia, S., Bokoch, G.M., Chernoff, J. (1997) Human p21 activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Current Biology*, **7**, 202-210.
- Sells, M.A., Boyd, J.T., Chernoff, J. (1999) p21-activated kinase 1 (Pak1) regulates cell motility in mammalian fibroblasts. *Journal of Cell Biology*, **145**, 837-849.
- Settleman, J., Albright, C.F., Foster, L.C., Weinberg, R.A. (1992a) Association between GTPase activators for Rho and Ras families. *Nature*, **359**, 153-154.
- Settleman, J., Narasimhan, V., Foster, L.C., Weinberg, R.A. (1992b) Molecular cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190: implications for a signalling pathway from ras to the nucleus. *Cell*, **69**, 539-549.
- Shapiro, A.L., Vinuela, E. and Maizel, Jr. J.V. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, **28**, 815-820.
- Shaw, G. (1996) The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. *BioEssays*, **18**, 35-46.

- Shih, T.Y., Weeks, M.O., Young, H.A., Scolnick, E.M. (1979) Identification of a sarcoma virus-coded phosphoprotein in nonproducer cells transformed by Kirsten or Harvey murine sarcoma virus. *Virology*, **96**, 64-79.
- Slamon, D.J., deKernion, J.B., Verma, I.M. and Cline, M.J. (1984) Expression of cellular oncogenes in human malignancies. *Science*, **224**, 256-262.
- Somsel-Rodman, J. and Wandering-Ness, A. (2000) Rab GTPases coordinate endocytosis. *Journal of Cell Science*, **113**, 183-192.
- Soncini, C., Berdo, I., Draetta, G. (2001) Ras-GAP SH3 domain binding protein (G3BP) is a modulator of USP10, a novel human ubiquitin specific protease. *Oncogene*, **20**, 3869-3879.
- Souchelnytskyi, S., Tamaki, K., Engström, U., Wernstedt, C., ten Dijke, P., Heldin, C.-H. (1997) Phosphorylation of Ser465 and Ser467 (SSXS-motif) in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signalling. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 28107-28115.
- Srivastava, S.K., Wheelock, R.H., Aaronson, S.A. and Eva, A. (1986) Identification of the protein encoded by the human diffuse B-cell lymphoma (dbl) oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**, 8868-8872.
- Stam, J.C., Sander, E.E., Michiels, F., van Leeuwen, F.N., Kain, H.E.T., van der Kammen, R.A. and Collard, J.G. (1997) Targeting of Tiam1 to the plasma membrane requires the cooperative function of the N-terminal pleckstrin homology domain and an adjacent protein interaction domain. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 28447-28454.
- Stam, J.C. and Collard, J.G. (1999) The DH protein family, exchange factors for Rho-like GTPases. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, **22**, 51-83.
- Sussman, D.J. and Milman, G. (1984) Short-term, high-efficiency expression of transfected DNA. *Molecular & Cellular Biology*, **4**, 1641-1643.
- Studier, F.W. and Moffat, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, **189**, 113-130.

- Tatsis, N., Lannigan, D.A., Macara, I.G. (1998) The function of the p190 Rho GTPase-activating protein is controlled by its N-terminal GTP binding domain., *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 34631-34638.
- ten Dijke, P., Miyazono, K., Heldin, C.H. (2000) Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, **25**, 64-70.
- Thomas, S.M. & Brugge, J.S. (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annual Reviews in Cell and Developmental Biology*, **13**, 513-609.
- Uchida, K., Nagatake, M., Osada, H., Yatabe, Y., Kondo, M., Mitsudomi, T., Masuda, A., Takahashi, T., Takahashi, T. (1996) Somatic *in vivo* alterations of the JV18-1 gene at 18q1 in human lung cancers. *Cancer Research*, **56**, 5583-5585.
- Ueda, M., Oho, C., Takisawa, H., Ogihara, S. (1992) Interaction of the low-molecular-mass, guanine-nucleotide-binding protein with the actin-binding protein and its modulation by the cAMP-dependent protein kinase in bovine platelets. *European Journal of Biochemistry*, **203**, 347-352.
- van Aelst, L., Joneson, T., Bar-Sagi, D. (1996) Identification of a novel Rac1-interacting protein involved in membrane ruffling. *EMBO Journal*, **15**, 3778-3786.
- van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes and Development*, **11**, 2295-2322.
- van Horck, F.P.G., Ahmadian, M.R., Haeusler, L.C., Moolenaar, W.H., Kranenburg, O. (2001) Characterization of p190RhoGEF, a RhoA-specific guanine nucleotide exchange factor that interacts with microtubules. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 4948-4956.
- van Leeuwen, F.N., van Delft, S., Kain, H.E., van der Kammen, R.A., Collard, J.G. (1999) Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading. *Nature Cell Biology*, **1**, 242-248.
- Vignal, E., De Toledo, M., Comunale, F., Ladopoulou, A., Gauthier-Rouviere, C., Blangy, A. and Fort, P. (2000) Characterization of TCL, a New GTPase of the Rho Family related to TC10 and Cdc42. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 36457-36464.

- Vincent, S. & Settleman, J. (1999) Inhibition of RhoGAP activity is sufficient for the induction of Rho-mediated actin reorganization. *European Journal of Cell Biology*, **78**, 539-548.
- Völkert, M., Wagner, M., Peters, C., Waldmann, H. (2001) The chemical biology of Ras lipidation. *Biological Chemistry*, **382**, 1133-1145.
- Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M. & Cooper, J.A. (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*, **74**, 205-214.
- Vojtek, A.B. & Der, C.J. (1998) Increasing complexity of the Ras signalling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 19925-19928.
- Wakefield, L.M. & Roberts, A.B. (2002) TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Current Opinion in Genetics & Development*, **12**, 22-29.
- Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T., Narumiya, S. (1999) Cooperation between mDial1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nature Cell Biology*, **1**, 136-143.
- Wei, Y., Zhang, Y., Derewenda, U., Liu, X., Minor, W., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P., Derewenda, Z.S. (1997) Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nature Structural Biology*, **4**, 699-703.
- Wells, C.D., Liu, M.Y., Jackson, M., Gutowski, S., Sternweis, P.M., Rothstein, J.D., Kozasa, T., Sternweis, P.C. (2002) Mechanisms for reversible regulation between Gai3 and Rho exchange factors. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 1174-1181.
- Wilson, L.K., Luttrell, D.K., Parsons, J.T., Parsons, S.J. (1989) pp60c-src tyrosine kinase, myristylation, and modulatory domains are required for enhanced mitogenic responsiveness to epidermal growth factor seen in cells overexpressing c-src. *Molecular and Cellular Biology*, **9**, 1536-1544.
- Whitehead, I.P., Campbell, S., Rossman, K.L. and Der, C.J. (1997) Dbl family proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1332**, F1-23.
- Whitman, M. (1998) Smads and early developmental signalling by the TGF β superfamily. *Genes and Development*, **12**, 2445-2462.
- Wittinghofer, A., Scheffzek, K. and Ahmadian, M.R. (1997) The interaction of Ras with GTPase-activating proteins. *FEBS Letters*, **410**, 63-67.

- Wittinghofer, A. and Waldmann, H. (2000) Ras - A molecular switch involved in tumor formation. *Angewandte Chemie – International Edition*, **39**, 4193-4214.
- Yaffe, M.B. (2002) Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nature Reviews*, **3**, 177-186.
- Yokoyama, K., Goodwin, G.W., Ghomashshi, F., Glomset, J.A., Gelb, M.H. (1991) A protein geranylgeranyl-transferase from bovine brain: implications for protein prenylation specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 5302-5306.
- Yuan, B.Z., Miller, M.J., Keck, C.L., Zimonjic, D.B., Thorgeirsson, S.S., Popescu, N.C. (1998) Cloning, characterization and chromosomal localization of a gene frequently deleted in human liver cancer (DLC-1) homologous to rat RhoGAP. *Cancer Research*, **58**, 2196-2199.
- Zabner, J., Fasbender, A.J., Moninger, T., Poellinger, K.A. and Welsh, M.J. (1995) Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 18997-19007.
- Zhang, Y., Chang, C., Gehling, D.J., Hemmati-Brivanlou, A., Derynck, R. (2001) Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 974-979.
- Zhao, Z. S., Manser, E., Chen, X. Q., Chong, C., Leung, T., Lim, L. (1998) A conserved negative regulatory region in α PAK: inhibition of PAK kinases reveals their morphological roles downstream of Cdc42 and Rac1. *Molecular and Cellular Biology*, **18**, 2153-2163.
- Zheng, Y. (2001) Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends in Biochemical Sciences*, **26**, 724-732.
- Zondag, G.C., Evers, E.E., ten Klooster, J.P., Janssen, L., van der Kammen, R.A., Collard, J.G. (2000) Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Biology*, **149**, 775-782.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1999 bis März 2003 in der Abteilung für Strukturelle Biologie des Max-Planck-Instituts für Molekulare Physiologie in Dortmund unter der Anleitung von Dr. M.R. Ahmadian angefertigt.

Prof. A. Wittinghofer danke ich für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Dissertation in seiner Abteilung.

Dr. M.R. Ahmadian danke ich für das interessante Thema, die gute Betreuung und viele hilfreiche Diskussionen.

Prof. E. Knust danke ich für die Anfertigung des Erstgutachtens.

Prof. J.F. Ernst danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Dr. S. Hahn und seinen Mitarbeitern danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern der Abteilung Strukturelle Biologie für das angenehme Arbeitsklima.

Bei P. Stege möchte ich mich für die hervorragende Einarbeitung, die Unterstützung bei allen praktischen Problemen im Labor und die Übernahme von Klonierungen bedanken.

D. Kühlmann, die sich in meiner Abwesenheit immer sehr sorgsam um meine Zellen gekümmert hat, gilt mein weiterer Dank.

Vielen Dank auch an die Laborkollegen L. Blumenstein, L.C. Häusler, L. Hemsath, D. Fiegen, K. Uhlenbrock, A. Eberth und W. Leibig. Ohne ihr Interesse an meiner Arbeit und ohne ihre Scherze hätte die Zeit am MPI nur halb so viel Spaß gemacht.

Spezieller Dank gilt H. Rehmann, der zur Entstehung der Grafiken in dieser Arbeit beigetragen hat und viele Anregungen zur Diskussion gegeben hat.

Den Beschäftigten der zentralen Einrichtungen des Max-Planck-Instituts danke ich für ihre freundliche Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglichten, und mich auch ansonsten in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

W. Simon danke ich für seine Hilfe bei allen Computerproblemen und dafür, dass er immer Verständnis für meine Arbeit aufgebracht hat.

S. van Straelen, Dr. D. Manteuffel, N. & A. Pangerl sowie Familie Schönknecht-Wefers danke ich für ihre langjährige Freundschaft.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation eigenständig, ohne unerlaubte Hilfe und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die vorgelegte Dissertation ist in der vorliegenden oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht worden.

Duisburg, im März 2003

(Ulrike Herbrand)

