



Regulatorische Mechanismen der unkonventionellen Rho-GTPase Wrch1 in der Signaltransduktion

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sarah Lioba Riße
aus Haltern am See

Düsseldorf, Januar 2013

aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: PD Dr. Mohammad Reza Ahmadian
Korreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.13

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Signaltransduktion durch kleine GTPasen	1
1.2 Rho-GTPasen und ihre Regulatoren.....	4
1.3 Cdc42-ähnliche GTPasen.....	9
1.3.1 Wrch1 und Chp.....	10
1.4 Potentielle Effektoren von Wrch1	13
1.4.1 PAK1	14
1.4.2 Pyk2	15
1.4.3 N-WASp	16
1.5 SH3-Domänen besitzende Adapterproteine.....	19
1.5.1 Grb2	22
1.5.2 Nck.....	24
1.5.3 Crk.....	25
1.5.4 Src.....	26
1.5.5 p120	28
2 Zielsetzung.....	30
3 Material und Methoden.....	31
3.1 Material.....	31
3.1.1 Bakterienstämme.....	31
3.1.2 Nährmedien und Antibiotika.....	31
3.1.3 Eukaryotische Zelllinien	32
3.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze.....	32
3.1.5 Puffer und Lösungen	33
3.1.6 Antikörper	35
3.1.7 Biochemikalien und Chemikalien	36
3.1.8 Chemikalien.....	38
3.1.9 Kit-Systeme	38
3.1.10 Verbrauchsmaterialien.....	38
3.1.11 Geräte	38
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	40
3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA	40
3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	40
3.2.3 Transformation von <i>E. coli</i>	41
3.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	41
3.2.5 DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen	44
3.2.6 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	44
3.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten	45

3.2.8	DNA- Sequenzierung.....	45
3.2.9	Lagerung transformierter Bakterienstämme.....	45
3.3	Proteinchemische Methoden	45
3.3.1	Präparative Produktion rekombinanter Proteine	45
3.3.2	Präparativer Zellaufschluss	46
3.3.3	Chromatographische Verfahren.....	46
3.3.4	Umkehrphasen HPLC.....	48
3.3.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
3.3.6	Western Blot.....	51
3.3.7	Immunologischer Nachweis von Proteinen (Immunoblotting)	51
3.3.8	Ultrafiltration zur Konzentrierung	52
3.3.9	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	53
3.3.10	Nukleotidaustausch	53
3.3.11	Analytische Gelfiltration	55
3.3.12	Affinitätspräzipitation (Pulldown-Assay) und Sedimentationsassay.....	55
3.3.13	Fluoreszenzspektroskopie	57
3.3.14	Isotherme Titrationsmikrokalorimetrie (ITC).....	58
3.4	Zellbiologische Methoden	59
3.4.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	59
3.4.2	Auftauen von Zellen.....	60
3.4.3	Passagieren von eukaryotischen Zellen	60
3.4.4	Bestimmung der Zellzahl	60
3.4.5	Kryokonservierung von Zellen	60
3.4.6	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	61
3.4.7	Zellyse eukaryotischer Zellen.....	61
4	Ergebnisse	62
4.1	Proteinisolierung	62
4.1.1	Effektoren	63
4.1.2	Adaptoren.....	65
4.1.3	GTPase aktivierende Proteine (GAPs)	66
4.1.4	GTPasen	67
4.1.5	Peptide	68
4.2	Wrch1 intramolekulare Interaktion	69
4.2.1	Bestimmung des für die Interaktionsstudien geeigneten fluoreszenzmarkierten Nukleotids für Wrch1	69
4.2.2	Nukleotidaustausch/Nukleotidbefreiung.....	70
4.2.3	Nukleotidassoziation und -dissoziation	71
4.2.4	Intrinsische GTP-Hydrolyse	72
4.3	Wrch1 intermolekulare Interaktion	75
4.3.1	Regulatoren.....	75
4.3.2	Adaptoren.....	77
4.3.3	Effektoren	91
4.3.4	Komplexe aus Wrch1-Effektoren-Adaptoren.....	97

5	Diskussion	100
5.1	Intramolekulare Interaktion von Wrch1	102
5.2	Intermolekulare Interaktion von Wrch1 mit Regulatoren, Effektoren und Adaptoren	105
6	Zusammenfassung	120
7	Literaturverzeichnis.....	124

Erklärung

Danksagung

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Mitglieder der Rho-Familie.	5
Tabelle 3.1: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele.	50
Tabelle 3.2: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele nach Schägger und von Jagow (Tricinegele).	50
Tabelle 4.1: Datenbankidentifikationsnummern der verwendeten cDNAs.	62
Tabelle 4.2: Konstrukte der Effektorproteine.	64
Tabelle 4.3: Konstrukte der Adapterproteine.	65
Tabelle 4.4: Konstrukte der GTPase aktivierenden Proteine.	66
Tabelle 4.5: Konstrukte der Guaninnukleotid-bindenden Proteine.	68
Tabelle 4.6: N-terminale Peptide der GTPase Wrch1.	69
Tabelle 4.7: Vergleich von nWrch1 und nChp in der Interaktion mit SH3- Domänen.	82
Tabelle 4.8: Bindungsaffinitäten und Interaktionsparameter von synthetischen Peptiden des mittleren PxxP-Motivs von nWrch1 (P ₂) und SH3-Domänen von Adapterproteinen.	87
Tabelle 4.9: Bindungsaffinitäten und Interaktionsparameter von dem N- Terminus von Wrch1 (nWrch1), dem mittleren PxxP-Motiv von nWrch1 (P ₂) und dem N-Terminus von Chp (nChp) und den Adapterproteinen Grb2 fl und Nck1 fl.	89

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Schalterfunktion kleiner GTPasen.....	3
Abbildung 1.2:	Einteilung der Rho-GTPasen	6
Abbildung 1.3:	Strukturmodelle von RhoA	7
Abbildung 1.4:	Sequenzvergleich der fünf Cdc42-ähnlichen GTPasen mit schematischer Darstellung der sekundären Struktur	10
Abbildung 1.5:	Wrch1 gehört zu der Gruppe der konventionellen GTPasen mit untypischen Eigenschaften.....	12
Abbildung 1.6:	Die potentiellen Effektoren von Wrch1 sind an verschiedenen Signaltransduktionskaskaden beteiligt.	14
Abbildung 1.7:	Struktur der N-terminalen SH3-Domäne von Grb2.....	20
Abbildung 1.8:	Funktionen von SH3-Domänen.....	21
Abbildung 4.1:	Reinigung von PAK1 fl.	64
Abbildung 4.2:	Schematische Darstellung der Domänenstruktur und Konstrukte der verwendeten Effektoren.	65
Abbildung 4.3:	Schematische Darstellung der Domänenstruktur und Konstrukte der verwendeten Adaptern.	66
Abbildung 4.4:	Schematische Darstellung der Domänenstruktur und Konstrukte der verwendeten GAP-Proteine.....	67
Abbildung 4.5:	Schematische Darstellung der Domänenstruktur und Konstrukte der verwendeten GTPasen.	68
Abbildung 4.6:	Bestimmung des für die Interaktionsstudien geeigneten fluoreszenzmarkierten Nukleotids	70
Abbildung 4.7:	Nukleotidassoziation und -dissoziation von Wrch Δ NAC und tGppNHp	72
Abbildung 4.8:	Intrinsische GTP-Hydrolyse von Wrch1 und Cdc42	74
Abbildung 4.9:	Intrinsische GTP-Hydrolyse von Wrch1.....	76
Abbildung 4.10:	GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse von Wrch1.....	77
Abbildung 4.11:	Bestimmung der Protein-Protein Interaktion zwischen nWrch1 und verschiedenen Adapterproteinen	78
Abbildung 4.12:	Struktur, Sequenz und Interaktion zwischen SH3- Domänen und nWrch1	80
Abbildung 4.13:	Sequenzvergleich der N-terminalen Aminosäuren von Wrch1 und Chp.	83
Abbildung 4.14:	Bestimmung des Bindungsmotivs zwischen SH3- Domänen und nWrch1.	85
Abbildung 4.15:	ITC-Experimente zwischen Konstrukten von Wrch1 und den <i>full length</i> Adapterproteinen Grb2 fl und Nck1 fl.	90
Abbildung 4.16:	Bestimmung des für die Interaktionsstudien zwischen Wrch1 und Effektoren geeigneten, fluoreszenzmarkierten Nukleotids	92
Abbildung 4.17:	Effektorassoziation von Wrch1 und Cdc42.....	93

Abbildung 4.18: Sedimentationsassay mit GST-Effektoren und Cdc42 oder Wrch1	95
Abbildung 4.19: Sedimentationsassay mit GST-Effektoren und Wrch1- <i>flag</i> aus transfizierten HeLa-Zelllysaten	96
Abbildung 4.20: Komplexbildung zwischen Adapterproteinen, Wrch1- <i>flag</i> und GST-PAK1 fl.....	97
Abbildung 4.21: Komplexbildung zwischen endogenen Effektoren, endogenen Adapterproteinen und GST-nWrch1	98
Abbildung 5.1: Übersicht des hypothetischen regulatorischen Mechanismus und der Funktion von Wrch1	101
Abbildung 5.2: Möglicher Funktionsmechanismus von Wrch1 vermittelt durch Avidität	117
Abbildung 5.3: Möglicher Funktionsmechanismus von Wrch1 mit Grb2 und PAK1 oder WASp.....	118

Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
Abr	<i>active bcr-related</i>
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxosulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat

B

bidest.	<i>bidestillata</i> (zweifach destilliert)
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise

C

C-Terminus	Carboxyterminus
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
Cdc42	<i>cell division cycle 42</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i> (Fadenwurm)
cDNA	komplementäre DNA
Chp	<i>Cdc42 homologous protein</i>
CRIB	<i>Cdc42/Rac1 interactive binding</i>
Crk	<i>chicken tumour virus no. 10 (CT10) regulator of kinase</i>
cSrc	zelluläres Src (<i>cellular src</i>)
Cy3	Cyanin

D

Dbl	<i>diffuse B-cell lymphoma</i>
DH	<i>Dbl homology</i>
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DLC	<i>deleted in liver cancer</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat

DTE	Dithioerythritol
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERM	Ezrin/Radixin/Moesin
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (und Co-Autoren)
etc.	<i>et cetera</i>
F	
F-Aktin	filamentöses Aktin
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
fl.	volle Länge (<i>full length</i>)
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
G	
g	Erdbeschleunigung
G-Aktin	globuläres Aktin
G-Domäne	Guaninnukleotid-bindende Domäne
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GBD	GTPase-bindende Domäne
GDI	Guaninnukleotiddissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor
GMP	Guanosinmonophosphat
GP	Gesamtprotein
GppCH ₂ p	Guanosin-5'-(β,γ-methylen)-triphosphat
GppNHp	Guanosin-5'-(β,γ-imido)-triphosphat
Graf	<i>GTPase-regulator associated with focal adhesion kinase</i>
Grb	<i>growth factor receptor-bound protein</i>
GSH	reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
H	
h	hora (Stunde)
H-Ras	Harvey-Ras

His ₆	Peptid aus 6 Histidinen
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
I	
IPTG	Isopropyl-β -D-thiogalactosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
K	
K _A	Assoziationskonstante
kcal	Kilokalorie
k _{cat}	maximale Geschwindigkeitskonstante
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
k _{off}	Dissoziationskonstante
k _{on}	Assoziationskonstante
L	
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
M	molar, Mol pro Liter
mant	N-Methylantraniloyl
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
mg	Milligramm
MgcRac	<i>male germ cell Rac GTPase-activating protein</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
N	
N-Terminus	Aminoterminus
N-WASp	neuronales WASp
Nck	<i>non-catalytic region of tyrosine kinase</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer

O

OD optische Dichte

OPHN1 Oligophrenin-1

P

P-reich Prolin-reich

p120 *RAS p21 protein activator*p190 *p190 Rho GTPase-activating protein*p50 *p50 Rho GTPase-activating protein*

PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PAK *p21 activated protein kinase*PBS *phosphate-buffered saline*PCR Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*)PDB *protein database*

PDE Phosphodiesterase

PDGF *platelett-derived growth factor*PH *Pleckstrin homology*pH pH-Wert (*potentia hydrogenii*)

PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid

Pyk *proline-rich-tyrosine kinase***R**Rab *ras-like proteins from brain*Rac *ras related C3 botulinum toxin substrate*Rad *ras associated with diabetes*Raf *rapid fibrosarkoma*Rag *Ras-related GTP-binding protein*Ran *ras related nuclear proteins*Ras *rat sarcoma*Rheb *Ras homolog enriched in brain*Rho *ras homologous*Rif *Rho in filopodia*Rit *Ras-like protein in many tissues**rn* *rattus norvegicus*

RNA Ribonukleinsäure

rpm Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*)

RT Raumtemperatur

RTK Rezeptortyrosinkinase

S

SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	<i>src homology 2 domain</i>
SH3	<i>src homology 3 domain</i>
Sos	<i>son of sevenless</i>
Src	<i>Rous sarcoma virus gene</i>

T

Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
tamra	Tetramethylrhodamine
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TB	<i>terrific broth</i>
TBA	Tetrabutylammoniumbromid
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween-20</i>
TC10	teratocarcinoma 10
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TCL	<i>TC10 like</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaureat

U

U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett

V

V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumenprozent
VCA	<i>verprolin homology, central region / cofilin homology, acidic region</i>
vSrc	virales Src

W

w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
WAS	Wiskott-Aldrich Syndrom
WASp	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
WH	<i>WASp homology</i>
WIP	<i>WASp interacting protein</i>
Wrch	<i>Wnt1-responsive Cdc42 homolog</i>
wt	Wildtyp

Z

z.B.	zum Beispiel
------	--------------

Abkürzungsverzeichnis der Aminosäuren

Die 20 Aminosäuren werden mit dem Ein- bzw. Drei-Buchstaben-Code abgekürzt.

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat/Asparaginsäure
E	Glu	Glutamat/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

Ein Organismus besteht aus funktionellen Einheiten, wobei die kleinste dieser Einheiten die Zelle darstellt. Die Funktion einer Zelle beruht auf vielen Einzelreaktionen, die in geordneter Reihenfolge nacheinander oder parallel ablaufen und dadurch ein komplexes Netzwerk aus biochemischen Prozessen darstellen. Interzelluläre Signale bewirken an der Zellmembran die Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden. Dadurch wird eine Weiterleitung, Amplifikation, aber auch Modifikation, Verschaltung und Inhibierung der Signale ausgelöst und eine Zellantwort hervorgerufen. Die Zellantwort besteht häufig in der Expression eines oder mehrerer Gene und bewirkt dadurch grundlegende Vorgänge, wie Proliferation, Differenzierung, Migration und programmierter Zelltod (Apoptose). Die an diesen Prozessen beteiligten Proteine bestehen ihrerseits aus funktionellen Bausteinen, die als Domänen bezeichnet werden. Klassifiziert werden Domänen aufgrund ihrer Struktur und Funktion. Viele Proteine besitzen dabei verschiedene Domänen und haben somit eine Vielzahl von Funktionen und können unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Sobald eine der Funktionen nicht mehr ausgeführt werden kann, kommt es zu Fehlern in der Signaltransduktion, wobei es häufig zum Verlust oder zu einer permanenten Stimulation eines Signalweges kommt. Je nach Bedeutung des Signalweges kann dies extreme Folgen haben, wie beispielsweise den ungewollten Zelltod, der zu degenerativen Krankheiten führen kann, oder wie eine unkontrollierte Zellteilung, die eine Ursache für die Entstehung von Krebs sein kann.

1.1 Signaltransduktion durch kleine GTPasen

Guaninnukleotid-bindende Proteine sind an verschiedenen intrazellulären Signalwegen beteiligt und lassen sich aufgrund verschiedener Sequenzhomologien und Funktionen in fünf Superfamilien einteilen [Bourne et al., 1991]: 1. Heterotrimere G-Proteine, 2. Kleine GTPasen der Ras-Superfamilie, 3. Translationsfaktoren, 4. Signalerkennungspartikel, 5. Große GTP-bindende Proteine.

Die Ras-Superfamilie stellt die größte der fünf Guaninnukleotid-bindenden Superfamilien dar. Sie lässt sich aufgrund von Sequenzhomologien in mindestens fünf Unterfamilien weiter untergliedern [Takai et al., 2001; Colicelli, 2004; Wennerberg et al., 2005]:

1. Ras-Proteine (*rat sarcoma*) regulieren die Apoptose, Proliferation und Differenzierung eukaryotischer Zellen [Vojtek und Der, 1998].

2. Rho-Proteine (*ras homologous*) sind an der Reorganisation des Zytoskeletts, der Kontrolle der Genexpression und dem Zellwachstum beteiligt [Mackay und Hall, 1998; Sander und Collard, 1999].
3. Rab-Proteine (*ras like proteins from rat brain*) regulieren den Vesikeltransport [Schimmoller et al., 1998; Somsel Rodman und Wandinger-Ness, 2000].
4. Arf-Proteine (*ADP-ribosylation factor*) steuern die Bildung von Vesikeln, ihren Transport von und zum Endoplasmatischen Retikulum sowie zum Golgi-Apparat [Moss und Vaughan, 1998; Jackson und Casanova, 2000].
5. Die Ran-Proteine (*ras related nuclear transport*) haben eine Beteiligung am Kerntransport [Moore, 1998].

Alle Guaninnukleotid-bindende Proteine besitzen eine G-Domäne, die sich durch ihre Fähigkeit auszeichnet, Nukleotide zu binden. Sie besteht aus fünf konservierten Sequenzmotiven (G1-G5) [Bourne et al., 1991]. Die G1-Region (P-Loop), die am höchsten konserviert ist, ist für die Bindung des α - und β -Phosphats sowie des Magnesium Ions verantwortlich [Saraste et al., 1990]. Die G2-Region enthält ein invariantes Threonin 35 (bei Ras), welches das Magnesium Ion und das γ -Phosphat des Nukleotids koordiniert und einen Teil der *Switch I* Region und der Effektor-Schleife bildet. Die G3-Region bildet einen Teil der *Switch II* Region und beinhaltet zwei konservierte Aminosäuren: Aspartat und Glycin (AS 57 und 60 bei Ras). Das Glycin ist an der Koordination des γ -Phosphats beteiligt und das Aspartat an der des Magnesium Ions. Das Glycin zusammen mit dem Threonin 35 gilt als Sensor für den nukleotidegebundenen Zustand, da sie das γ -Phosphat koordinieren. Die G4- und G5-Region sind für die Erkennung der Guanin Base verantwortlich.

Die kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie unterscheiden sich von anderen Guaninnukleotid-bindenden Proteinen dadurch, dass sie fast ausschließlich aus der G-Domäne bestehen und in der Zelle als Monomere vorliegen. Sie sind molekulare Schalter, da sie zwischen einer aktiven und inaktiven Konformation wechseln können [Vetter und Wittinghofer, 2001]. Die Strukturunterschiede der beiden Konformationen beziehen sich dabei hauptsächlich auf zwei Bereiche der Nukleotidbindungstasche, die sogenannten *Switch I* und *Switch II* Regionen der GTPase. Im aktiven Zustand liegt die GTPase in GTP-gebundener Form vor, im inaktiven Zustand hat sie GDP gebunden [Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997; Symons und Settleman, 2000]. Durch den Austausch von GDP zu GTP und die Hydrolyse

von gebundenem GTP zirkulieren GTPasen zwischen den beiden Konformationszuständen (Abb. 1.1).

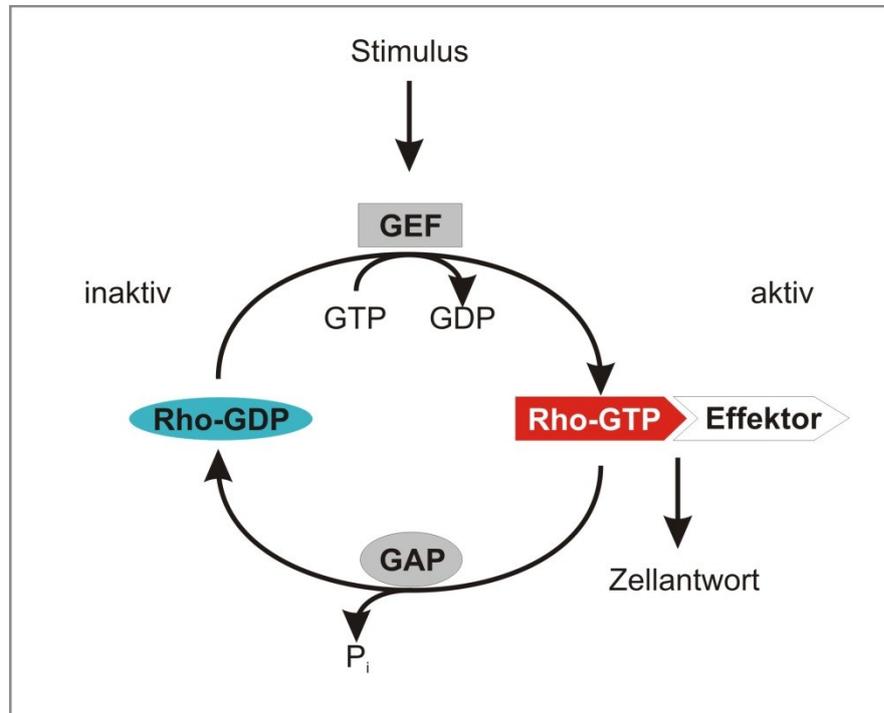


Abbildung 1.1: Schalterfunktion kleiner GTPasen.

Die intrinsischen Reaktionen der jeweiligen Konformationswechsel laufen dabei normalerweise sehr langsam ab. Sie werden durch Regulatoren um ein Vielfaches beschleunigt. GEF-Proteine (*guanine nucleotide exchange factors*) katalysieren den Austausch von GDP zu GTP, das in viel höheren Konzentrationen als GDP in der Zelle vorliegt, indem sie die Affinität für das gebundene Nukleotid herabsetzen und aktivieren dadurch GTPasen [Whitehead et al., 1997; Rossman et al., 2005]. GAP-Proteine (*GTPase-activating proteins*) beschleunigen die Hydrolyse von GTP zu GDP durch die Abspaltung des γ -Phosphats und kontrollieren damit die Inaktivierung von GTPasen [Scheffzek et al., 1998; Bernards und Settleman, 2004]. Nur im aktiven Zustand können Effektorproteine an die GTPase binden und führt zu Konformations- und Lokalisationsänderungen der Effektoren, wodurch diese mit anderen Proteinen interagieren können [Herrmann, 2003].

Eine weitere Gruppe der Regulatoren von Rho- und Rab-GTPasen stellen die GDI-Proteine (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*) dar. Sie binden meist an die inaktive Form der GTPase und inhibieren deren Aktivierung durch GEF-Proteine sowie die Membranlokalisation [Geyer und Wittinghofer, 1997; Olofsson, 1999; DerMardirossian und Bokoch, 2005]. GDIs binden dabei an den posttranslational

modifizierten C-Terminus der GTPase, die sogenannte CaaX-Sequenz, der für die Membranbindung verantwortlich ist [Gosser et al., 1997; Keep et al., 1997; Hoffman et al., 2000; Scheffzek et al., 2000]. Die CaaX-Sequenz (C für Cystein, a für aliphatische Aminosäure und X für eine beliebige Aminosäure) ist typisch für einen Großteil der GTPasen [Adamson et al., 1992; Michaelson et al., 2001] und für deren biologische Funktionalität von hoher Bedeutung. Katalysiert durch die Farnesyltransferase (FTase) bzw. die Geranylgeranyltransferase (GGTase) wird ein Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Rest kovalent an das Cystein der CaaX-Sequenz gebunden und die GTPase dadurch prenyliert [Sebti und Hamilton, 2000; Cox und Der, 2002]. Die Art der Modifikation wird bedingt durch die letzte Aminosäure (das X). Ser, Gln, Met und Ala bewirken eine Farnesylierung, wohingegen Leu zu einer Geranylgeranylierung führt [Casey et al., 1991; Moores et al., 1991; Reiss et al., 1991; Yokoyama et al., 1991; Roskoski und Ritchie, 1998]. Danach werden die drei C-terminalen Aminosäuren durch eine Endopeptidase abgespalten und die Carboxylgruppe des endständige Cystein durch eine Methyltransferase methyliert [Gutierrez et al., 1989; Hancock et al., 1991]. Einige GTPasen werden zusätzlich zu oder anstelle der Prenylierung palmitoyliert, meist an einem Cystein oberhalb der CaaX-Sequenz [Linder und Deschenes, 2003]. Hierbei handelt es sich um einen reversiblen Prozess, bei dem eine Palmitoyl-Fettsäure über eine Thioesterbindung an ein Protein gebunden wird und ebenfalls der Membranlokalisation dient [Resh, 1999].

1.2 Rho-GTPasen und ihre Regulatoren

Die Familie der Rho-GTPasen umfasst 18 Mitglieder, die aufgrund ihrer Sequenzhomologien und biologischen Funktion in fünf Untergruppen eingeteilt werden können (Tab. 1.1) [Wennerberg und Der, 2004]. Sie besitzen Sequenzhomologien zwischen 40 und 95 %, wobei einige GTPasen keiner Unterfamilie zugeteilt werden können (RhoD, RhoH, Rif). Es gibt fünf weitere Proteine (Miro1 und 2; RhoBTB1, 2 und 3), die den Rho-GTPasen ähneln, aber neben der G-Domäne keine besonders hohe Sequenzkonservierung aufweisen und deswegen nur als umstrittene Mitglieder der Rho-GTPasen gelten.

Tabelle 1.1: Mitglieder der Rho-Familie.

Rho Gruppe	Rac Gruppe	Cdc42 Gruppe	Rnd Gruppe	andere
RhoA	Rac1	Cdc42	Rnd1	RhoD
RhoB	Rac2	TC10	Rnd2	RhoH
RhoC	Rac3	TCL	Rnd3	Rif
	RhoG	Wrch1		
		Chp		

Rho-GTPasen werden allgemein als Regulatoren des Aktinzytoskeletts bezeichnet [Hall, 1998; Aspenstrom et al., 2004], üben aber auch andere Funktionen in Zellen aus [Jaffe und Hall, 2005]. Die am besten charakterisierten Rho-GTPasen sind die namensgebenden Mitglieder der ersten drei Unterfamilien RhoA (*ras homologous A*), Rac1 (*ras related C3 botulinum toxin substrate 1*) und Cdc42 (*cell division cycle 42*). Die Aktivierung dieser drei Proteine führt zur Reorganisation des Zytoskeletts. RhoA bedingt die Ausbildung von fokalen Adhäsionen und Stressfasern, die aus Aktin- und Myosinfilamenten bestehen [Ridley und Hall, 1992]. Die Aktivierung von Rac bewirkt die Bildung von Lamellipodien am Leitsaum von migrierender Zellen. Es handelt sich dabei um aktinhaltige Ausstülpungen der Zelloberfläche [Ridley et al., 1992]. Cdc42 ruft die Ausbildung von Filopodien hervor, fingerartigen, aktinreichen Ausstülpungen der Zellmembran [Kozma et al., 1995; Nobes und Hall, 1995]. Rho-GTPasen zirkulieren zwischen einem aktiven und einem inaktiven Zustand und besitzen dadurch eine molekulare Schalterfunktion, wie die meisten Proteine der Ras-Superfamilie. Rho-GTPasen können aufgrund ihrer intrinsischen Eigenschaften in drei Gruppen eingeteilt werden (Abb. 1.2) [Jaiswal et al., 2012c]: 1. Konventionelle GTPasen, zu denen der Großteil der Rho-Proteine zählen, wie Rho, Rac und Cdc42. Die Nukleotiddissoziation ist langsamer, als die intrinsische GTP-Hydrolyse, wodurch die Proteine in inaktiver Form vorliegen. 2. Konventionelle GTPasen mit untypischen Eigenschaften. Hierzu zählen RhoD und Rif. Die Nukleotiddissoziation ist schneller als die intrinsische GTP-Hydrolyse, folglich liegen diese beiden GTPasen überwiegend in aktiver Form vor. 3. Unkonventionelle GTPasen: RhoH und die Rnd-Unterfamilie besitzen keine intrinsische GTPase-Aktivität und liegen daher immer im aktiven, GTP-gebundenen Zustand vor [Buday et al., 2002b; Fiegen et al., 2002; Garavini et al., 2002; Chardin, 2003].

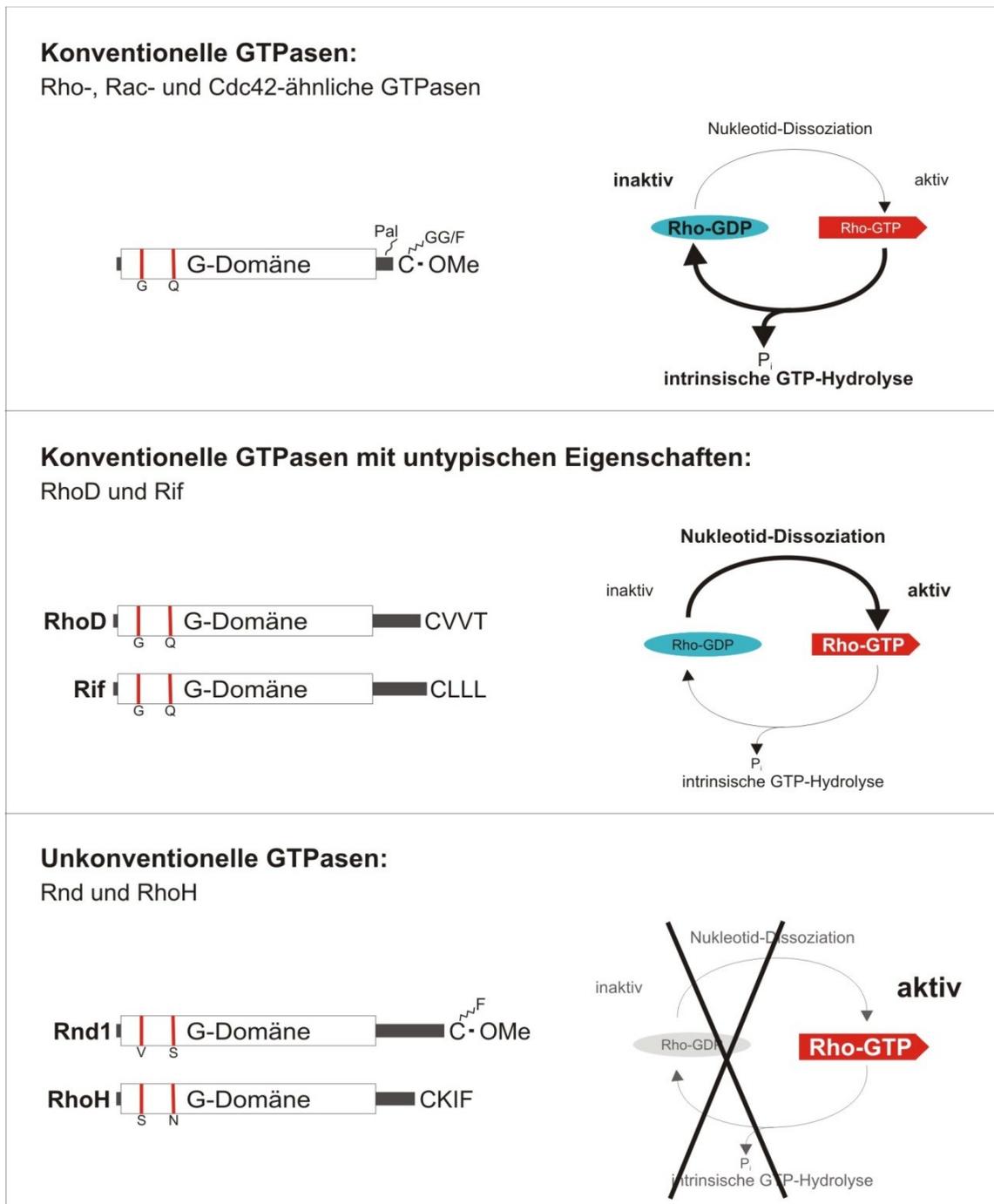


Abbildung 1.2: Einteilung der Rho-GTPasen in drei Gruppen aufgrund ihrer intrinsischen Eigenschaften. Konventionelle GTPasen haben eine schnellere intrinsische GTP-Hydrolyse im Vergleich zur Nucleotiddissoziation. Sie sind dadurch vorwiegend inaktiv. Bei der Gruppe der konventionellen GTPasen mit untypischen Eigenschaften ist es genau anders herum, wodurch sie meist aktiv, im GTP-gebundenen Zustand vorliegen. Unkonventionelle GTPasen besitzen keine intrinsische GTPase-Aktivität, dadurch sind sie konstitutiv aktiv. Ihnen fehlen zwei konservierte Aminosäuren, ein Glycin und ein Glutamin. Die konventionellen GTPasen werden alle prenyliert und somit geranylgeranyliert (GG) oder farnesyliert (F). Zusätzlich werden einige GTPasen palmitoyliert (Pal). Für RhoD, Rif und RhoH sind keine posttranslationalen Modifikationen bekannt, wodurch sie sich zusätzlich von den konventionellen GTPasen unterscheiden.

Ein Grund dafür ist, dass ihnen zwei für den Nucleotidaustausch essentielle Aminosäuren fehlen, die in den meisten Rho- und Ras-GTPasen konserviert sind

(Glycin 12 und Glutamin 61 Ras-Nummerierung). Diese beiden Aminosäuren sind unter anderem in onkogenen Varianten von Ras mutiert und führen zu dessen Hyperaktivität [Schubbert et al., 2007; Karnoub und Weinberg, 2008].

Die dreidimensionale Struktur von Rho-GTPasen zeichnet sich durch ein zentrales sechssträngiges β -Faltblatt aus, das von sechs α -Helices umgeben wird (Abb. 1.3). Ein typisches Charakteristikum stellt die sogenannte *insert-helix* ($\alpha 3'$ -Helix) dar, die nur bei Rho-Proteinen vorkommt und diese Familie dadurch strukturell von anderen GTPasen unterscheidet. Die Nukleotidbindung erfolgt durch die *Switch* I- und *Switch* II-Region der G-Domäne. Diese umfassen die Aminosäuren 27-40, bzw. 59-74 und sind die Bereiche, die verschiedene Konformationsunterschiede aufweisen können, abhängig von dem gebundenen Nukleotid (GDP oder GTP) (Abb. 1.3). Diese Konformationsänderung ist wichtig, da Bindungen zwischen Rho-GTPasen und ihren Interaktionspartnern nur in einem der beiden Konformationszustände stattfinden können.

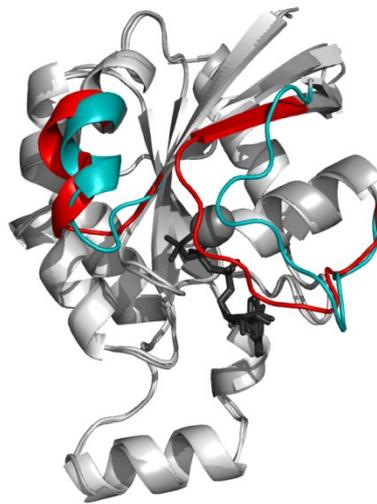


Abbildung 1.3: Strukturmodelle von RhoA in GDP (PDB: 1FTN) [Wei et al., 1997] und GTP (PDB: 1A2B) [Ihara et al., 1998] gebundenem Zustand. Die beiden *Switch*-Regionen sind für den GDP-gebundenen Zustand in cyan und für den GTP-gebundenen Zustand in rot dargestellt. Die Nukleotide sind in schwarz und das gebundenen Magnesium als Kugel in dunkelgrau dargestellt.

Für Rho-GTPasen ist eine Vielzahl von Regulatoren bekannt, die die molekulare Schalterfunktion der GTPase unterstützen. Es sind 74 GEFs, mehr als 80 GAPs und 3 GDIs beschrieben worden, die mit einer unterschiedlichen Anzahl der Rho-Proteine interagieren können [Rossman et al., 2005; Tcherkezian und Lamarche-Vane, 2007; Garcia-Mata et al., 2011]. Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) aktivieren Rho-GTPasen indem sie die langsam ablaufende intrinsische Dissoziation des Nukleotids beschleunigen [Jaiswal et al., 2012b]. Dabei spielt es

keine Rolle, ob die Guaninnukleotid-bindenden Proteine GDP oder GTP gebunden haben, da sie generell die Nukleotidfreisetzung katalysieren [Goody und Hofmann-Goody, 2002]. Da GTP in der Zelle aber im Verhältnis zu GDP in viel höheren Konzentrationen vorkommt, wird meistens GTP gebunden und die GTPase somit aktiviert. Fast alle der Guaninnukleotidaustauschfaktoren von Rho-GTPasen gehören zur Familie der Dbl homologen Proteine [Schmidt und Hall, 2002; Rossman et al., 2005]. Die namensgebende Dbl homologe Domäne (DH-Domäne, *Dbl homology domain*) umfasst etwa 200 Aminosäuren und ist für die GEF-Aktivität verantwortlich [Hart et al., 1994; Whitehead et al., 1997]. Die Bindung der DH-Domäne an die GTPase bewirkt eine strukturelle Veränderung der *Switch*-Regionen und dadurch eine starke Verminderung der Nukleotidaffinität [Vetter und Wittinghofer, 2001]. C-terminal der DH-Domäne befindet sich fast immer eine PH-Domäne (*pleckstrin homology domain*), die an Inositol-Phospholipide und andere Proteine binden kann und somit häufig für die Membranbindung verantwortlich ist [Cerione und Zheng, 1996; Irvine, 1998; Rebecchi und Scarlata, 1998; Lemmon und Ferguson, 2000].

Rho-GTPase aktivierende Proteine verfügen über eine namensgleiche GAP-Domäne, die durch ihre enzymatische Aktivität die langsame intrinsische GTP-Hydrolysereaktion von Guaninnukleotid-bindenden Proteinen um das bis zu 10^5 -fache beschleunigen kann [Wittinghofer et al., 1997; Graham et al., 1999]. Das GAP-Protein bindet dabei an die *Switch*-Regionen und den P-Loop und stabilisiert dadurch die flexiblen *Switch*-Regionen der GTPase. Gleichzeitig wird ein katalytisches Arginin (auch Arginin-Finger genannt) in das aktive Zentrum der Nukleotidbindungstasche der GTPase eingebracht und die GTP-Hydrolyse durch Stabilisierung der dafür wichtigen Reaktionspartner bewirkt [Ahmadian et al., 1997]. Ein konserviertes Glutamat (Q61 in Ras, Rac und Cdc42, bzw. Q63 in RhoA) wird dabei so positioniert, dass es ein Wassermolekül für den nukleophilen Angriff auf das GTP in Position bringt. Des Weiteren setzt das Arginin die Aktivierungsenergie für die Spaltung des γ -Phosphats von GTP herab, durch die Neutralisierung einer negativen Ladung, die während des Übergangszustands auftritt.

GDI-Proteine (Guaninnukleotiddissoziationsinhibitoren) bestehen aus einer N- und einer C-terminalen Domäne und inhibieren den Nukleotidaustausch von GTPasen [Olofsson, 1999]. Sie binden an die inaktive Form der GTPase und verhindern, wie der Name bereits besagt, die Dissoziation des GDPs. GDIs binden mit ihrer N-terminalen Domäne und sehr hoher Affinität an die *Switch*-Regionen [Longenecker

et al., 1999; Hoffman et al., 2000; Grizot et al., 2001] und blockieren damit die Bindungsstelle für andere Regulatoren, ebenso wie für Effektoren. Mit der C-terminalen Domäne binden sie an die Isoprenylgruppe am C-Terminus der GTPase und lösen dadurch die Membranverankerung der Rho-GTPase, indem sie die hydrophobe Isoprenylkette abschirmen [Hoffman et al., 2000; Lian et al., 2000; Scheffzek et al., 2000]. Voraussetzung hierfür ist, dass die GTPase posttranslational modifiziert ist, also am Cystein ihres C-Terminus isoprenyliert wurde [Gosser et al., 1997; Newcombe et al., 1999; Nomanbhoy und Cerione, 1999]. Somit bilden die GDIs eine Familie von negativen Regulatoren der Rho-GTPasen.

Rho-Proteine und ihre Regulatoren sind von zentraler Bedeutung in der Tumorentstehung, dem Tumorwachstum sowie der Metastasierung [Boettner und Van Aelst, 2002; Sahai und Marshall, 2002; Benitah et al., 2004; Ridley, 2004; Karlsson et al., 2009; Lazer und Katzav, 2011; Rathinam et al., 2011]. Bedingt wird die Entstehung von humanen Tumoren durch eine erhöhte Expression der Gene von Rho-GTPasen oder eine veränderte Aktivität ihrer Regulatoren. In vielen Fällen liegen Mutationen in den Genen der GEFs und GAPs für Rho-Proteine vor, die zu einer Fehlregulation der GTPase führen. Es sind keine Mutationen bekannt die die Gene der Rho-GTPasen direkt betreffen (Ausnahme RhoH [Ellenbroek und Collard, 2007; Vega und Ridley, 2008]). Im Gegensatz dazu sind viele Mutationen in den Genen von Ras-Proteinen bekannt, die tumorfördernde Wirkungen aufweisen.

1.3 Cdc42-ähnliche GTPasen

Die Mitglieder der Cdc42-ähnlichen GTPasen haben, wie andere Rho-GTPasen Einfluss auf die Organisation des Aktinzytoskeletts [Etienne-Manneville und Hall, 2002]. Wird Cdc42 aktiviert, resultiert daraus die Ausbildung von fingerartigen Ausstülpungen, Filopodien genannt, die parallele Aktinfilamente enthalten [Kozma et al., 1995; Nobes und Hall, 1995; Dutartre et al., 1996; Welch et al., 1997; Hall, 1998]. Effektorproteine, die von Cdc42 aktiviert werden und zur Filopodienausbildung beitragen, sind WASp (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) und N-WASp [Machesky und Insall, 1998; Miki et al., 1998a]. Auch TC10 und TCL, zwei weitere Mitglieder der Cdc42-ähnlichen GTPasen, aktivieren N-WASp [Abe et al., 2003] und bewirken dadurch die Bildung von Filopodien, wobei diese länger sind als bei der Aktivierung durch Cdc42 [Neudauer et al., 1998; Murphy et al., 1999]. Auch Wrch1 und Chp, die als untypische GTPasen gelten, gehören zu den Cdc42-ähnlichen GTPasen und wirken in gleicher Weise auf das Aktinzytoskelett (Tao 2001, Aronheim 1998). Chp kann N-WASp aktivieren, ebenso wie Cdc42, TC10

und TCL [Aronheim et al., 1998; Aspenstrom et al., 2004]. Dieser Aktivierungsmechanismus konnte aber nicht für Wrch1 gezeigt werden [Aspenstrom et al., 2004]. Alle fünf Mitglieder der Cdc42-ähnlichen GTPasen weisen hohe Sequenzhomologien auf und unterscheiden sich hauptsächlich in ihrem N- und C-Terminus (Abb. 1.4).

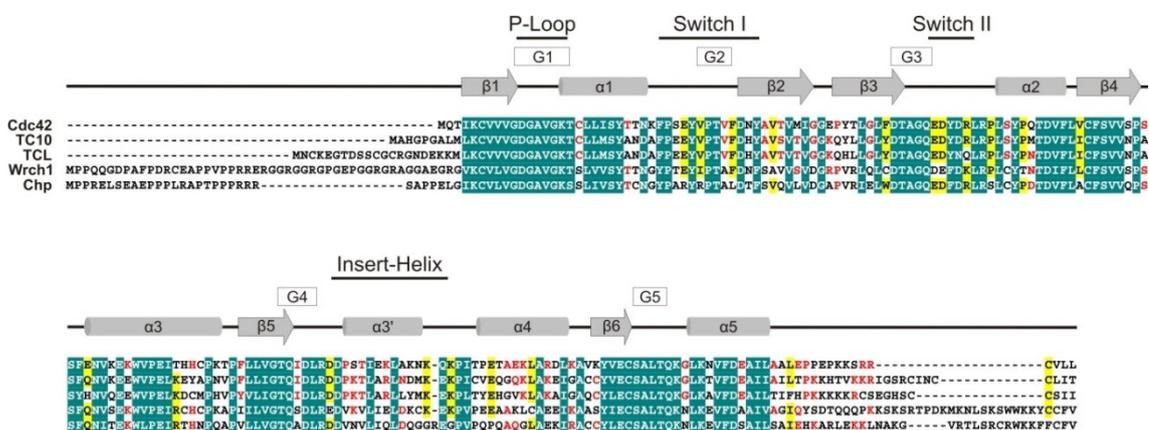


Abbildung 1.4: Sequenzvergleich der fünf Cdc42-ähnlichen GTPasen mit schematischer Darstellung der sekundären Struktur, der fünf konservierten Sequenzmotive die alle Guaninnukleotid-bindenden Proteine besitzen und der für Rho-GTPasen typischen Regionen P-Loop, Switch I und II sowie der Insert-Helix.

Wie andere kleine GTPasen sind auch die Cdc42-ähnlichen GTPasen posttranslational modifiziert. Cdc42 wird geranylgeranyliert [Yamane et al., 1991], wohingegen TC10 und wahrscheinlich auch TCL farnesyliert und palmitoyliert werden [Michaelson et al., 2001; Wennerberg und Der, 2004]. Wrch1 und Chp werden palmitoyliert und nicht, wie fast alle anderen Rho-GTPasen, isoprenyliert [Berzat et al., 2005; Chenette et al., 2005].

1.3.1 Wrch1 und Chp

Wrch1 und Chp gehören zur Unterfamilie der Cdc42-ähnlichen GTPasen, werden aber auch als untypische Rho-GTPasen bezeichnet, da sie sich in vieler Hinsicht von den klassischen GTPasen unterscheiden.

Wrch1 (*Wnt-responsive Cdc42 homologue 1*), auch RhoU genannt, wurde zuerst in Epithelzellen des Brustgewebes von Mäusen nachgewiesen, wo es infolge der Aktivierung des Wnt1-Signalweges exprimiert wurde [Tao et al., 2001]. Die Überexpression einer konstitutiv aktiven Form von Wrch1 resultiert in diesen Epithelzellen in einem Phänotyp, der ähnlich zu dem Wnt-Phänotyp ist und ruft Zellwachstum in NIH3T3 Zellen hervor [Tao et al., 2001; Shutes et al., 2004; Berzat et al., 2005]. Kürzlich wurde außerdem beschrieben, dass Wrch1 eine Rolle in der herkömmlichen Morphogenese von Epithelzellen spielt, wobei aktives Wrch1 mit

Par6 interagiert, ein Protein, das bedeutsam ist für die Zellpolarität [Brady et al., 2009]. In nicht-epithelialen Zellen induziert Wrch1 wie Cdc42 die Ausbildung von Filopodien [Saras et al., 2004; Ruusala und Aspenstrom, 2008] und dem damit zusammenhängenden Abbau von Stressfasern und fokalen Adhäsionen und führt zu Zellmotilität [Tao et al., 2001; Saras et al., 2004; Shutes et al., 2004; Chuang et al., 2007; Ory et al., 2007]. In diesem Zusammenhang interagiert Wrch1 mit verschiedenen Kinasen wie PAK1, JNK1 und Pyk2 [Tao et al., 2001; Chuang et al., 2007; Ruusala und Aspenstrom, 2008]. Die Transkription von Wrch1 wird nicht nur durch Wnt1, sondern auch durch RANKL, GP130/STAT3, Notch1 und EGF hervorgerufen [Tao et al., 2001; Brazier et al., 2006; Schiavone et al., 2009; Zhang et al., 2011; Bhavsar et al., 2012].

Wrch1 besitzt 57 % Sequenzidentität mit Cdc42 [Brady et al., 2009]. Es unterscheidet sich von den klassischen Mitgliedern der Rho-Familie durch C- und N-terminale Verlängerungen der Aminosäuresequenz. N-terminal befinden sich 46 und C-terminal 21 zusätzliche Aminosäuren. Die Bindung an die Membran wird durch posttranslationale Modifikation des C-Terminus ermöglicht, unterscheidet sich aber von den anderen Rho-GTPasen, die ein klassisches CaaX-Sequenz besitzen und isoprenyliert werden. Wrch1 besitzt eine CFV-Sequenz und wird stattdessen an dem Cystein palmitoyliert [Berzat et al., 2005]. Der N-Terminus besitzt 3 mutmaßliche PxxP-Motive, die für die Interaktion mit den SH3-Domänen (*Src homology 3*) der Proteine Grb2 und Nck2 verantwortlich sind [Saras et al., 2004; Shutes et al., 2004; Liu et al., 2006; Zhang et al., 2011].

Bisher sind für Wrch1 keine GEFs und GAPs bekannt, die den Austausch von GDP zu GTP beschleunigen, oder die GTP-Hydrolyse katalysieren. Im Gegensatz zu anderen GTPasen besitzt Wrch1 eine hohe intrinsische Nukleotidaustauschrate und scheint daher in der Zelle hauptsächlich in GTP-gebundener Form vorzuliegen [Saras et al., 2004; Shutes et al., 2004; Aspenstrom et al., 2007]. Die intrinsische GTP-Hydrolyserate hingegen ist vergleichbar mit der von Cdc42. Deswegen kann Wrch1 in die Gruppe der konventionellen GTPasen mit untypischen Eigenschaften eingeordnet werden (Abb. 1.5) [Jaiswal et al., 2012c]. Eine weitere Regulation der Aktivität von Wrch1 könnte in der Autoinhibierung der G-Domäne durch den eigenen N-Terminus liegen [Shutes et al., 2004]. Der Mechanismus der Regulation von Wrch1 könnte sich daher grundlegend von dem der klassischen GTPasen unterscheiden, die von GEFs aktiviert und von GAPs inaktiviert werden. Da Wrch1 palmitoyliert wird, scheiden auch GDIs als Regulatoren aus, da diese nur an

Isoprenylgruppen binden können. Stattdessen scheint eine positive Regulation aufgrund der Expression von Wrch1 und eine negative Regulation durch den gezielten Abbau des Proteins wahrscheinlich [Aspenstrom et al., 2007]. Die Funktion von Wrch1 und anderen untypischen GTPasen könnte außerdem reguliert werden durch Protein-Protein-Interaktionen, bedingt durch Domänen (im Falle von Wrch1 PxxP-Motive), die nicht in klassischen Rho-GTPasen vorkommen [Aspenstrom et al., 2007].

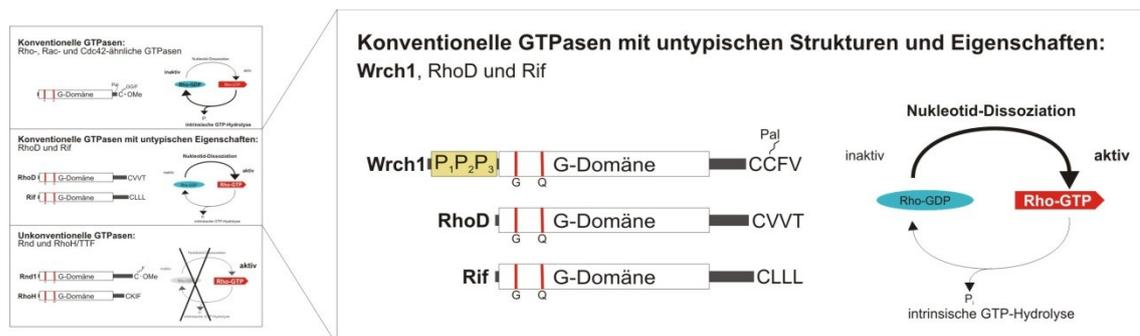


Abbildung 1.5: Wrch1 gehört zu der Gruppe der konventionellen GTPasen mit untypischen Eigenschaften, die eine von drei Gruppen darstellt, in die die Rho-GTPasen aufgrund ihrer intrinsischen Eigenschaften eingeteilt werden können. Es liegt überwiegend im aktiven, GTP-gebundenen Zustand vor, da die Nucleotid-Dissoziation schneller ist, als die intrinsische GTP-Hydrolyse. Es wird an seinem C-Terminus nicht prenyliert, sondern palmitoyliert (Pal) und besitzt als weitere strukturelle Besonderheit N-terminal drei PxxP-Motive (P₁-P₃).

Das Protein Chp (*Cdc42 homologous protein*) besitzt 52 % Sequenzidentität mit Cdc42 und 61 % mit Wrch1 und wird auch RhoV oder Wrch2 genannt. Es zählt genauso wie Wrch1 zu den untypischen GTPasen und weist neben der G-Domäne 16 zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus auf, sowie 28 Aminosäuren am N-Terminus. Eine klassische CaaX-Sequenz am C-Terminus fehlt. Stattdessen besitzt Chp eine CFV-Sequenz, die wie bei Wrch1 durch Palmitoylierung des Cysteins für die Membranbindung verantwortlich ist [Chenette et al., 2005; Chenette et al., 2006]. Der N-Terminus ist Prolin-reich und besitzt dadurch die Fähigkeit an die mittlere und C-terminale SH3-Domäne von Nck2 zu binden [Liu et al., 2006].

Chp führt wie Wrch1 und Cdc42 zur Ausbildung von Filopodien und fokalen Adhäsionen und aktiviert die JNK-Signaltransduktion [Aronheim et al., 1998; Aspenstrom et al., 2004]. Eine Überexpression in T-Zellen hingegen hat einen negativen Effekt auf die Migration dieser Zellen [Weisz Hubsman et al., 2007].

Im Gegensatz zu Wrch1, das in geringen Mengen in einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen exprimiert wird, scheint die Expression von Chp auf einige

Gewebe beschränkt zu sein [Aronheim et al., 1998; Tao et al., 2001; Katoh, 2002; Kirikoshi und Katoh, 2002; Daigo et al., 2004; Brazier et al., 2006].

Es ist bisher nicht bekannt, wie die GTPase Chp reguliert wird. GEFs und GAPs, die für die Aktivierung und Inaktivierung von GTPasen sorgen (GAPs und GEFs), sind für Chp nicht bekannt. GDIs kommen ebenfalls nicht in Frage, da Chp nicht isoprenyliert ist [Chenette et al., 2005; Chenette et al., 2006]. Ob Chp wie Wrch1 eine schnelle Nukleotidaustauschrate besitzt und deswegen keine GAPs und GEFs benötigt werden, konnte bisher nicht beschrieben werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Interaktion mit Effektoren nukleotidabhängig ist. Nur aktives, GTP-gebundenes Chp interagiert mit Effektoren wie PAK1, PAK2, PAK4, WASp/N-WASp, Par6 und MLK3 [Aronheim et al., 1998; Aspenstrom et al., 2004].

1.4 Potentielle Effektoren von Wrch1

Es sind mehr als 70 Effektoren bekannt, die von Rho-GTPasen aktiviert werden [Bustelo et al., 2007]. Den Effektor-GTPase-Interaktionen liegt ein genereller Mechanismus zugrunde. Die *Switch*-Regionen der GTPase ändern ihre Konformation abhängig von dem gebundenen Nukleotid. Effektoren können nur an die Konformation der GTPase binden, wenn diese GTP gebunden hat [Bishop und Hall, 2000; Bustelo et al., 2007]. In Mutationsstudien konnte allerdings gezeigt werden, dass nicht immer die gleichen Aminosäuren für die Effektor-Bindung verantwortlich sind, sondern große Unterschiede zwischen den Interaktionen mit verschiedenen Effektoren bestehen [Bishop und Hall, 2000]. Trotz des generellen Mechanismus der Interaktion zwischen GTPasen und ihren Effektoren, wird so eine Spezifität in der Bindung von unterschiedlichen Effektoren erreicht. Da Wrch1 ähnliche zelluläre Funktionen wie Cdc42 besitzt, könnten die beiden Proteine teilweise die gleichen Effektoren aktivieren. Da aber an jeder Bindung unterschiedliche Aminosäuren spezifisch für jede GTPase-Effektor Interaktion beteiligt sind, kommen für Wrch1 auch Effektoren in Frage, die nicht mit Cdc42 interagieren können. Deswegen wurden in dieser Arbeit drei Effektoren untersucht: PAK1 als bekannter Effektor von Wrch1. Pyk2 als kürzlich entdeckter Effektor. N-WASp als bekannter Effektor von Cdc42 und potentieller Effektor von Wrch1 (Abb. 1.6).

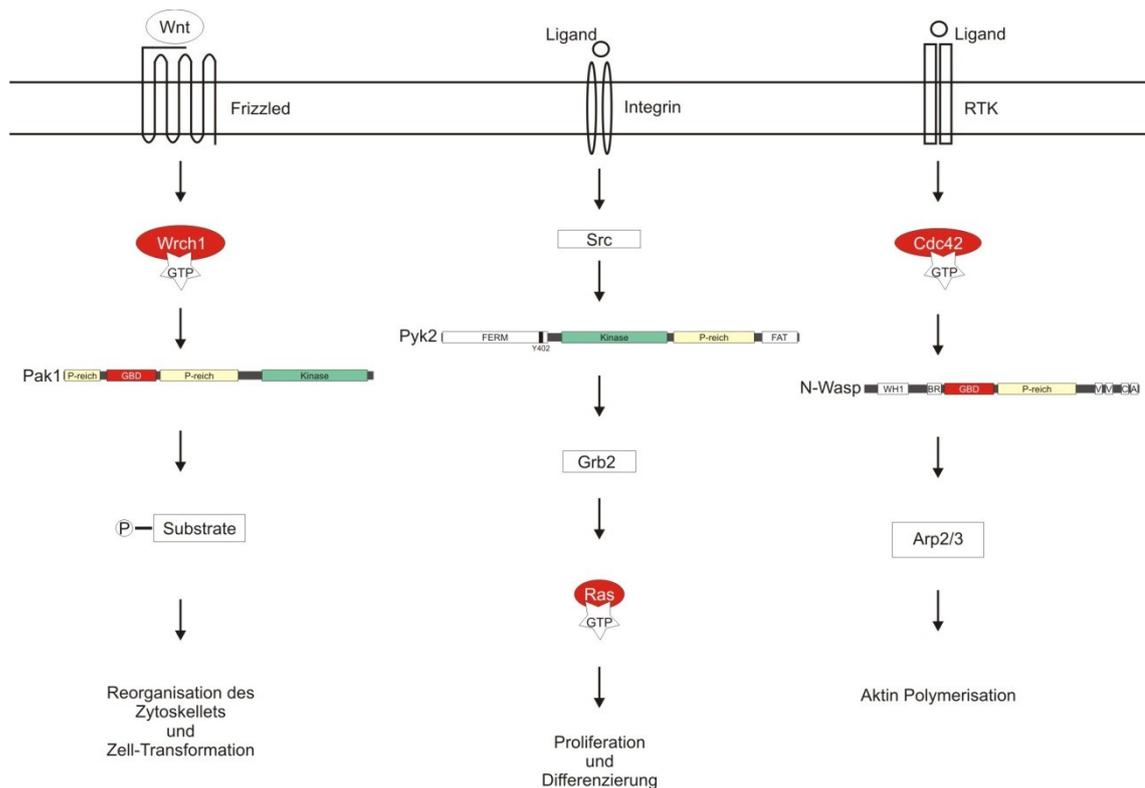


Abbildung 1.6: Die potentiellen Effektoren von Wrch1 sind an verschiedenen Signaltransduktionskaskaden beteiligt. PAK1 und WASp werden durch GTP-gebundene GTPasen aktiviert. Pyk2 hingegen ist für die Aktivierung von Ras verantwortlich. Durch ihre vielfältigen Domänen sind sie auch an vielen anderen Prozessen beteiligt.

1.4.1 PAK1

Die zuerst entdeckte Gruppe der durch Rho-GTPasen regulierten Effektoren sind die Mitglieder der PAK-Familie [Manser et al., 1994]. Sie sind die am besten charakterisierten Effektoren von Cdc42 und Rac. Die Sequenzen der sechs PAK-Serin/Threonin-Kinasen sind hoch konserviert und sie dienen als wichtige Mediatoren der Rac und Cdc42 Funktion [Arias-Romero und Chernoff, 2008]. Die Aktivierung von Proteinen der PAK-Familie beruht auf der Aktivität von Rezeptor-tyrosinkinase (*growth-factor-receptor tyrosine kinases*) und spielen dadurch eine wichtige Rolle in der Proliferation, Zellpolarität und der Organisation des Aktinzytoskeletts in eukaryotischen Zellen [Hofmann et al., 2004]. Außer durch Rho-GTPasen wird die Aktivität von Mitgliedern der PAK-Serin/Threonin-Kinasen durch andere Signalmoleküle beeinflusst, indem PAK-Proteine phosphoryliert und dephosphoryliert werden [Tsakiridis et al., 1996; Howe und Juliano, 2000; King et al., 2000; Tang et al., 2000].

PAK1 (*p21-activated kinase*) gehört zu der Gruppe 1 der PAK-Familie (PAK1-3) und ist im Gegensatz zu den Mitgliedern der Gruppe 2 (PAK4-6) autoinhibiert [Ong et al., 2011]. Der N-Terminus von PAK1 beinhaltet eine GBD-Domäne (GTPase-

binding domain), die an die aktive, GTP-gebundene Form von Rac und Cdc42 binden kann [Manser et al., 1994; Knaus et al., 1995; Martin et al., 1995]. N- und C-terminal wird die GBD-Domäne von zwei Prolin-reichen Sequenzabschnitten flankiert, die an Proteine binden können, die SH3-Domänen besitzen, so wie PIX [Manser et al., 1998], Nck [Bokoch et al., 1996] und Grb2 [Puto et al., 2003]. Der C-terminale Bereich der GBD-Domäne ist außerdem Teil der AID-Domäne (*autoinhibitory domain*), die für die Autoinhibierung der im C-Terminus von PAK1 gelegenen Kinase-Domäne verantwortlich ist. Diese Domänenorganisation besitzen außer PAK1 auch die beiden anderen Mitglieder der Gruppe 1 der PAK-Familie (PAK2, PAK3). Die Autoinhibierung von PAK1 kann durch die Interaktion mit aktiven GTPasen aufgehoben werden. Nachdem die GTPase gebunden hat, wird einerseits das als Dimer vorliegende PAK1 gespalten. Weitere Konformationsänderungen von PAK1 führen zur Destabilisierung und Dissoziation der autoinhibitorischen Domäne, wodurch die Kinase-Domäne frei wird. Die Autophosphorylierung von PAK1 führt dann zum Erreichen der vollständigen Kinase-Aktivität [Benner et al., 1995; Leeuw et al., 1998; Thompson et al., 1998; Zhao et al., 1998; Gatti et al., 1999; Lei et al., 2000; Morreale et al., 2000].

Substrate von PAK1 sind MLCK (*myosin light-chain kinase*) [Sanders et al., 1999], Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) [Chaudhary et al., 2000], MEK1 (*mitogen-activated protein*) [Frost et al., 1997], LIMK (*LIM domain kinase*) [Edwards et al., 1999] und Merlin/NF2 (*moesin-ezrin-radixin-like protein/Neurofibromin 2*) [Xiao et al., 2002]. Die Interaktion von PAK1 mit diesen und auch anderen Substraten verdeutlicht die Funktion von PAK1 in der Regulierung des Aktinzytoskeletts, Zellmotilität, Regulierung der Transkription und Einfluss auf den Zellzyklus [Bokoch, 2003]. Eine intensiv erforschte Signaltransduktionskaskade die durch PAK1 aktiviert wird, ist der MAP-Kinase Signalweg [Slack-Davis et al., 2003; Beeser et al., 2005]. Hier spielt die Phosphorylierung und Aktivierung der Kinasen MEK1 und Raf eine wichtige Rolle [Eblen et al., 2002; Slack-Davis et al., 2003].

1.4.2 Pyk2

Das Protein Pyk2 (*proline-rich-tyrosine kinase 2*) bildet mit dem Protein FAK (*focal adhesion kinase*) eine Familie der cytoplasmatischen Protein-Tyrosin-Kinasen (*focal adhesion protein tyrosine kinase family*). Sie besitzen eine Sequenzidentität von 46 %. Andere Namen für Pyk2 sind: *Focal adhesion kinase 2* (FAK2), *Calcium-dependent tyrosine kinase* (CADTK) oder *related adhesion focal tyrosine kinase* (RAFTK). FAK wird ubiquitär exprimiert, wohingegen die Expression von Pyk2 auf

verschiedene Gewebearten bzw. Zelltypen beschränkt ist [Schaller, 2010]. Beide Proteine weisen eine ähnliche Domänenorganisation auf. N-terminal besitzen sie eine FERM-Domäne (F: *Four-point-one-protein*, E: Ezrin, R: Radixin, M: Moesin), gefolgt von der katalytischen Kinase-Domäne, einer unstrukturierten Prolin-reichen Region und einer C-terminalen FAT-Domäne (*focal-adhesion targeting domain*). Die FERM-Domäne bindet an die katalytische Domäne und autoinhibiert somit die Kinaseaktivität. Beide Tyrosinkinase haben wichtige zelluläre Funktionen, primär durch die Regulation des Aktinzytoskeletts [Schaller, 2010]. Das Protein Pyk2 wird in diesem Zusammenhang durch Transmembranproteine wie Integrine, G-Protein gekoppelte Rezeptoren oder Rezeptortyrosinkinasen aktiviert, resultierend in einem Anstieg der Autophosphorylierung sowie erhöhter Kinase-Aktivität [Avraham et al., 2000]. Durch die Phosphorylierung von T402 und anderen Tyrosinen können Proteine, die SH2-Domänen beinhalten, an Pyk2 binden, wie Src und Grb2. Dies resultiert dann in der Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges [Dikic et al., 1996]. Auch FAK aktiviert den MAP-Kinase-Signalweg durch Interaktion mit Src und Grb2 [Nakamura et al., 2007]. Ein anderes Beispiel für die regulatorische Funktion des Aktinzytoskeletts liegt in der Assoziation von Pyk2 mit GEFs und GAPs [Schaller, 2010]. Durch die Bindung an diese Regulatoren nimmt Pyk2 Einfluss auf den Aktivitätsstatus von Rho-GTPasen. Beispiele hierfür sind: Graf, PSGAP, p190RhoGEF [Ohba et al., 1998; Ren et al., 2001; Lim et al., 2008]. Dieser Regulationsmechanismus trifft auch für FAK zu [Hildebrand et al., 1996; Ren et al., 2001; Zhai et al., 2003; Iwanicki et al., 2008; Lim et al., 2008; Tomar et al., 2009; Schaller, 2010]. Weitere zelluläre Funktionen in die Pyk2 involviert ist sind beispielsweise Zellpolarität und Zellmigration von Makrophagen [Okigaki et al., 2003; Owen et al., 2007].

1.4.3 N-WASp

Das Wiskott-Aldrich Syndrom (WAS) ist eine X-chromosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die in einer Insuffizienz des Immunsystems sowie Thrombozytopenie resultiert. Die Ursachen liegen in einer Mutation, wodurch das gleichnamige Protein WASp nicht mehr exprimiert werden kann. Dies hat eine erhebliche Beeinträchtigung der Signaltransduktion, vor allem der Aktinbildung zur Folge. Die klassischen Mitglieder der Wiskott–Aldrich Syndrom Protein Familie (WASp-Familie) lassen sich strukturell in zwei Gruppen einteilen: WASp- und WAVE-Proteine (WASp und N-WASp, n für *neural*) [Derry et al., 1994; Miki et al., 1996; Fukuoka et al., 1997; Winter et al., 1999] (WAVE1-3, *WASP family Verprolin-*

homologous proteins) [Miki et al., 1998b; Suetsugu et al., 1999]. Erst kürzlich wurden weitere Mitglieder der WASp-Familie entdeckt, WASH (*Wiskott–Aldrich syndrome protein and SCAR homologue*) [Linardopoulou et al., 2007], WHAMM (*WASp homolog-associated protein with actin, membranes and microtubules*) [Campellone et al., 2008], und JMY (*junction-mediating and -regulatory protein, p53 cofactor*) [Zuchero et al., 2009], die gewisse Ähnlichkeiten aber auch strukturelle Unterschiede aufweisen und somit keiner der beiden strukturellen Gruppen zugewiesen werden können. Sie bilden zwei neue Gruppen: WHAMM und JMY besitzen gewisse Ähnlichkeiten und können zu einer Gruppe zusammengefasst werden, WASH bildet alleine eine Gruppe. Sowohl die klassischen als auch die neuen Mitglieder der WASp-Familie besitzen alle C-terminal eine VCA-Domäne (V: *verprolin*, C: *cofilin*, A: *acidic*), durch deren Bindung die Aktivierung des Arp2/3 Komplexes bewirkt wird und zur Aktin-Polymerisation führt. [Miki und Takenawa, 1998; Machesky et al., 1999; Rohatgi et al., 1999]. Des Weiteren besitzen alle acht Proteine der WASp-Familie unmittelbar N-terminal der VCA-Domäne eine Prolinreiche Region, an die verschiedene Proteine, die SH3-Domänen enthalten, binden können, wie zum Beispiel Grb2 [Miki et al., 1996; She et al., 1997; Carlier et al., 2000], Nck [Rivero-Lezcano et al., 1995], Profilin [Suetsugu et al., 1998], PI3K [Finan et al., 1996], Itk [Bunnell et al., 1996] oder Fyn [Banin et al., 1996] die an N-WASp binden können. N-terminal bestehen große Unterschiede zwischen den Proteinen oder Gruppen von Proteinen. N-WASp und WASp besitzen außerdem eine GBD-Domäne (*GTPase-binding domain*), die eine basische Region und eine CRIB-Domäne (*Cdc42/Rac interactive binding domain*) beinhaltet und für die Bindung an die GTPasen Cdc42 und Rac verantwortlich ist. Auch andere GTPasen wie TC10 und Chp binden an die GBD-Domäne von WASp [Aronheim et al., 1998; Abe et al., 2003; Hemsath et al., 2005]. Am N-Terminus befindet sich bei beiden Proteinen eine WH1-Domäne (*WASp homology 1 domain*), an die das Protein WIP (*WASp-interacting protein*) [Ramesh et al., 1997] und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂) binden kann [Miki et al., 1996; Imai et al., 1999] und die außerdem wahrscheinlich für die Bindung an Membranen nötig ist. N-WASp unterscheidet sich von WASp in seiner Domänen-Organisation nur durch eine doppelte Verprolin-Domäne, die Teil der VCA-Domäne ist. WASp wird nur in hematopoietischen Zellen exprimiert, wohingegen N-WASp ubiquitär exprimiert wird. Beide Proteine liegen in einer autoinhibierten Konformation in der Zelle vor, wobei es sich um eine intramolekulare Interaktion zwischen der GBD-Domäne und VCA-Domäne handelt [Miki et al., 1998a], wodurch eine Bindung an den Arp2/3

Komplex verhindert wird und somit keine Aktin-Polymerisation stattfindet. Die Autoinhibierung wird durch Bindung unterschiedlicher Proteine an verschiedene Domänen von N-WASp aufgehoben: 1. GTPasen die an die GBD-Domäne binden, wobei Cdc42 am besten charakterisiert wurde [Miki et al., 1998a; Rohatgi et al., 1999; Kim et al., 2000; Prehoda et al., 2000]. 2. Die Bindung von PI(4,5)P₂ an die WH-Domäne [Rohatgi et al., 1999], wohingegen die Bindung des Proteins WIP eine stabilisierende Funktion hat [Krzewski et al., 2006; Sawa und Takenawa, 2006] und eine Degradation von N-WASp verhindert [Ramesh et al., 1997; Konno et al., 2004; Chou et al., 2006; de la Fuente et al., 2007]. 3. Adapterproteine wie Grb2, Nck, WISH aktivieren N-WASp durch Bindung an dessen Prolin-reiche Region [Carlier et al., 2000; Fukuoka et al., 2001; Rohatgi et al., 2001; Tomasevic et al., 2007]. Des Weiteren kann auch ein kooperativer Effekt von verschiedenen Bindungspartnern von N-WASp zu dessen Aktivierung führen, wie für PI(4,5)P₂ und Nck, oder Nck und Grb2 erst kürzlich beschrieben wurde [Scaplehorn et al., 2002; Rivera et al., 2009]. 4. Außerdem spielen posttranslationale Modifikationen, wie die Phosphorylierung von N-WASp durch Kinasen der Src-Familie eine Rolle bei der Aktivierung von N-WASp [Cory et al., 2002; Suetsugu et al., 2002; Torres und Rosen, 2003; Badour et al., 2004]. Phosphorylierte Tyrosine (Tyr291 und Tyr256 beim Menschen) stellen Bindungsstellen für SH2-Domänen dar, die N-WASp aktivieren können [Torres und Rosen, 2003, 2006]. Die Phosphorylierung eines konservierten Tyrosins (Tyr291 beim Menschen), das in der Nähe der CRIB-Domäne liegt, scheint durch die Aktivierung von Cdc42 gefördert zu werden [Sasahara et al., 2002; Torres und Rosen, 2003]. Dabei haben die Phosphorylierung von N-WASp und die Bindung von Cdc42 einen synergetischen Effekt auf die Aktivierung des Arp2/3 Komplexes. Demzufolge wird die Aktivierung des Arp2/3 Komplexes durch N-WASp aufgrund additiver Effekte vieler Arten von Signalmolekülen gesteigert.

1.5 SH3-Domänen besitzende Adapterproteine

Adapterproteine spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen zellulären Prozessen. Ohne selbst eine katalytische Funktion auszuüben, sind sie essentiell für die Signaltransduktion, indem sie als Regulatoren zellulärer Prozesse wie Proliferation, Zelldifferenzierung, Kontrolle des Zellzyklus, das Überleben der Zelle und Migration fungieren [Pawson und Scott, 1997; Szymkiewicz et al., 2004; Zeke et al., 2009]. Sie sind dafür verantwortlich, Proteine zu ihrem Wirkungsort zu rekrutieren, wo diese mit ihren Interaktionspartnern interagieren können und bilden dabei oft selbst einen wichtigen Bestandteil eines Multiproteinkomplexes. Somit können Adapterproteine als Elemente der Signaltransduktion oder auch Signalmoleküle verstanden werden, die spezifisch und selektiv die Interaktion zwischen den an sie gebundenen Proteinen ermöglichen [Zeke et al., 2009]. Zu den klassischen Adapterproteinen zählen Proteine, die ausschließlich aus Protein-Bindungsdomänen wie zum Beispiel PDZ, SH2- und SH3-Domänen aufgebaut sind, wie die Proteine Grb2, Nck und Crk, die nur aus SH2- und SH3-Domänen bestehen. Neben den Protein-Bindungsdomänen besitzen Adapterproteine häufig Bereiche in ihrer Struktur, die posttranslational modifiziert werden können [Szymkiewicz et al., 2004; Tsyba et al., 2011]. Proteine, die neben katalytischen und anderen Domänen Protein-Bindungsdomänen besitzen und dadurch neben anderen Funktionen ähnliche Funktionen wie die klassischen Adapterproteine ausüben, können als Proteine mit Adapterfunktion oder Multidomänen-adapterproteine bezeichnet werden [Tsyba et al., 2011; Reebye et al., 2012]. Beispiele hierfür sind Src, ITSN und p120, die neben einer katalytischen Kinase-Domäne, einer DH-Domäne und einer GAP-Domäne außerdem eine oder mehrere SH2- und/oder SH3-Domänen besitzen.

SH3-Domänen zeichnen sich dadurch aus, dass sie an Prolin-reiche Sequenzen binden können [Ren et al., 1993]. Es konnten bisher mehr als 300 SH3-Domänen im menschlichen Genom identifiziert werden [Zarrinpar et al., 2003; Saksela und Permi, 2012]. Sie bestehen aus ca. 60 Aminosäuren und weisen eine typische Struktur aus zwei β -Faltblätter auf, die aus 5 antiparallelen β -Faltblattsträngen bestehen. Charakteristisch sind außerdem zwei Schleifen, die *RT*- und *n-Src-Loop* genannt werden und in ihrer Länge und Gestalt sehr variabel sind [Musacchio et al., 1992; Ren et al., 1993]. Des Weiteren besitzen SH3-Domänen eine kurze 3_{10} -Helix. SH3-Domänen interagieren mit Proteinen die Prolin-reichen Sequenzen, sogenannte PxxP-Motive beinhalten, wobei P für Prolin und x für eine beliebige,

meist aber hydrophobe Aminosäure steht. C- oder N-terminal des PxxP-Motivs befinden sich typischerweise Aminosäuren mit positiv geladenen Resten [Sparks et al., 1994; Simon und Schreiber, 1995], meistens Arginin, das ebenfalls an der Bindung beteiligt ist [Wu et al., 1995]. Die Bindung des Liganden an die SH3-Domäne erfolgt in der sogenannten linkshändigen Poly Prolin Typ II (PPII) Helix-Konformation. Hierbei könne zwei Klassen von Liganden unterschieden werden, abhängig von der Orientierung ihrer Bindung an die SH3-Domäne: Zur Klasse I zählen Peptide, deren positiver Rest sich N-terminal befindet (RxxPxxP), wohingegen zur Klasse II Liganden zählen, deren positive Aminosäure sich C-terminal befindet (PxxPxR) [Feng et al., 1994; Lim et al., 1994]. SH3-Domänen bilden zwei hydrophobe Bindungstaschen, die von aromatischen Aminosäuren flankiert werden und die jeweils ein Dipeptid (xP) des xPxxP-Motivs binden können (Abb. 1.7). Eine dritte Bindungstasche, die von negativ geladenen Aminosäuren umgeben ist, bindet an die positiven Aminosäuren (meist Arginin) des Liganden der Klasse I oder II (Abb. 1.7) [Wu et al., 1995]. Diese Bindungstasche, bzw. dieser Bereich der SH3-Domäne ist verantwortlich für die Spezifität der Interaktion [Saksela und Permi, 2012].

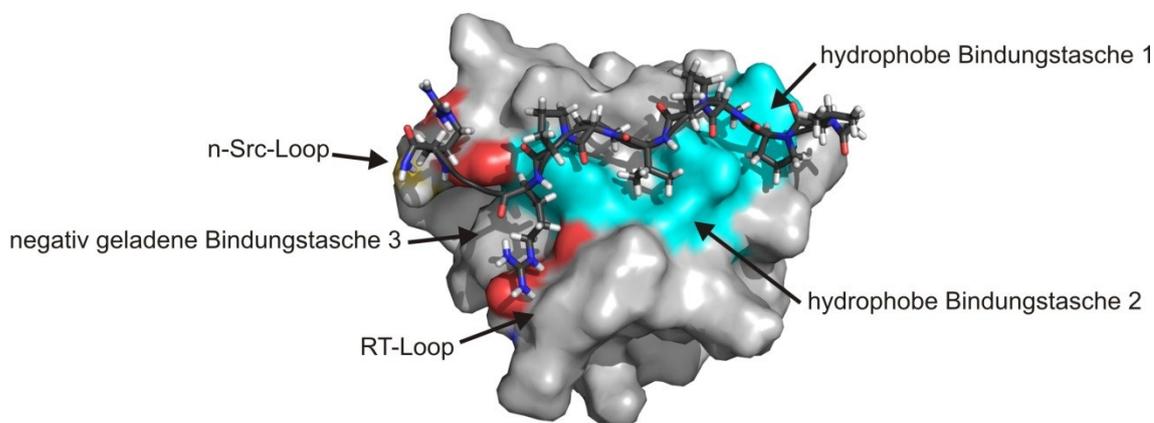


Abbildung 1.7: Struktur der N-terminalen SH3-Domäne von Grb2 im Komplex mit seinem Liganden (PDB: 1GBQ) [Wittekind et al., 1997]. Die aromatischen Aminosäuren, die die beiden hydrophoben Bindungstaschen flankieren sind in cyan dargestellt (Y7, F9, W36, Y52). Die negativen Reste der Aminosäuren des *RT*- und *n-Src-Loops* die an der Ligandenbindung beteiligt sind, sind in rot dargestellt (D15, E16 und C32, D33). Sie bilden einen Teil der negativ geladenen Bindungstasche. Der Ligand ist in schwarz dargestellt, mit negativen Ladungen in rot, positiven Ladungen in blau und neutralen Ladungen in weiß.

SH3-Domänen erfüllen größtenteils zwei wichtige Aufgaben: 1. Sie sind für die Bildung von Proteinkomplexen verantwortlich [Lowenstein et al., 1992]. 2. Sie fungieren als Regulatoren und sind an intramolekularen Interaktionen innerhalb des Proteins beteiligt, wie zum Beispiel als Autoinhibitoren [Moarefi et al., 1997; Nguyen und Lim, 1997] (Abb. 1.8).

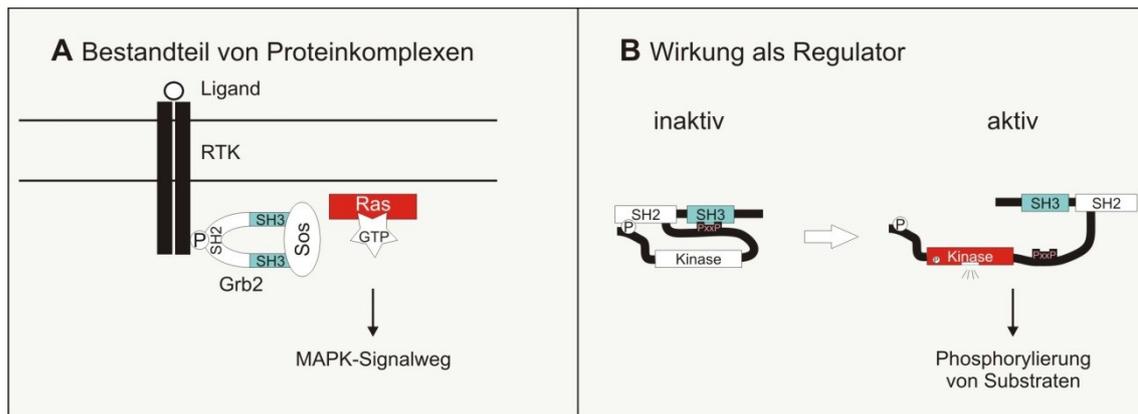


Abbildung 1.8: Funktionen von SH3-Domänen. **A:** Sie bilden wichtige Bestandteile von Proteinkomplexen und können somit an der Aktivierung von Signalkaskaden beteiligt sein. **B:** Eine weitere wichtige Funktion besteht in der Wirkung als Regulator. SH3-Domänen können an der Autoinhibierung von Proteinen beteiligt sein, wie zum Beispiel bei der Src-Kinase.

Die Spezifität zwischen PxxP-Motiven und SH3-Domänen ist abhängig von zusätzlichen Interaktionen zwischen den Bindungspartnern. Zum einen spielen die Aminosäuren, die das PxxP-Motiv umgeben, und zum anderen die flexiblen, weniger konservierten und in der Länge variierenden Schleifenregionen (*RT-* und *n-Src-Loop*) der SH3-Domäne eine essentielle Rolle [Panni et al., 2002; Hiipakka und Saksela, 2007]. Die Länge des *RT-Loops* liegt zwischen 15-31 Aminosäuren, ist aber meistens 18. Der *n-Src-Loop* variiert zwischen 3-31 Aminosäuren, ist aber meistens 4 Aminosäuren lang [Cesareni et al., 2002]. Durch diese zusätzlichen Kontakte zwischen der SH3-Domäne und dem Liganden kann die Spezifität bedeutend erhöht werden [Feng et al., 1994; Lee et al., 1996; Pisabarro und Serrano, 1996; Pisabarro et al., 1998; Ghose et al., 2001; Fazi et al., 2002; Dutta et al., 2004].

Dabei ist die Affinität zwischen SH3-Domänen und PxxP-Motiven mit Werten im mikromolaren Bereich eher gering [Mayer, 2001; Li, 2005]. Die Affinität zwischen SH3-Domänen und Liganden ist von verschiedenen Faktoren abhängig: 1. Die Länge des Liganden. Die Affinität kann geringer sein zwischen der SH3-Domäne und kurzen Liganden, die nur das PxxP-Motiv und einige umgebende Aminosäuren beinhalten, im Vergleich zu längeren Liganden [Feng et al., 1994]. 2. Die Struktur der SH3-Domäne spielt eine entscheidende Rolle, wie beispielsweise die Flexibilität der weniger konservierten *RT-Loop*-Regionen, die eine erhöhte Affinität aufweisen, im Vergleich zu SH3-Domänen mit unflexiblen *RT-Loop* [Arold et al., 1998]. 3. Die Avidität bei Interaktionen zwischen SH3-Domänen und PxxP-Motiven kann für einen Anstieg der Affinität verantwortlich sein. Die Avidität beschreibt

dabei die Stärke von multivalenten Bindungen und kommt vor, wenn Proteine über mehrere SH3-Domänen und/oder PxxP-Motive miteinander interagieren und sich dadurch die Interaktion intensiviert, oder anders gesagt, die eine Einzelreaktion fördert eine andere Einzelreaktion, was in Summe zu einer Verstärkung der Interaktion und erhöhter Affinität zwischen den Bindungspartnern führt. Avidität wurde nicht nur für Interaktionen von Proteinen mit SH3-Domänen und PxxP-Motiven in der Literatur diskutiert und nachgewiesen, sondern auch für andere Interaktionen gezeigt [Cussac et al., 1994; Lemmon et al., 1994; Cussac et al., 1999; Owen et al., 1999; Yuzawa et al., 2001; Praefcke et al., 2004; Kieken et al., 2009; McDonald et al., 2009; Zwang und Yarden, 2009; Kintscher et al., 2010].

Spezifität und Affinität spielen eine große Rolle, wenn man die Interaktion zwischen SH3-Domänen und Liganden mit untypischen Bindungsmotiven betrachtet, die für fast alle Interaktionen größer sind, als für Liganden mit kanonischen PxxP-Motiven der Klasse I und II [Saksela und Permi, 2012]. Beispiele für nicht-kanonische Liganden sind: +xxPxxP- und PxxPx+-Motive, bei denen das Arginin durch eine positive Aminosäure ersetzt ist [Feng et al., 1994; Lim et al., 1994] oder PxxDY-Motive, denen ein Prolin fehlt [Mongiovi et al., 1999; Santiveri et al., 2009]. Andere Liganden besitzen kein Prolin und haben dafür ein RxxK-Motiv. Sie binden an SH3-Domänen von GAD-Proteinen [Harkiolaki et al., 2003; Liu et al., 2003; Lewitzky et al., 2004]. Unterschieden werden können Liganden, die mit den hydrophoben xP-Bindungstaschen in der klassischen PPII-Helix-Konformation interagieren, und solche, die anders oder nicht mit diesen Bereichen der SH3-Domäne interagieren. Alle untypischen Liganden hingegen interagieren mit der negative Bindungstasche und deren Umgebung. Diese Bindung kann für die nicht-kanonischen Liganden von übergeordneter Bedeutung sein im Vergleich zu der Interaktion mit den hydrophoben Bindungstaschen [Saksela und Permi, 2012], was die Bedeutung dieses negativ geladenen Bereichs der SH3-Domäne verdeutlicht, der auch für die Spezifität von kanonischen Liganden eine wichtige Rolle spielt.

1.5.1 Grb2

Grb2 (*growth factor receptor bound 2*) ist ein ubiquitär exprimiertes Adapterprotein, das von grundlegender Bedeutung für eine Vielfalt von fundamentalen Signalwegen ist. Es ist das am besten charakterisierte Mitglied der SH2/SH3 Adapterproteinfamilie [Buday, 1999] und stellt das humane Homolog des Proteins Sem5 von *Caenorhabditis elegans* dar [Clark et al., 1992]. Das 25 kDa große Protein besteht aus einer zentralen SH2-Domäne, die N- und C-terminal von zwei SH3-

Domänen flankiert wird [Lowenstein et al., 1992] und besitzt, wie andere klassische Adapterproteine, keine enzymatische Aktivität. Ursprünglich wurde Grb2 als Interaktionspartner von EGFR identifiziert [Lowenstein et al., 1992], interagiert aber auch mit einer großen Anzahl anderer Proteine. Über die SH2-Domäne bindet Grb2 direkt an Rezeptor Tyrosin Kinasen wie EGF (*epidermal growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*), TrkA/B (*nerve growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*) oder HGF (*colony-stimulating factor-1 and hepatocyte growth factor*) und auch an nicht membrangebundene Tyrosinkinase wie FAK (*focal adhesion kinase*) und Bcr/Abl [Dharmawardana et al., 2006], oder an Substrate von Tyrosinkinase. Die N- und C-terminal gelegenen SH3-Domänen binden an Proteine mit Prolin-reichen Regionen wie Sos [Buday und Downward, 1993; Egan et al., 1993], WASp [She et al., 1997], N-WASp [Miki et al., 1996], Cbl [Meisner et al., 1995; Buday et al., 1996], C3G [Tanaka et al., 1994] oder Gab1 [Yart et al., 2003; McDonald et al., 2010]. Die am besten charakterisierte Interaktion ist die zwischen Sos (*Son of sevenless*) und Grb2, die im Zytoplasma in konstitutiv gebundener Form vorliegen. Sos ist ein GEF für Ras und katalysiert den Austausch von GDP zu GTP und aktiviert dadurch Ras. Die Aktivierung von Rezeptor Tyrosinkinase bedingt die Autophosphorylierung des Rezeptors. Grb2 kann an den phosphorylierten Rezeptor binden, wodurch Sos zur Membran transportiert wird. Sos befindet sich dadurch in unmittelbarer Nähe von Ras, welches seinerseits membrangebunden ist, und aktiviert die GTPase [Buday und Downward, 1993; Egan et al., 1993; Gale et al., 1993; Rozakis-Adcock et al., 1993]. Letztendlich wird dadurch die nachfolgende MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) Kaskade aktiviert [Tari und Lopez-Berestein, 2001]. Eine Beteiligung weiterer Proteine durch Bindung an die SH3-Domänen von Grb2 konnte kürzlich für das Protein Gad gezeigt werden, das neben der Aktivierung anderer Signalwege auch bei der Aktivierung von Ras eine Rolle spielt [Schlessinger und Lemmon, 2003; Yart et al., 2003; McDonald et al., 2010].

Grb2 spielt durch seine vielfältigen Interaktionen mit einer großen Anzahl von Proteinen aus unterschiedlichen Familien eine zentrale Rolle für die Aktin-basierte Motilität, Zellzyklusprogression, epitheliale Morphogenese und Angiogenese und ist von Bedeutung bei verschiedenen Krankheiten, vor allem Krebs. In soliden Tumoren und bei Leukämie ist das *grb2*-Gen häufig verdoppelt [Huebner et al., 1994], wohingegen eine Überexpression von Grb2 in Tumoren bei Brustkrebs festgestellt werden konnte [Daly et al., 1994; Verbeek et al., 1997]. Somit ist Grb2

ein Protein von hohem Interesse bei der Entwicklung von Krebstherapien [Giubellino et al., 2008].

1.5.2 Nck

Die Familie der Nck Adapterproteine (*non-catalytic region of tyrosine kinase*) besteht aus zwei Mitgliedern Nck1 und Nck2, die 68% Sequenzidentität besitzen. Die 47 kDa großen zytosolischen Proteine werden ubiquitär exprimiert und bestehen aus jeweils drei SH3-Domänen und einer C-terminalen SH2-Domäne [Lehmann et al., 1990]. Nck Proteine stellen das Bindeglied zwischen Rezeptoren und nicht membrangebundenen Tyrosinkinase und ihrer Funktion in der Regulierung des Aktinzytoskeletts dar [Lettau et al., 2009]. In den meisten Fällen interagiert Nck über seine SH2-Domäne mit phosphorylierten Rezeptoren wie PDGF [Nishimura et al., 1993; Chen et al., 2000; Rivera et al., 2006], EGF [Li et al., 1992; Park und Rhee, 1992] und Ephrin [Stein et al., 1998; Vindis et al., 2004] und mit seinen SH3-Domänen mit einer Reihe von anderen Interaktionspartnern und führt dadurch zu der Bildung von größeren Multiproteinkomplexen. Beispiele für solche Interaktionspartner sind PAK [Bokoch et al., 1996; Galisteo et al., 1996; Yablonski et al., 1998], FAK [Choudhury et al., 1996; Goicoechea et al., 2002], Sos [Hu et al., 1995] und WASp [Rivero-Lezcano et al., 1995; Rohatgi et al., 2001]. Nck rekrutiert ähnlich wie Grb2 diese an seine SH3-Domänen gebundenen Proteine zur Membran, wo Nck über die SH2-Domäne an aktivierte Rezeptoren bindet. Die an die SH3-Domäne gebundenen Proteine aktivieren verschiedene Signalwege. Die Adapterproteine Nck und Grb2 haben jedoch unterschiedliche Funktionen. Nck aktiviert nicht wie Grb2 den Ras/MAPK Signalweg [Tanaka et al., 1995; Roche et al., 1996; Buday et al., 2002a]. Stattdessen ist Nck nach Stimulation des PDGF- oder EGF-Rezeptors an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts beteiligt, indem es Effektoren der GTPasen Cdc42 und Rac, wie beispielsweise PAK1 zur Membran rekrutiert [Manser et al., 1994; Knaus et al., 1995]. Gemeinsamkeiten bestehen allerdings in der Aktivierung von WASp, dessen Autoinhibition durch die Bindung von Grb2 oder Nck aufgehoben werden kann [Rivero-Lezcano et al., 1995; Miki et al., 1996; She et al., 1997; Rohatgi et al., 2001], wobei hier eher ein kooperativer als kompetitiver Effekt zwischen den beiden Adapterproteinen vorliegt [Scaplehorn et al., 2002]. Interessanter Weise gibt es verschiedene Mechanismen für die Bindung von Liganden an die SH3-Domänen von Nck [Buday, 1999]. Einige Proteine interagieren spezifisch mit nur einer der drei SH3-Domänen von Nck (z. B. Dynamin), wohingegen andere nur mit mehreren SH3-Domänen gleichzeitig

interagieren (z. B. Cbl oder Bcr/Abl). Das Protein Dynamin bindet spezifisch an die dritte SH3-Domäne von Nck. Es interagiert dabei mit derselben Affinität mit verschiedenen, die dritte SH3-Domäne beinhaltenden Konstrukten von Nck, unabhängig von dessen Länge oder der Präsenz der ersten und zweiten SH3-Domäne [Wunderlich et al., 1999a]. Die Proteine Cbl und Bcr/Abl können nur mit Konstrukten von Nck interagieren, die alle drei SH3-Domänen beinhalten, und binden nicht an die isolierten SH3-Domänen [Wunderlich et al., 1999b]. Eine dritte Gruppe von Liganden kann mit einer isolierten SH3-Domäne von Nck interagieren, allerdings mit niedriger Affinität. Die Affinität ist deutlich höher, wenn alle drei SH3-Domänen an der Bindung beteiligt sind, wie für das Protein WASp beschrieben wurde [Rivero-Lezcano et al., 1995]. Weitere Faktoren sind für die Interaktion von Nck von Bedeutung. Posttranslationale Modifikationen, wie die Phosphorylierung von verschiedenen Serinen, Threoninen und Tyrosinen von Nck nach Stimulation durch Wachstumsfaktoren, erzeugen weitere Möglichkeiten für Interaktionen mit Nck [Li et al., 1992; Park und Rhee, 1992].

Nck ist somit ein Adapterprotein, das aktivierungsabhängige Prozesse in der Zelle reguliert, wie beispielsweise die Zellpolarisation und Migration und spielt dadurch eine bedeutende Rolle in der Signaltransduktion [Lettau et al., 2009].

1.5.3 Crk

Die Proteine CrkI und CrkII (*chicken tumour virus no. 10 (CT10) regulator of kinase*) sind Adapterproteine, die durch alternatives *Splicing* entstehen. Das 28 kDa große CrkI besteht dabei aus einer SH2- und einer SH3-Domäne und wird hauptsächlich in embryonalen Zellen exprimiert, ebenso wie als onkogene virale Form von Crk (vCrk). Das weit exprimierte CrkII ist mit 42 kDa deutlich größer und besteht aus einer SH2- und zwei C-terminal gelegenen SH3-Domänen. Ein weiteres Mitglied der Familie ist CrkL, das CrkII ähnelt.

Die C-terminale SH3-Domäne, die nur CrkII und CrkL besitzen, unterscheidet sich deutlich von klassischen SH3-Domänen. Ihr fehlen die konservierten aromatischen Aminosäuren, die die hydrophoben Bindungstaschen bilden, und bindet daher nicht an Liganden mit kanonischen PxxP-Motiven [Muralidharan et al., 2006]. Im Gegensatz dazu besitzen die C-terminale SH3-Domäne und die Linkerregion, die nicht in CrkI vorkommt autoinhibitorische Funktion. Ein Tyrosin (Y221) in der Linker-Region zwischen den beiden SH3-Domänen kann an die SH2-Domäne binden, die somit nicht an phosphorylierte Proteine binden kann [Feller et al., 1994;

Rosen et al., 1995; Kobashigawa et al., 2007]. Die C-terminale SH3-Domäne kann an die N-terminale SH3-Domäne binden, die dann nicht oder schlechter mit ihren Liganden mit kanonischen PxxP-Motiven interagieren kann [Kobashigawa et al., 2007; Sarkar et al., 2007; Sarkar et al., 2011; Sriram et al., 2011]. In dem Autoinhibitionsmechanismus der N-terminalen SH3-Domäne bestehen allerdings Unterschiede zwischen dem humanen Protein und dem bei Hühnern [Sriram und Birge, 2012]. Eine weitere Besonderheit der C-terminalen SH3-Domäne ist, dass sie ein Tyrosin in ihrem *RT-Loop* besitzt, das phosphoryliert werden kann und eine Bindungsstelle für andere Proteine bildet [Sriram et al., 2011]. CrkI und vCrk fehlt die C-terminale SH3-Domäne und somit können sie nicht autoinhibiert werden und können nicht mit denselben Proteinen interagieren wie CrkII.

Crk ist, wie andere Adapterproteine, ein Bindeglied zwischen Rezeptor Tyrosinkinasen und/oder ihren Substraten und Effektoren von GTPasen. Ursprünglich wurde es als Onkogenprodukt des CT10 *avian sarcoma virus* (vCrk) entdeckt, der für die Tumorbildung in neugeborenen Hühnern verantwortlich ist [Mayer et al., 1988], wodurch die Bedeutung dieses Adapterproteins gezeigt wird.

Die SH2-Domäne interagiert, wie bei anderen Adapterproteinen auch, mit aktivierten phosphorylierten Rezeptor Tyrosinkinasen, wie PDGF [Sorokin et al., 1998; Yokote et al., 1998]. Des Weiteren kann Crk mittels der SH2-Domäne andere Proteine als Rezeptor Tyrosinkinasen binden und somit indirekt in Multiproteinkomplexen an der Membran lokalisieren. Beispiele hierfür sind die Proteine Cas [Ingham et al., 1996] und Paxillin [Schaller und Parsons, 1995]. Über die N-terminale SH3-Domäne interagiert Crk mit Proteinen wie C3G [Knudsen et al., 1994; Matsuda et al., 1994; Tanaka et al., 1994], DOCK180 [Hasegawa et al., 1996] oder Abl [Ren et al., 1994]. C3G und Dock180 sind GEFs, die Signaltransduktionskaskaden über die GTPasen Rap [Gotoh et al., 1995] und Rac aktivieren [Kiyokawa et al., 1998; Nolan et al., 1998]. An diesen Prozessen ist auch die Abl-Kinase beteiligt [Zandy et al., 2007; Zandy und Pendergast, 2008].

Neben seiner pathogenen Wirkung in Krebsarten wie Leukämie spielt das Protein Crk somit eine wichtige Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen, wie Zell Adhäsion, Migration und Zellwachstum [Buday, 1999; Feller, 2001].

1.5.4 Src

Das ubiquitär exprimierte Protein Src [Parsons und Parsons, 2004] gehört zur Familie der Src-Kinasen, die aus acht Mitgliedern besteht, und zählen zu den nicht

membrangebundenen Kinasen. Src ist, wie die anderen Proteine seiner Familie, ein Regulator verschiedener grundlegender zellulärer Prozesse, wie Zellwachstum, Zellteilung, Differenzierung, programmierter Zelltod und auch Zelladhäsion und Migration [Thomas und Brugge, 1997; Wilde et al., 1999].

Src besitzt N-terminal eine einzigartige Domäne, wie alle Mitglieder der Familie der Src-Kinasen, die myristoyliert wird und zur Membranlokalisation nötig ist. Andere Mitglieder der Src-Kinasen (alle außer Src und Blk) werden außerdem palmitoyliert. Darauf folgen eine SH3- und SH2-Domäne, eine Kinase-Domäne und eine C-terminale regulatorische Region. Diese ist wichtig für die Autoinhibition von Src. Ein durch das Protein CSK phosphoryliertes Tyrosin innerhalb des C-Terminus kann an die SH2-Domäne binden und dadurch die Kinase-Domäne inhibieren [Cooper et al., 1986; Okada et al., 1991; Okada, 2012]. Dieses Tyrosin fehlt vSrc, welches C-terminal verkürzt ist, wodurch die onkogene Variante konstitutiv aktiv ist [Jove und Hanafusa, 1987; Yeatman, 2004]. Die autoinhibitorische Konformation von Src wird außerdem stabilisiert durch die Interaktion zwischen der SH3-Domäne und der Linkerregion zwischen SH2- und Kinase-Domäne. Durch Dephosphorylierung des Tyrosins im C-Terminus wird die autoinhibitorische Konformation aufgehoben. Volle enzymatische Aktivität wird durch Autophosphorylierung eines Tyrosins im Aktivierungs-Loop der katalytische Kinase-Domäne erreicht [Knighton et al., 1991]. Die Autoinhibierung von Src kann durch intermolekulare Interaktionen mit den SH2- und SH3-Domänen aufgehoben werden. Verschiedene phosphorylierte Proteine können an die SH2-Domäne von Src binden [Songyang et al., 1993], z. B. Paxillin, FAK und Cas [Sakai et al., 1994; Harte et al., 1996], aber auch Rezeptoren wie EGFR [Wilde et al., 1999], PDGF [Kypta et al., 1990] und Integrine [Huveneers und Danen, 2009]. An die SH3-Domäne können Proteine wie Shc, PI3K, Cas, Tks5 und Arhgef5 [Liu et al., 1993; Cheadle et al., 1994; Seals et al., 2005; Kuroiwa et al., 2011; Okada, 2012] binden und somit die autoinhibitorische Konformation destabilisieren. Src phosphoryliert in seiner aktiven Form Substrate wie FAK und Cas [Bjorge et al., 2000; Mitra und Schlaepfer, 2006], die ihrerseits an der Aktivierung von Src durch Bindung an die SH2-Domäne beteiligt waren [Sakai et al., 1994]. FAK und Cas wiederum spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Aktinzytoskeletts, da sie GEFs und GAPs von Rho-GTPasen regulieren [Huveneers und Danen, 2009].

Zelluläres Src (cSrc) wurde ursprünglich als Onkogenprodukt des *avian Rous sarcoma virus* (vSrc) entdeckt. Somit kann die Fehlregulation von cSrc bei Krank-

heiten wie Krebs ein Faktor sein, der zur Tumorbildung beiträgt [Frame, 2004]. Allerdings sind wenige Mutationen von Src in humanen Tumoren beschrieben [Irby et al., 1999]. Hieraus folgt, dass die Fehlregulation von Src für dessen hohe Aktivität oder Überexpression verantwortlich ist [Summy und Gallick, 2003; Shor et al., 2007].

1.5.5 p120

p120RasGAP (p120) ist ein zytosolisches Protein, das, wie der Name bereits sagt, die intrinsische GTP-Hydrolyse von allen Ras-Isoformen beschleunigt und somit zur Inaktivierung dieser GTPase führt [Ahmadian et al., 1997; Scheffzek et al., 1997; Ahmadian et al., 2003; Mitin et al., 2005]. Es stellt damit einen wichtigen negativen Regulator des Ras-Signalweges dar [McCormick, 1989]. N-terminal besitzt es eine SH2-Domäne, gefolgt von einer SH3- und einer zweiten SH2-Domäne. Des Weiteren besitzt p120 eine PH-, eine Calcium-abhängige Phospholipidbindungs- und C-terminal die katalytische GAP-Domäne. Über die beiden SH2-Domänen interagiert p120 mit Transmembranrezeptoren wie EGF und PDGF und auch nicht-membrangebundenen Proteinen wie vSrc [Ellis et al., 1990; Ellis et al., 1995]. Andere Interaktionspartner sind p190RhoGAP und FAK, wodurch eine Koordination des Ras- und des Rho-Signalweges stattfindet und zur Ausbildung von Stressfasern, fokalen Adhäsionen, Zellpolarität und Migration führt [Bryant et al., 1995; van der Geer et al., 1997; Leblanc et al., 1998; Kulkarni et al., 2000; Pamonsinlapatham et al., 2008; Endo und Yamashita, 2009]. Der SH3-Domäne von p120 fehlen typische in anderen SH3-Domänen konservierte Aminosäuren. Deswegen kann p120 keine kanonischen PxxP-Motive binden. Interaktionspartner sind Aurora Kinasen [Gigoux et al., 2002] und das Tumorsuppressor-Protein DLC1, ein GAP das spezifisch ist für Rho [Yang et al., 2009].

Die PH-Domäne von p120 bindet an Phosphoinositole in Membranen und ist somit für die Lokalisation von p120 verantwortlich [Rebecchi und Scarlata, 1998]. Des Weiteren kann die PH-Domäne von p120 mit der eigenen GAP-Domäne interagieren und scheint dadurch die Interaktion zwischen Ras und der GAP-Domänen zu beeinflussen [Drugan et al., 2000]. Sie spielt zusammen mit der Calcium-abhängigen Phospholipidbindungs-Domäne eine wichtige Rolle bei der Regulation der Proliferation [Koehler und Moran, 2001].

Im Unterschied zu anderen RasGAPs sind nur für p120 und Neurofibromin1 Mutationen bekannt, die zu Erbkrankheiten wie kapillaren/arteriovenösen Fehl-

bildungen und Neurofibromatose-1 führen [Eerola et al., 2003; Boon et al., 2005; Le und Parada, 2007; Lee und Stephenson, 2007]. Die Funktion als negativer Regulator von Ras ist von besonderem Interesse, da Ras eines der bekanntesten Onkogene darstellt, das in 20-30% der menschlichen Tumore auftritt [Kahn et al., 1987; Bos, 1989]. Mutationen im Ras-Gen führen zu einer konstitutiv aktiven Variante von Ras, die nicht von RasGAPs inaktiviert werden kann [Barbacid, 1987; Bos, 1989]. Eine weitere Möglichkeit, die zu hyperaktivem Ras führt, resultiert aus einer fehlerhaften Regulation von Ras durch EGF-Rezeptoren oder durch inaktive RasGAPs [Downward, 2003; Buday und Downward, 2008]. Eine Funktion von p120 besteht somit in der negativen Regulation von Ras über die N-terminale GAP-Domäne, wobei weitere Funktionen wie Proliferation, Migration und Apoptose abhängig sind von den verschiedenen C-terminalen Domänen und ihren Interaktionspartnern [Pamonsinlapatham et al., 2009].

2 Zielsetzung

Rho-GTPasen spielen in der Signaltransduktion bekanntermaßen eine essentielle Rolle, wobei sich die Proteine dieser Familie funktionell unterscheiden. Insbesondere die Wirkungsmechanismen der untypischen Rho-GTPasen sind bisher wenig untersucht und kaum verstanden.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht deswegen die untypische GTPase Wrch1 und ihre intra- und intermolekularen Eigenschaften. Neben der G-Domäne besitzt Wrch1 N-terminal zusätzliche 46 und C-terminal zusätzliche 21 Aminosäuren, deren Funktion bisher nicht eindeutig bestimmt worden ist. Deswegen sollten die intramolekularen Interaktionen von Wrch1 bestimmt werden, nämlich die Nukleotidbindungseigenschaften der G-Domäne und der Einfluss des N-Terminus auf diese Funktionen.

Des Weiteren sollten die intermolekularen Interaktionen von Wrch1 mit Proteinen verschiedener Klassen untersucht werden, da bisher nur wenige Interaktionspartner bekannt sind. Als Effektoren, die an die aktive GTP-gebundene Form der G-Domäne binden, sollten PAK1, N-WASp und Pyk2 untersucht werden. Es wurden bisher keine Regulatoren wie GAPs und GEFs für Wrch1 beschrieben, die für den Zyklus zwischen Aktivierung und Inaktivierung der meisten GTPasen essentiell sind. Es sollte ermittelt werden, ob eine Spezifität zwischen verschiedenen zu untersuchenden GAPs besteht und Wrch1 somit, wie die anderen GTPasen, einem herkömmlichen Regulationsmechanismus unterliegt. Auch hier sollte der Einfluss des N-Terminus auf die GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse gemessen werden. Als dritte Klasse von Proteinen, die als potentielle Interaktionspartner für Wrch1 in Frage kommen, sollten SH3-Domänen besitzende Adapterproteine untersucht werden. Wrch1 enthält in seinem N-Terminus drei PxxP-Motive, die bekanntermaßen mit SH3-Domänen interagieren können. Zunächst sollte die Bindung des N-Terminus von Wrch1 an isolierte SH3-Domänen von Grb2, Nck1, Crk, Src und p120RasGAP untersucht werden, wobei in einem weiteren Schritt ermittelt werden sollte, welches der drei PxxP-Motive von Wrch1 für die Interaktion verantwortlich ist. Verglichen werden sollte, welche Unterschiede in der SH3-Domänen-Bindung zwischen Wrch1 und dem nahe verwandten Protein Chp möglicherweise bestehen. Außerdem sollte untersucht werden, ob sich die Interaktion mit isolierten SH3-Domänen im Vergleich zu *full length* Adapterproteinen mit Wrch1 unterscheidet.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

E.coli Stamm	Genotyp	Referenz
XL1 Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene, Produktinformation
BL21(DE3)	ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal(λclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7gene1) dcm (DE3)	Studier und Moffat, 1986
BL21(DE3) Rosetta	ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal(λclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7gene1) dcm (DE3) pRARE ² (Cam ^r)	Novagen, Produktinformation
BL21(DE3) pLysS	ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal(λclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7gene1) dcm (DE3) pLysS (Cam ^r)	Novagen, Produktinformation
BL21(DE3) codon plus RIL	ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal(λclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7gene1) dcm (DE3) Tet ^r endA HTE (argU ileY leuW Cam ^r)	Carstens und Waeshe, 1999

3.1.2 Nährmedien und Antibiotika

Nährmedien

LB (Lauria-Bertani) Vollmedium	10 g/l Bacto-Trypton 10 g/l NaCl 5 g/l Hefeextrakt
LB Plattenagar	10 g/l Bacto-Trypton 10 g/l NaCl 5 g/l Hefeextrakt 16 g/l Bacto-Agar
TB (<i>terrific broth</i>) Vollmedium	12 g/l Bacto-Trypton 24 g/l Hefeextrakt 0,4 % (v/v) Glycerin 2,31 g/l KH ₂ PO ₄ 12,54 g/l K ₂ HPO ₄
SOC Medium	20 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 0,5 g/l NaCl 186 mg/l

Antibiotika

Ampicillin	100 mg/l Medium
Chloramphenicol	25 mg/l Medium
Kanamycin	25 mg/l Medium

3.1.3 Eukaryotische Zelllinien

HeLa (ATCC: CCL-2)

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

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

Nierenepithelzellen eines afrikanischen Grünaffens (*Cercocebus 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*).

3.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM (Dulbecco's modified eagles medium) 1 g/l Glukose	Gibco, Invitrogen (Paisley, Schottland)
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco, Invitrogen (Paisley, Schottland)
Trypsin-EDTA-Lösung (10x)	Genaxxon (Ulm)
Penicillin/Streptomycin (100x) (10000 U/ml Penicillin; 10 mg/ml Streptomycin)	Genaxxon (Ulm)
PBS (without MgCl ₂ /CaCl ₂)(10x)	Gibco, Invitrogen (Paisley, Schottland)
PBS (with MgCl ₂ /CaCl ₂) (10x)	Gibco, Invitrogen (Paisley, Schottland)

3.1.5 Puffer und Lösungen

Acrylamidlösung	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
Anodenpuffer (Tricingele)	200 mM Tris pH 8,9 (eingestellt mit HCl)
Austauschpuffer (10x)	2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM ZnCl_2
Blockierlösung 1	3-5 % Milchpulver in TBST
Blockierlösung 2	5 % BSA in TBST
Entfärbelösung (SDS-PAGE)	20 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Färbelösung (SDS-PAGE)	2 g/l Coomassie brilliant blue R250 2 g/l Coomassie brilliant blue G250 20 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Fish-Puffer	50 mM Tris 100 mM NaCl 2 mM MgCl_2 1 % Igepal CA-630 10 % Glycerin 20 mM β -Glycerophosphat 1 mM Na_3VO_4 1 Tablette/50 ml Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail pH 7,5 (eingestellt mit HCl)
Gelfiltrationspuffer	30 mM Tris 100 mM NaCl 5 mM MgCl_2 3 mM DTT pH 7,5 (eingestellt mit HCl)
Glutathion-Elutionspuffer	Standardpuffer (GSH-Sepharose) 20 mM Glutathion pH 7,5 (eingestellt mit NaOH)
Hochsalz-ATP-Puffer	Standardpuffer (GSH-Sepharose) 400 mM KCl 1 mM ATP
HPLC-Puffer	10 mM Tetrabutylammoniumbromid 100 mM Kaliumphosphat pH 6,5 (57,48 g/l K_2HPO_4 ; 93,25 g/l KH_2PO_4) 7,5 % - 25 % Acetonitril

Imidazol-Elutionspuffer	Standardpuffer (Ni-NTA-Agarose, Ni-Sepharose) 500 mM Imidazol pH 7,5 (eingestellt mit HCl)
ITC-Puffer	30 mM Tris 50 mM NaCl pH 7,5 (eingestellt mit HCl)
Kathodenpuffer (Tricingele)	100 mM Tris 160 mM Tricin 1 g/l SDS pH 8,25 (eingestellt mit HCl)
Laemmli-Probenpuffer (5x)	50 mM Tris 50 % Glycerin 500 mM DTT 10 % (w/v) SDS 0.5 % (w/v) Bromphenolblau pH 6,8 (eingestellt mit HCl)
Messpuffer	30 mM Tris 10 mM KPi 3 mM DTT 5 mM MgCl ₂ pH 7,5 (eingestellt mit HCl)
Pulldown-Puffer	30 mM Tris 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 3 mM DTT pH 7,5 (eingestellt mit HCl)
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 1 g/l SDS pH 8,3
SDS-Sammelgelpuffer	250 mM Tris 2 g/l SDS pH 6,8 (eingestellt mit Phosphorsäure)
SDS-Trenngelpuffer	750 mM Tris 2 g/l SDS pH 8,8 (eingestellt mit Phosphorsäure)
Standardpuffer (GSH-Sepharose)	30 mM Tris 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 3 mM DTT pH 7,5 (eingestellt mit HCl)

Standardpuffer (Ni-NTA-Agarose; Ni-Sepharose)	30 mM Tris 100 mM NaCl 20 mM Imidazol 5 mM MgCl ₂ 3 mM β-Mercaptoethanol pH 7,5 (eingestellt mit HCl)
Standardpuffer (GTPase)	30 mM Tris 100 mM NaCl 20 mM Imidazol 5 mM MgCl ₂ 3 mM β-Mercaptoethanol 0,1 mM GDP pH 7,5 (eingestellt mit HCl)
TAE-Puffer	40 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,5 (eingestellt mit Essigsäure)
TBST-Puffer	25 mM Tris 150 mM NaCl 3 mM KCl 0,1 % (v/v) Tween 20 pH 7,5 (eingestellt mit HCl)
Transferpuffer (Tankblot)	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
Tricingelpuffer	3 M Tris 3 g/l SDS pH 8,45 (eingestellt mit HCl)

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

3.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper	Organismus, Typ	Firma
Anti-Flag	Maus, mAb, IgG1, Klon M2	Sigma Aldrich (Steinheim)
Anti-Wrch1	Kaninchen, pAb, IgG	Novus Biologicals (Cambridge, England)
Anti-Cdc42	Maus, mAb, IgG1	BD Transduction Laboratories (Heidelberg)
Anti-Grb2	Kaninchen, mAb, Klon Y237	Epitomics (Burlingame, USA)
Anti-Crk	Maus, mAb, IgG2a	BD Transduction Laboratories (Heidelberg)
Anti-Nck	Kaninchen, pAb, IgG	Cell Applications (San Diego, USA)

Primäre Antikörper	Organismus, Typ	Firma
Anti-Src	Kaninchen, pAb	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-p120	Kaninchen, pAb, IgG	Abgent (San Diego, USA)
Anti-PAK1	Kaninchen, pAb	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-N-WASp	Kaninchen, mAb, IgG	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-FAK1	Kaninchen, pAb	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-Pyk2	Kaninchen, pAb	Cell Signaling (Danvers, USA)
Sekundäre Antikörper Spezifität, Organismus	Konjugat	Firma
Kaninchen anti-Maus	Meerretich-Peroxidase	Dako (Glostrup, Dänemark)
Ziege anti-Kaninchen, IgG	Meerretich-Peroxidase	Cell Signaling (Danvers, USA)

3.1.7 Biochemikalien und Chemikalien

Nukleotide

ATP	Gerbu (Gaiberg)
GDP	Sigma-Aldrich (Steinheim)
GTP	Jena Bioscience (Jena)
GppNHp	Jena Bioscience (Jena)
GppCH ₂ p	Jena Bioscience (Jena)
mantGDP	Jena Bioscience (Jena)
mantGTP	Jena Bioscience (Jena)
mantGppNHp	Jena Bioscience (Jena)
tamraGTP	MPI Dortmund
tamraGppNHp	Jena Bioscience (Jena)
Cy3GTP	Jena Bioscience (Jena)
Cy3GppNHp	Jena Bioscience (Jena)

Proteinstandard

PageRuler Prestained Protein Ladder: 170 / 130 / 95 / 72 / 55 / 43 / 34 / 26 / 17 / 10 kDa	Fermentas, Thermo Scientific (Karlsruhe)
--	---

Nukleinsäurestandard

GeneRuler 1kb DNA Ladder 250-10000 bp	Fermentas, Thermo Scientific (Karlsruhe)
--	---

Proteaseinhibitoren

Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail tablets	Roche (Mannheim)
PMSF (1 mM)	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Plasmide

pGEX-4T1, -4T2	GE Healthcare (München)
pGEX-2T	GE Healthcare (München)
pGEX-4T1 TEV	MPI Dortmund
pQE-30	Qiagen (Hilden)
pCDNA3 <i>flag</i>	MPI Dortmund

Enzyme und Proteine

Phusion-DNA-Polymerase	Finnzymes (Espoo, Finnland)
Taq-DNA-Polymerase	Fermentas, Thermo Scientific (Karlsruhe)
T4-DNA-Ligase	Fermentas, Thermo Scientific (Karlsruhe)
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, Thermo Scientific (Karlsruhe)
Thrombin	Serva (Heidelberg)
TEV	HHU Düsseldorf
Alkalische Phosphatase	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phosphodiesterase	Sigma-Aldrich (Steinheim)
BSA	Serva (Heidelberg)

Chromatographie-Säulenmaterial

GSH-Agarose	Macherey-Nagel (Düren)
GSH-Sepharose fast flow	GE-Healthcare (München)
Hi-Load™ Superdex G75	GE-Healthcare (München)
Hi Load™ Superdex G200	GE-Healthcare (München)
Ni-NTA-Agarose	Qiagen (Hilden)
Ni-Sepharose	GE-Healthcare (München)

3.1.8 Chemikalien

Agarose	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dimethylsulfoxyd (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Gerbu (Gaiberg)
Ethidiumbromid	AppliChem (Darmstadt)
Glutathion	Merck (Darmstadt)
Imidazol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isopropyl-b-D-thiogalactosid (IPTG)	Gerbu (Gaiberg)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)

Alle weiteren verwendeten Chemikalien, die vorstehend nicht genannt wurden, wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Gerbu, ICN, Life Technologies, Merck, Riedel de Haen, Roth, Serva und AppliChem bezogen.

3.1.9 Kit-Systeme

QIAprep Spin Mniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)

3.1.10 Verbrauchsmaterialien

Amicon Ultra Centrifugal Filter Units	Millipore, Merck (Darmstadt)
Nap5-Säulen	GE-Healthcare (München)
Pipettenspitzen	Star Lab (Ahrensburg)
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio One (Frickenhausen)
Kulturröhrchen	Greiner Bio One (Frickenhausen)
Plastik-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Nalgene Bottle-Top Filter	Nalge Nunc (Neerijse, Belgien)
Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkultur-Flaschen/Schalen	TPP (Trasadingen, Schweiz)

3.1.11 Geräte

Analysenwaage ABS	Kern (Balingen-Frommern)
DNA-Gelelektrophoresekammern	BioRad (München)
Elektroporator	BioRad (München)
Micro-Fluidizer	Microfluidics Corporation (Newton, USA)
Fluoreszenzspektrometer LS 50 B	Perkin Elmer (Waltham, USA)

Fluoreszenzspektrometer FluoroMax 4	Horiba (Bensheim)
Mikrokalorimeter VP-ITC	MicroCal (Milton Keynes, England)
Stopped-Flow SF-61 DX2 Double Mixing System	TgK Scientific, Hi-Tech Scientific (Bradford-on-Avon, England)
FPLC Äkta Prime	GE-Healthcare (München)
HPLC System Gold 166	Beckman Coulter (München)
Inkubator HAT	Infors (Bottmingen, Schweiz)
CO ₂ Inkubator	Heraeus (Hanau)
Magnetrührer SB161	Stuart, Dunn Labortechnik (Asbach)
SDS-PAGE-Kammer	BioRad (München)
PCR-Gerät MasterCycler	Eppendorf (Hamburg)
pH-Meter (pH 526)	WTW (Weilheim)
Photometer BioPhotometer plus	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Präzisions-Quarzküvetten	Hellma (Müllheim)
Rotoren (JA 10-14, 25.50)	Beckman Coulter (München)
Spannungsquellen Power Pac 300	BioRad (München)
Heizblock	Hartenstein (Würzburg)
Thermoschrank	Heraeus (Hanau)
Tischzentrifuge (5415D)	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge, kühlbar (5417R)	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge, kühlbar (5810R)	Eppendorf (Hamburg)
UV/VIS-Spektralphotometer DU 800	Beckman Coulter (München)
Vakuum-Membranpumpe	Ilmvac (Ilmenau)
Zentrifugen (Avanti J-20 XP)	Beckman Coulter (München)

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus 5 ml Schüttelkulturen wurde mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reinigung von Plasmid-DNA beruht auf einer alkalischen Lyse [Birnboim, 1992] der Bakterienzellen, darauf folgender Neutralisation, dem Einstellen von Hochsalzbedingungen und Adsorption der Plasmid-DNA an eine DEAE-gekoppelte Silicagel-Matrix.

Alle Schritte der Plasmid Isolierung wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zuerst wurden 5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* für 3 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in P1 Puffer (250 µl), der RNase A enthält, resuspendiert und durch die Zugabe von P2 Puffer (250 µl), der NaOH und SDS enthält, lysiert. Das SDS führt zur Solubilisierung von Membranlipiden und Proteinen der Zellmembran und somit der Freisetzung des Zellinhalts. Der alkalische pH-Wert hingegen bewirkt die Denaturierung von DNA und Proteinen und die Hydrolyse von RNA. Anschließend wurde N3 Puffer (350 µl) zugesetzt, der zur Neutralisation führt und zusätzlich die Salzkonzentration erhöht und damit eine Präzipitation von denaturierten Proteinen, chromosomaler DNA und Zellfragmenten herbeiführt. Die verhältnismäßig kurze Plasmid-DNA kann hingegen renaturieren und bleibt daher in Lösung. Das Präzipitat wurde durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 13000 rpm sedimentiert und der klare Überstand auf eine *QIAprep Spin* Säule gegeben und für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert, wobei die negative Ladung der Plasmid-DNA zu einer Adsorption an die positiv geladenen DEAE-Gruppen führt, die an die Silicagel-Matrix gekoppelt sind. Anschließend wurde die Silicagel-Matrix mit den Puffern PB (500 µl) und PE (750 µl) gewaschen und die Plasmid-DNA in 30-50 µl EP-Puffer eluiert.

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA Fragmenten nach ihrer Größe kann eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese [McDonell et al., 1977] durchgeführt werden. Die negativ geladene DNA wandert im elektrischen Feld; größere Fragmente wandern langsamer durch den Siebeffekt des Agarosegels. Anhand eines mit aufgetragenen DNA-Standards kann die Basenlänge linearisierter Fragmente bestimmt werden.

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden 1%-ige Gele verwendet, wobei die Agarose in TAE-Puffer gelöst wurde und während des Abkühlens Ethidiumbromid zugegeben wurde. Bevor die Agarose kalt und somit fest wurde, führte das

Einsetzen eines Kamms zur Ausbildung von Taschen. Anschließend wurde das Gel mit TAE-Puffer übergossen und die mit 6x Probenpuffer versetzten DNA Fragmente bei einer konstanten Spannung von 100 V aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese können die DNA Fragmente aufgrund des bei der Herstellung des Agarosegels verwendeten Ethidiumbromids auf einem UV-Transilluminator bei 312 nm sichtbar gemacht werden. Falls DNA Fragmente isoliert werden sollten, wurden sie aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem '*QIAquick gel extraction kit*' von Qiagen nach den Herstellerangaben isoliert.

3.2.3 Transformation von *E. coli*

Transformation bezeichnet die Aufnahme von freier Fremd-DNA in kompetente Bakterienzellen, die die Fähigkeit besitzen, zirkuläre superhelikale DNA-Moleküle aus der Umgebung aufzunehmen. Unterschieden werden kann chemische Kompetenz von Elektrokompetenz, die beide auf der Permeabilisierung der Zellmembran von *E. coli* beruhen.

Für die Transformation von chemisch kompetenten Zellen wurden 100 µl Zellen auf Eis aufgetaut mit 1-5 µl Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden sie für 90 sec einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und nach kurzer Inkubationszeit auf Eis (1 min) mit 1 ml SOC Medium (ohne Antibiotika) versetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 60-90 min bei 37°C und 100 rpm wurden die Zellen bei 3200 rpm für 2 min zentrifugiert, und in 50 µl des Überstands resuspendiert (der restliche Überstand wurde verworfen). Abschließend wurde die Bakterienzellsuspension auf dem jeweiligen Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert.

Für die Transformation von elektrokompetenten Zellen wurden 50 µl auf Eis aufgetaute Zellen mit 5 µl des Ligationsansatzes in einer Küvette mit Aluminiumelektroden (BIO-RAD) gemischt. Dann wurden die Zellen einem kurzen elektrischen Impuls (Gene Pulser II System, BIO-RAD) ausgesetzt und nach kurzer Inkubationszeit auf Eis (1 min) mit 1 ml SOC Medium versetzt und, wie oben beschrieben, weiter verfahren.

3.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) [Mullis et al., 1992] ist ein *in vitro* Verfahren zur selektiven Amplifizierung von Nukleinsäuren.

Für die Reaktion werden eine hitzestabile DNA-Polymerase sowie zwei Oligonukleotide benötigt, die komplementär sind zu kurzen Bereichen der zu amplifizierenden DNA-Stränge und diese flankieren. Für präparative PCRs wurde die thermostabile *Phusion* DNA-Polymerase verwendet, eine artifiziell hergestellte Variante der DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* der Firma Finnzymes. Diese besitzt eine Korrekturlesefunktion (3'-5'-Exonukleaseaktivität) und weist deshalb eine geringe Fehlerrate auf. Für analytische Zwecke hingegen wurde die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet, die nicht über eine solche Korrekturlesefunktion verfügt.

Durch das Durchlaufen einer dreistufigen Reaktion wird die DNA vervielfältigt. Zuerst wird der Matrizenstrang (*template*) durch thermische Denaturierung bei 98 °C getrennt. Während des darauf folgenden Abkühlens auf 50-60 °C können die Oligonukleotide sich an die komplementären Sequenzen des Matrizenstrangs anlagern (*annealing*). Die darauf folgende Temperaturerhöhung auf 72 °C bewirkt die Synthese des neuen DNA-Strangs durch die DNA-Polymerase, beginnend von den Oligonukleotiden (*elongation*). Eine mehrfache Wiederholung (25-30 mal) dieses dreistufigen Reaktionsmechanismus führt zur Vervielfältigung der Anzahl an neuen DNA-Strängen. Zu berücksichtigen ist die richtige Wahl der Annealing-Temperatur, die im Wesentlichen von dem G/C-Gehalt des Oligonukleotids abhängt und mit der Wallace-Formel [Sambrook et al., 1989] angenähert berechnet werden kann:

$$T = 2 (NA + NT) + 4 (NC + NG) - 10 [^{\circ}\text{C}]$$

(NX: Anzahl der paarenden Base X in der Primer-Sequenz)

Die Reaktionsansätze hatten ein Volumen von 100 µl:

5-fach Phusion-Puffer	20 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
DMSO	3 µl
5' Primer (10 pmol)	3 µl
3' Primer (10 pmol)	3 µl
DNA template	100 ng
Phusion-Polymerase	1 µl
H ₂ O	ad 100 µl auffüllen

Das Zusetzen von DMSO verhindert die unspezifische Ausbildung von Sekundärstrukturen und erleichtert die Amplifikation von G/C-reichen Matrizensträngen.

Folgendes Programm wurde für die präparative PCR verwendet:

Schritt 1:	Denaturierung	98 °C	2 min
Schritt 2:	Denaturierung	98 °C	30 s
Schritt 3:	Annealing	55 °C	30 s
Schritt 4:	Elongation	72 °C	15-30 s/kb
Schritt 5:	Elongation	72 °C	7 min

Die Schritte 2-4 wurden 25 mal wiederholt.

Nach der Beendigung der Reaktion wurden die Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das PCR-Produkt gegebenenfalls mit dem '*QIAquick gel extraction kit*' von Qiagen nach den Herstellerangaben isoliert und anschließend mit Restriktionsendonukleasen geschnitten (3.2.5) und in einen Vektor ligiert (3.2.7). Gelagert werden können DNA-Fragmente bei -20 °C.

Eine analytische Schnell-PCR wurde durchgeführt um den Klonierungserfolg zu überprüfen. Hierfür wurde mit einer Pipettenspitze ein einzelner Klon von einer LB-Agarplatte aufgenommen und in einem Eppendorfggefäß (0,5 ml) abgestreift sowie eine 5 ml Kultur angeimpft.

Dem Eppendorfggefäß wurden folgenden Reagenzien zugesetzt:

10-fach Taq-Puffer	2,5 µl
5-fach Q-Solution	5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
5' Primer (10 pmol)	3 µl
3' Primer (10 pmol)	3 µl
Taq-Polymerase	1 µl
H ₂ O	ad 25 µl aufgefüllen

Das Zusetzen der Q-Solution hat einen positiven Effekt auf die Amplifizierung sekundärstruktur- und G/C-reicher Sequenzen.

Folgendes Programm wurde für die analytische Schnell-PCR verwendet:

Schritt 1:	Denaturierung	94 °C	4 min
Schritt 2:	Denaturierung	94 °C	30 s
Schritt 3:	Annealing	55 °C	30 s
Schritt 4:	Elongation	72 °C	60 s
Schritt 5:	Elongation	72 °C	7 min

Die Schritte 2-4 wurden 25 mal wiederholt.

Nach der Beendigung der Reaktion wurden die Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.2) analysiert.

3.2.5 DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen wurden verwendet um doppelsträngige DNA zu spalten um diese für eine Ligation einzusetzen. Die verwendeten Enzyme gehören zum Typ II der Restriktionsendonukleasen und ihre Erkennungssequenz besteht aus palindromischen Sequenzen aus 4, 6 oder 8 Basenpaaren. Der Schnitt kann glatt, oder versetzt sein, wobei Restriktionsenzyme die versetzt schneiden benutzt wurden, da so geschnittene DNA leichter zu ligieren sind.

Zu einem Reaktionsansatz wurden 50 µl DNA, 1 µl Restriktionsenzym und 6 µl 10-fach Puffer (spezifisch für die eingesetzte Restriktionsendonuklease) hinzugefügt und mit Wasser auf ein Endvolumen von 60 µl aufgefüllt. Dann wurde der Reaktionsansatz für eine Stunde bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Nach anschließender Reinigung mit dem '*PCR Purification Kit*' der Firma Qiagen nach Herstellerangaben wurde die DNA, wie eben beschrieben, mit der zweiten Restriktionsendonuklease gespalten.

3.2.6 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Der restringierte Vektor wurde, bevor er für eine Ligation eingesetzt wurde mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um eine Selbstligation zu verhindern. In dem Reaktionsansatz wurden 50 µl des Vektors, 1 µl alkalische Phosphatase (AP) und 6 µl 10-fach AP-Puffer eingesetzt und mit sterilem Wasser zu einem Endvolumen von 60 µl aufgefüllt. Es wurde die '*fastAP*' von der Firma Fermentas eingesetzt, die für die Dephosphorylierung nur 10 min bei 37 °C benötigt. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des '*PCR Purification Kits*' der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers gereinigt.

3.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren mittels T4-DNA-Ligase wurden 100 ng des linearisierten Vektors mit dem geschnittenen DNA-Fragment in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 gemischt. Der Reaktionsansatz wurde mit 2 µl Ligasepuffer versetzt, mit Wasser auf ein Volumen von 20 µl gebracht und die Reaktion durch Zugabe von 1 µl T4-DNA-Ligase eingeleitet. Nach 2 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Ligase durch eine Inkubation von 10 min bei 65-70 °C inaktiviert.

3.2.8 DNA- Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde durch die Firma GATC-Biotech AG durchgeführt, die auf der Didesoxymethode nach Sanger [Sanger et al., 1977] basieren und auch Didesoxy-Kettenabbruchmethode genannt wird. Durchgeführt wird eine PCR, in der die Polymerase I ausgehend von Primern die DNA amplifiziert. In jedem von vier Reaktionsansätzen ist jeweils eins der vier freien, zum Einbau vorgesehenen Nukleotide (dNTPs) durch eine Didesoxy-Variante (ddNTP) ersetzt. An diese ddNTPs können keine weiteren Nukleotide gebunden werden, da die 3'-OH-Gruppe für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids fehlt. So entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die mittels Kapillarelektrophorese analysiert werden können.

3.2.9 Lagerung transformierter Bakterienstämme

Zur Lagerung transformierter Bakterien wurde zunächst ein einzelner Klon von einer LB-Agarplatte aufgenommen und eine Übernachtskultur (5 ml) angeimpft. Hieraus wurde eine Glycerinkultur erstellt, wobei 1400 µl Übernachtskultur mit 200 µl 80%-igem Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert wurde.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Präparative Produktion rekombinanter Proteine

Zur Expression rekombinanter Proteine wurde eine Vorkultur aus TB-Medium (mit den jeweiligen Antibiotika) mit 10 µl einer Glycerinkultur angesetzt und diese bei 37 °C und 150 rpm über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Hauptkultur (TB-Medium mit denselben Antibiotika) kultiviert, die im Verhältnis 1:100 mit der Vorkultur angeimpft wurde. Bei 37 °C und 150 rpm wurde bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD 600) zwischen 0,6 – 0,8 gewartet und dann die Genexpression durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. Das IPTG lagert sich an den modifizierten *lac*-Promotor an und fungiert als synthetischer Aktivator der Genexpression. Danach wurden die Bakterienzellen bei 20 °C und 150 rpm über Nacht

inkubiert und danach bei 5000 rpm für 15 min zentrifugiert. Nachdem das Zellpellet in einem geeigneten Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert wurde, wurde es schließlich im gleichen Puffer im Verhältnis 1:3, entsprechend des Feuchtgewichts der Bakterienzellen resuspendiert und die Bakterienzellsuspension bei -20 °C gelagert.

3.3.2 Präparativer Zellaufschluss

Die eingefrorenen Bakterienzellen wurden aufgetaut und Protease Inhibitor Cocktail-Tabletten (1/100 ml), DNase (2 µg/ml) und Lysozym (200 µg/ml; nur beim Zellaufschluss mit Ultraschall) zugefügt. Der Aufschluss erfolgte mit Hilfe eines Micro-Fluidizers, wobei die Zellen unter hohem Druck durch eine enge Kapillare gepresst werden und durch die Scherkräfte aufplatzen. Dieser Vorgang wird insgesamt 3 mal durchgeführt, um möglichst alle Zellen aufzuschließen. Als zweite verwendete Methode wurden Zellen durch Ultraschallwellen aufgeschlossen. Hierbei werden Kavitationskräfte freigesetzt, bei denen es abwechselnd zu Hoch- und Tiefdruckphasen kommt und so entstehende Vakuumbblasen unter Hochdruck implodieren und damit Scherkräfte die Zellen zum Platzen bringen. Bei beiden Verfahren müssen die Zellen gekühlt werden, da die Temperatur während der Prozesse ansteigt. Die aufgeschlossenen Zellen wurden anschließend bei 20000 rpm und 4 °C für 1 h zentrifugiert. Der Überstand wurde für chromatographische Verfahren (3.3.3) weiter verwendet.

3.3.3 Chromatographische Verfahren

Chromatographieverfahren werden genutzt, um gezielt einzelne Proteine aus einem Protein-Gemisch zu reinigen und zu analysieren. Die löslichen Proteine werden als flüssige Phase über eine Säule (feste Phase) gegeben. Die unterschiedlichen Proteine können hierbei aufgrund ihrer Affinität zum Säulenmaterial oder wegen ihrer unterschiedlichen Größen voneinander getrennt werden.

3.3.3.1 Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie werden Proteine aufgrund ihrer Affinität zu speziellen Liganden oder Bindungspartnern, die auf dem Packmaterial einer FPLC-Säule fixiert sind, von anderen löslichen Proteinen getrennt. Diese können nicht an die Liganden auf dem Säulenmaterial binden und können im Durchfluss aufgefangen werden. Die an die Bindungspartner gebundenen Proteine werden später eluiert. Detektiert werden die Proteine bei einer Absorption von 280 nm.

Die meisten verwendeten Proteine wurden als Fusionsproteine mit der Glutathion-S-Transferase (GST) synthetisiert. Ein bis zwei Proteaseschnittstellen zwischen dem GST und dem zu isolierenden Protein ermöglichten bei Bedarf die Abtrennung des GSTs. Die Säule bestand aus GSH FastFlow-Sepharose 4B von der Firma GE-Healthcare. Glutathion (GSH), das der spezifische Ligand für GST darstellt, ist kovalent an die Sepharose gebunden.

Zuerst wird die Affinitätschromatographiesäule mit Standardpuffer äquilibriert und anschließend die Proteinlösung aufgetragen. Danach wird bis zum Erreichen der Basislinie in der Absorption wieder mit Standardpuffer gewaschen und dann ein zusätzlicher Waschschrift (2-3 Säulenvolumen) mit Hochsalz-ATP-Puffer durchgeführt. Die hohe Salzkonzentration soll unspezifische Bindungen an das Glutathion trennen und das ATP im Puffer bewirkt die Abtrennung von Chaperonen, die möglicherweise an das Fusionsprotein gebunden sind. Nachdem wieder mit Standardpuffer bis zum Erreichen der Basislinie gewaschen wurde, konnte das Fusionsprotein mit Elutionspuffer eluiert und in Fraktionen aufgefangen werden. Der Elutionspuffer enthält Glutathion, welches mit dem an das Säulenmaterial gebundenen Glutathion um die Bindung an das GST konkurriert und somit dieses vom Säulenmaterial abtrennt. Das Säulenmaterial wurde nach Beendigung mit 6 M Guanidinhydrochlorid regeneriert und in Standardpuffer gelagert. Die einzelnen Auftragungs- und Waschschriffe und das Eluat wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert (3.3.5) und das eluierte Fusionsprotein für weitere chromatographische Verfahren konzentriert (3.3.8), sowie die Proteinkonzentration ermittelt (3.3.9).

In einigen Fällen wurden die verwendeten Proteine als His₆-Fusionsprotein gereinigt. Der Histidin-*tag* bindet hierbei an die Ni²⁺-Ionen die an die Sepharose, also das Packmaterial der Säule gebunden sind. Die einzelnen Waschschriffe sind die gleichen wie für die Reinigung der GST-Fusionsproteine. Unterschiede bestehen in der Elution, wobei das His₆-Fusionsprotein durch einen linear ansteigenden Imidazolgradienten eluiert wird. Das Imidazol konkurriert mit dem Histidin-Peptid des Fusionsproteins um die Bindung an die Ni²⁺-Ionen und führt mit steigender Konzentration schließlich zu dessen Verdrängung aus dem Chelatkomplex. Regeneriert wird die Ni-Sepharose mit 1 M Imidazol und anschließend in Standardpuffer gelagert.

3.3.3.2 Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie, oder auch Gelfiltration genannt, werden Proteine aufgrund ihrer Größe voneinander getrennt. Große Proteine können im Vergleich zu kleineren Proteinen kaum oder gar nicht in das hochporöse Säulenmaterial eindringen und durchlaufen somit die Chromatographie-Säule schneller. Wenn die Säule kalibriert ist, kann leicht die Größe der eluierten Proteine aufgrund des Retentionsvolumens näherungsweise bestimmt werden.

Säulen mit verschiedenen Porengrößen werden für unterschiedlich große Proteine verwendet. Kleinere Proteine bis zu einer Größe von 75 kDa können mit einer Superdex G75 Säule gereinigt werden, wohingegen eine Superdex G200 für größere Proteine verwendet wird. Die Größe der Säule ist ausschlaggebend für die Proteinmenge und das Auftragungsvolumen, das eingesetzt werden kann. Es wurden Säulen der Größe 16/60 (Durchmesser in mm/Länge in cm) oder 26/60 verwendet.

Der verwendete Standardpuffer wurde vor Beginn der Gelfiltration filtriert und entgast, dann wurde damit die Säule äquilibriert (mindestens ein Säulenvolumen). Danach wurde die konzentrierte Proteinlösung aufgetragen, mit Standardpuffer eluiert und die Fraktionen gesammelt. Anschließend wurden die Fraktionen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert (3.3.5) und die entsprechenden Fraktionen, die ausreichend reines Protein enthielten, vereinigt, konzentriert (3.3.8) und die Proteinkonzentration bestimmt (3.3.9).

3.3.4 Umkehrphasen HPLC

Die Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigchromatographie (*reversed-phase high performance liquid chromatography*) kann verwendet werden, um Nukleotide nachzuweisen und zu charakterisieren. Die Auftrennung erfolgt isokratisch unter Ionenpaarbindung [Tucker et al., 1986], wobei die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleotide an die positiv geladenen Tetrabutylammonium(TBA)-Ionen binden. Der hydrophobe Acylanteil der TBA-Ionen wiederum bindet an die hydrophobe Festphasen-Matrix (C-18). Die Retentionszeit nimmt zu mit steigender Anzahl der Phosphatgruppen oder, wenn es sich um fluoreszenzmarkierte Nukleotide handelt, deren unpolare Fluorophore mit der hydrophoben Säulenmatrix interagieren. Mittels des Lambert-Beer'schen-Gesetzes kann aus der optischen Dichte bei $\lambda=254$ nm unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten

die Nukleotidkonzentration errechnet werden. Nach der Kalibrierung können die Zusammensetzung und die Nukleotidkonzentration bestimmt werden.

Die Flussgeschwindigkeit betrug bei allen Messungen 1,8 ml/min. Die Acetonitrilkonzentration der mobilen Phase betrug 7,5 % bzw. 25 % bei fluoreszenzmarkierten Nukleotiden.

3.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) [Shapiro et al., 1967; Laemmli, 1970] dient der analytischen Auftrennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichts. Die Proteine liegen hierbei in denaturierter Form vor, das bedeutet, alle Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine sind aufgebrochen. Sie liegen somit als ellipsoide Strukturen vor. Die Denaturierung wird durch den Laemmli-Probenpuffer hervorgerufen, dessen enthaltendes Detergenz SDS an die Proteine bindet und die Auftrennung der intra- und intermolekularen Wechselwirkungen bedingt. Für die Spaltung von Disulfidbindungen wird dem Puffer außerdem ein Reduktionmittel zugesetzt (β -Mercaptoethanol, DTT oder auch DTE). Das SDS ist außerdem nötig, da es mit seiner negativ geladene Kopfgruppe die Eigenladung der Proteine maskiert und dadurch Anionen entstehen, die ein fast konstantes Verhältnis von Gesamtladung zu Molekulargewicht besitzen. Unterschiede der Eigenladung der unterschiedlichen Proteine können somit vernachlässigt werden. Als Folge der Molekularsiebeigenschaft des Polyacrylamidgels sind die relativen Mobilitäten der Proteine umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts.

Polyacrylamidgele entstehen durch Co-Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylen-Bisacrylamid. Die radikalische Kettenreaktion wird durch Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter und Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator eingeführt. Für die optimale Auftrennung von Proteinen verschiedener Größen wurden Gele mit unterschiedlichen Polyacrylamidkonzentrationen (7,5 %-15 %) hergestellt (Tab. 3.1). Es wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt, wobei dem Trenngel ein grobporigeres Sammelgel vorgeschaltet ist und eine Schärfung der Proteinbanden bewirkt.

Die mit 5-fach Laemmli-Probenpuffer versetzten Proben wurden zunächst einige Minuten bei 95 °C vollständig denaturiert. Nach dem Auftragen in die Taschen des Sammelgels erfolgte die Elektrophorese bei 100 V. Das Gel wurde nach Beendigung mit einer Färbelösung aus Coomassie Brilliant Blue (G250 und R250),

Ethanol und Essigsäure gefärbt und anschließend mit Entfärbelösung entfärbt, oder für einen Western blot (3.3.6) eingesetzt.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele.

Lösung	Sammelgel	7,5% Trenngel	10% Trenngel	12,5% Trenngel	15% Trenngel
H ₂ O	1,25 ml	1,5 ml	1 ml	0,5 ml	-
Acrylamid-lösung	0,3 ml	1,5 ml	2 ml	2,5 ml	3 ml
Trenngel-puffer	-	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Sammelgel-puffer	1,5 ml	-	-	-	-
10% (w/v) APS	20 µl	45 µl	45 µl	45 µl	45 µl
TEMED	10 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

Eine Variante zur SDS-PAGE stellt die SDS-Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow [Schagger und von Jagow, 1987] dar. Im Unterschied zu der Gelelektrophorese nach Laemmli besitzt sie ein größeres Auflösungsvermögen für Proteine die kleiner sind als 15 kDa. Der Hauptunterschied besteht neben dem Zusatz von Glycerin im Trenngel in der Verwendung eines Kathodenpuffers (der Tricin enthält) und Anodenpuffers. Auch hier wurde ein diskontinuierliches Gel-system verwendet, bei dem ein Sammelgel dem Trenngel vorgeschaltet wurde (Tab. 3.2).

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele nach Schägger und von Jagow (Tricingele).

Lösung	Tricin-Sammelgel	16% Tricingel
H ₂ O	2,59 ml	0,48 ml
Acrylamidlösung	0,41 ml	2,1 ml
Tricingelpuffer	1 ml	1,68 ml
Glycerin	-	0,78 ml
10% (w/v) APS	20 µl	45 µl
TEMED	10 µl	15 µl

3.3.6 Western Blot

Unter *Blotting* versteht man den elektrophoretischen Transfer von Molekülen von einem Gel auf eine Membran. Handelt es sich bei diesen Molekülen um zuvor elektrophoretisch aufgetrennte Proteine, bezeichnet man dies als Western Blot, der eine spezifische Nachweisreaktion von den aus dem Gel auf die Membran übertragenen immobilisierten Proteinen erlaubt. Der Transfer wurde nach dem *Tank-Blot* Verfahren durchgeführt. Hierfür wurden vor dem Transfer 6 *Whatman*-Papiere, 2 Schwämme, die Membran und das Polyacrylamidgel für 10 min in Transferpuffer inkubiert. Dann wurden die Bestandteile luftblasenfrei übereinander geschichtet. Ausgehend von der Anode (weiß) zur Kathode (schwarz) ist die Reihenfolge: Schwamm, 3 *Whatman*-Papiere, Membran, Gel, 3 *Whatman*-Papiere, Schwamm. Dann wurde die Kompressionskassette geschlossen und in die Laufkammer gesetzt, die mit Transferpuffer gefüllt wird. Ein ebenfalls eingesetzter Eisblock verhindert das Überhitzen der Apparatur. Die Laufzeit betrug je nach Größe der zu transferierenden Proteine 30-90 min bei 100 V.

3.3.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Immunoblotting)

Immobilisierte Proteine, die durch einen Western blot von einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran übertragen wurden, können selektiv durch Antigen-spezifische Antikörper immunologisch nachgewiesen werden. Der spezifische Nachweis rekombinanter Proteine erfolgt durch Antikörper die gegen ein Epitop der jeweiligen Proteine gerichtet sind. Der primäre Antikörper, der an das Protein bindet, wird wiederum von einem sekundären Antikörper, welcher kovalent an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, gebunden. Detektiert wird dann die Enzymaktivität der Peroxidase durch die ECL-Methode. Durch wird das Vorhandensein eines bestimmten Proteins indirekt nachgewiesen.

Zuerst wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch eine Inkubation mit Blockierlösung (TBST-Puffer mit 3-5 % Milchpulver oder TBST Puffer mit 5 % BSA) abgesättigt. Die Inkubation mit Blockierlösung auf einem Schüttler betrug mindestens 1 h oder wurde bei 4 °C über Nacht durchgeführt und die Lösung anschließend verworfen. Danach wurde der primäre Antikörper in einer entsprechenden Verdünnung in derselben Blockierlösung angesetzt und zu der Membran gegeben. Die Inkubationsdauer betrug 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Danach wurde die Membran 3-mal 5 min mit TBST gewaschen und dann der sekundäre Antikörper in entsprechender Verdünnung in Blockierlösung angesetzt, zu der Membran zugefügt und für 1 h bei Raum-

temperatur inkubiert. Abschließend wurde 3-mal 5 min mit TBST gewaschen und die Proteinbanden mittels ECL-Chemolumineszenz visualisiert. Dabei wird ein zyklisches Diacylhydrazid (Luminol) mit Wasserstoffperoxid durch die an den Sekundär-Antikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert. Das sich in einem elektronisch angeregten Zustand befindende Reaktionsprodukt gibt seine Energie durch Aussenden von Licht ab. Die Chemolumineszenz wird dabei durch die Anwesenheit sogenannter *Enhancer*-Moleküle verstärkt. Das Maximum der Lichtemission liegt bei 428 nm und kann somit mit kurzen Expositionszeiten zur Belichtung benutzt werden. Zur Visualisierung wurden einerseits hochsensitive Röntgenfilme (Fuji Medical X-Ray Film, Fujifilm) benutzt, die mit einer Entwicklermaschine (Curix 60, AGFA) entwickelt wurden. Hierbei wurde eine ECL-Lösung der Firma GE Healthcare (*ECL Western Blotting Detection Reagents*, RPN2106) eingesetzt. Andererseits wurde ein Imager (ChemoStar Imager, INTAS) verwendet um die Chemolumineszenz sichtbar zu machen. Dafür wurde eine andere ECL-Lösung (*ECL Prime Western Blotting Detection Reagent*, RPN2236, GE Healthcare) benutzt.

3.3.8 Ultrafiltration zur Konzentrierung

Bei der Ultrafiltration wird das Volumen einer Proteinlösung reduziert und die enthaltenen Proteine somit konzentriert. Hierfür wurden Amicon-Zentrifugenkonzentratoren der Firma Millipore verwendet. Die Proteinlösung wird bei der Zentrifugation durch eine Membran mit bestimmter Porengröße gedrückt. Abhängig von der Porengröße der Membran können das Lösungsmittel und niedermolekulare Bestandteile die Membran passieren, wohingegen Proteine ab einer bestimmten Größe zurückgehalten werden. Das bedeutet, dass bei der Wahl der Membran die Porengröße kleiner sein muss, als das Molekulargewicht des zu konzentrierenden Proteins.

Es wurden Amicon-Zentrifugenkonzentratoren mit verschiedenen Ausschlußgrößen (*molecular weight-cut-off*, MWCO) benutzt: 3, 10, 30 und 50 kDa. Die Konzentratoren wurden mit Proteinlösung gefüllt und dann in einem Ausschwingrotor bei maximal 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert, bis das gewünschte Endvolumen oder die gewünschte Konzentration erreicht wurde. Angewandt wurde das Verfahren nach den jeweiligen Chromatographieverfahren (3.3.3) für weitere Reinigungsschritte oder zur Lagerung des Proteins nach der Reinigung.

3.3.9 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

3.3.9.1 Bradford-Methode

Bei der Bradford-Methode erfolgt die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung durch Farbreaktion mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 [Bradford, 1976]. Der Farbstoff wird in seiner anionischen Form stabilisiert, wenn er mit den Seitenketten von Arginin, aber auch Histidin, Lysin, Tyrosin, Tryptophan and Phenylalanin des Proteins [Compton und Jones, 1985] interagiert, wobei es zur Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 zu 595 nm kommt. Die Proteinkonzentration wird anhand einer Kalibrierungsgeraden, die mit einer BSA-Standard-Lösung erstellt wird, bestimmt.

Die zu untersuchende Proteinlösung wurde zu 500 µl der Bradford-Lösung pipettiert und die Extinktion bei 595 nm nach 5 minütiger Inkubation gemessen. Extinktionswerte zwischen 0,2-0,8 wurden mit Hilfe der Kalibrierungsgeraden ausgewertet.

3.3.9.2 Methode nach Ehresmann

Eine andere Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration ist die Methode nach Ehresmann [Ehresmann et al., 1973]. Diese wurde eingesetzt bei kleineren Proteinen und wenn aufgrund fehlender Arginine die Bradford-Methode erkennbar falsche Werte lieferte. Gemessen wird die UV-Absorption der verdünnten Proteinlösung bei 228,5 und 234,5 nm (gegen Puffer). Die Konzentration kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Protein (mg/ml)} = \frac{(A_{228,5} - A_{234,5})}{3,154}$$

3.3.10 Nukleotidaustausch

Bei dem Nukleotidaustausch oder der Nukleotidbefreiung von kleinen GTPasen nach John [John et al., 1990] wird das an die GTPase gebundene Nukleotid (meist GDP) abgebaut und ein Nukleotidanalogen, das im gleichen Verhältnis oder im Überschuss (1,5-fach) vorliegt, gebunden. Der enzymatische Abbau des Nukleotids zu GMP bzw. G wird durch Zugabe von alkalischer Phosphatase (0,2-1,0 U) eingeleitet. Außerdem wird ein spezieller Austauschpuffer (2 M (NH)₂SO₄, 1 mM ZnCl₂) verwendet, der die Austauschrate des Nukleotids erhöht. Die GTPase bindet das frei vorliegende, nicht hydrolysierbare, synthetische Nukleotid (GppNHp, GppCH₂p, mantGppNHp, tamraGppNHp oder Cy3GppNHp) mit einer viel höheren

Affinität als das durch den Abbau vorliegende Monophosphat oder Guanin. Das Nukleotidanalogen wird somit quantitativ gebunden. Der Ansatz wurde bei 4 °C über Nacht oder für 2-3 h inkubiert. Die Hydrolyse des Nukleotids wurde dabei mittels HPLC (*high performance liquid chromatography*) (3.3.4) überprüft.

Bei dem Nukleotidaustausch wurde nach dem vollständigen Abbau des Nukleotids das Protein (je nach Volumen) über eine NAP-5-Säule (GE-Healthcare) nach dem Prinzip einer Gelfiltration gereinigt und somit Protein, das nun synthetisches Nukleotid gebunden hatte von ungebundenem synthetischem Nukleotid und Nucleosid getrennt. Detektiert wurden anschließend die Protein enthaltenden Fraktionen, indem je 2 µl auf eine Nitrocellulose-Membran pipettiert wurden und mit Ponceau-Reagenz gefärbt wurden. Positive Fraktionen wurden vereinigt und mittels HPLC die Konzentration bestimmt.

Bei der Nukleotidbefreiung wurde nach Austausch zu GppNH₂p in einem zweiten Schritt das Nukleotid mittels Phosphodiesterase hydrolysiert, wobei der Abbau wieder mittels HPLC verfolgt wurde. Inaktiviert wurde die alkalische Phosphatase und die Phosphodiesterase durch zweimaliges Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff.

Das nukleotidfreie Protein konnte anschließend mit einem gewünschten Nukleotid beladen werden, indem es mit 1-1,2-fachem Überschuss zu der unbeladenen GTPase gegeben wird. Nach kurzer Inkubationszeit auf Eis wird der Ansatz über eine NAP5-Säule gereinigt und so überschüssiges ungebundenes Nukleotid abgetrennt und weiter verfahren wie bei dem Nukleotidaustausch.

Eine andere Methode, die den direkten Nukleotidaustausch verursacht, erfolgt durch die Zugabe von EDTA. Es komplexiert das Mg²⁺, welches für die Stabilisierung zwischen GTPase und Nukleotid nötig ist, und hebt somit die Nukleotidbindung an das Protein auf. Durch einen sehr hohen Überschuss (50-fach bis 100-fach) des gewünschten Nukleotids (z.B. GTP, GppNHp) wird diese Bindung begünstigt. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis kann das Protein wiederum über eine NAP5-Säule gereinigt werden und von überschüssigem freiem Nukleotid getrennt werden. Wichtig ist hierbei einen Puffer zu verwenden, der Mg²⁺ enthält. Danach wird wie zuvor verfahren und abschließend die Konzentration mittels HPLC bestimmt.

Bei geringer Affinität einer GTPase zu seinem Nukleotid kann der Nukleotid-austausch auch ohne Verwendung von EDTA und lediglich durch Zugabe eines Überschusses des gewünschten Nukleotids bewirkt werden.

3.3.11 Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration wird genutzt, um das Molekulargewicht und die Stöchiometrie von Einzelproteinen zu bestimmen. Außerdem dient sie zur qualitativen Bestimmung der Bindung zwischen zwei Interaktionspartnern, da der Komplex aus zwei Proteinen früher eluiert, als die beiden Einzelproteine. Als Säule wurde eine Sephadex S75 10/30 eingesetzt. Die Säule wird mit Proteinen bekannter Größe kalibriert, so dass später leicht die Größe des zu bestimmenden Proteins ermittelt werden kann. Das Probenvolumen betrug 100 μ l und die Konzentration lag zwischen 200-300 μ M und bei sehr kleinen Proteinen noch etwas höher. Um die Ergebnisse zu visualisieren wurden während des Laufs Fraktionen gesammelt und diese mittels SDS-PAGE (3.3.5) analysiert. Bei geringen Konzentrationen wurden die Proben erst mit 5-fach Laemmli-Probenpuffer versetzt und dann auf einem 95 °C Heizblock eingedampft und somit das Volumen verringert und die Konzentration erhöht.

3.3.12 Affinitätspräzipitation (Pulldown-Assay) und Sedimentationsassay

Mit der Affinitätspräzipitation und dem Sedimentationsassay werden Protein-Protein Interaktionen qualitativ bestimmt. Bei beiden Methoden wird eines der beiden Proteine als GST-Fusionsprotein eingesetzt, an Glutathion-Sepharose-*beads* gebunden und dann das zweite Protein (ohne GST) zugesetzt, gewaschen und die Proben analysiert.

Nachdem die Glutathion-Sepharose-*beads* (100 μ l) in Standardpuffer äquilibriert wurden (3-mal mit 1 ml waschen, dazwischen zentrifugieren 1 min, 4 °C, 2000 rpm), wurde das GST-Fusionsprotein (40 μ M) zugefügt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das zweite Protein (60 μ M) zugesetzt und 45 min bei 4 °C inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 200 μ l. Zur späteren Analyse mittels SDS-PAGE wurde eine Probe (20 μ l; *Input*-Kontrolle) abgenommen und mit 5-fach Laemmli-Probenpuffer versetzt und aufgekocht. Anschließend wurde 3-6 mal mit 1 ml Standardpuffer gewaschen.

Bei der Affinitätspräzipitation wurde zwischen den Waschschritten bei 4 °C und 2000 rpm zentrifugiert. Bei dem Sedimentationsassay wurden die Proben auf Eis belassen und ca. 10 min gewartet bis die Glutathion-Sepharose-*beads* von alleine

auf den Boden des Reaktionsgefäßes absanken. Der Nachteil der Zentrifugation ist, dass schwache Bindungen zwischen den beiden Proteinen durch die Zentrifugalkraft aufgebrochen werden können. Deswegen stellt der Sedimentationsassay die sensitivere Methode dar, da hier auch schwache Bindungen nachgewiesen werden können.

Nach dem letzten Waschschrift wird der Puffer fast vollständig abgenommen und mit 50 µl 2-fach Leammli-Probenpuffer eluiert, die Proben aufgeköcht und zusammen mit der *Input*-Kontrolle über SDS-PAGE (3.3.5) analysiert. Bei einer Interaktion der beiden Proteine sind das Fusionsprotein und der Bindungspartner im Gel sichtbar, sonst nur das Fusionsprotein.

Zur Überprüfung der Affinitätspräzipitation und des Sedimentationsassays wurden Positiv- und Negativ-Kontrollen parallel zu dem zu untersuchenden Ansatz durchgeführt. In der Positiv-Kontrolle setzt man zwei Proteine ein, von denen bekannt ist, dass sie miteinander interagieren. Als Negativ-Kontrolle kann GST eingesetzt werden um auszuschließen, dass das Fusionsprotein über das GST mit dem potentiellen Bindungspartner interagiert.

Die Affinitätspräzipitation bzw. der Sedimentationsassay wurde mit zwei gereinigten Proteinen durchgeführt oder mit einem gereinigten GST-Fusionsprotein, das mit Lysaten von eukaryotischen Zellen (transfiziert oder untransfiziert) inkubiert wurde. Der Interaktionspartner wird dann als ein Protein aus einer Vielzahl an Proteinen gebunden. Häufig binden auch noch andere Proteine aus der Proteinsuspension an eines der beiden Proteine und bilden somit einen Multi-Proteinkomplex, wobei man nicht sagen kann, welche Proteine in diesem Komplex die direkten Interaktionspartner sind. Dies ist der Hauptunterschied zu der Affinitätspräzipitation bzw. dem Sedimentationsassay mit zwei isoliert vorliegenden Proteinen, bei dem somit die direkte Interaktion untersucht wird.

100 µl in Fish-Puffer äquilibrierte GSH-*beads* wurden mit 100 µM des GST-Fusionsproteins für 30 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und die GSH-*beads* 3 mal mit je 1 ml Fish-Puffer gewaschen. Zwischen den Waschschriften wurde jeweils 1 min bei 500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach der Lyse der eukaryotischen Zellen (3.4.7) wurden diese mit den GSH-*beads* und dem daran gebundenen GST-Fusionsprotein für 45 min bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Außerdem wurde eine Probe der lysierten Zellen (50-100 µl, totales Zelllysat, total) vor der Inkubation mit den GSH-*beads* abge-

nommen und mit 5-fach Laemmli-Probenpuffer versetzt, aufgeköcht und für eine Analysierung verwahrt. Danach wurde 3 mal mit je 1 ml Fish-Puffer gewaschen und die GSH-beads sedimentiert oder bei 4 °C und 500 rpm 1 min zentrifugiert. Zuletzt wurde der Fish-Puffer fast vollständig abgenommen und die GSH-beads mit 50-100 µl 2-fach Laemmli-Probenpuffer versehen, aufgeköcht und zusammen mit den Proben des totalen Zellysats (total) durch SDS-PAGE (3.3.5), Western blot (3.3.6) und Immunoblotting (3.3.7) analysiert. Als Negativkontrolle wurde auch hier GST eingesetzt.

3.3.13 Fluoreszenzspektroskopie

Der Fluoreszenzspektroskopie liegt zugrunde, dass bestimmte Moleküle abhängig von ihrem elektronischen Grundzustand Lichtquanten absorbieren, wodurch sie in einen elektronisch angeregten Zustand versetzt werden und anschließend wieder emittieren können, wenn die aufgenommene Energie beim Zurückfallen des Elektrons in seinen Grundzustand frei wird. Die bei der Abregung frei werdende Strahlung ist energieärmer und somit langwelliger als die Anregungswellenlänge, weil ein Teil der Energie durch Rotation, Translation und Vibration verloren geht. Dies wird auch als Rotverschiebung bezeichnet.

Die Fluoreszenz ist abhängig von der Umgebung des Fluorophors. Ausgehend von deren Polarität entscheidet sich, wie hoch der Anteil strahlungsloser Übergänge (*Quenching*) bei der Lichtemission des angeregten Moleküls ist. Dabei wird die Energie strahlungslos in Form von Translations-, Rotations- und Schwingungsenergie auf die molekulare Ebene des angeregten Moleküls übertragen. Die Wellenlänge wird durch diesen Prozess kaum verschoben.

Das Messprinzip der Fluoreszenzspektroskopie beruht auf der Änderung des Fluoreszenzsignals durch die Interaktion zweier Moleküle und eine dadurch bedingte Polaritätsverschiebung in der Umgebung des Fluorophors. Damit ermöglicht die Fluoreszenzspektroskopie die zeitaufgelöste Messung von Polaritätsänderung in der Umgebung des Fluorophors und kann deswegen für kinetische Messungen verwendet werden, wenn sich in der Fluorophorumgebung im Laufe der Zeit der Reaktion genügend ändert.

3.3.13.1 Fluoreszenzmarkierte Nukleotide

Zur Untersuchung von GTPasen können Nukleotidanaloga eingesetzt werden, die kovalent mit einem Fluorophor verknüpft sind. Es kamen mant-, tamra- und Cy3 modifizierte Guanosinnukleotide zum Einsatz, die das Fluorophor an der 2'- oder

3'-Position der Ribose tragen. Die Exzitationswellenlänge von mant-Nukleotiden liegt bei 366 nm und die der Emission bei 450 nm. Tamra- und Cy3-markierte Nukleotide besitzen eine Exzitationswellenlänge von 550 nm und eine Emissionswellenlänge von 570 nm. Verwendet werden sollten dieser fluoreszenzmarkierten Nukleotide, um die Nukleotidassoziation, -dissoziation sowie die Hydrolyse und die Interaktion zwischen GTPasen und Effektoren zu messen.

Die Beladung der Proteine mit den verschiedenen Nukleotiden erfolgte hierbei durch Nukleotidaustausch (3.3.10) oder das fluoreszenzmarkierte Nukleotid wurde unmittelbar vor der Messung mit nukleotidfreiem Protein gemischt.

3.3.13.2 Bestimmung langsamer Reaktionen

Fluoreszenzemissionsspektren langsamer Reaktionen (> 1000 s) wurden mit dem Fluoreszenzspektrometer (Perkin-Elmer LS50B) gemessen. Dieses Gerät verfügte über einen Küvettenwechsler und somit konnten 4 Proben parallel in 24 sec-Intervallen gemessen werden. Verwendet wurden Quarzküvetten. Das Reaktionsvolumen lag bei 600 μ l. Unter Berücksichtigung der Exzitations- und Emissionswellenlänge, sowie der Schlitzbreite wurden verschiedene fluoreszenzmarkierte Nukleotide in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt.

3.3.13.3 Bestimmung schneller Reaktionen

Schnelle Reaktionen, die in weniger als 1000 s ablaufen, wurden an einer *stopped-flow* Apparatur (Applied Photophysics SX18MV) gemessen. Bei dieser Methode werden zwei Lösungen, welche die beiden Interaktionspartner enthalten, schnell in eine Messzelle injiziert, unter gleichzeitiger Aufnahme des Fluoreszenzsignals mittels eines Photomultipliers. Die gerätebedingte Totzeit ist bei diesem Gerät kleiner als 2 Millisekunden. Die Exzitation erfolgt, wie beschrieben, bei 366 nm (mant) oder 550 nm (tamra, Cy3) und das Emissionslicht wird über einen Kantenfilter bei Wellenlängen über 408 nm bzw. 570 nm bestimmt.

3.3.14 Isotherme Titrationsmikrokalorimetrie (ITC)

Bei der isothermen Titrationskalorimetrie kann die Bindungsstärke zwischen zwei Molekülen bestimmt werden, die über die Wärmeänderung durch die frei werdende bzw. verbrauchte Wärme, bei der Bindung berechnet werden kann. Das Gerät detektiert schon sehr geringe Wärmeänderungen, die in der Messzelle im Vergleich zu einer Referenzzelle entstehen. Außer der Bindungskonstante lassen sich bei einer Messung die Änderung der Enthalpie ΔH , die bei der Interaktion der Proteine auftritt, bestimmen sowie die Bindungsstöchiometrie zwischen den beiden

Proteinen. Gemessen wird die Leistung, die nötig ist, um den Temperaturgradienten auszugleichen ($P = U \cdot I$ und $P = E/t$). Trägt man die Leistung gegen die Zeit auf, so gibt die Fläche unter dem Graphen die in diesem Zeitraum als Wärme abgegebene Energie wieder. Wird diese Wärme gegen das molare Verhältnis der beteiligten Proteine aufgetragen, erhält man eine Kurve, aus deren Krümmung die Affinitätskonstante K_A berechnet werden kann. Der reziproke Wert der Assoziationskonstante liefert die Bindungskonstante K_D .

Die Konzentration der eingesetzten Proteine kann vor der Messung näherungsweise über folgende Formel abgeschätzt werden:

$$\text{Konzentration}_{\text{Zelle}} / K_D \text{ erwartet} = 20\text{-}50$$

Die Konzentration des Proteins im Titrator wird dann 10-fach höher gewählt, als die Konzentration des Proteins in der Zelle. Generell gilt, dass für Interaktionen mit niedrigeren Bindungskonstanten höhere Proteinkonzentrationen eingesetzt werden müssen.

Es wurde ein VP-ITC Microkalorimeter (Microcal, Northhampton) eingesetzt. Eine auf die gewünschte Temperatur (15 °C) kalibrierte Messzelle im Inneren des Geräts wird mit der Lösung eines Proteins gefüllt. Die Proteinlösung wurde vorher entgast und auf die gleiche Temperatur wie die Messzelle vorgewärmt. Das zweite, ebenfalls entgaste und vorgewärmte Protein wird in einen Pipettierautomaten (Titrator) gefüllt und in einzelnen Titrationsschritten (8 µl) zu dem Protein in der Messzelle zugefügt bis zu dessen Sättigung. Die Injektionszeit betrug 2 µl/s, die Integrationszeit 2 s. Zwischen den Injektionen wurde 480 s gewartet, bis zum Erreichen der Ausgangstemperatur. Für die Messungen wurden sowohl das Protein in der Messzelle als auch das Protein in der Spritze in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte durch das Programm Origin für ITC 3.1 von Microcal.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Für alle Arbeiten wurden HeLa-Zellen verwendet. Diese wurden in *Dulbecco's modified eagles medium* (DMEM) mit 1 g/l Glukose bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Dem Medium wurde außerdem 10 % fetales Kälberserum (FCS, *fetal calf serum*) und 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin zugesetzt. Kultiviert wurden die Zellen in 15 ml Medium in Kulturflaschen (T75, 75 cm²).

3.4.2 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden schnell bei 37 °C aufgetaut und 10 ml kaltes Medium tropfenweise zugefügt. Danach wurde 5 min bei Raumtemperatur und 1000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und über Nacht bei Standardbedingungen kultiviert (3.4.1). Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen.

3.4.3 Passagieren von eukaryotischen Zellen

Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt. Zuerst wurde das Kulturmedium mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellen anschließend mit sterilem PBS (ohne $MgCl_2/CaCl_2$) gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA für 5 min bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Die von der Oberfläche abgelösten Zellen wurden in 2 ml Medium aufgenommen, um die Zellzahl zu bestimmen. Abhängig von der gewünschten Dichte wurde die entsprechende Menge an Zellen in eine neue, 15 ml vorgewärmtes Medium enthaltende Zellkulturflasche überführt. Inkubiert wurden die Zellen anschließend bei Standardbedingungen (37 °C und 5 % CO_2).

3.4.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der *TC10 cell counter* der Firma Bio Rad eingesetzt. Hierfür wurden 10 μ l einer Zellsuspension auf einen speziellen Objektträger aufgetragen und dieser in das Gerät eingesetzt. So konnten Konzentrationen im Bereich von 5×10^4 – 5×10^6 Zellen/ml bestimmt werden. Bei geringerer Konzentration wurden die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer und Verwendung eines Mikroskops bestimmt.

3.4.5 Kryokonservierung von Zellen

Nachdem die Zellen passagiert, also gewaschen, von der Oberfläche abgelöst und zentrifugiert wurden, wurde das Zellpellet in 2 ml Medium resuspendiert, das 20 % FCS und 10 % DMSO enthielt, und die Zellzahl ermittelt (3.4.4). Dann wurden jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Kryogefäß eingefroren. Hierfür wurden jeweils 1,5 ml Medium mit 20 % FCS und 10 % DMSO in das Kryogefäß vorgelegt und dann das entsprechende Volumen resuspendierter Zellen zugegeben. Die Kryogefäße wurden dann in eine mit Isopropanol gefüllte Gefrierbox überführt und für mindestens 24 h bei -80 °C eingefroren. In der Box ist ein kontinuierliches Abkühlen der Zellen um 1 °C/min gewährleistet. Die Kryogefäße wurden nach der Inkubation

bei -80 °C für eine langfristige Lagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

3.4.6 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Zur Transfektion von HeLa Zellen wurde das Transfektionsreagenz *Turbofect* der Firma Fermentas eingesetzt. Eine bestimmte Zahl von Zellen (1×10^6 , oder $1,5 \times 10^6$ Zellen) wurde am *Tag* vor der Transfektion in Zellkulturschalen überführt und über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten *Tag* wurde 1 ml DMEM (ohne FCS) mit 5 µg der zu transfizierenden DNA und 10 µl Turbofect versetzt, gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Kurz vor der Transfektion wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch neues vorgewärmtes Medium (10 ml) ersetzt. Dann wurde die Transfektionslösung tropfenweise auf die Zellen aufgebracht und diese anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ für 4-6 h inkubiert. Danach wurde das Gemisch aus Medium und Transfektionslösung abgenommen und gegen neues, vorgewärmtes Medium (10 ml) ersetzt. Nach 24 h wurde das Medium erneut gewechselt und weiter inkubiert bis zur Lyse der Zellen (3.4.7).

3.4.7 Zellyse eukaryotischer Zellen

Transfizierte Zellen wurden 48 h nach der Transfektion lysiert. Untransfizierte Zellen wurden, 24-48 h nachdem sie passagiert wurden, lysiert. Alle Schritte erfolgten bei 4 °C. Zuerst wurden die Zellen mit 10 ml eiskaltem PBS (mit MgCl₂/CaCl₂) gewaschen. Danach wurde 1 ml PBS (mit MgCl₂/CaCl₂) über die Zellen gegeben und diese mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 500 µl Fish-Puffer resuspendiert und anschließend für 15 min auf einem Rotator inkubiert. Danach wurde für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und direkt für die Affinitätspräzipitation oder den Sedimentationsassay (3.3.12) eingesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Proteinisolierung

Um biochemische Interaktionsstudien mit Proteinen durchführen zu können, müssen diese in reiner Form vorliegen, um Störungen zu vermeiden und das Fehlerpotential in Messungen zu minimieren. Außerdem wird häufig eine relativ große Menge der Proteine benötigt. Um dies zu gewährleisten, wurden die zu untersuchenden Proteine in Bakterien produziert (3.3.1) und anschließend über chromatographische Verfahren gereinigt (3.3.3). Hierfür wurden die Proteine oder Proteinfragmente kloniert. Die jeweilige kodierende DNA-Sequenz wurde mittels PCR (3.2.4), Restriktion (3.2.5) und anschließender Ligation (3.2.7) in einen geeigneten Vektor kloniert und in XL1Blue-Zellen (*E. coli*) transformiert (3.2.3). Der Klonierungserfolg wurde durch eine analytische Schnell-PCR (3.2.4) und eine DNA-Sequenzierung (3.2.8) überprüft. Bei einem positiven Resultat wurde die DNA in Expressionsstämme von *E. coli* transformiert und eine Glycerinkultur für die langfristige Lagerung bei -80 °C angelegt (3.2.9). Die DNA-Sequenzen der verwendeten cDNAs wurden aus der *Genebank* Datenbank erhalten und sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Datenbankidentifikationsnummern der verwendeten cDNAs.

GTPase	accession number	Effektoren	accession number
Wrch1	BC040076	PAK1	NM_002576
Chp	AF097887	N-WASp	NM_003941
Cdc42	NM_001791	Pyk2	NM_004103
Adaptoren	accession number	GAP Proteine	accession number
Grb2	NM_002086	p50GAP	NM_004308
Nck1	BC006403	OPHN1	NM_002547
Src	V00402	Graf1	Y10388
Crk	NM_005206	p190GAP	M94721
p120	NM_002890	Abr	L19704
		MgcRac	BC032754
		DLC1	NM_006094

Die Synthese der Proteine erfolgte als GST-Fusionsproteine (3.3.1). Nachdem die Zellen aufgeschlossen (3.3.2) und zentrifugiert waren, wurde der Überstand in einem ersten Reinigungsschritt über eine Affinitätschromatographiesäule gereinigt (3.3.3). Das Eluat wurde mittels Ultrafiltration konzentriert (3.3.8) und die Konzentration bestimmt (3.3.9). Danach wurde das Protein entweder durch eine Protease gespalten TEV (*tobacco etch virus*) oder Thrombin oder weiter als Fusionsprotein gereinigt. In einem zweiten Schritt wurde das proteolytisch gespaltene Protein oder das Fusionsprotein dann über eine Größenausschlusschromatographie gereinigt und die entsprechenden Fraktionen vereinigt. Häufig wurde bei proteolytisch gespaltenen Proteinen noch eine Affinitätschromatographie durchgeführt um den GST-tag vollständig zu entfernen. Nach Konzentrierung durch Ultrafiltration und Bestimmen der Konzentration wurde das Protein aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

4.1.1 Effektoren

Alle Effektorproteine wurden als GST-Fusionsproteine gereinigt. Die einzelnen Auftragungs- und Waschschriffe während der Affinitätschromatographie wurden mittels SDS-PAGE (3.3.5) visualisiert und sind für den Effektor PAK1 fl exemplarisch in Abbildung 4.1 dargestellt. Das konzentrierte Eluat wurde teilweise mithilfe einer Protease gespalten und der Rest weiter als Fusionsprotein gereinigt. Danach wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt, sowohl für das Fusionsprotein als auch für das gespaltene Protein, und die einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.1 B,C). Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und konzentriert, im Fall von GST-PAK1 fl. PAK1 fl wurde einer weiteren Affinitätschromatographie unterzogen, um die Reinheit zu erhöhen und abgespaltenes GST zu entfernen. Das finale hoch reine Protein (Abb. 4.1 D) wurde bei -80 °C gelagert.

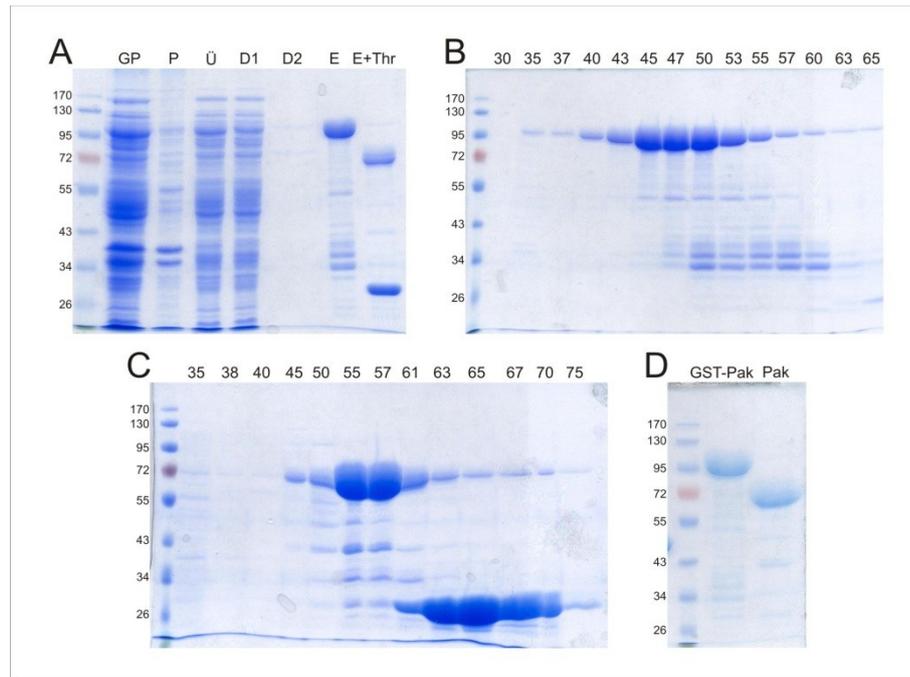


Abbildung 4.1: Reinigung von PAK1 fl. (10 % SDS-Gel, Coomassiefärbung) **A:** Affinitätschromatographie (GSH-FF Sepharose) und die einzelnen Waschschrte. GP: Gesamtprotein nach Zellaufschluss; P: Sediment nach Zentrifugation der Zellen nach dem Zellaufschluss; Ü: Überstand nach Zentrifugation der Zellen nach dem Zellaufschluss; D1: Durchfluss der Affinitätschromatographiesäule beim Aufragen des Überstandes und Waschen mit Standardpuffer; D2: Durchfluss beim Waschen mit Hochsals-ATP-Puffer; E: Vereinigte Fraktionen nach Elution mit Elutionspuffer; E+Thr: Probe des Eluats versetzt mit Thrombin über Nacht bei 4 °C. **B:** Größenausschlusschromatographie (Superdex 200 26/60) des GST-Fusionsproteins. 30-65: gesammelte Fraktionen. Die Fraktionen 38-52 wurden vereinigt und konzentriert. **C:** Größenausschlusschromatographie (Superdex 200 26/60) des proteolytisch gespaltenen Proteins. 35-75: gesammelte Fraktionen. Die vereinigten Fraktionen 52-59 wurden über eine weitere Affinitätschromatographiesäule gegeben. **D:** gereinigtes GST-PAK1 fl nach der Größenausschlusschromatographie und PAK1 fl nach einer zweiten Affinitätschromatographie.

Fast alle Proteine konnten in großen Mengen und hoher Reinheit gereinigt werden. Eine Ausnahme stellte das Konstrukt N-WASp GBD-PPP dar. Nach dem proteolytischen Entfernen des GST-tags fing das Protein an zu degradieren. Das Konstrukt konnte somit nur als GST-Fusionsprotein verwendet werden, da dieses stabil war. Eine Zusammenstellung der verwendeten Konstrukte ist in der Tabelle 4.2 sowie der Abbildung 4.2 aufgeführt.

Tabelle 4.2: Konstrukte der Effektorproteine.

Effektoren	Bezeichnung	Vektor	Proteinfragment	Molekulargewicht
PAK1	PAK1 fl	pGEX-4T2	1-545	60,6 kDa
N-WASp	N-WASp GBD	pGEX-4T1	142-276	15,3 kDa
	N-WASp GBD-PPP	pGEX-4T1 TEV	142-393	26,5 kDa
Pyk2	Pyk2 FERM	pGEX-4T1 TEV	1-406	46,8 kDa

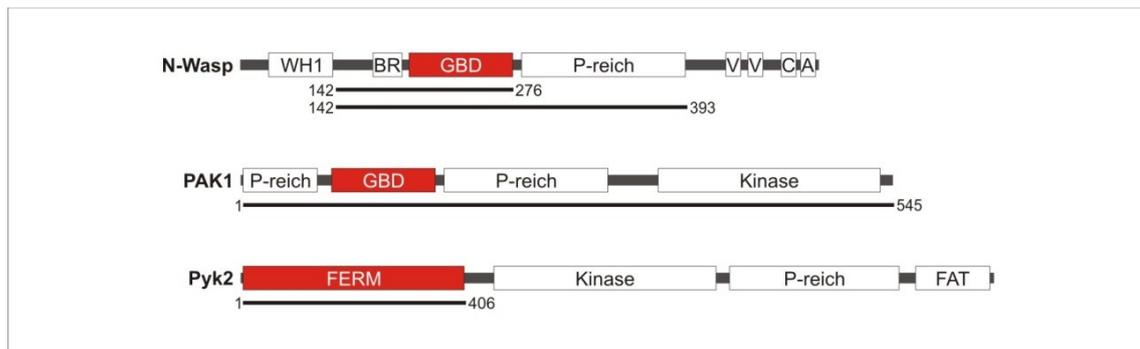


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur und Konstrukte der verwendeten Effektoren.

4.1.2 Adaptoren

Alle Adaptoren wurden als GST-Fusionsproteine gereinigt. Die einzelnen Proteinfragmente stellen dabei jeweils eine der SH3-Domänen des Proteins dar (Tab. 4.3 und Abb. 4.3). Alle SH3-Domänen wurden jeweils als GST-Fusionsprotein für Sedimentationsassays (3.3.12) und ohne GST-tag für die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) (3.3.14) isoliert. Insbesondere für die ITC-Messungen mussten die Proteine in großen Mengen und hoher Reinheit vorliegen. Die Proteinkonzentration dieser verhältnismäßig kleinen Konstrukte wurde mit der Ehresmann-Methode bestimmt (3.3.9).

Tabelle 4.3: Konstrukte der Adapterproteine.

Adaptoren: SH3-Domänen	Bezeichnung	Vektor	Proteinfragment	Molekulargewicht
Grb2	Grb2-1	pGEX-4T1	1-55	6,4 kDa
	Grb2-2	pGEX-4T1	159-217	6,9 kDa
Nck1	Nck1-1	pGEX-4T1 TEV	5-60	6,8 kDa
	Nck1-2	pGEX-4T1 TEV	109-163	6,4 kDa
	Nck1-3	pGEX-4T1 TEV	173-262	10,0 kDa
Src	Src SH3	pGEX-4T1 TEV	77-140	7,0 kDa
Crk	Crk SH3	pGEX-4T1	131-191	7,4 kDa
p120	p120 SH3	pGEX-4T1	275-350	8,9 kDa

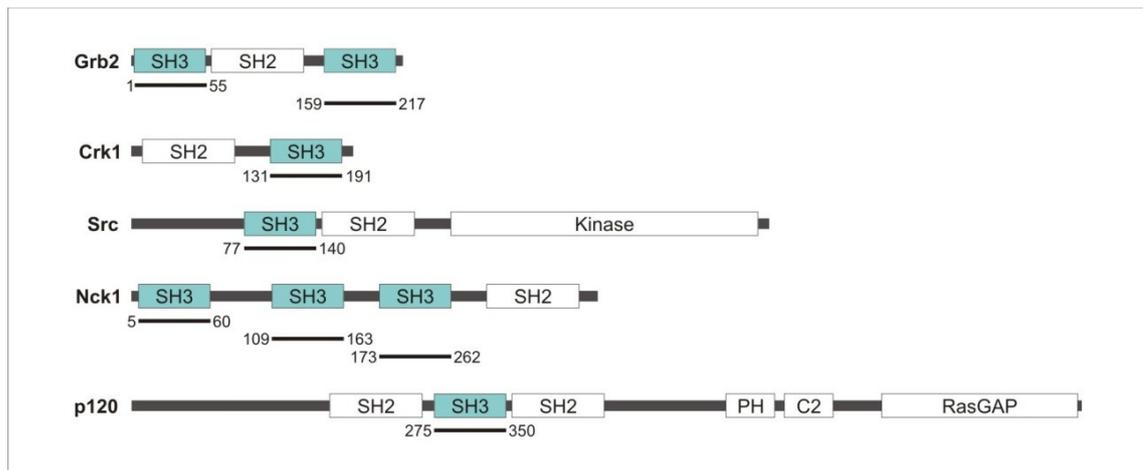


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur und Konstrukte der verwendeten Adapterproteine.

4.1.3 GTPase aktivierende Proteine (GAPs)

Für Interaktionsstudien zwischen GTPasen und Regulatoren wurden verschiedene GTPase aktivierende Proteine verwendet (GAPs). Die verwendeten Konstrukte der GAPs wurden von Mamta Jaiswal (p190, Graf1, Abr, MgcRac und DLC1) und Dr. Katja Kößmeier (p50GAP und OPHN1) gereinigt und zur Verfügung gestellt (Abb. 4.4 und Tab. 4.4). Die Konstrukte beinhalten die GAP-Domäne, die für die Interaktion mit der GTPase verantwortlich ist.

Tabelle 4.4: Konstrukte der GTPase aktivierenden Proteine.

GAPs	Bezeichnung	Vektor	Proteinfragment	Molekulargewicht
p50RhoGAP	p50 GAP	pGEX-2T	198-439	27,4 kDa
p190GAP	P190 GAP	pGEX-4T1	1250-1513	30,1 kDa
OPHN1	OPHN1 GAP	pGEX-4T1 TEV	360-572	24,4 kDa
Graf1	Graf GAP	pGEX-4T1 TEV	361-576	24,5 kDa
Abr	Abr GAP	pGEX-4T1	559-822	29,9 kDa
MgcRac	MgcRac GAP	pGEX-4T2	348-623	30,1 kDa
DLC1	DLC1 GAP	pGEX-4T1 TEV	609-878	30,1 kDa

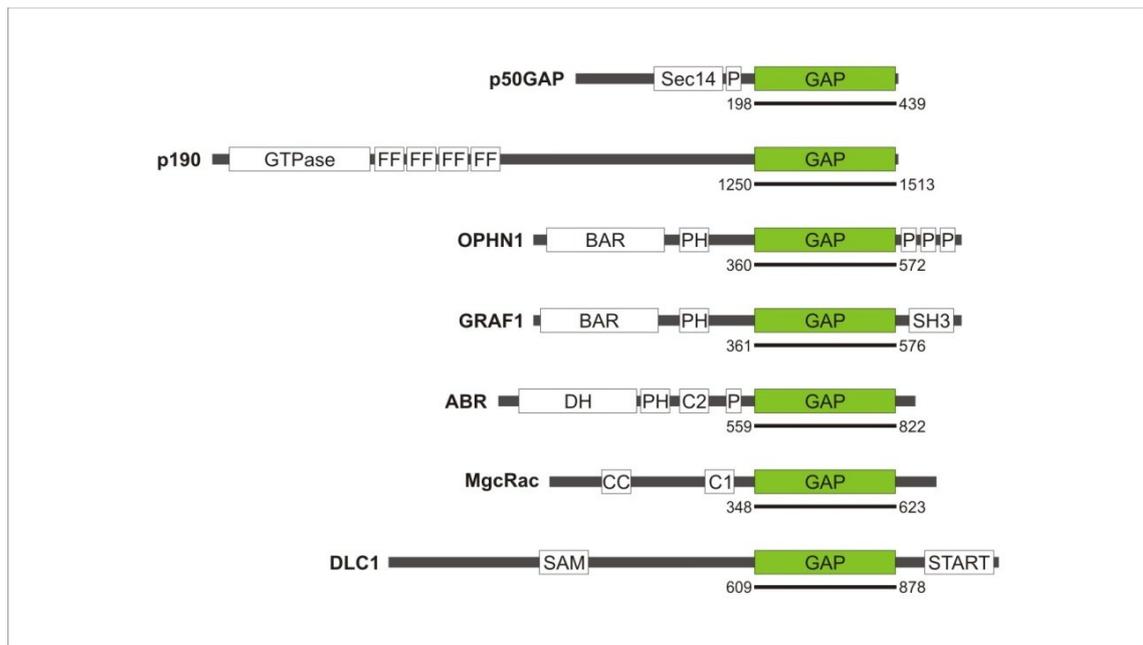


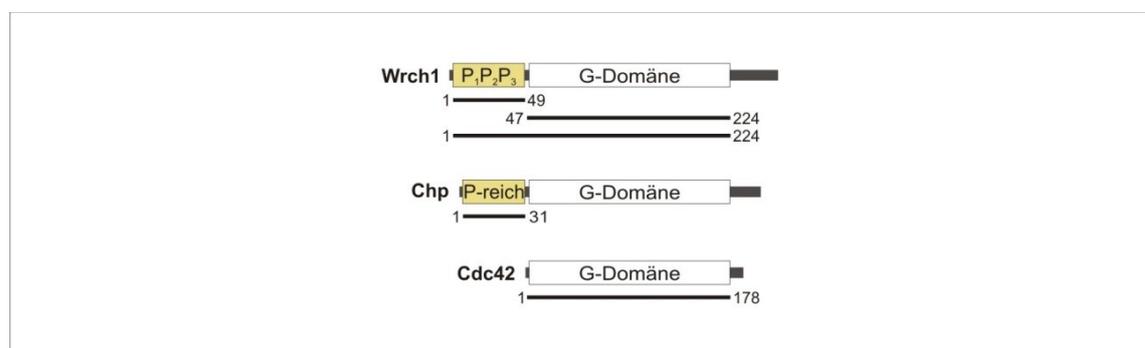
Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur und Konstrukte der verwendeten GAP-Proteine.

4.1.4 GTPasen

Die hier verwendeten Konstrukte der Guaninnukleotid-bindenden Proteine wurden als GST- oder His₆-Fusionsproteine exprimiert und gereinigt, wie beschrieben. Zur Stabilisierung des Protein-Nukleotid Komplexes wurde dem Standardpuffer für GTPasen 0,1 mM freies GDP zugesetzt, sofern die Konstrukte die G-Domäne beinhalteten. Insbesondere bei der Reinigung der Wrch1 Konstrukte ist die Zugabe von freiem GDP besonders wichtig, da dieses Protein eine vergleichsweise geringe Nukleotidaffinität besitzt. Eine Zusammenstellung aller Konstrukte ist in Tabelle 4.5 aufgeführt und schematisch in Abbildung 4.5 dargestellt. Zur Überprüfung des GTPase-Nukleotid Komplexes wurde die Nukleotidkonzentration von GDP mittels Umkehrphasen HPLC bestimmt (3.3.4). Diese lag bei Cdc42ΔC und WrchΔNΔC bei 100 % im Verhältnis zur Proteinkonzentration, die durch die Bradford-Methode (3.3.9) bestimmt wurde. Bei dem Konstrukt WrchΔC-His₆, lag die Nukleotidkonzentration nur bei 35 %. Deswegen wurde dieses Konstrukt anschließend als GST-Fusionsprotein gereinigt. Die Nukleotidkonzentration lag bei 70 %. Allerdings wurde das Konstrukt, das mit Thrombin vom GST getrennt werden sollte, nicht nur an der Schnittstelle zwischen GST und WrchΔC getrennt, sondern ein weiteres Mal innerhalb der Sequenz geschnitten. Deswegen wurde WrchΔC in einen GST-Vektor kloniert, der zusätzlich zu der Thrombin- eine TEV-Schnittstelle besitzt. Somit konnte das GST abgetrennt werden und hoch reines WrchΔC mit einer Nukleotidkonzentration von 70 % GDP gewonnen werden.

Tabelle 4.5: Konstrukte der Guaninnukleotid-bindenden Proteine.

GTPasen	Bezeichnung	Vektor	Proteinfragment	Molekulargewicht
Wrch1	nWrch1	pGEX-4T1	1-49	5,0 kDa
	Wrch Δ N Δ C	pGEX-4T1	47-224	19,4 kDa
	Wrch Δ C	pGEX-4T1	1-224	24,1 kDa
	Wrch Δ C-His ₆	pQE-30	1-224	25,0 kDa
	Wrch Δ C	pGEX-4T1 TEV	1-224	24,1 kDa
Chp	nChp	pGEX-4T1	1-31	3,3 kDa
Cdc42	Cdc42 Δ C	pGEX-2T	1-178	19,8 kDa

**Abbildung 4.5:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur und Konstrukte der verwendeten GTPasen.

4.1.5 Peptide

Für weiterführende Untersuchungen des N-Terminus von Wrch1 (nWrch1) wurden Peptide eingesetzt, die von Dr. Belen Vaz (MPI Dortmund) und Dr. Matthew F. Burton (Technische Universität Eindhoven) synthetisiert wurden (Tab. 4.6). Die Peptide 1-3 (P₁, P₂, P₃) bestehen aus jeweils einem der drei PxxP-Motive von nWrch1. Die Peptide 2-4 und 2-5 (P₂₋₄ und P₂₋₅) stellen P₂ mit jeweils einer Punktmutation im PxxP-Motiv dar (P → A) und die Peptide 2-6 – 2-11 (P₂₋₆ – P₂₋₁₁) umfassen verkürzte Varianten des P₂. Alle Peptide wurden für ITC-Messungen eingesetzt.

Tabelle 4.6: N-terminale Peptide der GTPase Wrch1.

Peptide	Sequenz	Molekulargewicht (Da)
P ₁	QQGD P AF P DRCE	1361,57
P ₃	GGRG P GE P GGRG	1052,51
P ₂	RCEA P P V P P RRERG	1618,85
P ₂₋₄	RCEA P A V P P RRERG	1592,83
P ₂₋₅	RCEA P P V A P RRERG	1592,83
P ₂₋₆	-CEAPPVPPRRE-G	1306,65
P ₂₋₇	--EAPPVPPR--G	1074,59
P ₂₋₈	---APPVPPR--G	945,55
P ₂₋₉	--EAPPVPPR---G	918,49
P ₂₋₁₀	---APPVPPR---G	789,45
P ₂₋₁₁	----PPVPPR---G	718,41

4.2 Wrch1 intramolekulare Interaktion

4.2.1 Bestimmung des für die Interaktionsstudien geeigneten fluoreszenzmarkierten Nukleotids für Wrch1

Die intramolekulare Interaktion einer GTPase mit ihrem Nukleotid sowie die intermolekulare Interaktion mit anderen Proteinen, wie Effektoren und Regulatoren, kann durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden visualisiert werden (3.3.13). Deswegen wurden verschiedene Fluorophore (mant, tamra und Cy3) mit den gereinigten Konstrukten der GTPasen Wrch1 und Cdc42 getestet. Es wurden jeweils 0,4 μ M des fluoreszenzmarkierten Nukleotids vorgelegt und dann die GTPase (2 μ M) in GDP-gebundener Form zugegeben und die Änderungen in der Fluoreszenz bei Berücksichtigung der Exzitations- und Emissionswellenlänge verfolgt. Da ein Küvettenwechsler verwendet wurde, wurden drei Ansätze mit drei verschiedenen Konstrukten von Wrch1 (Wrch Δ N Δ C, Wrch Δ C) und Cdc42 (Cdc42 Δ C) parallel gemessen.

Bei dem Einsatz von mantGppNHp (mGppNHp) wurde nach Zugabe von Cdc42 Δ C eine Zunahme in der Fluoreszenz und Stabilisierung des Signals gemessen (Abb. 4.6 A). Der Nukleotidaustausch für Cdc42 konnte mithilfe von mGppNHp visualisiert werden. Nach Zugabe von EDTA (20 mM) wurde eine Abnahme der Fluoreszenz beobachtet, bedingt durch die Destabilisierung des GTPase-Nukleotid-

Komplexes. Bei beiden Konstrukten von Wrch1 konnte keine deutliche Änderung des Fluoreszenzsignals detektiert werden (Abb 4.6 A). Des Weiteren wurde tamraGTP (tGTP) eingesetzt und für alle drei Konstrukte von Wrch1 (Wrch Δ N Δ C, Wrch Δ C) und Cdc42 (Cdc42 Δ C) eine Zunahme in der Fluoreszenz gemessen und eine Abnahme als Folge der EDTA Zugabe (Abb 4.6 B). Auffällig war hierbei, dass der Nukleotidaustausch im Falle der Wrch1 Konstrukte schneller war, als bei Cdc42.

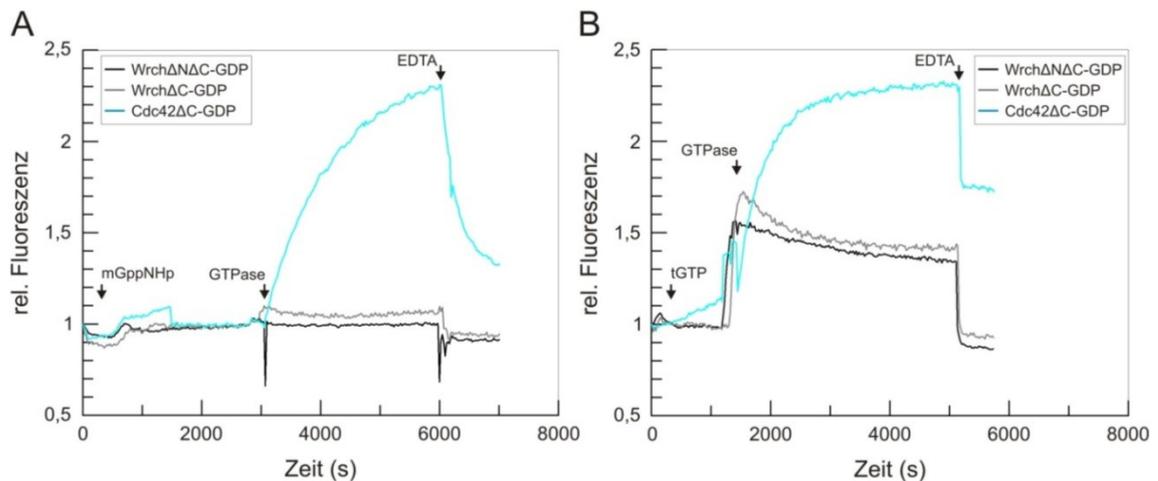


Abbildung 4.6: Bestimmung des für die Interaktionsstudien geeigneten fluoreszenzmarkierten Nukleotids für Wrch1. **A:** mGppNHp (0,4 μ M) und **B:** tGTP (0,4 μ M) wurden als fluoreszenzmarkierte Nukleotide zur Visualisierung des Nukleotidaustausch von GTPasen (2 μ M in GDP gebundener Form) getestet. Wrch Δ N Δ C (schwarz), Wrch Δ C (grau) und Cdc42 Δ C (cyan).

Ähnliche Ergebnisse zu den Messungen mit tGTP wurden bei der Verwendung von Cy3GTP erzielt (Daten nicht gezeigt). Auch hier war der Nukleotidaustausch schneller bei Wrch Δ N Δ C und Wrch Δ C als bei Cdc42. Somit können tamra- und Cy3-Nukleotide, nicht aber mant-Nukleotide für Wrch1 verwendet werden, um intra- und intermolekulare Interaktionen zu bestimmen.

4.2.2 Nukleotidaustausch/Nukleotidbefreiung

Der Nukleotidaustausch von GTPasen ist eine Methode von zentraler Bedeutung und Voraussetzung für viele biochemische und biophysikalische Methoden zur Bestimmung der intra- und intermolekularen Interaktionen der Proteine. Abhängig von dem gebundenen Nukleotid (GTP oder GDP) befinden sich GTPasen im aktiven oder inaktiven Zustand. Dies wird für viele Methoden ausgenutzt, um die Aktivität der GTPase zu prüfen, zu vergleichen und zu visualisieren. Einige intermolekulare Interaktionen finden nur in einem der beiden Zustände statt und machen einen Nukleotidaustausch damit unverzichtbar.

Standardisiert wird der Nukleotidaustausch mit den Enzymen alkalische Phosphatase und Phosphodiesterase durchgeführt (3.3.10), die für den Abbau von GTP und GDP zu GMP und G verantwortlich sind bzw. die Hydrolyse eines Nukleotid-analogen bewirken.

Problematisch wird es, wenn die GTPase während des Nukleotidaustausches ihre Aktivität teilweise oder vollständig verliert. Kritisch ist hierbei häufig der nukleotidfreie Zustand, da die Stabilisierung des Proteins durch sein Nukleotid fehlt, ebenso wie das Verwenden des für die alkalische Phosphatase-Aktivität nötigen Austauschpuffers, der für die GTPase störend wirken kann.

Deswegen wurde für die GTPase Wrch1 neben der enzymatischen Austauschvariante die EDTA-Methode verwendet oder das gebundene Nukleotid durch Zugabe eines hohen Überschusses an ungebundenem Nukleotid ohne EDTA ausgetauscht (3.3.10).

4.2.3 Nukleotidassoziation und -dissoziation

Bei der Nukleotidassoziation handelt es sich um sehr schnelle Reaktionen, die mittels der *stopped-flow* Methode bestimmt werden können (3.3.13). Voraussetzung ist, dass die Bindung von dem verwendeten Nukleotid (hier tGppNHp) an die GTPase im nukleotidfreien Zustand zu einer signifikanten Änderung des Fluoreszenzsignals führt und dadurch zeitlich aufgelöst analysiert werden kann. Werden mehrere Messungen mit verschiedenen Konzentrationen der GTPase durchgeführt, kann aus den jeweiligen einfach exponentiellen Raten (k_{obs}) des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit zur Konzentration die Assoziationsrate (K_{on}) bestimmt werden.

Für die Nukleotidassoziation wurden 0,1 μM tGppNHp mit unterschiedlichen Konzentrationen von nukleotidfreiem Wrch $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ in einer *stopped-flow* Apparatur gemischt und ein rascher Fluoreszenzanstieg beobachtet (Abb. 4.7 A). Mit steigender Wrch $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ Konzentration konnte allerdings keine Zunahme der jeweiligen einfach exponentiellen Raten (k_{obs}) des Fluoreszenzsignals beobachtet werden. Alle Messungen lieferten eine Rate von $k_{\text{obs}} = 0,06 \text{ s}^{-1}$. Lediglich die Amplitude stieg mit höheren Konzentrationen von Wrch $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ an. Wrch $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ besaß also nur eine gemäßigte Aktivität, da bei der Konzentrationserhöhung der GTPase eine schnellere Assoziation erwartet wurde. Somit konnte auch keine Assoziationsrate (k_{on}) bestimmt werden.

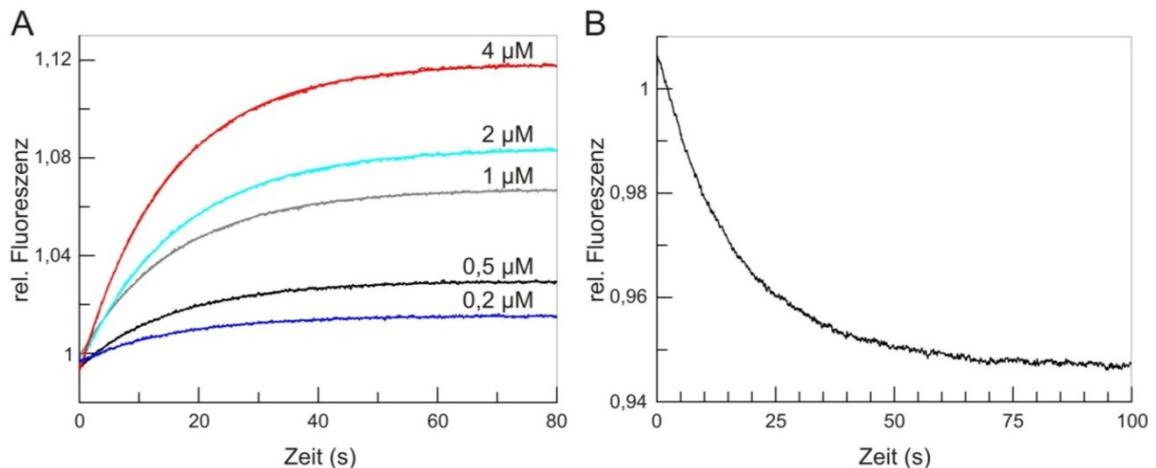


Abbildung 4.7: Nukleotidassoziation und -dissoziation von WrchΔNΔC und tGppNHp. **A:** Kinetik der Nukleotidassoziation von WrchΔNΔC in nukleotidfreier Form und tGppNHp. Steigende Konzentrationen von WrchΔNΔC (blau: 0,2 μM, $k_{\text{obs}} = 0,061 \text{ s}^{-1}$; schwarz: 0,5 μM, $k_{\text{obs}} = 0,062 \text{ s}^{-1}$; grau: 1 μM, $k_{\text{obs}} = 0,062 \text{ s}^{-1}$; cyan: 2 μM, $k_{\text{obs}} = 0,06 \text{ s}^{-1}$; rot: 4 μM, $k_{\text{obs}} = 0,066 \text{ s}^{-1}$) wurden mit 0,1 μM tGppNHp gemessen. **B:** Für die Nukleotiddissoziation wurden direkt vor der Messung 0,5 μM WrchΔNΔC nukleotidfreie Form mit 0,1 μM tGppNHp versetzt und mit einem 100-fachen Überschuss an nicht fluoreszierenden GppNHp gemessen ($k_{\text{off}} = 0,06 \text{ s}^{-1}$).

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante wurden 0,1 μM tGppNHp mit 0,5 μM WrchΔNΔC gemischt und somit die Assoziation von der GTPase und dem Nukleotid bewirkt. Anschließend wurde das Gemisch mit einem 100-fachen Überschuss an nicht fluoreszierendem GppNHp (10 mM) in der *stopped-flow* Apparatur gemischt. Bei diesem Verdrängungsexperiment kommt es zum Austausch des gebundenen fluoreszenzmarkierten Nukleotids gegen das freie unmarkierte Nukleotid, woraus eine Abnahme der Fluoreszenz resultiert, deren Reaktionsrate exponentiell ist. Die ermittelte Dissoziationskonstante ist in Abbildung 4.7 B dargestellt und beträgt für WrchΔNΔC und tGppNHp $k_{\text{off}} = 0,06 \text{ s}^{-1}$. Dieser Wert entspricht den ermittelten exponentiellen Raten (k_{obs}) der Nukleotidassoziation (Abb. 4.7 A). Die geringe Proteinaktivität, die schon bei den Nukleotidassoziationsmessungen festgestellt wurde hatte somit auch Auswirkungen auf die Dissoziation.

Die Nukleotidbefreiung von WrchΔNΔC führte zu inaktivem Protein, das auch bei Zugabe eines Nukleotids nur eine geringe Aktivität zeigte.

4.2.4 Intrinsische GTP-Hydrolyse

Die intrinsische GTP-Hydrolyse wurde mittels Umkehrphasen-HPLC bestimmt (3.3.4). Hierfür wurden 60 μM GTPase (WrchΔNΔC oder Cdc42ΔC) in nukleotidfreiem Zustand mit 50 μM GTP gemischt und nach verschiedenen Inkubationszeiten bei 25 °C jeweils 30 μl Probe in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Untersuchung

der Nukleotidzusammensetzung wurde jede Probe schnell bei 95 °C aufgetaut, dadurch die Proteine denaturiert und eine weitere GTP-Hydrolyse verhindert und die Probe unmittelbar durch HPLC analysiert. Die GTP Konzentration nimmt im Verhältnis zur Gesamtnukleotidkonzentration (GTP + GDP) ab und kann als exponentielle Reaktionsrate gegen die Zeit aufgetragen werden. Für $Wrch\Delta N\Delta C$ konnte keine exponentielle, sondern eher eine lineare Reaktionsrate für die intrinsische GTP-Hydrolyse gemessen werden, mit einem Wert von $k_{obs} = 0,004 \text{ min}^{-1}$ (Abb. 4.8 A). Um diesen Wert und die Aktivität von $Wrch\Delta N\Delta C$ zu überprüfen, wurde die Messung mit Protein wiederholt, das nicht enzymatisch in den nukleotidfreien Zustand überführt wurde, sondern mittels der EDTA-Methode (3.3.10) direkt zu GTP ausgetauscht wurde. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass die Verwendung von Enzymen und dem für diese nötigen Austauschpuffer oder der nukleotidfreie Zustand *per se* Einfluss auf die Aktivität von $Wrch\Delta N\Delta C$ hatte. Hierfür wurde $Wrch\Delta N\Delta C \cdot GDP$ mit einem 50-fachen Überschuss an GTP und 20 mM EDTA inkubiert und dann bei 4 °C über eine Nap5-Säule ungebundenes Nukleotid entfernt. Durch den Überschuss an GTP im Vergleich zu GDP, liegt ein Großteil des Proteins in GTP gebundenem Zustand vor. Sobald das EDTA entfernt ist, muss sehr schnell und bei 4 °C gearbeitet werden, da die intrinsische GTP-Hydrolyse bereits beginnt. Die Proteine wurden unmittelbar nach der Elution von der Nap5-Säule in flüssigem Stickstoff eingefroren, bzw. eine Probe direkt bei 95 °C inkubiert und die Nukleotidzusammensetzung aus GTP und GDP mittels HPLC bestimmt. Für die intrinsische GTP-Hydrolyse wurde dann mit einer Konzentration von 50 μM $Wrch\Delta N\Delta C \cdot GTP$ begonnen und wie oben beschrieben verfahren. Die Analyse der einzelnen Proben zeigte eine Abnahme des GTP-Gehalts und eine exponentielle Reaktionsrate mit einem Wert von $k_{obs} = 0,063 \text{ min}^{-1}$ und somit eine viel schnellere Hydrolysereaktion verglichen mit dem $Wrch\Delta N\Delta C$ in nukleotidfreiem Zustand, welches mittels der enzymatischen Methode nukleotidbefreit wurde (Abb. 4.8 A). Daraus kann geschlossen werden, dass abhängig von der Nukleotid-austausch-Methode die Proteinaktivität von $Wrch\Delta N\Delta C$ erhalten bleiben kann (EDTA-Methode, direkter Nukleotidaustausch) bzw. verloren geht (enzymatische Methode, indirekt, über nukleotidfreien Zustand). Deshalb wurden für alle weiteren Experimente zur intrinsischen GTP-Hydrolyse die Proteine mittels der EDTA-Methode ausgetauscht.

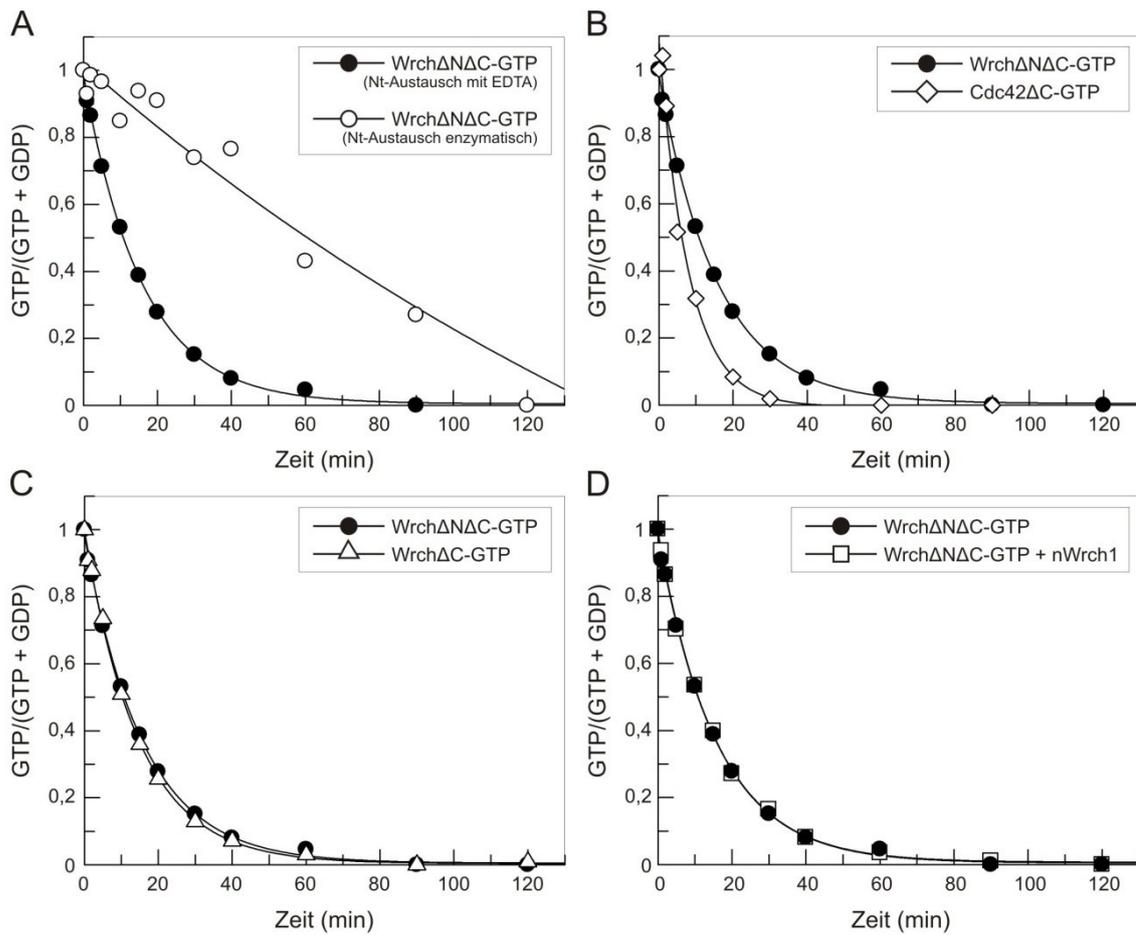


Abbildung 4.8: Intrinsische GTP-Hydrolyse von Wrch1 und Cdc42. Bestimmung der GTPase-Hydrolyse-reaktion verschiedener Konstrukte von Wrch1 und Cdc42 mittels HPLC. **A:** Unterschiede in der Hydrolyserate von WrchΔNΔC nach vorausgegangenem enzymatischem Nukleotidaustausch (weiße Kreise, $k_{\text{obs}} = 0,004 \text{ min}^{-1}$) und GDP zu GTP Austausch mittels der EDTA Methode (schwarze Kreise, $k_{\text{obs}} = 0,063 \text{ min}^{-1}$). **B-D:** Vergleich der Hydrolyse-reaktion verschiedener Konstrukte nach Austausch mittels der EDTA Methode, **B:** WrchΔNΔC (schwarze Kreise, $k_{\text{obs}} = 0,063 \text{ min}^{-1}$) und Cdc42ΔC (weiße Rauten, $k_{\text{obs}} = 0,124 \text{ min}^{-1}$), **C:** WrchΔNΔC (schwarze Kreise, $k_{\text{obs}} = 0,063 \text{ min}^{-1}$) und WrchΔC (weiße Dreiecke, $k_{\text{obs}} = 0,068 \text{ min}^{-1}$), **D:** WrchΔNΔC (schwarze Kreise, $k_{\text{obs}} = 0,063 \text{ min}^{-1}$) und WrchΔNΔC + nWrch1 (weiße Quadrate, $k_{\text{obs}} = 0,064 \text{ min}^{-1}$).

Die intrinsische GTP-Hydrolyse von WrchΔNΔC·GTP wurde in einem weiteren Experiment mit der von Cdc42ΔC·GTP verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass Cdc42ΔC GTP schneller hydrolysiert als WrchΔNΔC ($k_{\text{obs}} = 0,063 \text{ min}^{-1}$), nämlich mit einer Rate von $k_{\text{obs}} = 0,124 \text{ min}^{-1}$ (Abb. 4.8 B). Um den Einfluss des N-Terminus von Wrch1 auf die GTP-Hydrolyse zu bestimmen, wurden die Raten von WrchΔC·GTP mit WrchΔNΔC·GTP verglichen (Abb. 4.8 C). Die berechneten Hydrolyseraten waren sehr ähnlich: WrchΔC·GTP, $k_{\text{obs}} = 0,068 \text{ min}^{-1}$ und WrchΔNΔC·GTP, $k_{\text{obs}} = 0,063 \text{ min}^{-1}$. In einem weiteren Experiment, das den Einfluss des N-Terminus auf die G-Domäne von Wrch1 betraf, wurde vor der Messung WrchΔNΔC·GTP mit einer 10-fach höheren Konzentration von dem N-Terminus von Wrch1 (nWrch1) versetzt. Auch hier wurde eine nahezu identische

Hydrolyserate bestimmt ($Wrch\Delta N\Delta C \cdot GTP + nWrch1$, $k_{obs} = 0,064 \text{ min}^{-1}$, Abb. 4.8 D). Somit konnte ein Effekt des N-Terminus von Wrch1 auf die Hydrolyserate ausgeschlossen werden.

4.3 Wrch1 intermolekulare Interaktion

Für intermolekulare Interaktionsstudien mit Wrch1 wurden Proteine aus verschiedenen Proteinfamilien untersucht. Für die Interaktion mit GTPasen bekannte Proteine sind Effektoren und Regulatoren (GEFs und GAPs). Da Wrch1 im Unterschied zu anderen GTPasen einen verlängerten N-Terminus besitzt, der drei PxxP-Motive enthält, kommen außerdem Adapterproteine, die SH3-Domänen besitzen, als mögliche Interaktionspartner in Frage. Für die intermolekulare Interaktion von Wrch1 wurden verschiedene Effektoren, GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) und Adaptoren untersucht.

4.3.1 Regulatoren

Regulatoren der GTPasen sind Proteine, die den Austausch von GDP zu GTP katalysieren (GEFs) und die Hydrolyse von GTP bewirken (GAPs) und dadurch die GTPase aktivieren oder inaktivieren.

4.3.1.1 Einfluss von p50 GAP auf die intrinsische GTP-Hydrolyse von Wrch1 mittels HPLC

Der Einfluss einiger GAPs auf die GTPase Wrch1 sollte untersucht werden. Als erstes wurde p50 GAP während den Messungen zur intrinsischen GTP-Hydrolyse eingesetzt. Das Nukleotid der beiden verwendeten Wrch1 Konstrukte ($Wrch\Delta N\Delta C \cdot GDP$ und $Wrch\Delta C \cdot GDP$) wurde mittels der EDTA-Methode zu GTP ausgetauscht. 50 μM $Wrch1 \cdot GTP$ wurden nach schnellem Auftauen bei 25 °C inkubiert und zu vorher festgelegten Zeitpunkten eine 30 μl Probe abgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Untersuchung der Nukleotidzusammensetzung wurde jede Probe schnell bei 95 °C aufgetaut und die Proben sofort mittels HPLC analysiert. Die Abnahme in der GTP-Konzentration kann dann gegen die Zeit aufgetragen werden und die exponentielle Reaktionsrate bestimmt werden, die für die intrinsische GTP-Hydrolyse von $Wrch\Delta N\Delta C \cdot GTP$ $0,063 \text{ min}^{-1}$ und für $Wrch\Delta N\Delta C \cdot GTP$ $0,068 \text{ min}^{-1}$ betrug. In einem zweiten Reaktionsansatz wurde 5 μM p50 GAP zu $Wrch\Delta N\Delta C \cdot GTP$ oder $Wrch\Delta C \cdot GTP$ (beide 50 μM) zugesetzt und Proben nach 0, 1 und 10 min genommen und mittels HPLC analysiert. Im Gegensatz zur intrinsischen GTP-Hydrolyse wurde der Abbau von GTP

durch Zugabe von p50 GAP sowohl für Wrch Δ N Δ C·GTP als auch Wrch Δ C·GTP beschleunigt (Abb. 4.9 A,B).

Bereits nach 10 min war kaum noch GTP vorhanden. Es bestand dabei kein Unterschied zwischen Wrch Δ N Δ C und Wrch Δ C. Der N-Terminus von Wrch1 hatte somit keinen Einfluss auf die GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse.

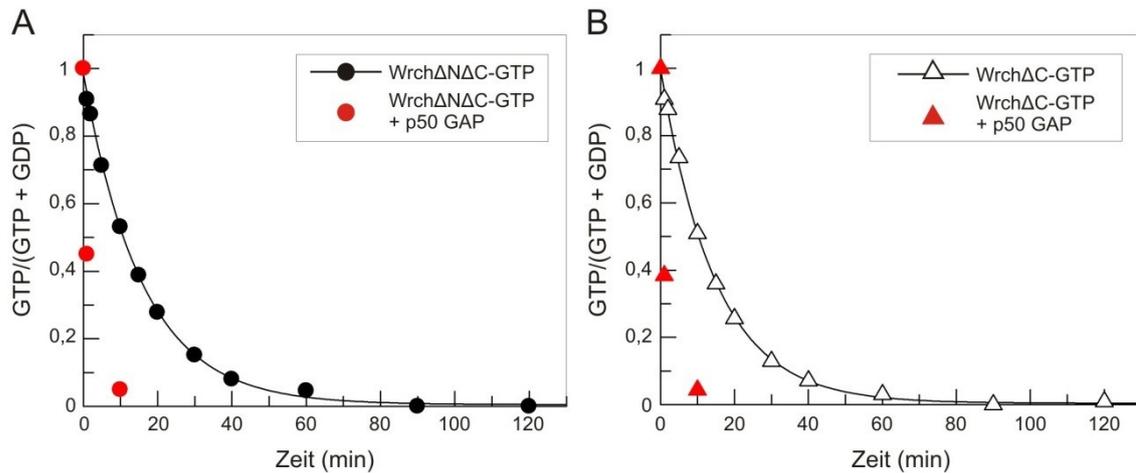


Abbildung 4.9: Intrinsische GTP-Hydrolyse von Wrch1 unter dem Einfluss von p50 GAP. Alle Konstrukte der GTPase Wrch1 wurden mittels der EDTA-Methode von GDP zu GTP ausgetauscht und dann ihre Hydrolysereaktion mittels HPLC bestimmt. **A:** Vergleich in der intrinsischen Hydrolyserate von Wrch Δ N Δ C·GTP (50 μ M, schwarze Kreise, $k_{\text{obs}} = 0,063 \text{ min}^{-1}$) und GAP-stimulierter Hydrolyse durch p50 GAP (5 μ M, rote Kreise). **B:** Vergleich in der intrinsischen Hydrolyserate von Wrch Δ C·GTP (50 μ M, weiße Dreiecke, $k_{\text{obs}} = 0,068 \text{ min}^{-1}$) und GAP-stimulierter Hydrolyse durch p50 GAP (5 μ M, rote Dreiecke).

4.3.1.2 GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse von Wrch1 ermittelt durch die stopped-flow Methode: GAP-Assay

Der GAP-Assay wurde durchgeführt, um Hydrolyseraten von verschiedenen GAPs zu ermitteln und diese dann untereinander und mit der intrinsischen GTP-Hydrolyse vergleichen zu können. Hierfür wurde die *stopped-flow* Methode verwendet, die präzise Messergebnisse bei schnellen Reaktionen liefert. 0,2 μ M tGTP wurden mit 0,3 μ M Wrch Δ N Δ C in nukleotidfreier Form gemischt und dann mit 10 μ M der GAP-Domänen von p50, OPHN1, Graf1, p190, Abr, MgcRac oder DLC1 in der *stopped-flow* Apparatur gemessen. Im Vergleich zur intrinsischen GTP-Hydrolyse waren die K_{obs} -Werte 10-20 fach höher (Abb. 4.10).

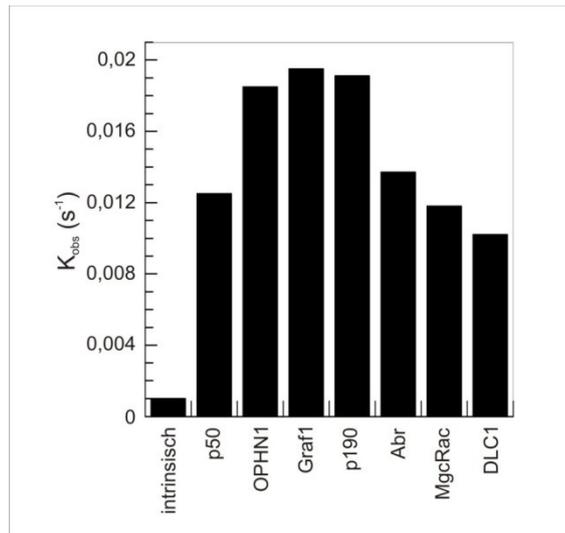


Abbildung 4.10: GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse von Wrch1. 0,3 μM Wrch $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ in nukleotidfreier Form und 0,2 μM tGTP wurden mit 10 μM der verschiedenen GAP-Proteine in einer *stopped-flow* Apparatur gemischt und die Abnahme in der Fluoreszenz detektiert. Die einfach exponentiellen Raten (k_{obs}) die so erhalten wurden, wurden im Vergleich zur intrinsischen GTP-Hydrolyse von Wrch $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ aufgetragen. p50= 0,0125 s^{-1} , OPHN1= 0,0185 s^{-1} , Graf1= 0,0195 s^{-1} , p190= 0,0191 s^{-1} , Abr= 0,0137 s^{-1} , MgcRac= 0,0118 s^{-1} , DLC1= 0,0102 s^{-1} , intrinsisch= 0,0010 s^{-1} .

Erwartet wurde, dass die GAP-stimulierte Hydrolyse schneller als gemessen ist, da einige GAPs bekannt sind, die die Reaktion um das mehr als 1000-fache beschleunigen können. Insbesondere da die GAP-Konzentrationen 50-fach höher waren als die von Wrch1 wurde eine schnellere Hydrolyserate erwartet, vor allem wenn man die Ergebnisse mit den HPLC-Messungen von p50 GAP vergleicht (Abb. 4.9). Hier war die p50-GAP Konzentration 10-fach niedriger, als die Konzentration von Wrch $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ ·GTP. Schon bei diesen Messungen konnte außerdem festgestellt werden, dass nukleotidfreies Wrch $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ eine geringere Aktivität aufwies, als solches, das direkt zu GTP mittels der EDTA-Methode ausgetauscht wurde (Abb. 4.8 A). Eine geringe Wrch1 Aktivität könnte auch hier der Grund sein für die nur 10- bis 20-fach höheren Raten der GAP-stimulierten GTP-Hydrolyse.

4.3.2 Adaptoren

Wrch1 besitzt im Unterschied zu anderen GTPasen einen um ca. 50 Aminosäuren verlängerten N-Terminus mit drei PxxP-Motiven. Diese Motive sind bekannt für ihre Bindung an SH3-Domänen. In dieser Studie sollte untersucht werden: 1. Ob der N-Terminus von Wrch1 (nWrch1), alle drei PxxP-Motive enthaltend, an isolierte SH3-Domänen von Adapterproteinen binden kann; 2. welches der drei PxxP-Motive für eine Bindung verantwortlich ist; 3. welche das PxxP-Motiv flankierenden Aminosäuren an der Bindung beteiligt sind; und 4. wie die Interaktion beeinflusst wird, wenn nicht isolierte SH3-Domänen, sondern *full length* Adapterproteine eingesetzt

werden. Des Weiteren sollten die Unterschiede zwischen Wrch1 und Chp (auch Wrch2 oder RhoV) in ihrer Fähigkeit, Adapterproteine zu binden, untersucht werden.

4.3.2.1 Qualitativer Nachweis der Interaktion zwischen Wrch1 und Adapterproteinen

Für die Interaktionsstudien zwischen dem N-Terminus von Wrch1 (nWrch1) und Adapterproteinen wurden acht verschiedene SH3-Domänen von fünf Proteinen eingesetzt: Grb2 (Grb2-1 und Grb2-2), Nck1 (Nck1-1, Nck1-2 und Nck1-3), Crk, Src und p120 (Abb. 4.3). Zunächst wurde ein Sedimentationsassay mit gereinigten Proteinen durchgeführt (3.3.12). Hierfür wurden die einzelnen SH3-Domänen als GST-Fusionsprotein an GSH-Sepharose-*beads* gebunden (40 μ M) und mit nWrch1 (60 μ M) bei 4 °C inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit Standardpuffer und anschließender Sedimentation wurden die GSH-Sepharose-*beads* mit 2-fach Laemmli-Probenpuffer versetzt und alle Proben bei 95 °C aufgekocht und anschließend mittels SDS-PAGE (3.3.5) und immunologischem Nachweis (3.3.7) unter Verwendung eines Anti-Wrch1 Antikörpers analysiert (Abb. 4.11 A).

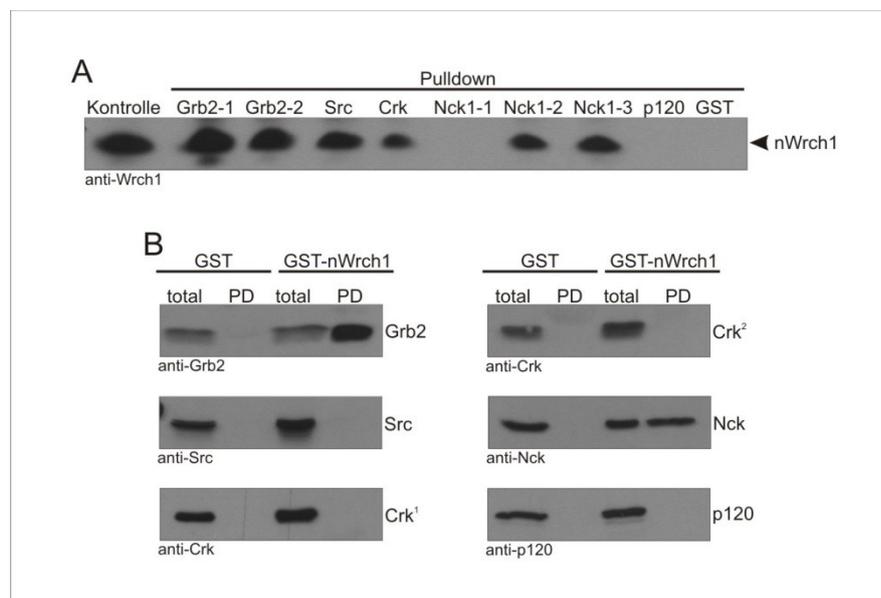


Abbildung 4.11: Bestimmung der Protein-Protein Interaktion zwischen nWrch1 und verschiedenen Adapterproteinen [Risse et al., 2012]. Analysiert wurden alle Proben mittels SDS-PAGE (7,5-15 %) und immunologischem Nachweis unter Verwendung verschiedener Antikörper (Anti-Wrch1, -Grb2, -Src, -Crk, -Nck, und -p120). Als Negativ-Kontrolle wurde GST eingesetzt. **A:** Sedimentationsassay mit GST gebundenen SH3-Domänen von verschiedenen Adapterproteinen und dem N-Terminus von Wrch1 (nWrch1). Die GST-SH3-Domänen (Grb2-1, Grb2-2, Src, Crk, Nck1-1, Nck1-2, Nck1-3 und p120) wurden an GSH-*beads* gekoppelt und anschließend mit nWrch1 inkubiert, gewaschen und analysiert. **B:** Sedimentationsassay mit gereinigtem GST-nWrch1 und endogenen Adapterproteinen aus untransfizierten HeLa-Zelllysaten. GST-nWrch1 wurde an GSH-*beads* gebunden und mit Zelllysaten inkubiert. Um endogene Proteine zu detektieren, die an nWrch1 gebunden hatten, wurde das Zelllysate (total) und die sedimentierten *beads* (PD) analysiert.

nWrch1 konnte an beide SH3-Domänen von Grb2 (Grb2-1 und Grb2-2), die SH3-Domänen von Src und Crk und an zwei von drei SH3-Domänen von Nck1 (Nck1-2 und Nck1-3) binden. Es konnte keine Bindung mit der ersten SH3-Domäne von Nck1 (Nck1-1) und mit der von p120 detektiert werden. GST wurde als Kontrolle benutzt und zeigte ebenfalls keine Bindung an nWrch1 [Risse et al., 2012].

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob der N-Terminus von Wrch1 auch an die endogenen Adapterproteine und nicht nur an die isolierten SH3-Domänen bindet. Untransfizierte HeLa-Zellen wurden lysiert und mit an GSH-beads gebundenem GST-nWrch1 oder GST als Negativkontrolle (je 100 µM) inkubiert. Nach 3-fachem Waschen mit Fish-Puffer wurden alle Proteine von den GSH-beads eluiert und zusammen mit Proben des Zellysats analysiert. Hierfür wurden Antikörper gegen die jeweiligen Adapterproteine verwendet. Es konnten endogenes Nck und Grb2 im Komplex mit GST-nWrch1 nachgewiesen werden (Abb. 4.11 B). Dies bestätigt die Ergebnisse des Sedimentationsassays mit den isolierten GST-SH3-Domänen und nWrch1 (Abb. 4.11 A). Endogenes Src, Crk und p120 konnten nicht im Komplex mit GST-nWrch1 nachgewiesen werden, obwohl sie in den Zellen exprimiert wurden und im Zellysat detektiert werden konnten (Abb. 4.11 B). Die GST gebundene SH3-Domäne von p120 konnte auch im Sedimentationsassay mit gereinigten Proteinen nicht an nWrch1 binden und somit stimmen die Ergebnisse aus beiden Sedimentationsassays überein. Im Gegensatz dazu stehen die Daten für Src und Crk, die in dem Assay mit gereinigten SH3-Domänen mit nWrch1 interagierten, jedoch nicht als endogene Proteine einen Komplex mit GST-nWrch1 formen konnten. Keines der untersuchten Adapterproteine interagierte mit der Negativkontrolle GST [Risse et al., 2012] (Abb. 4.11 B).

4.3.2.2 Quantitativer Nachweis der Interaktion zwischen Wrch1 und isolierten SH3-Domänen von Adapterproteinen

Die Interaktion zwischen den SH3-Domänen der Adapterproteine und dem N-Terminus von Wrch1 sollte strukturell analysiert werden. Da keine Struktur des N-Terminus von Wrch1 bekannt ist, wurde das Strukturmodell des Komplexes aus der SH3-Domäne von Sem5 (Grb2 Homolog in *Caenorhabditis elegans*) und seinem gebundenem Peptid untersucht (Abb. 4.12 A; PDB: 1SEM [Lim et al., 1994]). Dieses Peptid ähnelt dem mittleren PxxP-Motiv von Wrch1, wodurch Rückschlüsse auf die Interaktion zwischen Wrch1 und SH3-Domänen gezogen werden können. Deutlich wird hier, dass vier aromatische Aminosäuren der SH3-Domäne Sem5 maßgeblich an der Bindung des PxxP-Motivs beteiligt sind.

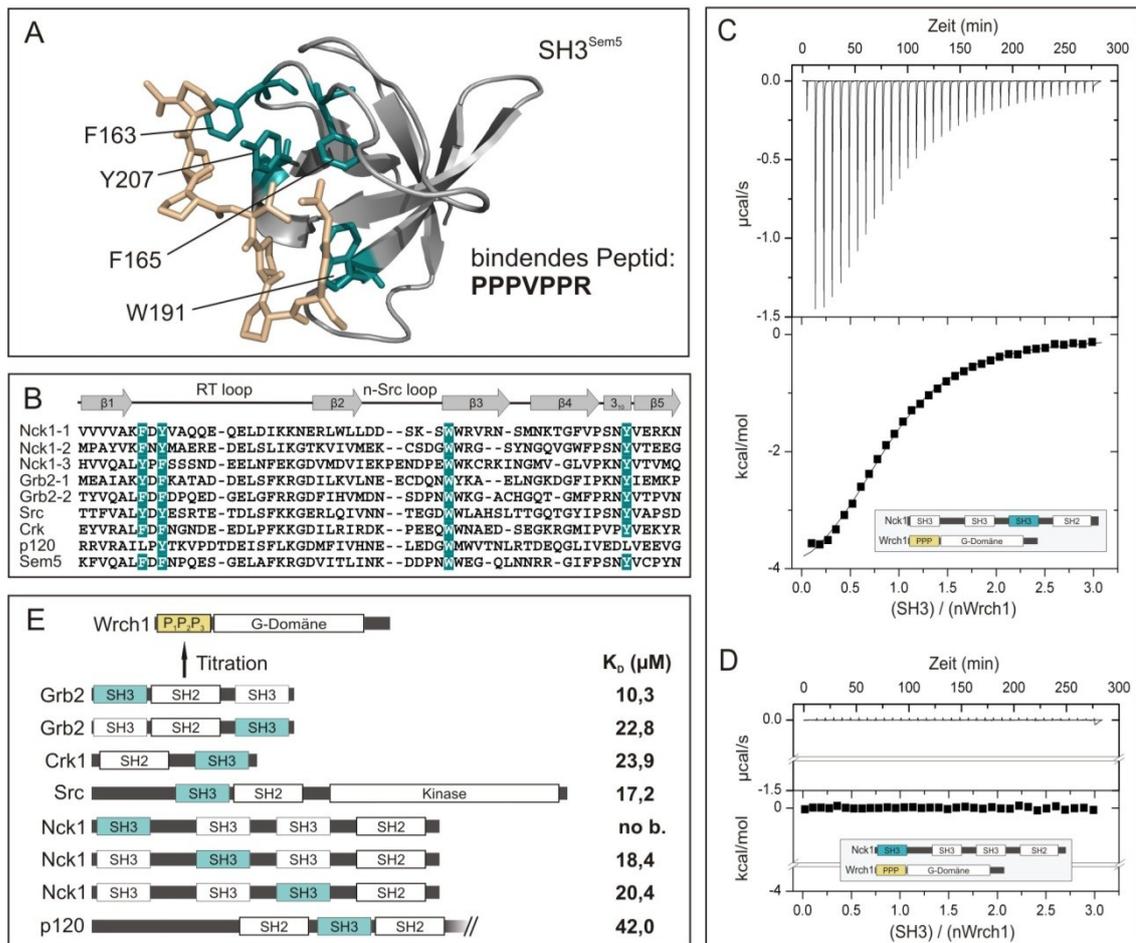


Abbildung 4.12: Struktur, Sequenz und Interaktion zwischen SH3-Domänen und nWrch1 [Risse et al., 2012]. **A:** Struktur der SH3-Domäne (grau) von Sem5 (Grb2 Homolog in *Caenorhabditis elegans*) im Komplex mit seinem bindenden Peptid (beige, PDB: 1SEM) [Lim et al., 1994]. Aromatische Aminosäuren, die die SH3-Domäne flankieren, sind in cyan hervorgehoben und mit der Nummer der Aminosäure aus dem Protein (gesamte Länge, *full length*) angegeben. **B:** Sequenzvergleich von SH3-Domänen der verwendeten Proteine und Sem5 (Struktur aus A). Die in den meisten SH3-Domänen konservierten aromatischen Aminosäuren sind in der Farbe cyan markiert. Die Sekundärstruktur von SH3-Domänen ist über den Sequenzen schematisch dargestellt. **C, D:** Repräsentative ITC-Experimente zwischen nWrch1 und zwei SH3-Domänen von Nck1. Titration von jeweils 1500 µM SH3-Domäne aus der Spritze zu 50-100 µM nWrch1 in der Messzelle, bei einer Temperatur von 15 °C und Verwendung eines Messpuffers bestehend aus 30 mM Tris/HCl, pH 7,5 und 50 mM NaCl. Nck1-3 (**C**) oder Nck1-1 (**D**) wurden zu nWrch1 titriert. Der obere Graph zeigt die Heizenergie aufgetragen gegen die Zeit und der untere Graph die integrierte Heizenergie in Abhängigkeit zum molaren Verhältnis der Interaktionspartner. **C:** Die Auswertung der ITC-Messung zwischen Nck1-3 und nWrch1 lieferte folgenden Daten: $K_A = 4,91 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (entspricht $K_D = 20,4 \text{ µM}$), $\Delta H = -4,65 \pm 0,07 \text{ kcal/mol}$, $N = 0,91$. **D:** Bei der Messung zwischen Nck1-1 und nWrch1 wurde keine Interaktion detektiert. **E:** Domänenstruktur der Proteine, die für die ITC-Messungen eingesetzt wurden. Gereinigte SH3-Domänen (cyan) wurden zu nWrch1 titriert und die Gleichgewichts-dissoziationskonstanten (K_D) berechnet.

Mittels Sequenzvergleich wurde überprüft, ob die verwendeten SH3-Domänen der von Sem5 ähneln (Abb. 4.12 B). Dabei wurde deutlich, dass der SH3-Domäne von p120 zwei der vier aromatischen Aminosäuren fehlen, die in allen anderen SH3-Domänen konserviert sind.

Um die qualitativen Daten, die in den Sedimentationsassays erhalten wurden zu quantifizieren, wurden ITC- (isotherme Titrationskalorimetrie) Messungen durchgeführt (3.3.14). Bei dieser Methode kann die Interaktion zwischen zwei verschiedenen Molekülen aufgrund der auftretenden Wärmeänderungen nachgewiesen werden.

nWrch1 wurde in Konzentration von 50-100 μM in der Messzelle vorgelegt und die verschiedenen SH3-Domänen in Konzentrationen von 1500 μM zutitriert. Die Messungen wurden bereits während der Diplomarbeit begonnen und dann mit weiteren SH3-Domänen fortgeführt, wobei das Protokoll für die Messungen beibehalten wurde, um alle Daten miteinander vergleichen zu können. In Abbildung 4.12 C und D sind zwei für die Interaktionsstudien repräsentative Messungen dargestellt. Die negativen Ausschläge der Heizenergie nach jedem Titrationschritt von Nck1-3 zu nWrch1 wiesen auf eine exotherme Reaktion hin. Trägt man die integrierte Heizenergie gegen das molare Verhältnis der interagierenden Proteine auf, erhält man eine Kurve, die genutzt wird, um die Bindungsenthalpie (ΔH), die Assoziationskonstante (K_A) und den stöchiometrischen Faktor (N) zu bestimmen. Die Bindungsenthalpie für die Interaktion zwischen Nck1-3 und nWrch1 betrug $-4,65 \text{ kcal/mol}$, wobei dieser negative Wert für eine exotherme Reaktion steht. Der stöchiometrische Faktor N war annähernd 1 (0,91). Ein Molekül Nck1-3 interagiert mit einem Molekül nWrch1 und somit konnten die beiden Proteine in einem Verhältnis von 1:1 binden. Aus der Assoziationskonstante kann durch Kehrwertbildung die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) errechnet werden, die für diese Interaktion $20,4 \mu\text{M}$ betrug und als niedrig affin eingestuft werden kann. Die Ergebnisse für die Messung zwischen nWrch1 und zutitriertem Nck1-1 zeigten nur sehr geringe Änderungen in der Heizenergie. Folglich fand keine Interaktion zwischen nWrch1 und Nck1-1 statt. Alle Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für die Interaktionen zwischen nWrch1 und den untersuchten SH3-Domänen sind in Abbildung 4.12 E dargestellt. Sie lagen alle im mikromolaren Bereich. Grb2-1 hatte die höchste Affinität ($K_D = 10,3 \mu\text{M}$) und p120 die niedrigste ($K_D = 42 \mu\text{M}$). Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der anderen SH3-Domänen lagen um $20 \mu\text{M}$ (Src, $K_D = 17,2 \mu\text{M}$; Nck1-2, $K_D = 18,4 \mu\text{M}$; Nck1-3, $K_D = 20,4 \mu\text{M}$; Grb2-2, $K_D = 22,8 \mu\text{M}$; Crk, $K_D = 23,9 \mu\text{M}$). Nck1-1 war die einzige der untersuchten SH3-Domänen, die nicht mit dem N-Terminus von Wrch1 interagiert [Risse et al., 2012].

Bei allen Interaktionen zwischen den SH3-Domänen und nWrch1 handelte es sich um exotherme Reaktionen (Tab. 4.7), da die Bindungsenthalpien alle negativ waren. Der stöchiometrische Faktor war für fast alle Reaktionen 1, somit binden die Proteine in einem Verhältnis von 1:1 aneinander [Risse et al., 2012].

Tabelle 4.7: Vergleich von nWrch1 und nChp in der Interaktion mit SH3-Domänen.

Ligand	nWrch1			nChp		
	K _D (μM)	ΔH (kcal/mol)	N	K _D (μM)	ΔH (kcal/mol)	N
Grb2-1	10,3	-7,11 ± 0,13	1,00	38,5	-0,83 ± 0,05	1,25
Grb2-2	22,8	-6,65 ± 0,18	0,84	Keine Bindung		
Crk1 SH3	23,9	-2,41 ± 0,05	1,18	Keine Bindung		
Src SH3	17,2	-6,93 ± 0,12	0,95	29,7	-0,55 ± 0,04	1,11
Nck1-1	Keine Bindung			Keine Bindung		
Nck1-2	18,4	-2,10 ± 0,04	2,78	Keine Bindung		
Nck1-3	20,4	-4,65 ± 0,07	0,91	Keine Bindung		
p120 SH3	42,0	-1,07 ± 0,17	0,9	Keine Bindung		

Zusammenstellung der durch ITC-Messungen ermittelten Daten für die Interaktion zwischen nWrch1 oder nChp und SH3-Domänen von verschiedenen Adapterproteinen [modifiziert nach Risse et al., 2012]. Titration von jeweils 1500-2000 μM SH3-Domäne aus der Spritze zu 50-100 μM nWrch1 in der Messzelle, bei einer Temperatur von 15 °C und Verwendung eines Messpuffers bestehend aus 30 mM Tris/HCl, pH 7,5 und 50 mM NaCl; K_D, Gleichgewichtsdissoziationskonstante, berechnet aus K_A, Assoziationskonstante; ΔH, Bindungsenthalpien; N, stöchiometrischer Faktor.

Eine Ausnahme stellte hier die Interaktion von Nck1-2 mit nWrch1 dar. Der stöchiometrische Faktor betrug etwa 3. Dies würde bedeuten, dass 3 Moleküle Nck1-2 mit einem Molekül nWrch1 interagieren. Um auszuschließen, dass es während der Messung zu einer Oligomerisierung von Nck1-2 kommt, wurde die Messung unter Verwendung des Reduktionsmittels TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin) in dem Puffer wiederholt. Dies bewirkte eine Inhibierung der Interaktion. Es konnten keine Änderungen in der Heizenergie mehr detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Zur Verifikation wurde die Messung zwischen der SH3-Domäne von Crk und nWrch1 mit TCEP enthaltendem Puffer durchgeführt. Auch hier wurde keine Interaktion zwischen den beiden Proteinen

festgestellt. Das Reduktionsmittel TCEP schien generell die Bindung zwischen SH3-Domänen und dem N-Terminus von Wrch1 zu inhibieren.

4.3.2.3 Vergleich zwischen Wrch1 und Chp und ihrer Bindung an SH3-Domänen von Adapterproteinen

Chp (RhoV, Wrch2), ein weiteres Protein der Cdc42-ähnlichen GTPasen, weist starke Homologien zu Wrch1 auf. Es besitzt wie Wrch1 N-terminal der G-Domäne zusätzliche Aminosäuren, die mehrere Proline enthalten. Ein Sequenzvergleich zwischen dem N-Terminus von Wrch1 (human), humanem Chp (*hs* Chp) und Chp welches in Ratten exprimiert wird (*rn* Chp) zeigt, dass jedoch gewisse Unterschiede zwischen den Proteinen bestehen (Abb. 4.13). Wrch1 besitzt zwei PxxP-Motive der Klasse II (PxxPxR), wobei das eine von beiden ein doppeltes PxxP-Motiv darstellt (PPxPPRR). Ein drittes PxxP-Motiv befindet sich weiter C-terminal, kann aber keiner Klasse von PxxP-Motiven zugeordnet werden. Humanes Chp besitzt ein PxxP-Motiv der Klasse II, welches dem mittleren PxxP-Motiv von Wrch1 ähnelt und C-terminal mehrere Arginine besitzt. Weiter N-terminal befindet sich ein Prolin-reicher Sequenzabschnitt mit einem Arginin C-terminal, der aber kein vollständiges PxxP-Motiv bildet (PPPLR). Hier bestehen artspezifischen Unterschiede zwischen humanem Chp und dem der Ratte. Das Arginin fehlt und ist durch ein Prolin ersetzt und bildet somit ein vollständiges PxxP-Motiv (PPPLP). Allerdings fehlt hier ein C- oder N-terminal gelegenes Arginin. Ein zweiter wichtiger artspezifischer Unterschied betrifft das PxxP-Motiv, das C-terminal mehrere Arginine besitzt und dem mittleren PxxP-Motiv von Wrch1 ähnelt. *Rn* Chp fehlt ein Prolin und besitzt hier kein vollständiges PxxP-Motiv, so wie es bei humanem Chp vorkommt (*rn* Chp: STPPRRR; *hs* Chp: PTPPPRRR). Obwohl sich die beiden Sequenzbereiche von humanem Chp und dem in Ratten exprimierten Chp in nur zwei Aminosäuren unterscheiden, bestehen große artspezifische Unterschiede zwischen dem humanen Chp und *rattus norvegicus* Chp.

hs nWrch1	MPPQQGDPAF P DC E AP P V P PRERGGRRG R GP G EG P GGRRAGGAEGRG
rn nChp	MPPRE L SEAE P PL P AST P PPRRRS-----AP P ELG-----
hs nChp	MPPRE L SEAE P PL R AP T PPRRRS-----AP P ELG-----

Abbildung 4.13: Sequenzvergleich der N-terminalen Aminosäuren von Wrch1 und Chp. Die Proline, die Teil der PxxP-Motive bzw. der Prolin-reichen Sequenzen sind, sind in rot dargestellt. In blau sind Arginine markiert, die für eine Interaktion mit SH3-Domänen wichtig sein könnten. *hs*, *homo sapiens*; *rn*, *rattus norvegicus*.

Es sollte untersucht werden, ob auch Chp wie Wrch1 an SH3-Domänen binden kann. Deswegen wurde der N-Terminus von Chp (*rattus norvegicus*) ebenfalls für ITC-Messungen verwendet, die nach dem gleichen Protokoll wie für Wrch1 durchgeführt wurden (3.3.14), um alle Daten vergleichen zu können. nChp wurde in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt und die SH3-Domänen zutitriert, bis zu einer Konzentration von 1500 μM . Nur die N-terminale SH3-Domänen von Grb2 (Grb2-1) und die von Src interagierten mit nChp (Tab. 4.7). Beide Interaktionen waren exotherm und der stöchiometrische Faktor (N) lag jeweils bei 1, was zeigt, dass die Proteine einen 1:1 Komplex bildeten. Die berechnete Gleichgewichtsdissoziationskonstante betrug für die Interaktion mit Grb2-1 38,5 μM und mit Src SH3 29,7 μM und ist damit niedriger als in den Messungen mit nWrch1 (Grb2-1: 10,3 μM , Src: 17,2 μM). Somit war die Interaktion zwischen den beiden SH3-Domänen mit nChp schwächer im Vergleich zu nWrch1. Die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 (Grb2-2), zwei der drei SH3-Domänen von Nck1 (Nck1-2, 1-3) und die SH3-Domäne von Crk konnten nicht an den N-Terminus von Chp binden. Für alle diese SH3-Domänen konnte eine Bindung mit nWrch1 gemessen werden und eine Affinität um 20 μM berechnet werden. p120, das mit einer geringeren Affinität mit Wrch1 interagierte ($K_D = 42 \mu\text{M}$), konnte nicht an nChp binden. Es konnte keine Bindung der C-terminalen SH3-Domäne von Nck1 (Nck1-1) an nWrch1 oder nChp gemessen werden. Somit bestehen große Unterschiede in der Bindungsspezifität zwischen humanem Wrch1 und *rattus norvegicus* Chp in Bezug auf die SH3-Domänen besitzenden Proteine Grb2, Nck1, Src, Crk und p120.

4.3.2.4 Interaktion der PxxP-Motive von Wrch1 mit SH3-Domänen

Der N-Terminus besitzt drei PxxP-Motive, also drei mögliche Bindungsmotive für SH3-Domänen. Um festzustellen, welche der drei PxxP-Motive als Interaktionspartner in Frage kommen, wurden synthetische Peptide (P_1 , P_2 , P_3) der drei Sequenzbereiche in ITC-Messungen eingesetzt und alle SH3-Domänen der Adaptoren untersucht. Die Messungen mit den Peptiden von Wrch1 wurden bereits während der Diplomarbeit begonnen und während der Promotionszeit fortgeführt. Dabei zeigte sich, dass das mittlere PxxP-Motiv (P_2) für die Bindung verantwortlich ist und weder das N- noch das C-terminale PxxP-Motiv (P_1 und P_3) mit den SH3-Domänen interagierten [Risse et al., 2012] (Abb. 4.14 A).

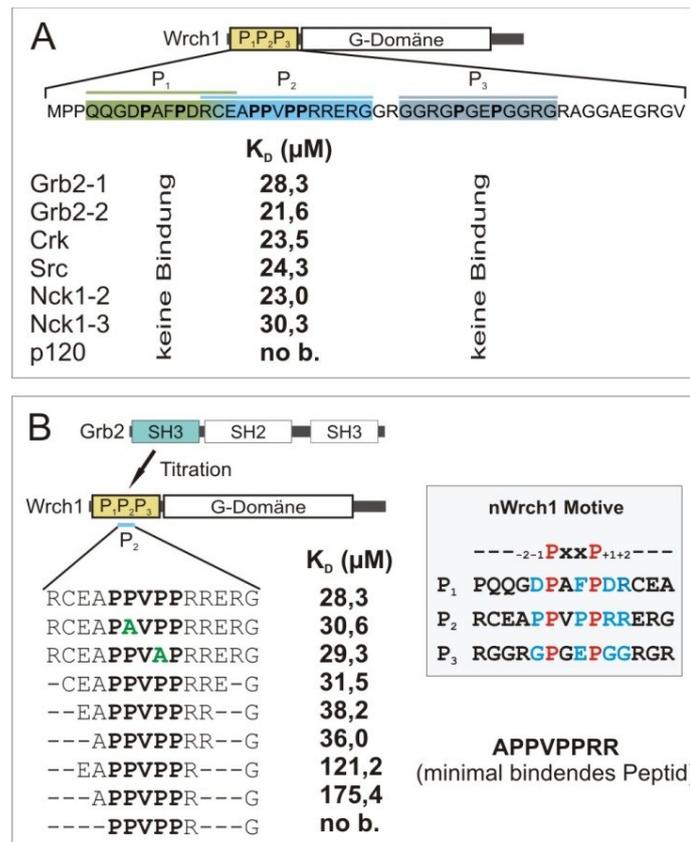


Abbildung 4.14: Bestimmung des Bindungsmotivs zwischen SH3-Domänen und nWrch1 [Risse et al., 2012]. Die Interaktion verschiedener synthetischer Peptide von Wrch1 mit SH3-Domänen wurde durch ITC-Messungen ermittelt. Titration von jeweils 750-1500 μM SH3-Domäne aus der Spritze zu 50-100 μM der Peptide von Wrch1 in der Messzelle, bei einer Temperatur von 15 °C und Verwendung eines Messpuffers bestehend aus 30 mM Tris/HCl, pH 7,5 und 50 mM NaCl. Alle Messdaten sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst. **A:** Drei synthetische Peptide (P₁, P₂ und P₃) des N-Terminus von Wrch1 wurden in ITC-Experimenten eingesetzt, die Bindung zu verschiedenen SH3-Domänen getestet und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante berechnet. P₁ und P₃ binden keine der SH3-Domänen, P₂ bindet alle außer p120 SH3. **B:** ITC-Messungen mit verschiedenen Peptiden des mittleren PxxP-Motivs P₂ und Grb2-1. Mutationsstudien zur Bestimmung der für eine Interaktion nötigen Aminosäuren des PxxP-Motivs von P₂. Hierfür wurden Proline des PxxP-Motivs zu Alanin mutiert (in grün dargestellt). Ermittlung der minimalen Peptidsequenz von P₂, die für die Bindung nötig ist.

Die aus den Assoziationskonstanten ermittelten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) für die Messungen zwischen P₂ und den SH3-Domänen lagen im mikromolaren Bereich und ähneln damit den Werten für die Messungen zwischen dem N-Terminus mit allen drei PxxP-Motiven (nWrch1) und den SH3-Domänen. Die höchste Affinität besaß Grb2-2 ($K_D = 21,6 \mu\text{M}$), gefolgt von Nck1-2 (23,0 μM), Crk (23,5 μM), Src (24,3 μM), Grb2-1 (28,3 μM) und Nck1-3 (30,3 μM), welches damit die niedrigste Affinität aufwies. p120 interagiert mit keinem der drei Peptide. Alle Messwerte für die Enthalpie waren negativ, somit handelte es sich um exotherme Reaktionen (Tab. 4.8). Der stöchiometrische Faktor für die Messungen betrug etwa 1 mit Ausnahme von Nck1-2 (Tab. 4.8). Demzufolge interagierten die

Proteine in einem 1:1 Komplex miteinander. Diese Werte stehen im Einklang mit den Daten, die zwischen dem N-Terminus von Wrch1 (mit allen drei PxxP-Motiven) und den SH3-Domänen erhalten wurden (Tab. 4.7). Eine weitere Gemeinsamkeit besteht zwischen den Messungen zwischen Nck1-2 und P₂ und Nck1-2 und nWrch1. In beiden Fällen lag der stöchiometrische Faktor bei 3. Dies ist unwahrscheinlich, da eine Bindung von drei Molekülen Nck1-2 an das verhältnismäßig kurze P₂ kaum möglich ist. Da keine Bindung der beiden Peptide P₁ und P₃ an Nck1-2 gemessen werden konnte, kann auch ausgeschlossen werden, dass drei Moleküle Nck1-2 an nWrch1 binden. Ein Unterschied in den Ergebnissen zwischen den Messungen mit den Peptiden und dem N-Terminus von Wrch1 bestand im Falle von p120, das an nWrch1 binden konnte aber an keines der drei Peptide [Risse et al., 2012].

Ein Peptid aus 14 Aminosäuren (P₂) ist für die Interaktion der GTPase Wrch1 mit SH3-Domänen von Adapterproteinen ausreichend. Die beiden anderen PxxP-Motive von Wrch1 binden nicht an SH3-Domänen.

4.3.2.5 Bindungseigenschaften des mittleren PxxP-Motivs von Wrch1

Nachdem festgestellt wurde, dass das Peptid 2 (P₂) allein für die Interaktion mit den SH3-Domänen verantwortlich ist und nicht die beiden C- und N-terminal flankierenden PxxP-Motive, sollte das Peptid 2 weiterführend untersucht werden. Insbesondere weil es sich dabei um ein doppeltes PxxP-Motiv handelt (PPVPP), wurden Peptide untersucht, die in einem der beiden PxxP-Motive eine Mutation von Prolin zu Alanin aufwiesen (Abb. 4.14 B). Mittels ITC-Messungen (überwiegend durchgeführt während der Diplomarbeit und verifiziert im Zuge dieser Arbeit) mit Grb2-1 konnte gezeigt werden, dass beide Peptide eine ähnliche Gleichgewichtsdissoziationskonstante besaßen (P₂₋₄, K_D= 30,6 µM; P₂₋₅, K_D= 29,3 µM). Sie verfügten über fast die gleiche Affinität zu der N-terminalen SH3-Domäne von Grb2 wie das P₂ ohne Mutationen (K_D= 28,3 µM) und unterschieden sich auch nicht wesentlich in der Enthalpie, die negativ war, oder dem stöchiometrischen Faktor, der näherungsweise bei 1 lag [Risse et al., 2012] (Abb. 4.14 B, Tab. 4.8). Die Mutationen hatten somit keinen Einfluss auf die Bindung zwischen Wrch1 und Grb2-1.

Tabelle 4.8: Bindungsaffinitäten und Interaktionsparameter von synthetischen Peptiden des mittleren PxxP-Motivs von nWrch1 (P₂) und SH3-Domänen von Adapterproteinen.

Ligand	Peptid	K _D (µM)	ΔH (kcal/mol)	N
Grb2-1	P ₂	28,3	-16,99 ± 0,91	1,16
Grb2-2	P ₂	21,6	-1,20 ± 0,11	1,23
Crk1 SH3	P ₂	23,5	-2,04 ± 0,17	1,02
Src SH3	P ₂	24,3	-4,64 ± 0,32	0,91
Nck1-2	P ₂	23,0	-1,32 ± 0,04	3,05
Nck1-3	P ₂	30,3	-4,39 ± 0,53	0,95
p120 SH3	P ₂	Keine Bindung		
Grb2-1	P ₂	28,3	-16,99 ± 0,91	1,16
Grb2-1	P ₂₋₄	30,6	-5,12 ± 0,38	1,15
Grb2-1	P ₂₋₅	29,3	-9,23 ± 0,31	1,33
Grb2-1	P ₂₋₆	31,5	-9,31 ± 0,63	1,4
Grb2-1	P ₂₋₇	38,2	-8,97 ± 0,44	0,99
Grb2-1	P ₂₋₈	36,0	-7,42 ± 0,57	0,89
Grb2-1	P ₂₋₉	121,2	-13,96 ± 2,77	0,90
Grb2-1	P ₂₋₁₀	175,4	-1,39 ± 0,24	4,17
Grb2-1	P ₂₋₁₁	Keine Bindung		

Zusammenstellung der durch ITC-Messungen ermittelten Daten für die Interaktion zwischen Peptiden von nWrch1 und SH3-Domänen von verschiedenen Adapterproteinen [modifiziert nach Risse et al., 2012]. Titration von jeweils 750-1500 µM SH3-Domäne aus der Spritze zu 50-100 µM nWrch1 in der Messzelle, bei einer Temperatur von 15 °C und Verwendung eines Messpuffers bestehend aus 30 mM Tris/HCl, pH 7,5 und 50 mM NaCl. Die genauen Sequenzen können aus Abbildung 4.14 B entnommen werden. K_D, Gleichgewichtsdissoziationskonstante, berechnet aus K_A, Assoziationskonstante; ΔH, Bindungsenthalpie; N, stöchiometrischer Faktor.

Um nachzuweisen, welche der das mittlere PxxP-Motiv flankierenden Aminosäuren für eine Interaktion mit Adapterproteinen wichtig sind, wurden verkürzte Peptide unterschiedlicher Länge in ITC-Messungen untersucht. Bei einer Reduktion von 14 Aminosäuren (P₂) auf 12 (P₂₋₆) oder 10 (P₂₋₇) wurden keine großen Unterschiede festgestellt (Abb. 4.14 B, Tab. 4.8). Die Affinität von P₂₋₇ war lediglich etwas geringer und lag bei 38,2 µM (P₂, K_D= 28,3 µM; P₂₋₆, K_D= 31,5 µM). Das Entfernen eines N-terminal gelegenen Glutamats bewirkte ebenfalls keine Änderung in der Interaktion mit Grb2-1 und zeigte, dass diese Aminosäure nicht direkt an der Interaktion beteiligt war (P₂₋₈, K_D= 36,0 µM; ΔH= -7,42 kcal/mol; N= 0,89). Im Gegensatz dazu war ein C-terminales Arginin für die Bindung an SH3-Domänen

essentiell. Die Affinität für das Peptid, dem dieses Arginin fehlte (P_{2-9}), war deutlich geringer ($K_D = 121,2 \mu\text{M}$) als für die anderen verkürzten Peptide. Das Peptid P_{2-10} , dem sowohl das N-terminale Glutamat als auch das C-terminale Arginin fehlte, besaß eine noch niedrigere Affinität zu Grb2-1 ($K_D = 175,4 \mu\text{M}$). Bei weiterer N-terminaler Verkürzung um ein Alanin konnte schließlich keine Bindung mehr detektiert werden. Das minimale bindende Peptid besteht somit aus 8 Aminosäuren (APPVPPRR) mit einem essentiellen Arginin C-terminal [Risse et al., 2012].

4.3.2.6 Quantitativer Nachweis der Interaktion zwischen Wrch1, P_2 (Wrch1) oder Chp und *full length* Adapterproteinen

Die einzelnen SH3-Domänen der untersuchten Adapterproteine (Grb2, Nck1, Src, Crk und p120) besaßen alle eine Affinität zwischen 10-42 μM für die verschiedenen PxxP-Motiv beinhaltenden Liganden von Wrch1. nWrch1 besitzt dabei drei PxxP-Motive, P_2 besteht nur aus dem mittleren PxxP-Motiv von Wrch1, und nChp besitzt neben einem vollständigen ein weiteres unvollständiges PxxP-Motiv. Grb2 und Nck1 enthalten jeweils zwei SH3-Domänen, die unabhängig voneinander an nWrch1 und P_2 binden konnten (Grb2-1, Grb2-2, Nck1-2, Nck1-3, nicht Nck1-1) und unterschieden sich dadurch von den anderen untersuchten Adapterproteinen Src, Crk und p120, die jeweils nur eine SH3-Domäne besitzen mit der sie mit nWrch1 oder P_2 interagierten. Deswegen sollte untersucht werden, welchen Einfluss *full length* Proteine, also Proteine, die alle ihre Domänen enthalten, auf die Bindung an nWrch1 und P_2 haben. Möglicherweise interagiert nWrch1 mit beiden SH3-Domänen gleichzeitig über das mittlere PxxP-Motiv (P_2) sowie eines der beiden N- oder C-terminal gelegenen PxxP-Motive (P_1 oder P_3). Es konnte keine Interaktion zwischen P_1 oder P_3 und den isolierten SH3-Domänen gemessen werden (Abb. 4.14 A). Es ist jedoch denkbar, dass ein kooperativer Effekt zwischen P_2 und P_1 oder P_3 vorliegt und die Affinität dieser beiden PxxP-Motive erhöht ist, wenn - wie im Falle von Grb2 fl - zwei Bindungsstellen verfügbar sind.

Hierzu wurden ITC-Messungen durchgeführt, unter den gleichen Bedingungen wie bereits für die Interaktionsstudien zwischen den isolierten SH3-Domänen und ihren Liganden (3.3.14). Grb2 fl oder Nck fl wurde in einer Konzentration von 20 μM in der Messzelle eingesetzt und nWrch1 oder P_2 bis zu einer Konzentration von 500 μM in 8 μl Schritten zutitriert. Zunächst wurden die Interaktionen zwischen Nck1 fl und nWrch1 sowie Grb2 fl und nWrch1 bestimmt. Bei beiden Reaktionen handelte es sich um exotherme Reaktionen, da die Bindungsenthalpien (ΔH) negativ waren (Tab. 4.9, Abb. 4.15 A,B). Die Affinitäten lagen bei 2,63 μM für Nck fl

und 0,75 μM für Grb2 fl und damit um ein vielfaches höher als bei den Interaktionen der isolierten SH3-Domänen von Nck1 und Grb2 mit nWrch1 [Risse et al., 2012]. Diese lagen für Nck1-2 und Nck1-3 um 20 μM und für Grb2-1 und Grb2-2 bei 10,3 bzw. 22,8 μM (Tab. 4.7). Der stöchiometrische Faktor (N) lag für die beiden Interaktionen bei zwei. Das bedeutet, dass Nck fl und Grb2 fl zwei Bindungsstellen für nWrch1 besitzen und die Proteine einen 1:2 Komplex bilden (Nck fl/Grb2 fl : nWrch1).

Tabelle 4.9: Bindungsaffinitäten und Interaktionsparameter von dem N-Terminus von Wrch1 (nWrch1), dem mittleren PxxP-Motiv von nWrch1 (P_2) und dem N-Terminus von Chp (nChp) und den Adapterproteinen Grb2 fl und Nck1 fl.

Ligand	Grb2 fl			Nck1 fl		
	K_D (μM)	ΔH (kcal/mol)	N	K_D (μM)	ΔH (kcal/mol)	N
nWrch1	0,75	$-5,96 \pm 0,06$	2,01	2,63	$-3,54 \pm 0,08$	2,23
P_2 (Wrch1)	1,97	$-5,22 \pm 0,08$	2,12			
nChp	52,9	$-1,23 \pm 1,88$	1,27			

Zusammenstellung der durch ITC-Messungen ermittelten Daten für die Interaktion zwischen nWrch1, P_2 (Wrch1) oder nChp und den Adapterproteinen Grb2 fl und Nck1 fl (fl: *full length*). Titration von jeweils 500 μM nWrch1, P_2 , oder nChp aus der Spritze zu 20-30 μM Grb2 fl und Nck1 fl in der Messzelle, bei einer Temperatur von 15 °C und Verwendung eines Messpuffers bestehend aus 30 mM Tris/HCl, pH 7,5 und 50 mM NaCl. K_D , Gleichgewichtsdissoziationskonstante, berechnet aus K_A , Assoziationskonstante; ΔH , Bindungsenthalpie; N, stöchiometrischer Faktor.

Wenn nWrch1 mit mehr als einem PxxP-Motiv mit den *full length* Proteinen interagieren würde, würde ein 1:1 Komplex erwartet. Deswegen wurde in einem weiteren Experiment die Interaktion zwischen Grb2 fl und P_2 untersucht (Tab. 4.9, Abb. 4.15 C). Die Affinität lag bei 1,97 μM und war etwas geringer als zwischen Grb2 fl und nWrch1 ($K_D = 0,75 \mu\text{M}$). Der stöchiometrische Faktor lag bei zwei, wodurch gezeigt werden konnte, dass Grb2 fl und P_2 in einem 1:2 Verhältnis miteinander interagieren. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass außer dem mittleren PxxP-Motiv P_2 weitere PxxP-Motive des N-Terminus von Wrch1 an der Interaktion mit den *full length* Adapterproteinen beteiligt waren [Risse et al., 2012].

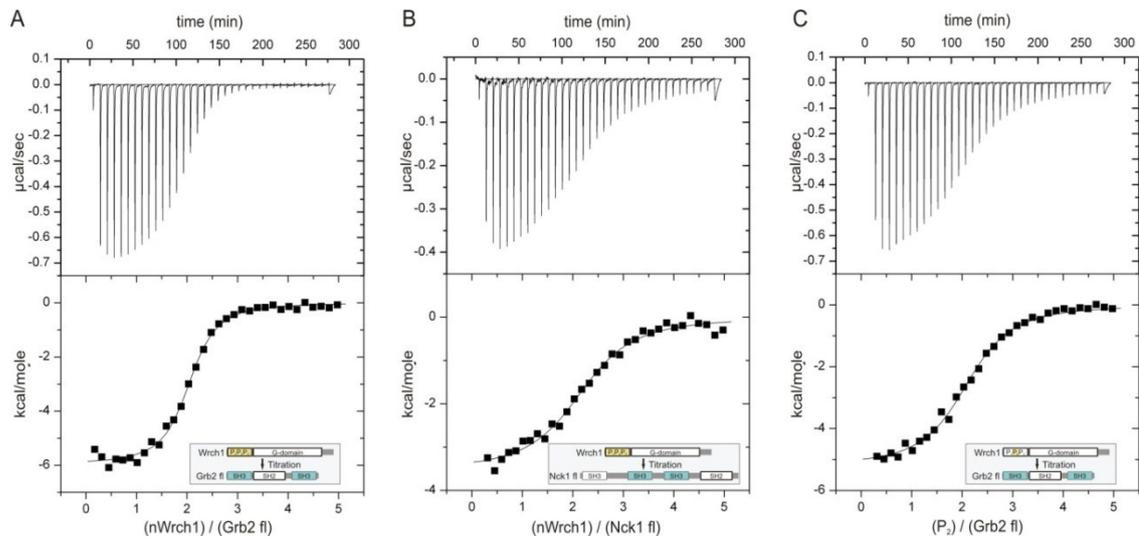


Abbildung 4.15: ITC-Experimente zwischen Konstrukten von Wrch1 und den *full length* Adapterproteinen Grb2 fl und Nck1 fl [Risse et al., 2012]. Titration von jeweils 500 μM Wrch1 aus der Spritze zu 20 μM der *full length* Adapterproteine in der Messzelle, bei einer Temperatur von 15 $^{\circ}\text{C}$ und Verwendung eines Messpuffers bestehend aus 30 mM Tris/HCl, pH 7,5 und 50 mM NaCl. nWrch1 wurde zu Grb2 fl (**A**) oder Nck1 fl (**B**) titriert, bzw. P₂ wurde zu Grb2 fl titriert (**C**). Der obere Graph zeigt die Heizenergie aufgetragen gegen die Zeit und der untere Graph die integrierte Heizenergie in Abhängigkeit zum molaren Verhältnis der Interaktionspartner. Die Auswertung der ITC-Messung lieferte folgende Daten: **A:** nWrch1 und Grb2 fl: $K_A = 1,33 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (entspricht $K_D = 0,75 \mu\text{M}$), $\Delta H = -5,96 \pm 0,06 \text{ kcal/mol}$, $N = 2,01$; **B:** nWrch1 und Nck1 fl: $K_A = 3,80 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (entspricht $K_D = 2,63 \mu\text{M}$), $\Delta H = -3,54 \pm 0,08 \text{ kcal/mol}$, $N = 2,23$; **C:** P₂ und Grb2 fl: $K_A = 5,07 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (entspricht $K_D = 1,97 \mu\text{M}$), $\Delta H = -5,22 \pm 0,08 \text{ kcal/mol}$, $N = 2,12$.

nChp konnte nur an die N-terminale SH3-Domäne von Grb2 (Grb2-1) mit einer geringen Affinität von 38,5 μM binden. Somit kann dieses Protein verwendet werden, um zu überprüfen, ob Grb2 fl *per se* mit höheren Affinitäten an PxxP-Motiv enthaltende Liganden bindet, im Vergleich zu den beiden isolierten SH3-Domänen von Grb2 (Grb2-1 und Grb2-2). Grb2 fl wurde in ITC-Messungen in einer Konzentration von 30 μM eingesetzt und nChp bis zu einer Konzentration von 500 μM zutitriert. Die Proteine bildeten einen 1:1 Komplex ($N = 1,27$) und die aus der Assoziationskonstante berechnete Gleichgewichtsdissoziationskonstante betrug 52,9 μM (Tab. 4.9). Folglich war die Affinität zwischen nChp und Grb2 fl geringer als zwischen nChp und der isolierten SH3-Domäne Grb2-1. Grb2 fl interagierte nicht *per se* mit einer höheren Affinität mit PxxP-Motiv enthaltenden Liganden sondern nur mit nWrch1 bzw. dem mittleren PxxP-Motiv von Wrch1 (P₂), wobei beide SH3-Domänen an der Interaktion beteiligt waren. Vom Prinzip her ähnlich verhielt sich Nck1 fl, das mit einer höheren Affinität mit nWrch1 interagierte als seine isolierten SH3-Domänen.

4.3.3 Effektoren

Effektoren können nur an die aktive Form, also die GTP-gebundene Form von GTPasen binden. Visualisiert werden kann die Bindung durch Verwendung von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden (3.3.10). Wenn sich in der Umgebung des Fluorophors etwas ändert, spiegelt sich dies in einer Zu- oder Abnahme der Fluoreszenz wieder. Dieses Prinzip sollte genutzt werden, um Wrch1-Effektor-Interaktionen zu studieren.

4.3.3.1 Bestimmung des für die Effektorassoziation geeigneten fluoreszenzmarkierten Nukleotids für Wrch1

Als Effektor wurde PAK1 eingesetzt, da dieses Protein ein aus der Literatur bekannter Interaktionspartner von Wrch1 und Cdc42 ist. Mant-Fluorophore, die sonst standardmäßig für solche Interaktionen eingesetzt werden, konnte nicht genutzt werden, da keine Fluoreszenzänderung auftrat, wenn sie mit Konstrukten von Wrch1 im Fluorimeter gemessen wurden (Abb. 4.6 A). Bei der Analyse des für Wrch1 geeigneten fluoreszenzmarkierten Nukleotids konnte allerdings gezeigt werden, dass Cy3- oder tamra-gekoppelte Nukleotide für Wrch1 in Frage kommen (Abb. 4.6 B).

Ähnliche Experimente wurden deswegen durchgeführt, um zu testen, ob diese Fluorophore auch genutzt werden können, um die Effektorassoziation an Wrch1 zu visualisieren. Dafür wurde 0,4 μM Cy3GTP vorgelegt und dann die GTPase (2 μM ; Wrch $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ oder Cdc42 ΔC) in GDP-gebundener Form zugefügt, was in einem Anstieg des Fluoreszenzsignals sichtbar wurde (Abb. 4.16). In einer zweiten Küvette wurde in einem weiteren Schritt der Effektor GST-PAK1 fl (8 μM) zugegeben. Dabei konnte ein erneuter Anstieg in der Fluoreszenz beobachtet werden, im Vergleich zu dem Ansatz dem kein Effektor zugemischt wurde. Die Änderung war für Wrch $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ deutlicher als für Cdc42 ΔC . In einem dritten Experiment wurde, nachdem Cy3GTP vorgelegt wurde in einem Schritt ein Gemisch aus 2 μM GTPase in GDP-gebundener Form und 8 μM GST-PAK1 fl zugegeben. Dies resultierte in einem sehr schnellen und sehr starken Anstieg der Fluoreszenz. Die Amplitude war deutlich größer als bei der Zugabe der GTPase allein. Allerdings näherte sich diese mit der Zeit der Amplitude der Reaktion bei der GTPase und Effektor in zwei Schritten zugefügt wurden. Nach Zugabe von EDTA (20 mM) wurde eine Abnahme der Fluoreszenz beobachtet, bedingt durch die Destabilisierung des GTPase-Nukleotid-Komplexes.

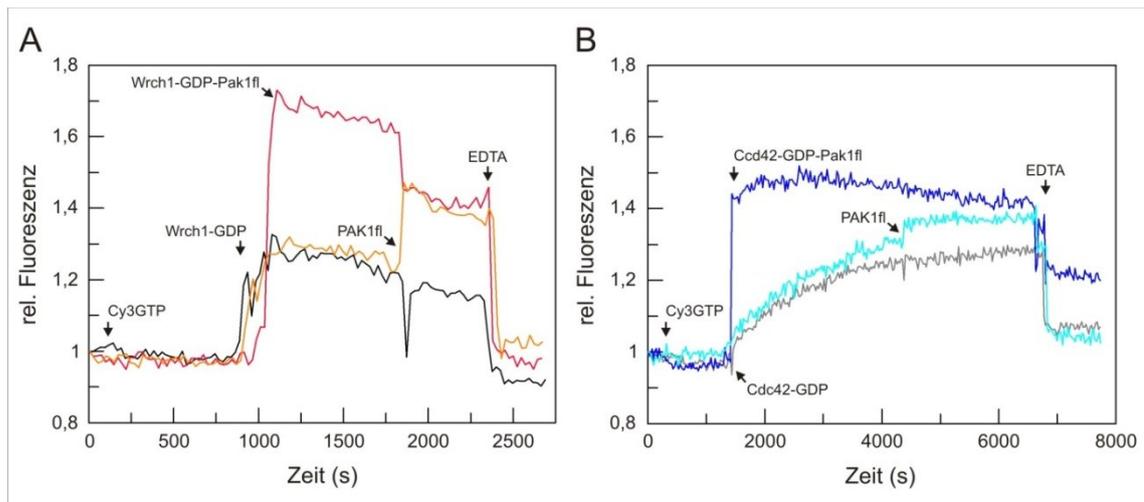


Abbildung 4.16: Bestimmung des für die Interaktionsstudien zwischen Wrch1 und Effektoren geeigneten, fluoreszenzmarkierten Nukleotids. **A, B:** Das fluoreszenzmarkierte Nukleotid Cy3GTP ($0,4\mu\text{M}$) wurde vorgelegt und dann $2\mu\text{M}$ GDP-gebundene GTPase zugefügt und die Änderungen in der Fluoreszenz gemessen. Zu bestimmten Ansätzen wurde außerdem GST-PAK1 fl als Effektor zugesetzt. **A:** Nach Zugabe von Wrch $\Delta\text{N}\Delta\text{C}\cdot\text{GDP}$ (schwarze Kurve) steigt die Fluoreszenz. In einem zweiten Ansatz wurde nach Zugabe der GTPase GST-PAK1 fl ($8\mu\text{M}$, orangefarbene Kurve) zugefügt. Im dritten Ansatz wurde Wrch $\Delta\text{N}\Delta\text{C}\cdot\text{GDP}$ ($2\mu\text{M}$) vor Zugabe mit GST-PAK1 fl ($8\mu\text{M}$) gemischt und dann zu dem Fluorophor gegeben (rote Kurve). Abschließend wurde zu allen drei Ansätzen 20 mM EDTA zugesetzt. **B:** Als GTPase wurde Cdc42 $\Delta\text{C}\cdot\text{GDP}$ eingesetzt und so, wie in A beschrieben, verfahren. Graue Kurve: $2\mu\text{M}$ Cdc42 $\Delta\text{C}\cdot\text{GDP}$, cyanfarbene Kurve: in zwei Schritten wurde zuerst Cdc42 $\Delta\text{C}\cdot\text{GDP}$, dann GST-PAK1 fl zugefügt; blaue Kurve: in einem Schritt wurde Cdc42 $\Delta\text{C}\cdot\text{GDP}\cdot\text{GST-PAK1 fl}$ zugesetzt. Abschließend wurde zu allen drei Ansätzen 20 mM EDTA zugesetzt.

Im Falle von tGTP konnte im Gegensatz zu Cy3GTP eine Abnahme in der Fluoreszenz beobachtet werden, sobald der Effektor zugegeben wurde. Folglich war die Amplitude bei einer Zugabe aus dem Gemisch von Wrch $\Delta\text{N}\Delta\text{C}\cdot\text{GDP}$ und GST-PAK1 fl kleiner (Daten nicht gezeigt).

Sowohl tamra als auch Cy3 können für die Visualisierung der Effektor Interaktion von Wrch1 genutzt werden.

4.3.3.2 Effektorassoziation von Wrch1 und Cdc42

Die Effektorassoziation von GTPasen ist ein sehr schneller Prozess. Die Bestimmung der Assoziationsraten kann deswegen mittels der *stopped-flow* Methode unter Verwendung fluoreszierender Nukleotide erfolgen. Drei verschiedene Effektoren wurden hier für Wrch1 und Cdc42 untersucht. Die GTPasen werden in ihrer aktiven Form, also in GTP-gebundenem Zustand benötigt. Um die GTP-Hydrolyse zu verhindern, wurde fluoreszenzmarkiertes GppNHp benutzt, das ein nicht-hydrolysierbares GTP-Analogon darstellt. Wrch $\Delta\text{N}\Delta\text{C}\cdot\text{GDP}$ wurde mittels enzymatischer Methoden zu Wrch $\Delta\text{N}\Delta\text{C}\cdot\text{tGppNHp}$ und Cdc42 $\Delta\text{C}\cdot\text{GDP}$ zu Cdc42 $\Delta\text{C}\cdot\text{mGppNHp}$ ausgetauscht. In ersten Experimenten mit

Wrch Δ N Δ C·tGppNHp und PAK1 fl konnte keine Änderung in der Fluoreszenz ermittelt werden. Dies konnte aufgrund der Ergebnisse, die mit Wrch Δ N Δ C·GDP, tGTP/Cy3GTP und GST-PAK1 fl bei fluorimetrischen Messungen erhalten wurden (Kapitel 4.3.3.1), nicht erwartet werden. Außerdem ist PAK1 ein aus der Literatur bekannter Effektor von Wrch1 und sollte somit als Positivkontrolle dienen. Deswegen wurde Wrch Δ N Δ C in einem zweiten Versuch in nukleotidfreier Form eingesetzt und unmittelbar vor dem Experiment mit tGppNHp gemischt und für die Messungen verwendet. 0,2 μ M Wrch Δ N Δ C (nukleotidfrei) wurden mit 0,1 μ M tGppNHp gemischt und mit je 2 μ M PAK1 fl, N-WASp GBD oder Pyk2 FERM in einer *stopped-flow* Apparatur gemessen. Es konnten keine Fluoreszenz-Zu- oder Abnahmen detektiert werden (Abb. 4.17 A) und somit eine Effektorassoziation an Wrch1 ausgeschlossen werden. Die gleichen Effektoren (je 2 μ M) wurden in Messungen mit Cdc42 Δ C·mGppNHp (0,1 μ M) eingesetzt. Die Effektorassoziation konnte für die Proteine PAK1 fl und N-WASp GBD in Form einer Fluoreszenz Abnahme verfolgt werden (Abb. 4.17 B). Die Assoziation von N-WASp GBD war dabei schneller, mit einer Rate von $k_{\text{obs}} = 2,047 \text{ s}^{-1}$. Die Rate für PAK1 fl lag im Vergleich dazu bei $k_{\text{obs}} = 0,100 \text{ s}^{-1}$. Cdc42 Δ C·mGppNHp interagiert nicht mit Pyk2 FERM, da keine Änderung des Fluoreszenzsignals beobachtet wurde.

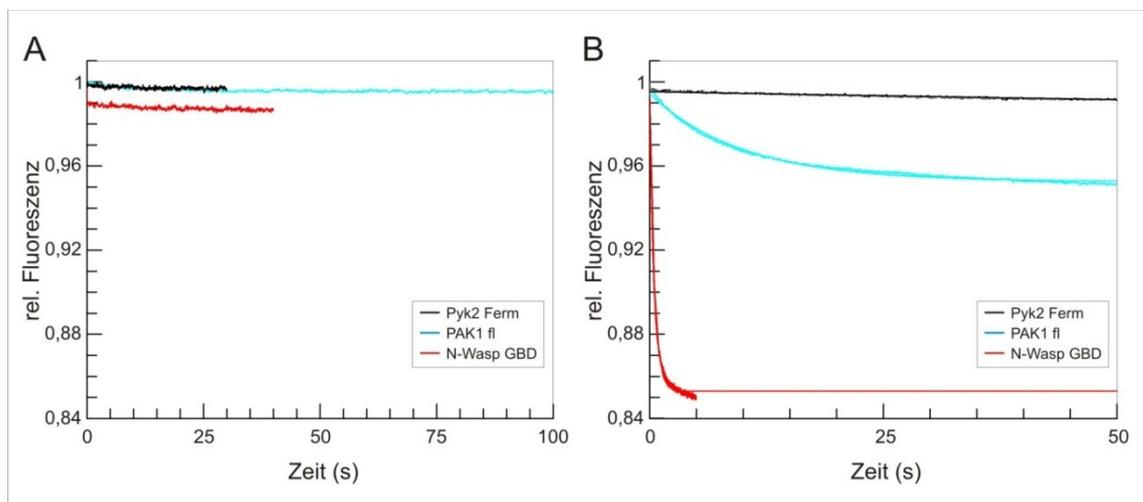


Abbildung 4.17: Effektorassoziation von Wrch1 und Cdc42. Die GTPase-Effektor-Interaktion wurde mit **A:** Wrch Δ N Δ C (0,2 μ M) in nukleotidfreier Form und tGppNHp (0,1 μ M) oder **B:** Cdc42 Δ C·mGppNHp (0,1 μ M) und den Effektoren (je 2 μ M) PAK1 fl (cyan), N-WASp GBD (rot) und Pyk2 FERM (schwarz) gemessen. Bei einer Interaktion konnten die Raten in der Fluoreszenzabnahme bestimmt werden (Cdc42 Δ C·mGppNHp mit N-WASp GBD: $k_{\text{obs}} = 2,047 \text{ s}^{-1}$, Cdc42 Δ C·mGppNHp mit PAK1 fl: $k_{\text{obs}} = 0,100 \text{ s}^{-1}$).

Da eine Effektorassoziation zwischen Cdc42 und PAK1 oder N-WASp beobachtet werden konnte, kann ausgeschlossen werden, dass die Effektoren inaktiv sind. Das bedeutet für die Messungen mit Wrch1, dass keiner der getesteten Effektoren mit

dieser GTPase interagiert, oder dass Wrch1 selbst inaktiv ist. Aufgrund der veröffentlichten Literatur und den vorher durchgeführten Experimenten mit diesen Proteinen und Nukleotiden unter Verwendung eines Fluorimeters wurde angenommen, dass eine Bindung zwischen Wrch1 und PAK1 stattfindet. Da schon bei anderen Versuchen deutlich wurde, dass Wrch1 eine geringere oder keine Aktivität mehr aufwies, sobald das Nukleotid entfernt oder ausgetauscht wurde, scheint es wahrscheinlich, dass dies auch hier der Fall war (siehe Nukleotidassoziation und -dissoziation 4.2.3, intrinsische GTP-Hydrolyse 4.2.4 und GAP-Assay 4.3.1.2).

4.3.3.3 Sedimentationsassay mit GST-Effektoren und Wrch1

Die Effektor-Wrch1 Interaktion sollte, da sie fluorimetrisch nicht quantitativ bestimmt werden konnte, in einem Sedimentationsassay qualitativ untersucht werden. Es wurden hierfür Wrch1 und Cdc42 in jeweils aktiver, GppNHp-gebundener und inaktiver, GDP-gebundener Form eingesetzt. 40 μ M GST-Effektor (N-WASp GBD, PAK1 fl, Pyk2 FERM oder GST) wurden an GSH-Sepharose *beads* gebunden und mit jeweils 60 μ M GTPase (Wrch Δ C·GppNHp, Wrch Δ C·GDP, Cdc42 Δ C·GppNHp oder Cdc42 Δ C·GDP) inkubiert, gewaschen und analysiert. Dabei stellte sich anhand der Negativkontrolle GST heraus, dass mehr als 3 Waschschrte nötig waren, um falsche positive Ergebnisse zu vermeiden. Nach Optimierung der Durchführung des Experiments und Erhöhung der Waschschrte auf 6 wurde das Experiment erneut durchgeführt. Cdc42 konnte in seiner aktiven Form an GST-PAK1 fl und GST-N-WASp GBD binden (Abb. 4.18 A,B). Es konnte in GppNHp-gebundenem Zustand nicht an GST-Pyk2 FERM binden. In inaktiver Form konnte keine Bindung an eines der GST-Fusionsproteine festgestellt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Messungen zwischen fluoreszenzmarkiertem aktiven Cdc42 und den Effektoren überein, bei denen N-WASp und PAK1 nicht aber Pyk2 als Bindungspartner ermittelt werden konnten (Abb. 4.17 B).

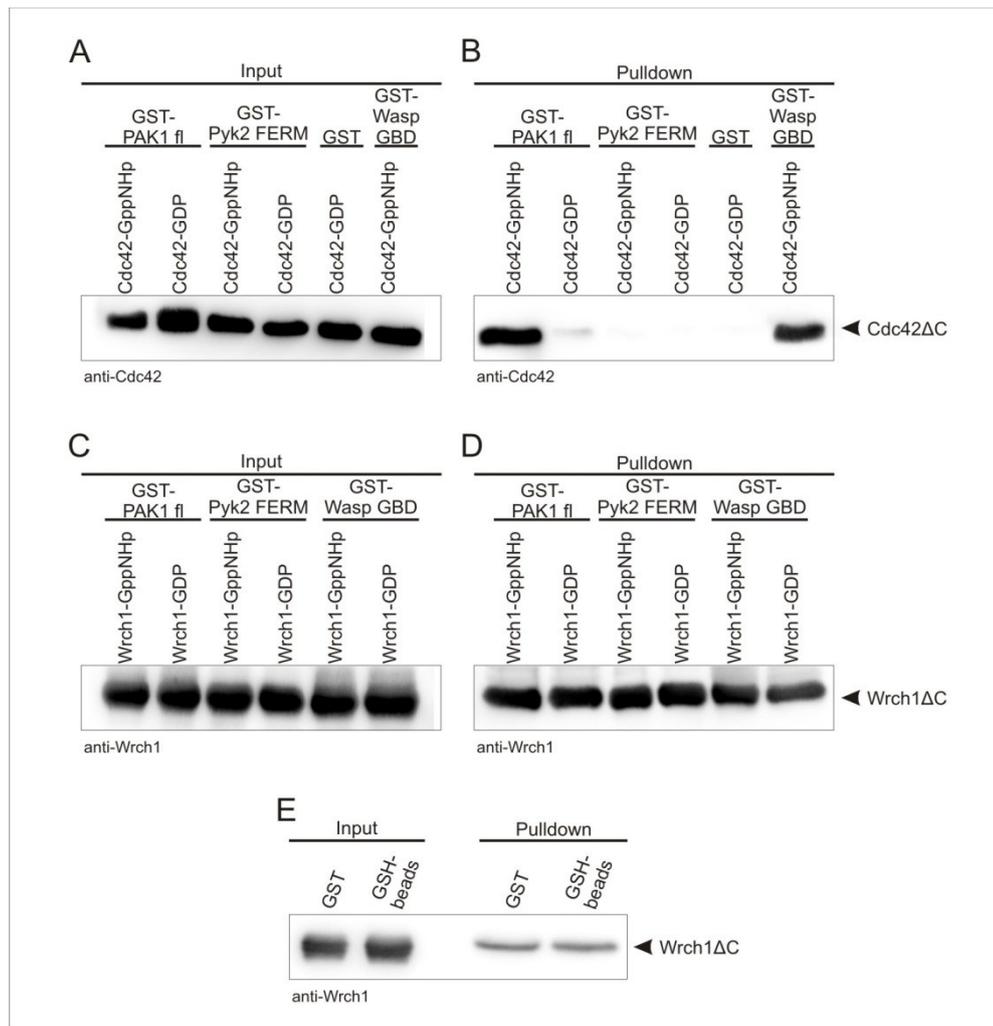


Abbildung 4.18: Sedimentationsassay mit GST-Effektoren und Cdc42 oder Wrch1. 40 μ M GST-Fusionsprotein wurden an GSH-beads gebunden und mit 60 μ M GTPase in GDP- oder GppNHp-gebundenem Zustand inkubiert. Analysiert wurden alle Proben mittels SDS-PAGE (12,5 %) und immunologischen Nachweises unter Verwendung verschiedener Antikörper (Anti-Wrch1 und Anti-Cdc42). Als Negativkontrolle wurde GST eingesetzt. **A:** Eingesetztes Cdc42 Δ C (Input) und **B:** von den beads eluiertes Cdc42 Δ C (Pulldown). **C:** Eingesetztes Wrch1 Δ C (Input) und **D:** von den beads eluiertes Wrch1 Δ C (Pulldown). **E:** Negativkontrollen (GST, oder GSH-beads alleine) für Wrch1 Δ C.

Bei dem parallel durchgeführten Sedimentationsassay für Wrch1 zeigte sich, dass selbst 6-maliges Waschen nicht ausreichend war, um ungebundenes Protein zu entfernen. Unabhängig von der Nukleotidbindung (GppNHp oder GDP) konnte Wrch1 im immunologischen Nachweis mit einem Wrch1-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 4.18 C,D). Auch in der Negativkontrolle, bei der neben GST auch GSH-Sepharose beads ohne GST-Fusionsprotein eingesetzt wurden, konnte Wrch1 detektiert werden (Abb. 4.18 E). Vermutlich war das Protein während der Versuchsdurchführung präzipitiert und somit im Sediment verblieben.

Eine inter- und intramolekulare Charakterisierung der G-Domäne von Wrch1 scheint aufgrund der Instabilität des aus *E. coli* gereinigten Proteins schwierig.

Deswegen wurde in einem weiteren Schritt in Bezug auf die Effektor-Bindung mit Wrch1 aus eukaryotischen Zellen weitergearbeitet.

4.3.3.4 Sedimentationsassay mit GST-Effektoren und Wrch1-flag transfizierten HeLa-Zelllysaten

Der Sedimentationsassay mit aus *E. coli* gereinigtem Wrch1 konnte aufgrund von Präzipitation des Proteins keine aussagekräftigen Ergebnisse liefern. Deswegen wurde ein Sedimentationsassay mit den Effektoren als GST-Fusionsprotein und mit Wrch1-flag transfizierten HeLa-Zelllysaten durchgeführt. Bei Wrch1-flag handelte es sich nicht um eine Deletionsvariante, wie bei dem zuvor verwendeten Wrch Δ C. Durch die Expression in eukaryotischen Zellen werden die Proteine außerdem post-transnational modifiziert, was zusätzlich zu ihrer Stabilität beitragen kann.

HeLa-Zellen wurden mit 5 μ g DNA transfiziert und nach 48 Stunden lysiert. Die Effektoren GST-PAK1 fl, GST-N-WASp GBD und GST-Pyk2 FERM oder GST (je 100 μ M) wurden an GSH-Sepharose-beads gebunden und mit den Zelllysaten inkubiert, anschließend gewaschen und analysiert. Dabei konnte eine deutliche Bindung zwischen GST-PAK1 fl und Wrch1-flag detektiert werden (Abb. 4.19), wohingegen GST-Pyk2 nicht mit Wrch1-flag interagierte. Für GST-N-WASp GBD konnte eine ganz schwache Bande detektiert werden. Falls hier eine Bindung vorliegt, ist diese sehr schwach.



Abbildung 4.19: Sedimentationsassay mit GST-Effektoren und Wrch1-flag aus transfizierten HeLa-Zelllysaten. GST-Fusionsprotein wurde an GSH-beads gebunden und mit Zelllysate inkubiert. Analysiert wurden alle Proben mittels SDS-PAGE (12,5 %) und immunologischem Nachweis unter Verwendung eines Anti-flag Antikörpers. Als Negativkontrolle wurde GST eingesetzt. Analysiert wurden das Zelllysate (total) sowie das Eluat der GSH-beads (Pulldown).

GST, das als Negativkontrolle eingesetzt wurde, interagiert nicht mit Wrch1-flag. Somit konnte hier deutlich gezeigt werden, dass Wrch1 nicht präzipitierte, wie in dem Sedimentationsassay mit aus *E. coli* gereinigtem Wrch1.

4.3.4 Komplexe aus Wrch1-Effektoren-Adaptoren

In den vorhergegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Wrch1 mit verschiedenen Adaptoren und Effektoren interagieren kann. Inwieweit diese Proteine alle zusammen in einem Komplex interagieren, sollte in den nächsten Experimenten untersucht werden.

Im durchgeführten Sedimentationsassay mit den Effektoren als GST-Fusionsproteine und Wrch1-*flag* transfizierten HeLa Zelllysaten eluierten GST-PAK1 fl und Wrch1-*flag* zusammen (Abb. 4.19). Ob in diesem GTPase-Effektor-Komplex auch endogene Adapterproteine vorkommen, wurde durch immunologischen Nachweis analysiert. Hierfür wurden Antikörpern für die Adapterproteine Grb2, Src, Crk und Nck verwendet und die Proben aus dem Sedimentationsassay zwischen GST-PAK1 fl und Wrch1-*flag* transfizierten HeLa Zelllysaten auf das Vorkommen dieser Proteine überprüft. Die endogenen Proteine Grb2 und Nck konnten im Komplex zusammen mit PAK1 und Wrch1 nachgewiesen werden (Abb. 4.20). Src und Crk konnten an keines der in diesem Komplex interagierenden Proteine binden. GST, das als Negativkontrolle benutzt wurde, band nicht an die untersuchten Adapterproteine. Bei dem Nachweis von Grb2 war eine Bande für das Eluat von GST zu sehen. Hierbei handelte es sich um das GST, das an die GSH-*beads* gebunden hatte und das ein ähnliches Molekulargewicht hat wie das Protein Grb2 und deswegen hier sichtbar ist.

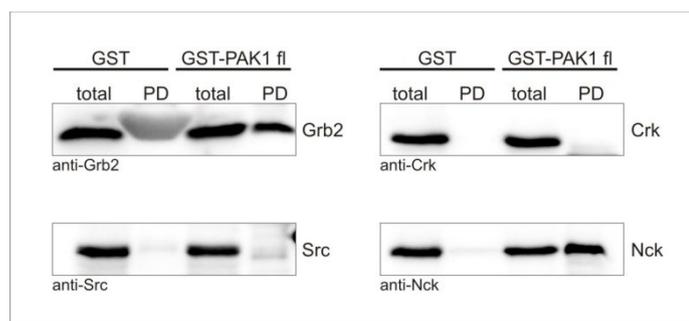


Abbildung 4.20: Komplexbildung zwischen Adapterproteinen, Wrch1-*flag* und GST-PAK1 fl. Sedimentationsassay mit GST-PAK1 fl und mit Wrch1-*flag* transfizierten HeLa-Zelllysaten. Analysiert wurde mittels immunologischen Nachweises welche endogenen Adapterproteine zusammen mit GST-PAK1 fl und Wrch1-*flag* im selben Komplex eluieren. Untersucht wurden die Adaptoren Grb2, Src, Crk und Nck unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen die Proteine. Als Negativ-Kontrolle wurde GST eingesetzt. Analysiert wurden das Zelllysat (total) sowie das Eluat der GSH-*beads* (PD).

Bei dem Sedimentationsassay mit Zelllysaten kann nicht beantwortet werden, bei welchen der im Komplex auftretenden Proteine es sich um eine direkte oder indirekte Bindung handelt oder welche Domänen der Proteine dafür verantwortlich

sind. Um die Relevanz des PxxP-Motiv enthaltenden N-Terminus von Wrch1 zu ergründen wurde überprüft, welche Proteine aus untransfizierten HeLa Zelllysaten an diesen binden. Gezeigt werden konnte bereits, dass die endogenen Adapterproteine Nck und Grb2 in einem Sedimentationsassay an GST-nWrch1 binden (Abb. 4.11 B). Auch hier sollte untersucht werden, welche weiteren Proteine im Komplex mit GST-nWrch1 und Nck oder Grb2 eluieren. Der Fokus lag dabei auf den Effektorproteinen, insbesondere weil nur der N-Terminus von Wrch1 verwendet wurde, also die G-Domäne, die für eine direkte GTPase-Effektor-Interaktion bekannt ist, fehlte. Bei einem Komplex aus dem N-Terminus von Wrch1, den Adaptoren Nck oder Grb2 und Effektorproteinen würde dies bedeuten, dass die Effektor-Wrch1 Interaktion sich von anderen herkömmlichen Effektor-GTPase Bindungen unterscheidet.

Die Sedimentationsassay-Proben, bei denen endogenes Grb2 und Nck mit GST-nWrch1 eluierten, wurden demzufolge mittels Antikörpern für die Effektoren PAK1, N-WASp, FAK1 und Pyk2 untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass endogenes PAK1 im Komplex mit GST-nWrch1 und den beiden Adaptoren eluierte, wobei in der Negativkontrolle mit GST ebenfalls eine, jedoch viel schwächere Bande zu sehen war (Abb. 4.21). Etwas schwächer, aber ähnlich, sahen die Ergebnisse für N-WASp aus, bei dem in der Negativkontrolle eine schwache Bande zu sehen war und eine stärkere im Eluat mit nWrch1. Die Effektoren FAK1 und Pyk2 konnten jeweils nur als schwache Banden (Pyk2 kaum) im Eluat mit nWrch1 detektiert werden, trotz guter Expression in untransfizierten HeLa Zellen.

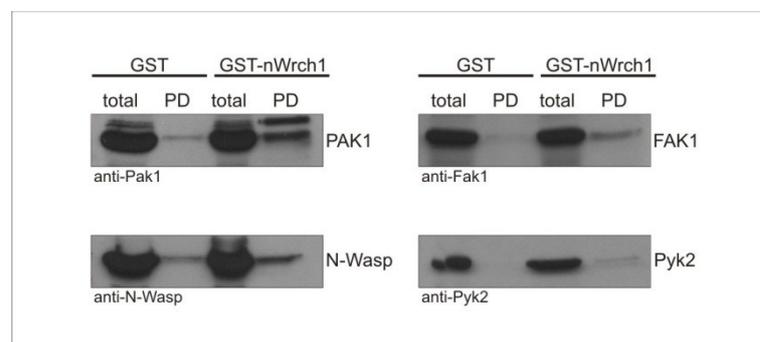


Abbildung 4.21: Komplexbildung zwischen endogenen Effektoren, endogenen Adapterproteinen und GST-nWrch1. Sedimentationsassay mit gereinigtem GST-nWrch1 und endogenen Effektorproteinen aus untransfizierten HeLa-Zelllysaten. GST-nWrch1 wurde an GSH-beads gebunden und mit Zelllysaten inkubiert. Um endogene Proteine zu detektieren, die an nWrch1 gebunden hatten, wurde das Zelllysate (total) und die sedimentierten beads (PD) analysiert. Im selben Komplex wurden auch die Adaptoren Grb2 und Nck nachgewiesen (Abb. 4.11 B). Analysiert wurden alle Proben mittels SDS-PAGE (7,5 oder 12,5 %) und immunologischem Nachweis unter Verwendung verschiedener Antikörper (Anti-PAK1, -N-WASp, -Fak1 und -Pyk2).

Die Ergebnisse sind nicht eindeutig, weisen aber darauf hin, dass die G-Domäne für die Komplexbildung zwischen Effektoren und Wrch1 eine untergeordnete Rolle spielt, der N-Terminus mit der Fähigkeit, Adapterproteine zu binden, aber eine große Bedeutung hat.

Die Ergebnisse der Komplexbildung zwischen Wrch1, Adaptoren und Effektoren machen deutlich, dass sich Wrch1 unter physiologischen Bedingungen mit Adaptoren wie Nck und Grb2 und Effektoren wie PAK1 im Komplex befindet und somit in verschiedene Signaltransduktionskaskaden involviert ist. Die Funktion des N-Terminus ist dabei die Bindung an Adapterproteine. Ob Effektoren von Wrch1 direkt an die G-Domäne binden oder aber die Hilfe von Adaptoren nötig ist, um Wrch1 und Effektorproteine zusammen zu bringen, muss dabei weitergehend untersucht werden.

5 Diskussion

Die Signaltransduktion umfasst alle Prozesse von dem extrazellulären Signal über daraus resultierende intrazelluläre Signalkaskaden bis zur Zellantwort. Dabei handelt es sich um ein komplexes Netzwerk von biochemischen Prozessen, die nacheinander und parallel ablaufen, Signale weiterleiten, amplifizieren, modifizieren und inhibieren, um zum Schluss eine bestimmte Wirkung auszuüben, wie Proliferation, Differenzierung, Migration oder Apoptose. Die an diesen Prozessen beteiligten Proteine bestehen ihrerseits aus funktionellen Einheiten, den Proteindomänen, die aufgrund ihrer Struktur und Funktion klassifiziert werden können. Proteindomänen sind in sich eigenständig faltende Module eines Proteins, die eine kompakte dreidimensionale Struktur ausbilden und unabhängig von anderen Sequenzbereichen des Proteins stabil und funktionell sind. Sie weisen typische Sequenzhomologien auf und sind konserviert in Proteinen aus verschiedenen Proteinfamilien, und üben spezifische Funktionen aus. Generelle Funktionen sind (i) die Bindung an andere Proteine, die eine Bindungsstelle für die Domäne aufweisen, und die Bildung von Proteinkomplexen ohne katalytische Funktion oder (ii) katalytische Funktionen, wobei die Domäne an ein spezifisches Substrat bindet [Scott und Pawson, 2009]. Viele Proteine besitzen dabei mehrere verschiedene Domänen und haben somit eine Vielzahl von Funktionen.

Diese Funktionen zu verstehen, war der Ausgangspunkt für diese Arbeit. Im Mittelpunkt steht dabei die GTPase Wrch1. Sie zählt zu den unkonventionellen Rho-GTPasen, die bisher nur unvollständig charakterisiert wurde. Wrch1 wurde erst kürzlich entdeckt [Tao et al., 2001] und somit ist erst wenig über diese GTPase bekannt. Im ersten Teil der Arbeit sollte deswegen die intramolekulare Interaktion bestimmt werden. Wrch1 besitzt neben einer für GTPasen typischen G-Domäne N-terminal 46 zusätzliche Aminosäuren, die drei PxxP-Motive aufweisen und für ihre Fähigkeit bekannt sind, an SH3-Domänen zu binden. Eine autoinhibitorische Funktion des N-Terminus auf die G-Domäne wird außerdem in der Literatur diskutiert [Shutes et al., 2004]. Somit sollten einerseits die intrinsischen Eigenschaften der G-Domäne von Wrch1 untersucht werden und zum anderen der Einfluss des N-Terminus auf diese Eigenschaften bestimmt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die intermolekularen Interaktionen von Wrch1 mit Regulatoren und Effektoren sowie SH3-Domänen beinhaltenden Adapterproteinen untersucht werden. Bisher konnten keine Regulatoren wie GEFs und GAPs ermittelt werden, die für konventionelle Rho-GTPase eine essentielle Rolle spielen.

Auch über Effektoren von Wrch1 ist wenig bekannt. Aufgrund der im N-Terminus auftretenden PxxP-Motive kommen außerdem SH3-Domänen beinhaltende Adapterproteine als potentielle Interaktionspartner für Wrch1 in Frage. Die Aufgabe von Adapterproteinen könnte darin liegen, als Bestandteil von Multiprotein-komplexen und Bindung einerseits an den N-Terminus von Wrch1 und andererseits an Bereiche der potentiellen Effektoren eine Wrch1-Effektor-Interaktion erst zu ermöglichen (Abb. 5.1).

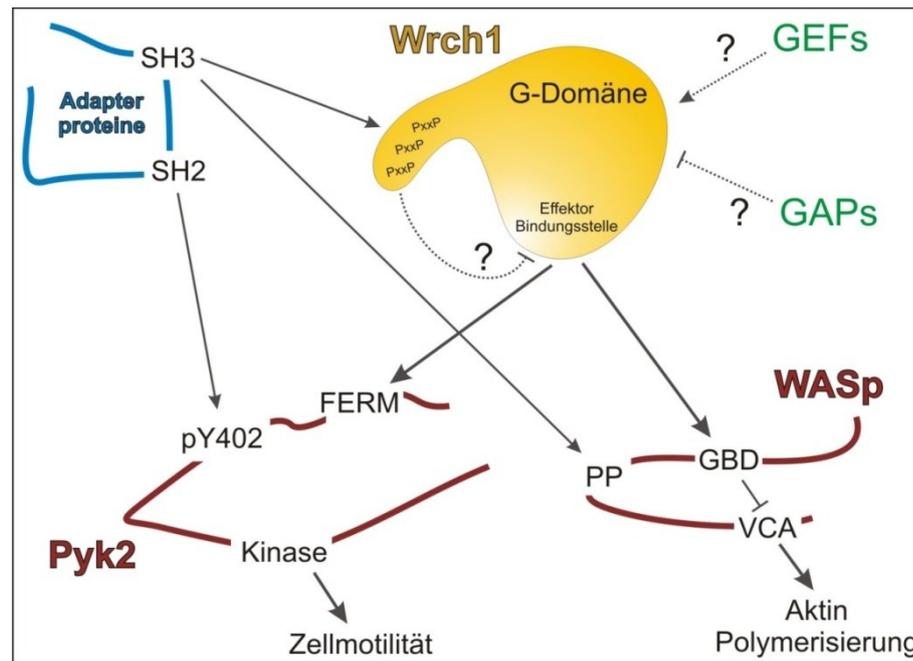


Abbildung 5.1: Übersicht des hypothetischen regulatorischen Mechanismus und der Funktion von Wrch1. Wrch1 scheint durch verschiedene Mechanismen reguliert zu werden. Im Gegensatz zu dem konventionellen GTPase Zyklus, der durch drei Klassen von Regulatorproteinen kontrolliert wird (GDIs, GEFs und GAPs), scheint die Funktion von Wrch1 durch die eigene besondere N-terminale Region, die SH3-Domänen binden kann, reguliert zu werden. SH3- und SH2-Domänen besitzende Adapterproteine könnten eine entscheidende Rolle bei der Wrch1-Effektor-Interaktion spielen, indem sie als Teil des Multiproteinkomplexes fungieren und dadurch die Interaktion von Wrch1 mit Effektoren wie Pyk2 und WASp erst ermöglichen. FERM, *Four-point-one-protein* Ezrin Radixin Moesin; GAP, GTPase aktivierendes Protein; GBD, GTPasen-Bindungsdomäne, GEF, Guanin-nukleotidaustauschfaktor; Kinase, Kinase-Domäne; PP, Prolin-reiche Region; PxxP, P, Prolin und x, eine beliebige Aminosäure; Pyk2, *Proline-rich tyrosine kinase 2*; pY402, phosphoryliertes Tyrosin 402; SH2, *Src homology 2 domain*; SH3, *Src homology 3 domain*; VCA, *Verprolin cofilin-acidic region*; WASp, Wiskott-Aldrich Syndrom Protein; Wrch1, *Wnt-responsive Cdc42 homolog 1*.

Die Betrachtung der einzelnen Domänen bzw. Sequenzbereiche von Wrch1, nämlich der G-Domäne und des N-Terminus, bildet somit den Ausgangspunkt für intramolekulare und intermolekulare Interaktionsstudien, die bei der Einordnung der GTPase Wrch1 in der Signaltransduktion hilfreich sein können.

5.1 Intramolekulare Interaktion von Wrch1

Über intramolekulare Interaktionen der unkonventionellen GTPase Wrch1 ist wenig bekannt. Deswegen sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welche intrinsischen Eigenschaften Wrch1 besitzt und in wie weit es sich von Cdc42, einer konventionellen GTPase aus derselben Gruppe von Rho-GTPasen, unterscheidet. Cdc42 ist (zusammen mit RhoA und Rac1) eines der am besten charakterisierten Rho-Proteine. Des Weiteren sollte der Einfluss des N-Terminus von Wrch1 auf die intrinsischen Eigenschaften der eigenen G-Domäne untersucht werden. Der N-Terminus beinhaltet 46 zusätzliche Aminosäuren, die SH3-Domänen-Bindungsmotive enthalten und scheint autoinhibitorisch auf die G-Domäne zu wirken [Shutes et al., 2004]. Deswegen wurden verschiedene Konstrukte von Wrch1 kloniert, exprimiert und gereinigt, nämlich eines, das nur die G-Domäne enthält (Wrch Δ N Δ C), und ein nur C-terminal verkürztes Konstrukt, das den N-Terminus und die G-Domäne umfasst (Wrch Δ C). Ein drittes Konstrukt wurde verwendet, das nur den N-Terminus enthält (nWrch1). Um intrinsische Eigenschaften von GTPasen zu untersuchen, kann man fluoreszenzmarkierte Nukleotide zur Hilfe nehmen [Ahmadian et al., 2002; Hemsath und Ahmadian, 2005; Jaiswal et al., 2012a]. Dabei ist die Fluoreszenz-Reporter-Gruppe kovalent an die 2'(3')-Hydroxylgruppe der Ribose gebunden. Bei der Bestimmung des für die Interaktionsstudien geeigneten Nukleotids für Wrch1 stellte sich heraus, dass mant-(N-methylantraniloyl) Nukleotide nicht geeignet sind, da keine Fluoreszenzänderung detektiert werden konnte, sowie für Cdc42, bei dem ein Anstieg in der Fluoreszenz deutlich den Nukleotidaustausch von gebundenem GDP zu mantGDP visualisierte (Abb. 4.6). Für Wrch1 wurden andere fluoreszenzmarkierte Nukleotide getestet, wobei bei der Verwendung von tamra- (Tetramethylrhodamin) und Cy3 (Cyanin) der Nukleotidaustausch für Wrch1 und Cdc42 visualisiert werden konnte (Abb. 4.6). Interessanterweise war der Nukleotidaustausch bei Wrch1 schneller im Vergleich zu Cdc42. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass nicht jedes Fluorophor gleichermaßen für alle Rho-GTPasen geeignet ist. Das gleiche gilt für Methoden und Prozesse, wie zum Beispiel die intrinsische und GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse, die unter Verwendung der Fluoreszenz-Reporter-Gruppe tamra, nicht aber mit mant untersucht und visualisiert werden kann [Eberth et al., 2005]. Bei den eben beschriebenen Versuchen handelte es sich um Vorversuche, um die Wahl des Fluorophors zu treffen, das für die Nukleotidassoziation und -dissoziation eingesetzt werden sollte. Für diese Experimente wurde nukleotidfreies Protein eingesetzt und mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden die Assoziation bestimmt.

Dabei stellte sich heraus, dass Wrch1 in nukleotidfreier Form instabil wurde und Konzentrations-unabhängig immer die gleiche Assoziations-Rate besaß. Die Rate für die Dissoziation war außerdem die gleiche wie für die Assoziation. Somit wies nukleotidfreies Wrch1 nur noch eine mäßige Aktivität auf und die intrinsischen Nukleotidbindungseigenschaften konnten nicht bestimmt werden. Wrch1 benötigt ein gebundenes Nukleotid, um seine Aktivität und Stabilität zu erhalten. In den Vorversuchen zur Bestimmung des geeigneten Fluorophors konnte nur qualitativ gezeigt werden, dass der Nukleotidaustausch bei Wrch1 schneller war im Vergleich zu Cdc42, aber nicht quantitativ. Hohe intrinsische Nukleotidaustauschraten konnten aber bereits in der Literatur für Wrch1 beschrieben werden [Saras et al., 2004; Shutes et al., 2004; Aspenstrom et al., 2007]. Rho-GTPasen können aufgrund dieser intrinsischen Eigenschaften in eine von drei Gruppen eingeteilt werden: 1. Konventionelle GTPasen, 2. konventionelle GTPasen mit untypischen Eigenschaften und 3. unkonventionelle GTPasen [Jaiswal et al., 2012c]. Konventionelle GTPasen liegen hauptsächlich in GDP-gebundener inaktiver Form vor, da die Nukleotiddissoziation langsamer ist als die intrinsische GTP-Hydrolyse. Bei GTPasen der zweiten Gruppe ist es genau anders herum, folglich liegen sie in der Zelle, die viel mehr GTP als GDP enthält, in GTP-gebundener Form vor. Unkonventionelle GTPasen besitzen keinen typischen GTPasen-Zyklus. Ihnen fehlen zwei für die GTP-Hydrolyse wichtige Aminosäuren (Glycin12 und Glutamin61 Ras-Nummerierung), wodurch sie in konstitutiv aktiver GTP-gebundener Form vorliegen. Um Wrch1 in eine der drei Gruppen der Rho-Proteine einteilen zu können, wurde die intrinsische GTP-Hydrolyse bestimmt. Hierfür musste das an Wrch1 gebundene GDP gegen GTP ausgetauscht werden. Bei dem Nukleotidaustausch nach John [John et al., 1990] findet dabei erst eine Nukleotidbefreiung statt, bevor es durch Zugabe von (in diesem Fall) GTP, zu einer erneuten Nukleotidbindung kommt. Dies könnte der Grund sein, warum Wrch1 eine fast lineare anstelle einer erwarteten exponentiellen Reaktionsrate für die intrinsische GTP-Hydrolyse aufwies (Abb. 4.8). Um dies zu prüfen, wurde Wrch1 mithilfe der EDTA-Methode ausgetauscht. EDTA komplexiert dabei Mg^{2+} , das für die Stabilität des GTPase-Nukleotid Komplex nötig ist und hebt die Nukleotidbindung auf. Durch gleichzeitige Zugabe eines sehr hohen Überschusses des gewünschten Nukleotids (hier GTP) wird dessen Bindung begünstigt. Die intrinsische GTP-Hydrolyse der G-Domäne von Wrch1 (Wrch Δ N Δ C) wurde nach dem Nukleotidaustausch mit der EDTA-Methode erneut gemessen. Die exponentielle Reaktionsrate ($k_{obs} = 0,063 \text{ min}^{-1}$) spiegelt dabei eine viel schnellere Hydrolysereaktion wieder, verglichen mit Wrch1,

das mittels der enzymatischen Methode nach John ausgetauscht wurde ($k_{\text{obs}} = 0,004 \text{ min}^{-1}$) (Abb. 4.8) und stimmt außerdem mit Werten aus der Literatur überein [Shutes et al., 2004]. Wrch Δ N Δ C konnte zwar mittels enzymatischem Nukleotidaustausch in GTP-gebundener Form erhalten werden, allerdings war damit ein drastischer Verlust der GTP-Hydrolyse-Aktivität verbunden. Der Aktivitätsverlust von Wrch Δ N Δ C während des enzymatischen Nukleotidaustausches könnte mehrere Gründe haben. Zum einen könnte der für die Enzymaktivität nötige Austauschpuffer einen negativen Effekt auf die GTPase-Aktivität haben, zum anderen könnte der nukleotidfreie Zustand *per se* zu einem Aktivitätsverlust von Wrch1 führen. Ein anderer Faktor könnte die Zeit sein. Die Durchführung des Nukleotidaustausches mittels EDTA ist dabei viel schneller als die enzymatische Methode. Um die Daten der intrinsischen GTP-Hydrolyse vergleichen zu können, wurde das Nukleotid von Cdc42 ebenfalls mittels der EDTA-Methode ausgetauscht. Die intrinsische Hydrolysereaktion von Cdc42 war im Vergleich zu Wrch Δ N Δ C ($k_{\text{obs}} = 0,063 \text{ min}^{-1}$) schneller und betrug $0,124 \text{ min}^{-1}$ (Abb. 4.8). In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus keinen Einfluss auf die intrinsische GTP-Hydrolyse von Wrch1 hat. Dafür wurde ein Konstrukt eingesetzt, das den N-Terminus und die G-Domäne beinhaltet (Wrch Δ C). Die erhaltene Reaktionsrate entspricht mit einem Wert von $0,068 \text{ min}^{-1}$ fast dem Wert für die G-Domäne von Wrch1 (Abb. 4.8). Abschließend wurde die intrinsische GTP-Hydrolyse der G-Domäne von Wrch1 (Wrch Δ N Δ C) in Anwesenheit eines 10-fachen molaren Überschusses des N-Terminus (nWrch1) gemessen und auch hier konnte keine Änderung der Reaktionsrate ermittelt werden (Abb. 4.8). Dies verdeutlicht, dass der N-Terminus keine inhibitorische Funktion auf die intrinsische GTP-Hydrolyse von Wrch1 besitzt. Dies stimmt mit der Literatur überein, in der keine inhibitorische Wirkung des N-Terminus auf die GTP-Hydrolyse beschrieben werden konnte [Shutes et al., 2004]. Stattdessen konnte hier ein Effekt des N-Terminus auf die Assoziation von Wrch1 und Interaktionspartnern, wie Effektoren, die mit der G-Domäne interagieren, gezeigt werden.

Die in der Literatur beschriebenen schnellen Austauschraten und die im Verhältnis dazu eher langsame GTP-Hydrolyse unterstützen die Einordnung von Wrch1 in die Gruppe von konventionellen GTPasen mit untypischen Eigenschaften, die in der Zelle überwiegend in aktiver, GTP-gebundener Form vorliegen. In wieweit diese unkonventionelle GTPase reguliert und vor allem inaktiviert wird, bedarf weiterer Untersuchungen.

5.2 Intermolekulare Interaktion von Wrch1 mit Regulatoren, Effektoren und Adaptoren

GAPs

Da Wrch1 aufgrund seiner intrinsischen Eigenschaften wahrscheinlich überwiegend in aktivem, GTP-gebundenen Zustand vorliegt, spielt die Inaktivierung durch GAPs im Vergleich zu den aktivierenden Regulatoren GEFs eine übergeordnete Rolle. Ein Sequenzvergleich zwischen Wrch1 und Cdc42 zeigt dabei, dass Wrch1 prinzipiell durch GAPs reguliert werden könnte. Glycin 12 und Glutamin 61 (Cdc42 Nummerierung), die bei den meisten Ras- und Rho-GTPasen vorkommen und für die GTP-Hydrolyse essentiell sind, sind auch in Wrch1 konserviert (Abb. 1.4). Die große Bedeutung des katalytischen Glutamin 61 liegt dabei in seiner stabilisierenden Funktion eines Wassermoleküls bei der GTP-Hydrolyse. Eine Substitution des Glycins 12 durch eine andere Aminosäure behindert außerdem das Einbringen des für GAPs typischen Arginin-Fingers in die Nukleotidbindungstasche und hemmt somit die katalytische Funktion der GAPs [Rittinger et al., 1997; Scheffzek et al., 1997; Hoffman et al., 1998]. Da für Wrch1 bisher keine Untersuchungen bezüglich der Interaktion mit GAPs vorliegen, wurden verschiedene GTPase aktivierende Proteine untersucht, die mit unterschiedlichen Rho-GTPasen interagieren, wobei meistens nur Informationen über die drei am besten charakterisierten GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 vorliegen. Es wurden dafür sieben verschiedene GAPs getestet: p50GAP, p190, OPHN1, Graf1, DLC1, Abr und MgcRac. Diese GAPs besitzen unterschiedliche Spezifitäten für Rho-GTPasen. Abr und MgcRac katalysieren dabei die Hydrolyse von Cdc42 und Rac1, nicht aber von RhoA [Chuang et al., 1995; Toure et al., 1998; Kawashima et al., 2000]. Abr, das neben der GAP-Funktion auch ein Guaninnukleotidaustauschfaktor ist, beschleunigt den Austausch von GDP zu GTP von RhoA und aktiviert somit diese GTPase [Vaughan et al., 2011]. P50GAP wird auch p50RhoGAP oder Cdc42GAP genannt und stellt, wie diese Namen schon verdeutlichen, ein GTPase aktivierendes Protein für RhoA und Cdc42 dar [Garrett et al., 1989; Barfod et al., 1993; Lancaster et al., 1994; Scheffzek und Ahmadian, 2005]. Graf1, p190 und DLC1 sind spezifische GAPs für RhoA [Ridley et al., 1993; Healy et al., 2008; Kim et al., 2009; Doherty et al., 2011]. Hingegen weist OPHN1 keine Spezifität für nur ein Protein auf, sondern inaktiviert RhoA, Rac1 und Cdc42 gleichermaßen [Billuart et al., 1998; Eberth et al., 2009].

In einem ersten Experiment konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus von Wrch1 keinen Einfluss auf die GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse besaß. Dafür wurden zwei Konstrukte von Wrch1 eingesetzt, von denen eines nur die G-Domäne beinhaltet. Das andere besaß zusätzlich den N-Terminus. Nach einem Nukleotid-austausch mittels der EDTA-Methode zu GTP wurde der Einfluss von p50GAP auf die intrinsische GTP-Hydrolyse getestet (Abb. 4.9). Hierbei zeigte sich, dass p50GAP unabhängig von dem N-Terminus von Wrch1 die GTP-Hydrolyse beschleunigt. Zur quantitativen Bestimmung der GAP-stimulierten Hydrolyse wurde ein GAP-Assay durchgeführt, bei dem alle sieben GTPase aktivierenden Proteine und die G-Domäne von Wrch1 eingesetzt wurden. Die Hydrolyseraten waren nur 10 bis 20-fach höher im Vergleich zur intrinsischen Hydrolyse (Abb. 4.10). Erwartet wurde eine viel höhere Beschleunigung, da GAPs bekannt sind, die die Reaktion um ein Vielfaches beschleunigen können [Boguski und McCormick, 1993; Scheffzek et al., 1998; Bernards, 2003]. Insbesondere waren die Konzentrationen der GAPs 50-fach höher als die von nukleotidfreiem Wrch1. Es könnte hierfür zwei Gründe geben: 1. Die eingesetzten GAPs sind für Wrch1 ineffizient. 2. Das verwendete Wrch1 ist inaktiv. Der zweite Grund scheint wahrscheinlich, da schon in den Messungen der intrinsischen GTP-Hydrolyse (4.2.4) oder der Nukleotidassoziation und dissoziation (4.2.3), in denen auch nukleotidfreies Wrch1 eingesetzt wurde, die Aktivität des Proteins unzureichend war. Deswegen konnten hier keine GAPs identifiziert werden, die eine Spezifität für Wrch1 aufweisen und es wurden aufgrund der mangelnden Aktivität des nukleotidfreien Wrch1 keine weiteren GAPs getestet.

Effektoren

Wrch1 besitzt ähnliche zelluläre Funktionen wie das verwandte Protein Cdc42. Beide Proteine haben Auswirkungen auf das Aktinzytoskelett. Ihre Aktivierung resultiert in der Ausbildung von Filopodien und führt somit zur Zellmotilität [Kozma et al., 1995; Nobes und Hall, 1995; Tao et al., 2001; Saras et al., 2004; Ruusala und Aspenstrom, 2008]. Ein bekannter gemeinsamer Effektor beider GTPasen ist dabei PAK1 [Tao et al., 2001; Arias-Romero und Chernoff, 2008]. Deswegen sollte diese Kinase bei Interaktionsstudien mit beiden Proteinen als Positiv-Kontrolle eingesetzt werden. N-WASp ist einer der prominentesten Effektoren von Cdc42 und gilt wegen seiner Interaktion mit dem Arp2/3-Komplex als Aktivator der Aktinpolymerisation [Miki und Takenawa, 1998; Kim et al., 2000; Hemsath et al., 2005]. Ob N-WASp auch ein Effektor von Wrch1 ist, sollte in dieser Arbeit unter-

sucht werden. Pyk2, das erst kürzlich als Effektor von Wrch1 beschrieben wurde [Ruusala und Aspenstrom, 2008], sollte als drittes Protein untersucht werden. Zudem wurde bisher keine Interaktion zwischen Cdc42 und Pyk2 beschrieben und sollte hier deshalb ebenfalls experimentell untersucht werden.

Die Effektorassoziation sollte mit fluoreszenzspektroskopischen Methoden ermittelt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Fluoreszenz-Reporter-Gruppe mant für Wrch1 ungeeignet war (4.2.1), und wurde hier deswegen auch nicht eingesetzt. Da es sich bei diesen Experimenten um intermolekulare handelt und nicht um intramolekulare Interaktionen, wurden auch hier erst Vorversuche durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl tamra- als auch Cy3-gebundene Nukleotide zur Visualisierung der Effektorassoziation von Wrch1 mit PAK1 genutzt werden können (Abb. 4.16). Somit wurde ein Nukleotidaustausch unter Verwendung eines fluoreszenzmarkierten GTP-Analogen (tamraGppNHp für Wrch1 oder mantGppNHp für Cdc42) durchgeführt. Dieses GTP-Analogen kann nicht von GTPasen hydrolysiert werden, wodurch die Interaktion der GTPase in seiner aktiven Konformation mit Effektoren untersucht werden kann. Es konnten N-WASp (GBD-Domäne) und PAK1 fl als Interaktionspartner für Cdc42 ermittelt werden, wobei die Assoziation mit N-WASp mit einer Rate von $2,047 \text{ s}^{-1}$ schneller war als mit PAK1 ($k_{\text{obs}} = 0,100 \text{ s}^{-1}$). Zwischen Pyk2 (FERM-Domäne) und Cdc42 konnte keine Bindung gemessen werden (Abb. 4.17). Für Wrch1 konnte keine Assoziation mit PAK1 gezeigt werden, obwohl eine Interaktion dieser beiden Proteine aus der Literatur bekannt ist. Zur Kontrolle wurde nukleotidfreies Wrch1 eingesetzt, das unmittelbar vor den Messungen mit tamraGppNHp inkubiert wurde. Keiner der drei Effektoren konnte an Wrch1 binden (Abb. 4.17). Ausgeschlossen werden konnte, dass die Effektorproteine inaktiv sind, da eine Assoziation zumindest für N-WASp und PAK1 an Cdc42 gezeigt werden konnte. Wahrscheinlicher ist, dass Wrch1 in Folge des enzymatischen Nukleotidaustausches inaktiv war. Diese Problematik konnte bereits bei nukleotidfreiem Wrch1 beobachtet werden, das für die Bestimmungen der Nukleotidassoziation und -dissoziation eingesetzt wurde (4.2.3), sowie bei der GAP-stimulierten GTP-Hydrolyse (4.3.1.2). Die Instabilität des Proteins wurde auch deutlich bei der Durchführung einer Affinitätspräzipitation mit GST-gebundenen Effektoren und Wrch1, das in GDP oder GppNHp-gebundener Form eingesetzt wurde. Unabhängig vom nukleotidgebundenen Zustand der GTPase oder der GST-Effektoren konnte Wrch1 immunologisch in allen Proben nachgewiesen werden (Abb. 4.18). Selbst nach Verdopplung der

Anzahl der Waschschr tte konnte in den Negativkontrollen, für die GST oder nur GSH Sepharose *beads* eingesetzt wurden, Wrch1 deutlich mittels eines Wrch1-Antikörpers nachgewiesen werden (Abb. 4.18). Dies legt die Vermutung nahe, dass das Protein präzipitiert war. Für Cdc42 hingegen konnten die fluoreszenzspektroskopischen Ergebnisse bestätigt werden und die Interaktion von aktivem GppNHp-gebundenem Cdc42 mit den beiden Effektoren PAK1 und N-WASp visualisiert werden (Abb. 4.18). Aufgrund der Instabilität des aus *E. coli* gereinigten Proteins war eine inter- und intramolekulare Charakterisierung von Wrch1 schwierig. Deswegen wurde in einem weiteren Schritt in Bezug auf die Effektor-Bindung mit Wrch1 aus eukaryotischen Zellen weitergearbeitet. In einem erneuten Affinit spr zipitationsexperiment konnte dabei deutlich PAK1 als Interaktionspartner von Wrch1 ermittelt werden (Abb 4.19). Zwischen Pyk2 (FERM-Domäne) und Wrch1 konnte dabei keine Interaktion festgestellt werden, allerdings konnte eine schwache Bande für Wrch1 und GST-N-WASp (GBD-Domäne) detektiert werden. In diesem Experiment wurde nur die GBD-Domäne von N-WASp eingesetzt, da dies der Bereich ist, der bekanntermaßen für die Interaktion zwischen Cdc42 und N-WASp verantwortlich ist [Symons et al., 1996]. Eine nur schwache Bindung an Wrch1 könnte bedeuten, dass die GBD-Domäne von N-WASp für eine starke Bindung nicht ausreicht und andere Bereiche oder Aminosäuren von N-WASp an der Interaktion mit Wrch1 beteiligt sind. Denkbar wäre auch, dass neben anderen Sequenzbereichen von N-WASp auch weitere Proteine beteiligt sind und Wrch1 und N-WASp nur in einem Multiproteinkomplex miteinander interagieren, wobei ein Adapterprotein in Frage kommen würde, dass für die Interaktion von Wrch1 und N-WASp wichtig ist. Grb2 beispielsweise ist nötig für die Aktivierung von Ras, indem es Sos, einen Guaninnukleotid austauschfaktor von Ras, zur Membran rekrutiert, an der Ras aktiviert werden kann [Buday und Downward, 1993; Egan et al., 1993]. Die Prolin-reichen Sequenzbereiche sowohl in WASp als auch in Wrch1 könnten Bindungsstellen für solche SH3-Domänen beinhaltenden Adapterproteine sein. Posttranslationale Modifikationen, wie die Palmitoylierung von Wrch1 oder auch Phosphorylierung von Wrch1 oder N-WASp, könnten wesentlichen Einfluss auf ihre Funktionen nehmen. Die Phosphorylierung von N-WASp führt einerseits zu der eigenen Aktivierung und hat andererseits zusammen mit der Bindung von Cdc42 einen synergetischen Effekt auf die Aktivierung des Arp2/3 Komplexes und somit der Aktinpolymerisation [Cory et al., 2002; Sasahara et al., 2002; Suetsugu et al., 2002; Torres und Rosen, 2003]. Die Phosphorylierung von Wrch1 scheint für dessen Lokalisation und Effektor-Bindung

eine wichtige Rolle zu spielen. Dabei hat die Phosphorylierung von Wrch1 einen negativen Effekt auf die Effektor-Bindung und ist für die Lokalisation an Endosomen verantwortlich. Die Aktivierung von Wrch1 hängt dabei von dessen Dephosphorylierung ab, wodurch Wrch1 an die Zellmembran bindet und mit seinem Effektor PAK1 interagiert [Alan et al., 2010]. Somit wäre es denkbar, dass verschiedenen Domänen von N-WASp an einer Interaktion mit Wrch1 beteiligt sind und weitere Proteine dabei eine wichtige Rolle spielen. Posttranslationale Modifikationen könnten für weitere Proteine neue Bindungsstellen bilden, und für die Aktivität und Lokalisation der Proteine bedeutsam sein.

Adaptoren

Adapterproteine sind Signalmoleküle, die spezifisch und selektiv die Interaktion zwischen den an sie gebundenen Proteinen ermöglichen. Häufig bestehen sie nur aus Protein-Bindungsdomänen. Sie besitzen somit keine enzymatische Funktion. Ihre Bedeutung zeichnet sich schon in der Embryonalentwicklung ab, in der das Fehlen und die Fehlfunktion eines einzigen Adapterproteins bereits zur Letalität führen kann, wie beispielsweise für Grb2 und Nck beschrieben wurde [Cheng et al., 1998; Blatt et al., 2003; Giubellino et al., 2008]. Untersucht wurde in dieser Arbeit, ob verschiedene Adapterproteine mit Wrch1 interagieren, das im Unterschied zu anderen GTPasen N-terminal der G-Domäne 46 zusätzliche Aminosäuren besitzt, in denen SH3-Bindungsmotive (PxxP-Motive) enthalten sind. Zuerst wurden SH3-Domänen von Adapterproteinen identifiziert, die mit dem N-Terminus von Wrch1 interagieren. Danach wurde untersucht, welcher Bereich des N-Terminus von Wrch1, der drei PxxP-Motive enthält, für die Interaktion verantwortlich ist. Außerdem wurden die Unterschiede zwischen Wrch1 und Chp in ihrer Fähigkeit, SH3-Domänen zu binden, studiert. Einen letzten Aspekt von Interesse stellte die Untersuchung von *full length* Adapterproteinen und ihrem Bindungsverhalten gegenüber dem N-Terminus von Wrch1 oder Chp dar.

Acht SH3-Domänen von fünf verschiedenen Proteinen wurden untersucht: Die klassischen Adapterproteine Grb2, Nck1, Crk und die SH3-Domänen beinhaltenden Proteine Src und p120. Qualitativ konnten beide SH3-Domänen von Grb2, die mittlere und C-terminale SH3-Domäne von Nck1 und die SH3-Domänen von Crk und Src als Interaktionspartner von Wrch1 nachgewiesen werden (Abb. 4.11). Die N-terminale SH3-Domäne von Nck1 und die SH3-Domäne von p120 zeigten bei dieser Affinitätspräzipitation keine Interaktion mit Wrch1. Durch ITC-Experimente konnten diese Daten quantitativ bestätigt werden. Die Affinitäten

lagen dabei bei Werten zwischen 10,3 – 23,9 μM (Tab. 4.7). Die Interaktion zwischen dem N-Terminus von Wrch1 und den SH3-Domänen können als klassische PxxP-Motiv – SH3-Domänen Interaktion beschrieben werden. 1. Die Proteine bilden einen 1:1 Komplex, wobei die zwei hydrophoben Bindungstaschen der SH3-Domäne, die von aromatischen Aminosäuren umgeben werden, jeweils ein xP Dipeptid des PxxP-Motivs binden. 2. Die Affinitäten im mikromolaren Bereich zwischen Wrch1 und den verschiedenen Adapterproteinen spiegeln für diese Art der Interaktion typische Werte wieder [Mayer, 2001]. Eine Ausnahme stellte dabei p120 dar. Es interagiert mit einer Affinität von 42 μM mit dem N-Terminus von Wrch1 und damit deutlich schlechter als die anderen SH3-Domänen. Die geringe Affinität könnte auch der Grund dafür sein, dass diese Interaktion nicht in der Affinitätspräzipitation nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.11). Zieht man den Sequenzvergleich der SH3-Domänen hinzu (Abb. 4.12), ist p120 die einzige SH3-Domäne, der für die Bindung wichtige aromatische Aminosäuren fehlen. Diese sind durch zwei Leucine ersetzt. Außerdem wurde in der Literatur bereits diskutiert, dass die SH3-Domäne von p120 kein PxxP-Bindungsmotiv darstellt [Duchesne et al., 1993; Pamonsinlapatham et al., 2009], sondern stattdessen auf unbekannte Weise mit Proteinen wie DLC1 [Yang et al., 2009] und Aurora Kinasen [Gigoux et al., 2002] interagiert.

Eine der acht untersuchten SH3-Domänen interagiert nicht mit dem N-Terminus von Wrch1. Die Bindung von der N-terminalen SH3-Domäne von Nck1 konnte weder in den Affinitätspräzipitation- noch den ITC-Experimenten nachgewiesen werden (Abb. 4.11 und Abb. 4.12). Die N-terminale SH3-Domäne von Nck1 besitzt 82% Sequenzidentität mit der N-terminalen SH3-Domäne von Nck2 [Lettau et al., 2009]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass auch diese SH3-Domäne von Nck2 nicht mit Wrch1 interagiert [Saras et al., 2004]. Außerdem konnte durch die NMR-Struktur von der N-terminalen SH3-Domäne von Nck2 im Komplex mit einem PxxDY-Motiv von CD3 ϵ verdeutlicht werden, dass diese nicht mit typischen PxxP-Motiven interagiert [Takeuchi et al., 2008]. Die Bindung an ein PxxDY-Motiv anstelle eines klassischen PxxP-Motivs konnte ein Jahr später auch für die N-terminale SH3-Domäne von Nck1 verifiziert werden [Santiveri et al., 2009]. Somit besitzen die N-terminalen SH3-Domänen der beiden Isoformen Nck1 und Nck2 eine Spezifität für untypische PxxDY- anstatt für klassische PxxP-Motive, wie sie in Wrch1 vorkommen.

Der N-Terminus von Wrch1 beinhaltet drei PxxP-Motive, die für eine Interaktion mit SH3-Domänen in Frage kommen. Deswegen sollte in einem weiteren Schritt untersucht werden, welches dieser drei Motive für die Interaktion mit SH3-Domänen verantwortlich ist. Hierbei konnte nur eine Bindung des mittleren PxxP-Motivs mit den SH3-Domänen von Grb2 (N- und C-terminale SH3-Domäne), Nck1 (mittlere und C-terminale SH3-Domäne), Crk und Src festgestellt werden. Weder das N- noch C-terminale PxxP-Motiv von Wrch1 interagiert mit den verschiedenen SH3-Domänen.

Bemerkenswerterweise zeigte die SH3-Domäne von p120, die mit sehr geringer Affinität mit dem N-Terminus von Wrch1 interagiert, keine Bindung an eins der drei PxxP-Motiv-enthaltenden Peptide von Wrch1. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die SH3-Domäne von p120 nicht an kanonische PxxP-Motive bindet und in einer anderen Weise mit Proteinen interagiert [Kaneko et al., 2008; Pamonsinlapatham et al., 2009].

SH3-Domänen bilden mit ihren Liganden normalerweise einen 1:1 Komplex. Die mittlere SH3-Domäne von Nck1 besaß sowohl mit dem N-Terminus als auch dem mittleren PxxP-Motiv von Wrch1 einen stöchiometrischen Faktor von 3 (Tab. 4.7 und Tab. 4.8). Es konnte keine Interaktion mit dem N- oder C-terminalen PxxP-Motiv von Wrch1 detektiert werden (Abb. 4.14). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass Nck1-2 mit allen drei PxxP-Motiven in einem Verhältnis von 1:3 interagiert. Die beiden Isoformen Nck1 und Nck2 besitzen ähnliche Funktionen und ihre beiden mittleren SH3-Domänen besitzen eine Sequenzidentität von 82 % [Lettau et al., 2009]. Das Cystein 139 innerhalb der mittleren SH3-Domäne von Nck2 ist bekannt dafür, Dimere auszubilden [Hake et al., 2008]. Dieses Cystein ist konserviert in Nck1 und könnte somit gleichermaßen zur Oligomerisation von Nck1 führen. Deswegen wurden Messungen unter Verwendung des Reduktionsmittels TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin) durchgeführt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass TCEP nicht nur die Interaktion zwischen der mittleren SH3-Domäne von Nck1 sondern auch die von Crk und dem N-Terminus von Wrch1 verhindert. Somit scheint TCEP generell eine Interaktion zwischen SH3-Domänen und dem N-Terminus von Wrch1 zu unterbinden und ist für diese ITC-Experimente kein geeignetes Reduktionsmittel.

Eine Bindung zwischen dem mittleren PxxP-Motiv von Wrch1 mit der mittleren SH3-Domäne von Nck2 konnte bereits gezeigt werden, wohingegen keine Inter-

aktion mit dem N- und C-terminale PxxP-Motiv von Wrch1 und dieser SH3-Domäne beobachtet werden konnte [Liu et al., 2006]. Dies steht im Einklang mit anderen Studien, in denen Mutationen im mittleren PxxP-Motiv von Wrch1 einen Verlust der Bindungsfähigkeit mit der N- und C-terminalen SH3-Domäne von Grb2 zur Folge hatte [Zhang et al., 2011]. Zusätzlich zu den beiden hydrophoben Bindungstaschen für die beiden Dipeptide besitzen SH3-Domänen eine dritte, negativ geladene Tasche, die für die Bindung flankierender Aminosäuren des PxxP-Motivs verantwortlich ist [Cesareni et al., 2002]. Vergleicht man die drei PxxP-Motive von Wrch1 miteinander, wird deutlich, dass nur das mittlere PxxP-Motiv eine stark positiv geladene Region besitzt (Abb. 4.14). Das N- und C-terminale PxxP-Motiv beinhalten nur einen positiv geladenen Rest, wohingegen das mittlere PxxP-Motiv C-terminal von drei positiven Aminosäuren umgeben ist. Das Unvermögen des N- und C-terminalen PxxP-Motivs von Wrch1, SH3-Domänen zu binden, kann wahrscheinlich begründet werden durch: 1. Negativ geladene Aminosäuren im N-terminalen Motiv (Asp7 und Asp12 in der -1 bzw. +1 Position des PxxP-Motivs) könnten eine Bindung an die SH3-Domäne, die häufig ebenfalls negativ geladenen Regionen aufweist behindern. 2. Dem C-terminalen Motiv von Wrch1 fehlen eine hydrophobe Aminosäure im PxxP-Motiv (Glu35 anstelle eines Phe oder Val) und eine positiv geladene flankierende Aminosäure in der +2 Position. Somit ähnelt das C-terminale Motiv keiner bekannten Klasse von SH3-Domänen bindenden PxxP-Motiven [Cesareni et al., 2002].

Um festzustellen welche Aminosäuren des mittleren PxxP-Motivs an einer Bindung an SH3-Domänen beteiligt sind, wurden weitere Experimente durchgeführt. Erstens sollte gezeigt werden, welche Proline des PxxP-Motivs für eine Interaktion nötig sind, und zweitens wurde untersucht, inwieweit die flankierenden Aminosäuren an einer Bindung beteiligt sind. Substitutionen eines der inneren Proline zu Alanin des doppelten PxxP-Motivs (PPVPP) hatten dabei keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften (Abb. 4.14 und Tab. 4.8). Dies legt die Vermutung nahe, dass hier ein kompensatorischer Effekt vorliegt, indem nur eins der beiden PxxP-Motive für die Bindung verantwortlich und ausreichend ist. Experimente mit verkürzten Peptiden des mittleren PxxP-Motivs zeigten, dass ein C-terminales Arginin essentiell für die Bindung (+2 Position), hingegen ein anderes Arginin (+4 Position) verzichtbar ist (Abb. 4.14 und Tab. 4.8). Dies verdeutlicht, dass das mittlere PxxP-Motiv nicht nur strukturell, sondern auch funktionell eindeutig zur Klasse II der Liganden von SH3-Domänen gehört, mit einer typischen Konsensussequenz von

Px#PxR (wobei # eine hydrophobe und x eine beliebige Aminosäure darstellt) [Feng et al., 1994; Lim et al., 1994; Mayer und Eck, 1995; Mayer, 2001; Cesareni et al., 2002; Saksela und Permi, 2012].

Chp ähnelt in vielerlei Hinsicht Wrch1 und besitzt N-terminal der G-Domäne Prolin-reiche Sequenzbereiche. Deswegen wurde die Interaktion mit den verschiedenen SH3-Domänen der Adapterproteine untersucht, um sie mit Wrch1 zu vergleichen. Es wurde der N-Terminus von Chp, welches in Ratten exprimiert wird (*rn* Chp) und sich von humanem Chp unterscheidet, eingesetzt. Humanes Chp besitzt ein PxxP-Motiv der Klasse II, welches dem mittleren PxxP-Motiv von Wrch1 ähnelt und C-terminal mehrere Arginine besitzt. *Rn* Chp fehlt hier ein Prolin und dadurch besitzt es kein vollständiges PxxP-Motiv. Somit gibt es deutliche artspezifische Unterschiede. N-terminal befindet sich bei humanem Chp eine Prolin-reiche Region, hingegen bei *rn* Chp ein vollständiges PxxP-Motiv. Diesem fehlen allerdings C- oder N-terminal gelegene Arginine, somit handelt es sich nicht um ein klassisches PxxP-Motiv.

Von den acht eingesetzten SH3-Domänen konnten nur Src und die N-terminale SH3-Domäne von Grb2 mit *rn* Chp interagieren. Die SH3-Domänen von Nck1, Crk und p120 sowie die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 wiesen keine Bindung an *rn* Chp auf (Tab. 4.7). Die Affinitäten waren dabei geringer als bei den Messungen mit Wrch1 (Tab. 4.7). Wrch1 und Src (17,2 μM) besaßen eine fast doppelt so hohe Affinität wie *rn* Chp und Src (29,7 μM). Die Affinität im Falle von Grb2 war sogar um das Vierfache schlechter für *rn* Chp (38,5 μM) im Vergleich zu Wrch1 (10,3 μM). *Rn* Chp interagiert dabei mit den SH3-Domänen in einem Verhältnis von 1:1, somit binden die SH3-Domänen entweder an das N-terminale PxxP-Motiv oder die Prolin-reiche Region, die dem PxxP-Motiv von humanem Chp und dem mittleren PxxP-Motiv von Wrch1 ähneln. Das N-terminale PxxP-Motiv von *rn* Chp ähnelt keinem der bekannten klassischen PxxP-Motive. Ihm fehlen nicht nur flankierende negativ geladene Aminosäuren, sondern es besitzt im Gegenteil N-terminal positiv geladene Aminosäuren und C-terminal unpolare bzw. neutrale Aminosäuren. Es gibt kaum Literatur über die Interaktion zwischen Chp und SH3-Domänen beinhaltenden Adapterproteinen. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass humanes Chp mit der mittleren SH3-Domäne von Nck2 interagiert [Liu et al., 2006]. Dabei ist das PxxP-Motiv von humanem Chp, welches starke Ähnlichkeiten mit dem mittleren PxxP-Motiv von Wrch1 aufweist, für die Bindung verantwortlich. Zieht man nun in Betracht, dass 1. von den drei PxxP-Motiven in Wrch1 nur das mittlere an

einer Bindung mit SH3-Domänen beteiligt ist und dass 2. humanes Chp ähnliche Bindungseigenschaften wie Wrch1 aufweist, dann ist es wahrscheinlicher, dass auch dieser Bereich von *rn* Chp trotz unvollständigem PxxP-Motiv für die Bindung verantwortlich ist und nicht das weiter N-terminal enthaltene untypische PxxP-Motiv. Die anzahlmäßig geringeren und auch schwächeren Interaktionen zwischen *rn* Chp und nur zwei SH3-Domänen zeigen dabei deutlich, dass das fehlende Prolin prinzipiell für eine Interaktion nötig ist. Somit kann davon ausgegangen werden, dass humanes Chp und das in Ratten exprimierte Chp unterschiedliche Interaktionspartner haben.

In einer Affinitätspräzipitation konnten die endogenen Adapterproteine Grb2 und Nck aus Lysaten von HeLa Zellen als Bindungspartner des N-Terminus von Wrch1 identifiziert werden. Endogenes Src, Crk und p120, die in vorangegangenen Experimenten, wie den ITC-Messungen und einer Affinitätspräzipitation mit gereinigten Proteinen, als Interaktionspartner bestimmt werden konnten, wiesen hier keinerlei Bindung auf. Dafür könnte es mehrere Gründe geben: Unter den Rahmenbedingungen bei den ITC-Messungen können die beiden eingesetzten Proteine aneinander binden oder nicht. Dies konnte beispielsweise für die Interaktion zwischen Wrch1 und der mittleren oder C-terminalen SH3-Domäne von Nck1 im Gegensatz zu der nicht bindenden N-terminalen SH3-Domäne von Nck1 gezeigt werden (Abb. 4.12). Die isolierten SH3-Domänen der unterschiedlichen Proteine, die in den ITC-Experimenten eingesetzt wurden, lagen in hoch reiner Form vor und waren in hohen Konzentrationen für eine Interaktion mit dem N-Terminus von Wrch1 verfügbar. Wesentlich ist dabei, dass nur zwei Proteine vorliegen und nicht ein Gemenge aus Proteinen, die um eine Bindung an Wrch1 konkurrieren und dessen Bindungsstelle besetzen. Im Gegensatz dazu zeigt die Affinitätspräzipitation, für die Lysate von HeLa Zellen benutzt wurden, die Bindung von endogenen *full length* Adapterproteinen aus einem Gemisch von allen löslichen Proteinen und Proteinkomplexen dieser eukaryotischen Zellen an Wrch1. Außerdem könnten unter diesen experimentellen Bedingungen nicht alle Bindungspartner für eine Interaktion mit GST-nWrch1 verfügbar sein, weil sie eine enge Bindung mit anderen Proteinen eingehen und somit nicht für andere Bindungspartner zugänglich sind. Des Weiteren könnten Interaktionspartner in inaktivem, möglicherweise autoinhibiertem Zustand vorliegen, wie zum Beispiel bekannt für die Kinase Src [Pawson, 2004]. Um zu überprüfen, ob Src tatsächlich in inaktiver Form vorliegt und somit keine Interaktion mit Wrch1 stattfinden kann, wurden Experimente mit in

COS-7 Zellen transfiziertem c-Src oder v-Src durchgeführt. C-Src kann dabei in inaktiver oder „geschlossener“ Konformation vorliegen, hingegen ist v-Src konstitutiv aktiv und nimmt somit eine „offene“ Konformation ein, aufgrund einer Y527F Mutation. Die mit diesen COS-7 Zellen durchgeführte Affinitätspräzipitation lieferte keine aussagekräftigen Ergebnisse, da sowohl c-Src als auch v-Src nicht nur in den Proben mit GST-nWrch1 sondern auch, wenn gleich in geringerem Maße, in den Kontroll-Experimenten mit GST detektiert werden konnten. Vermuten lässt sich, dass Src durch GST-nWrch1 aus Zelllysaten extrahiert werden kann, wenn die Konzentration von Src durch Überexpression erhöht wird. Möglicherweise ist die Affinitätspräzipitation, wie auch für andere Protein-Protein Interaktionen, keine geeignete Methode, um die Bindung zwischen GST-nWrch1 und Src darzustellen.

Eine Begründung für die Bindung von endogenem Grb2 und Nck aus Zelllysaten an GST-nWrch1 könnte sein, dass diese beiden Proteine, im Gegensatz zu Src und Crk, zwei funktionelle Wrch1-bindende SH3-Domänen besitzen (Abb. 4.12, Tab. 4.7). Dies wurde bestätigt durch ITC-Experimente mit Grb2 und Nck1 *full length* Proteinen, die im Vergleich zu ihren isolierten SH3-Domänen eine deutlich höhere Affinität gegenüber Wrch1 Konstrukten aufwiesen (Tab. 4.9 und Tab. 4.7). Hierbei interagieren zwei Moleküle von Wrch1 über das mittlere PxxP-Motiv mit den beiden SH3-Domänen der *full length* Adapterproteine (Grb2 und Nck1), die somit zwei Bindungsstellen besitzen. Es ist wahrscheinlich, dass die anfänglich lockere Komplexbildung mit zwei Wrch1 Molekülen sekundär vorübergehend eine allosterische Interaktion zwischen den SH3-Domänen der *full length* Adapterproteine hervorruft und dadurch die Affinität der Interaktionen erhöht wird, was als „Avidität“ bezeichnet wird. Dieser Mechanismus kann hoch spezifische Zellantworten hervorrufen, wie zum Beispiel für Signalkaskaden, an denen Wachstumsfaktoren beteiligt sind und Grb2 durch die Bindung von Liganden an beide SH3-Domänen eine Rolle spielt [Zhang et al., 2011]. Ein Mechanismus für Grb2, bei dem Avidität von großer Bedeutung ist, wurde bereits durch Lemmon *et al* für die Interaktion zwischen Grb2 und Sos postuliert, konnte aber nicht mit den verwendeten Prolinreichen Peptiden von Sos gezeigt werden [Lemmon et al., 1994]. Allerdings ist die Bindung beider SH3-Domänen von Grb2 an Zielproteine für eine stabile Komplexbildung und hohe Bindungs-Affinität erforderlich [Cussac et al., 1994; Chook et al., 1996], wobei zwei verschiedene Peptide von Sos durch ihre Bindung an Grb2 die Affinität im Vergleich zu einem einzelnen Peptid von Sos erhöhen [Cussac et al., 1999]. Dadurch konnte für die Interaktion zwischen Grb2 und Sos eine starke

Bindung aufgrund des Mechanismus der Avidität nachgewiesen werden. Avidität konnte auch für die Interaktion zwischen Intersectin und N-WASp beschrieben werden [Kintscher et al., 2010]. Ein Anstieg der Affinität zwischen diesen Proteinen wurde mit steigender Anzahl an SH3-Domänen von Intersectin beobachtet, die mit den vielfach hintereinander vorkommenden PxxP-Motiven der Prolin-reichen Region von N-WASp interagierten. Dabei ist eindeutig die multivalente Bindung für die hohe Affinität verantwortlich, unabhängig davon, welche der fünf SH3-Domänen von Intersectin eingesetzt wurden. Avidität ist auch bei anderen Arten von Interaktionen bekannt, wie zwischen DPF-, WxxF/W, oder FxDxF-Motive beinhaltenden Peptiden. und Proteinen, die an endozytotischen Prozessen beteiligt sind [Praefcke et al., 2004; Zwang und Yarden, 2009]. Ausgeschlossen werden kann, dass das *full length* Konstrukt von Grb2 *per se* mit höherer Affinität mit Bindungspartnern interagiert verglichen mit den isolierten SH3-Domänen, da mit dem Prolin-reichen N-Terminus von Chp nur eine schwache Affinität gemessen werden konnte (Tab. 4.9). Die ermittelte Affinität von 52,9 μM zwischen Grb2 *full length* und Chp ist sogar im Vergleich zu derjenigen zwischen der N-terminalen SH3-Domäne von Grb2 und Chp (38,5 μM) etwas geringer (Tab. 4.7). Eine Interaktion zwischen der C-terminale SH3-Domäne von Grb2 und Chp konnte nicht gemessen werden. Folglich interagieren Chp und Grb2 unter Bildung eines 1:1 Komplexes. Somit kann Avidität bei der Interaktion zwischen Grb2 und Chp keine Rolle spielen, da nur eine Bindungsstelle in Grb2 für Chp vorhanden ist. Die starke Bindung zwischen den Adapterproteinen Grb2 und Nck1 ist somit spezifisch für das mittlere PxxP-Motiv von Wrch1.

Unabhängig voneinander konnte gezeigt werden, dass Wrch1 zum einen mit den Adapterproteinen Grb2 und Nck und zum anderen mit Effektoren wie PAK1 interagiert. In abschließenden Experimenten konnte außerdem gezeigt werden, dass diese vier Proteine Bestandteil eines Multiproteinkomplexes sind (Abb. 4.19 und Abb. 4.20). Somit scheint die simultane Interaktion zwischen Wrch1, den Adaptoren Grb2 und Nck, sowie dem Effektor PAK1 eine physiologische Relevanz zu besitzen und funktionell für die Zellantwort von Bedeutung zu sein. In Abbildung 5.2 ist ein hypothetisches Modell vorgeschlagen, wobei Wrch1 aufgrund von Avidität eine starke Bindung an Grb2 eingeht und nach Aktivierung des Rezeptors zur Membran rekrutiert wird. Wrch1, das aufgrund seiner intrinsischen Nukleotideigenschaften überwiegend in GTP-gebundenem Zustand vorliegt [Saras et al., 2004; Shutes et al., 2004; Aspenstrom et al., 2007], kann dort seinen Effektor

PAK1 aktivieren und somit die Zellantwort hervorrufen. Inwieweit die Bindung von Wrch1 an die Membran durch Palmitoylierung des C-Terminus selbst eine Rolle spielt, bleibt dabei zu untersuchen.

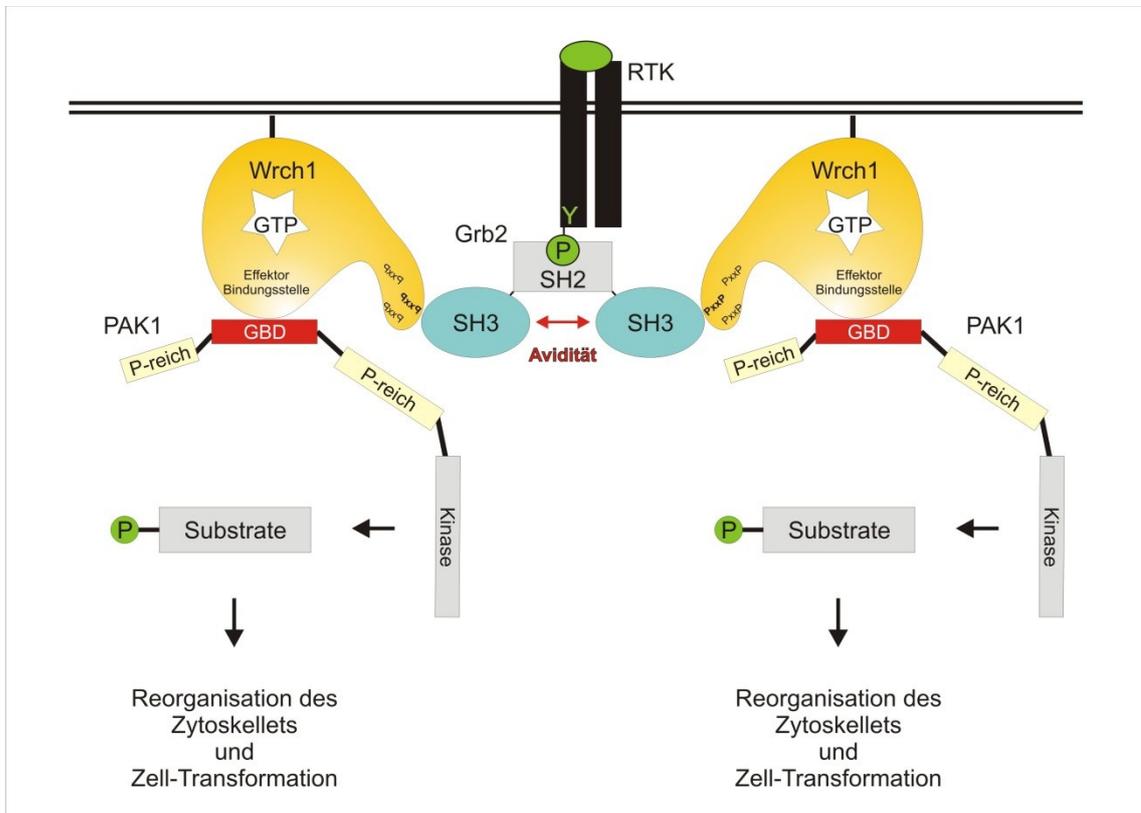


Abbildung 5.2: Möglicher Funktionsmechanismus von Wrch1 vermittelt durch Avidität. Grb2 bindet nach Aktivierung an phosphorylierte Rezeptortyrosinkinasen. Über seine SH3-Domänen kann es mit Wrch1 interagieren, wobei die Bindung an beide SH3-Domänen aufgrund von Avidität die Affinität erhöht. Wrch1 in GTP-gebundener Form kann dann an der Membran den Effektor PAK1 binden, dessen Aktivierung zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts und zur Zell-Transformation führt.

Weitere Experimente legen die Vermutung nahe, dass eine Interaktion zwischen der G-Domäne von Wrch1 und seinen Effektoren indirekt oder nur sehr schwach sein könnte. In Affinitätspräzipitations-Experimenten, in denen nur der N-Terminus von Wrch1 ohne die G-Domäne verwendet wurde, konnten neben den Adaptern Grb2 und Nck auch die Effektoren PAK1 und N-WASp detektiert werden (Abb. 4.11 und Abb. 4.21). Dies würde bedeuten, dass in dem Multiproteinkomplex aus Wrch1, Adaptern und Effektoren keine direkte, oder nur sehr schwache Bindung zwischen der G-Domäne von Wrch1 und der GBD-Domäne der Effektoren besteht. Eine Interaktion würde durch die Adapterproteine Grb2 oder Nck ermöglicht, die durch die Interaktion jeweils einer SH3-Domäne mit Wrch1 und dem Effektor als Bindeglied fungieren und Wrch1 und PAK1/N-WASp in unmittelbare Nähe zueinander bringen (Abb. 5.3). Dies würde auch erklären, warum keine (oder nur sehr

schwache) Interaktion zwischen der GBD-Domäne von N-WASp und Wrch1 gemessen werden konnte (Abb. 4.19). Die Prolin-reiche Region von N-WASp, die für eine Interaktion nötig wäre, fehlte in diesem Experiment, in dem nur die GBD-Domäne von N-WASp eingesetzt wurde.

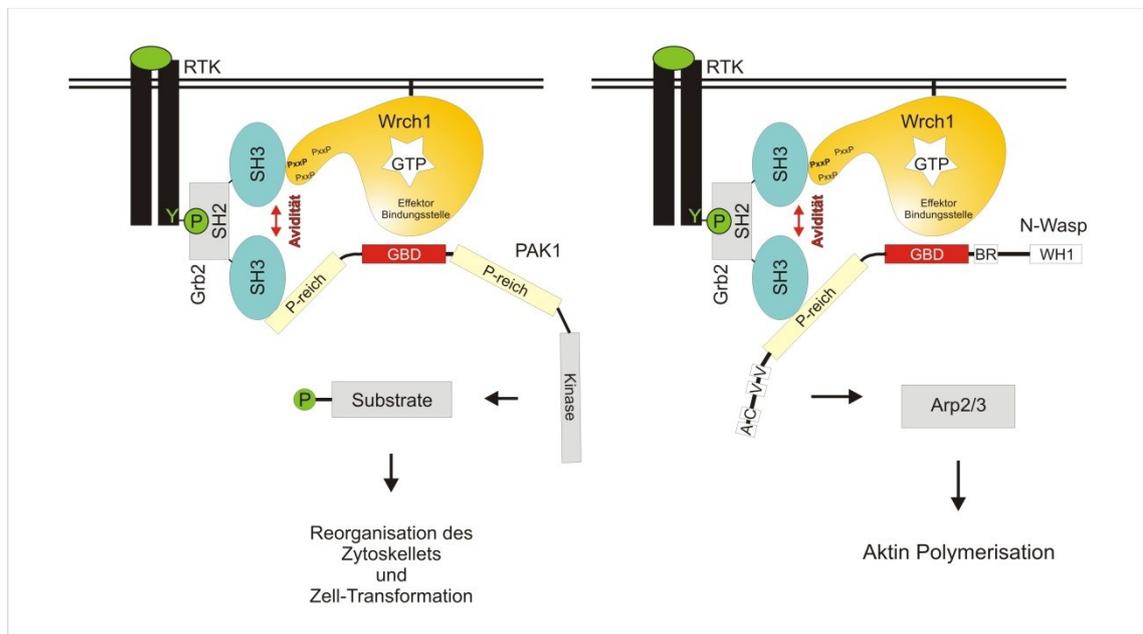


Abbildung 5.3: Möglicher Funktionsmechanismus von Wrch1 mit Grb2 und PAK1 oder WASp. Grb2 bindet nach Aktivierung an phosphorylierte Rezeptortyrosinkinasen. Über seine SH3-Domänen bindet es an Wrch1 und an PAK1 oder N-WASp. Möglicherweise wird auch hier die Bindung an die beiden Proteine verstärkt, indem die multivalente Interaktion des Adapterproteins die Affinität erhöht und zur Avidität führt. Durch die Komplexbildung zwischen den drei Proteinen befinden sich Wrch1 und PAK1/N-WASp in unmittelbarer Nähe, wodurch eine Interaktion dieser beiden Proteine möglich wäre. Die Aktivierung von PAK1/N-WASp führt dann zur Aktin Polymerisation. Die Funktion von Grb2 in diesem Komplex wäre, über die durch Avidität verstärkte Interaktion mit Wrch1 und PAK1/N-WASp, das Bindeglied zwischen dieser GTPase und ihren Effektoren darzustellen.

Dieser Mechanismus, bei dem Adapterproteine als Bindeglied fungieren, könnte wiederum durch Avidität unterstützt werden, indem eine sehr hohe Gesamtaffinität zwischen Adapterprotein und GTPase sowie Adapterprotein und Effektor besteht und dadurch ein sehr stabiler Komplex vorliegt. Ob Wrch1 durch Grb2 zur Membran rekrutiert wird, wie für Sos beschrieben wurde [Buday und Downward, 1993; Egan et al., 1993], oder durch seine Palmitoylierung bereits membrangebunden vorliegt [Berzat et al., 2005], bleibt zu untersuchen. Insbesondere die Interaktion mit N-WASp, das bisher nicht als Effektor von Wrch1 [Aspenstrom et al., 2004] sondern nur von den anderen GTPasen der Cdc42-ähnlichen GTPasen identifiziert werden konnte [Aronheim et al., 1998; Machesky und Insall, 1998; Miki et al., 1998a; Abe et al., 2003], muss in der Zukunft weiterführend untersucht werden. Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Untersuchung des Einflusses des N-Terminus

von Wrch1 auf die Effektorassoziation. Es gibt Hinweise dafür, dass ein autoinhibitorischer Mechanismus negativ auf die Bindung zwischen Effektoren und Wrch1 wirkt [Shutes et al., 2004]. Daher könnte die Bindung von SH3-Domänen an den N-Terminus von Wrch1 dazu beitragen, dass die Autoinhibition aufgehoben wird und Effektoren aktiviert werden können, die durch die Adapterproteine im selben Multiproteinkomplex auftreten. Eine solche Form der Autoinhibition ist außerdem wahrscheinlich, da Wrch1 aufgrund seiner schnellen Nukleotidaustauschrate überwiegend in aktiver Form vorliegt [Aspenstrom et al., 2007] und bisher auch keine anderen inaktivierenden Mechanismen für Wrch1 durch Regulatoren wie GAPs bekannt sind. Die Avidität zwischen den Adaptoren Grb2 oder Nck1 und Wrch1 ist dafür verantwortlich, dass eine hohe Affinität und somit Spezifität zwischen diesen Proteinen vorliegt. Dadurch wird gewährleistet, dass nicht jedes Protein, das eine SH3-Domäne besitzt, die an PxxP-Motive der Klasse II binden kann, mit Wrch1 interagiert. Die Avidität stellt dabei einen wichtigen Mechanismus dar, der für die Signaltransduktion und spezifische Zellantwort essentiell ist. Die Avidität der Interaktion mit Grb2 und Nck ist dabei spezifisch für die Bindung an Wrch1 und weist dadurch ein weiteres Mal darauf hin, dass Wrch1, obgleich Mitglied der Cdc42-ähnlichen GTPasen, eine funktionell und strukturell unkonventionelle GTPase darstellt mit individuellen Eigenschaften, die es in der Zukunft besser zu verstehen gilt.

6 Zusammenfassung

Die untypische GTPase Wrch1/RhoU gehört zu der Gruppe der Cdc42-ähnlichen Guaninnukleotid-bindenden Proteine und ist somit ein Mitglied der Rho-GTPasen, unterscheidet sich jedoch deutlich von anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie. Neben der Guaninnukleotid-bindenden G-Domäne weist Wrch1 N- und C-terminal zusätzliche Aminosäuren auf, die für dessen Funktion von großer Bedeutung sind. Der N-Terminus beinhaltet Prolin-reiche Sequenzbereiche, die bekanntermaßen an SH3-Domänen binden können. Des Weiteren scheint der N-Terminus eine autoinhibitorische Funktion auszuüben, indem er mit der eigenen G-Domäne interagiert. Bisher ist nur wenig über diese GTPase sowie ihre Funktion und Regulation bekannt. Deswegen stand die Charakterisierung intra- und intermolekularer Proteininteraktionen von Wrch1 im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Der Einfluss des N-Terminus auf die intrinsischen Eigenschaften der G-Domäne wurde mittels fluoreszenzspektroskopischer Methoden analysiert. Es stellte sich heraus, dass Wrch1 eine geringe Nukleotidaffinität besaß, wodurch ein Nukleotid-austausch erschwert wurde und größtenteils in inaktivem Protein resultierte. Deswegen konnten weder die Nukleotidassoziation noch die Dissoziation mittels biochemischer Verfahren bestimmt werden. Die intrinsische GTP-Hydrolyse konnte jedoch nach Nukleotidaustausch mittels der EDTA-Methode gemessen werden. Hieraus konnte geschlossen werden, dass die Hydrolyserate von Wrch1 geringer war als bei dem verwandten Protein Cdc42, und dass hierbei der eigene N-Terminus keinen Einfluss auf diese Reaktion hatte.

Um intermolekulare Eigenschaften von Wrch1 besser zu verstehen, wurden bisher wenig charakterisierte Interaktionen mit Effektoren und Adaptoren untersucht. Von den drei möglichen Effektoren PAK1, Pyk2 und N-WASp konnte hierbei nur PAK1 eindeutig als Interaktionspartner von Wrch1 bestimmt werden.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit mittels verschiedener Methoden gezeigt werden, dass die eingesetzten Adapterproteine über ihre SH3-Domänen mit dem N-Terminus von Wrch1, der drei PxxP-Motive enthält, interagieren. Wrch1 bindet *in vitro* an die isolierten SH3-Domänen von Grb2 (N- und C-terminale SH3-Domäne), Nck1 (mittlere und C-terminale SH3-Domäne), Crk1, Src und p120, wobei die Affinitäten der einzelnen Interaktionen als niedrig affin eingestuft werden können. Interessanterweise konnte jedoch nur das mittlere der drei PxxP-Motive von Wrch1 mit den SH3-Domänen interagieren, nicht jedoch das N- oder C-terminale PxxP-

Motiv. Hierbei sind acht Aminosäuren (APPVPPRR) für eine Bindung ausreichend, wobei das mittlere PxxP-Motiv von Wrch1, aufgrund eines für die Bindung essentiellen C-terminalen Arginins, zur Klasse II der an SH3-Domänen bindenden Liganden gezählt werden kann.

Chp, ein Wrch1-verwandtes Protein, das ebenfalls einen Prolin-reichen N-Terminus besitzt, konnte hingegen nur mit der SH3-Domäne von Src und der N-terminalen SH3-Domäne von Grb2 interagieren, nicht aber mit den anderen untersuchten SH3-Domänen von Grb2, Nck1, Crk und p120, die in dieser Arbeit als Bindungspartner von Wrch1 identifiziert wurden. Somit liegen deutliche Unterschiede zwischen den beiden GTPasen Chp und Wrch1, in ihrer Fähigkeit mit Adapterproteinen zu interagieren, vor.

Die isolierten SH3-Domänen von Grb2, Nck1, Src, Crk1, und p120 wiesen in ITC-Messungen und Affinitätspräzipitations-Experimenten eine niedrige Affinität gegenüber ihrem Interaktionspartner Wrch1 auf. Interessanterweise konnte eine starke Bindung zwischen Wrch1 und endogenem Grb2 und Nck, nicht aber Src, Crk1 oder p120, aus Zelllysaten festgestellt werden. Diese hohe Affinität konnte *in vitro* durch ITC-Experimente mit dem N-Terminus von Wrch1 und *full length* Grb2 und Nck1 verifiziert werden. Hierbei wird anscheinend die geringe Affinität der SH3-Domänen durch die hohe Avidität der *full length* Adapterproteine kompensiert, die simultan über beide SH3-Domänen mit Wrch1 interagieren können.

Die Funktion von Wrch1 in der Signaltransduktion scheint somit abhängig zu sein von der Fähigkeit SH3-Domänen zu binden und mit verschiedenen Effektoren in Multiproteinkomplexen zu interagieren, wobei PAK1, Grb2 und Nck als physiologische Interaktionspartner von Wrch1 in Frage kommen.

Summary

The atypical GTPase Wrch1/RhoU belongs to the family of Cdc42-like guanine nucleotide-binding proteins and as such it is a member of the Rho-GTPases. Wrch1 is different from other proteins of this family because it contains beside the G-domain N- and C-terminal extensions important for its cellular function. The N-terminus of Wrch1 contains proline-rich sequences, which are known as SH3 domain-binding motifs. Another function of the N-terminus seems to be the autoinhibition of the G-domain of Wrch1. Up to now, only little is known about this GTPase, its function and regulation. Therefore, the aim of this thesis was to analyse and understand the intra- and intermolecular protein interactions of Wrch1.

The effects of the Wrch1 N-terminus on the intrinsic properties of the G-domain were analysed using fluorescence-based methods. Wrch1 turned out to exhibit a low affinity for the bound nucleotides whereby the nucleotide exchange was hindered. Accordingly, the protein was mostly inactive. Thus, the nucleotide association and dissociation could not be determined. The intrinsic GTP-hydrolysis was measured after nucleotide exchange via the EDTA-method and showed that the rate of hydrolysis of Wrch1 was lower compared to the closely related protein Cdc42. Additionally, it could be shown that the N-terminus of Wrch1 did not affect the intrinsic GTP-hydrolysis.

For a better understanding of the intermolecular properties of Wrch1, its interactions with effectors and adaptors were characterized. Of the three possible effectors, PAK1, Pyk2 and N-WASp, only PAK1 could be clearly determined as a binding partner of Wrch1.

The N-terminus of Wrch1 containing three PxxP motifs interacts with SH3 domains of different adaptor proteins. Here, employing different methods, it could be demonstrated that *in vitro* Wrch1 bound to isolated SH3 domains of Grb2 (N- and C-terminal SH3 domain), Nck1 (middle and C-terminal SH3 domain), Crk1, Src, and p120 where the affinities determined by different measurements revealed rather low-affinity interactions.

Interestingly, it could be shown, that only the central of the three PxxP motifs of Wrch1 is responsible for the interaction with the investigated SH3-domains, and no binding could be detected for the N- or C-terminal PxxP motif of Wrch1. Here, eight amino acids (APPVPPRR) of Wrch1 are sufficient for SH3-binding. The central

PxxP motif of Wrch1 contains an essential C-terminal arginine and thus belongs to the class II of SH3 domain-binding ligands.

Chp, a protein closely related to Wrch1 contains also a proline-rich N-terminus. Interestingly, Chp bound only to the SH3 domain of Src and the N-terminal SH3-domain of Grb2 and not to the other SH3 domains of Grb2, Nck1, Crk1, and p120, which have been identified in this study as Wrch1 binding partners. Thus, there are clear differences between the two GTPases Chp and Wrch1 in their interacting properties regarding adaptor proteins.

Using sedimentation and isothermal titration calorimetric (ITC) measurements isolated SH3 domains of Grb2, Nck1, Src, Crk1, and p120 were identified as low-affinity Wrch1-binding partners. Interestingly, under cell-based conditions nWrch1 bound tightly to endogenous Grb2 and Nck, but not to Crk, Src or p120. Consistent with this, a very tight nWrch1 interaction with full-length Grb2 and Nck1 was confirmed *in vitro* by ITC measurements indicating that high avidity of the adaptor proteins can compensate for the low affinity of their SH3 domains.

Taken together, novel functional insights from this study suggest that multiple upstream signals may converge on Wrch1 directly through its SH3 domain-binding properties and interactions with effectors in multiprotein complexes, where PAK1, Grb2 and Nck can be considered as physiological binding partners of Wrch1.

7 Literaturverzeichnis

- Abe, T., Kato, M., Miki, H., Takenawa, T., and Endo, T. (2003). Small GTPase Tc10 and its homologue RhoT induce N-WASP-mediated long process formation and neurite outgrowth. *J Cell Sci* 116, 155-168.
- Adamson, P., Marshall, C.J., Hall, A., and Tilbrook, P.A. (1992). Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem* 267, 20033-20038.
- Ahmadian, M.R., Hoffmann, U., Goody, R.S., and Wittinghofer, A. (1997). Individual rate constants for the interaction of Ras proteins with GTPase-activating proteins determined by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 36, 4535-4541.
- Ahmadian, M.R., Kiel, C., Stege, P., and Scheffzek, K. (2003). Structural fingerprints of the Ras-GTPase activating proteins neurofibromin and p120GAP. *J Mol Biol* 329, 699-710.
- Ahmadian, M.R., Wittinghofer, A., and Herrmann, C. (2002). Fluorescence methods in the study of small GTP-binding proteins. *Methods Mol Biol* 189, 45-63.
- Alan, J.K., Berzat, A.C., Dewar, B.J., Graves, L.M., and Cox, A.D. (2010). Regulation of the Rho family small GTPase Wrch-1/RhoU by C-terminal tyrosine phosphorylation requires Src. *Mol Cell Biol* 30, 4324-4338.
- Arias-Romero, L.E., and Chernoff, J. (2008). A tale of two Paks. *Biol Cell* 100, 97-108.
- Arold, S., O'Brien, R., Franken, P., Strub, M.P., Hoh, F., Dumas, C., and Ladbury, J.E. (1998). RT loop flexibility enhances the specificity of Src family SH3 domains for HIV-1 Nef. *Biochemistry* 37, 14683-14691.
- Aronheim, A., Broder, Y.C., Cohen, A., Fritsch, A., Belisle, B., and Abo, A. (1998). Chp, a homologue of the GTPase Cdc42Hs, activates the JNK pathway and is implicated in reorganizing the actin cytoskeleton. *Curr Biol* 8, 1125-1128.
- Aspenstrom, P., Fransson, A., and Saras, J. (2004). Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* 377, 327-337.
- Aspenstrom, P., Ruusala, A., and Pacholsky, D. (2007). Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases. *Exp Cell Res* 313, 3673-3679.
- Avraham, H., Park, S.Y., Schinkmann, K., and Avraham, S. (2000). RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling. *Cell Signal* 12, 123-133.
- Badour, K., Zhang, J., Shi, F., Leng, Y., Collins, M., and Siminovitch, K.A. (2004). Fyn and PTP-PEST-mediated regulation of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) tyrosine phosphorylation is required for coupling T cell antigen receptor engagement to WASp effector function and T cell activation. *J Exp Med* 199, 99-112.
- Banin, S., Truong, O., Katz, D.R., Waterfield, M.D., Brickell, P.M., and Gout, I. (1996). Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) is a binding partner for c-Src family protein-tyrosine kinases. *Curr Biol* 6, 981-988.
- Barbacid, M. (1987). ras genes. *Annu Rev Biochem* 56, 779-827.
- Barfod, E.T., Zheng, Y., Kuang, W.J., Hart, M.J., Evans, T., Cerione, R.A., and Ashkenazi, A. (1993). Cloning and expression of a human CDC42 GTPase-activating protein reveals a functional SH3-binding domain. *J Biol Chem* 268, 26059-26062.
- Beeser, A., Jaffer, Z.M., Hofmann, C., and Chernoff, J. (2005). Role of group A p21-activated kinases in activation of extracellular-regulated kinase by growth factors. *J Biol Chem* 280, 36609-36615.
- Benitah, S.A., Valeron, P.F., van Aelst, L., Marshall, C.J., and Lacal, J.C. (2004). Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta* 1705, 121-132.
- Benner, G.E., Dennis, P.B., and Masaracchia, R.A. (1995). Activation of an S6/H4 kinase (PAK 65) from human placenta by intramolecular and intermolecular autophosphorylation. *J Biol Chem* 270, 21121-21128.

- Bernards, A. (2003). GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochim Biophys Acta* 1603, 47-82.
- Bernards, A., and Settleman, J. (2004). GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol* 14, 377-385.
- Berzat, A.C., Buss, J.E., Chenette, E.J., Weinbaum, C.A., Shutes, A., Der, C.J., Minden, A., and Cox, A.D. (2005). Transforming activity of the Rho family GTPase, Wrch-1, a Wnt-regulated Cdc42 homolog, is dependent on a novel carboxyl-terminal palmitoylation motif. *J Biol Chem* 280, 33055-33065.
- Bhavsar, P.J., Infante, E., Khwaja, A., and Ridley, A.J. (2012). Analysis of Rho GTPase expression in T-ALL identifies RhoU as a target for Notch involved in T-ALL cell migration. *Oncogene*.
- Billuart, P., Biennu, T., Ronce, N., des Portes, V., Vinet, M.C., Zemni, R., Roest Crollius, H., Carrie, A., Fauchereau, F., Cherry, M., *et al.* (1998). Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature* 392, 923-926.
- Birnboim, H.C. (1992). Extraction of high molecular weight RNA and DNA from cultured mammalian cells. *Methods Enzymol* 216, 154-160.
- Bishop, A.L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2, 241-255.
- Bjorge, J.D., Pang, A., and Fujita, D.J. (2000). Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines. *J Biol Chem* 275, 41439-41446.
- Bladt, F., Aippersbach, E., Gelkop, S., Strasser, G.A., Nash, P., Tafuri, A., Gertler, F.B., and Pawson, T. (2003). The murine Nck SH2/SH3 adaptors are important for the development of mesoderm-derived embryonic structures and for regulating the cellular actin network. *Mol Cell Biol* 23, 4586-4597.
- Boettner, B., and Van Aelst, L. (2002). The role of Rho GTPases in disease development. *Gene* 286, 155-174.
- Boguski, M.S., and McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366, 643-654.
- Bokoch, G.M. (2003). Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem* 72, 743-781.
- Bokoch, G.M., Wang, Y., Bohl, B.P., Sells, M.A., Quilliam, L.A., and Knaus, U.G. (1996). Interaction of the Nck adapter protein with p21-activated kinase (PAK1). *J Biol Chem* 271, 25746-25749.
- Boon, L.M., Mulliken, J.B., and Vikkula, M. (2005). RASA1: variable phenotype with capillary and arteriovenous malformations. *Curr Opin Genet Dev* 15, 265-269.
- Bos, J.L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49, 4682-4689.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117-127.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brady, D.C., Alan, J.K., Madigan, J.P., Fanning, A.S., and Cox, A.D. (2009). The transforming Rho family GTPase Wrch-1 disrupts epithelial cell tight junctions and epithelial morphogenesis. *Mol Cell Biol* 29, 1035-1049.
- Brazier, H., Stephens, S., Ory, S., Fort, P., Morrison, N., and Blangy, A. (2006). Expression profile of RhoGTPases and RhoGEFs during RANKL-stimulated osteoclastogenesis: identification of essential genes in osteoclasts. *J Bone Miner Res* 21, 1387-1398.

- Bryant, S.S., Briggs, S., Smithgall, T.E., Martin, G.A., McCormick, F., Chang, J.H., Parsons, S.J., and Jove, R. (1995). Two SH2 domains of p120 Ras GTPase-activating protein bind synergistically to tyrosine phosphorylated p190 Rho GTPase-activating protein. *J Biol Chem* 270, 17947-17952.
- Buday, L. (1999). Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins. *Biochim Biophys Acta* 1422, 187-204.
- Buday, L., and Downward, J. (1993). Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73, 611-620.
- Buday, L., and Downward, J. (2008). Many faces of Ras activation. *Biochim Biophys Acta* 1786, 178-187.
- Buday, L., Khwaja, A., Sipeki, S., Farago, A., and Downward, J. (1996). Interactions of Cbl with two adapter proteins, Grb2 and Crk, upon T cell activation. *J Biol Chem* 271, 6159-6163.
- Buday, L., Wunderlich, L., and Tamas, P. (2002a). The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal* 14, 723-731.
- Buday, L., Wunderlich, L., and Tamas, P. (2002b). The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal* 14, 723-731.
- Bunnell, S.C., Henry, P.A., Kolluri, R., Kirchhausen, T., Rickles, R.J., and Berg, L.J. (1996). Identification of Itk/Tsk Src homology 3 domain ligands. *J Biol Chem* 271, 25646-25656.
- Bustelo, X.R., Sauzeau, V., and Berenjano, I.M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* 29, 356-370.
- Campellone, K.G., Webb, N.J., Znameroski, E.A., and Welch, M.D. (2008). WHAMM is an Arp2/3 complex activator that binds microtubules and functions in ER to Golgi transport. *Cell* 134, 148-161.
- Carlier, M.F., Nioche, P., Broutin-L'Hermite, I., Boujemaa, R., Le Clainche, C., Egile, C., Garbay, C., Ducruix, A., Sansonetti, P., and Pantaloni, D. (2000). GRB2 links signaling to actin assembly by enhancing interaction of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASp) with actin-related protein (ARP2/3) complex. *J Biol Chem* 275, 21946-21952.
- Casey, P.J., Thissen, J.A., and Moomaw, J.F. (1991). Enzymatic modification of proteins with a geranylgeranyl isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8631-8635.
- Cerione, R.A., and Zheng, Y. (1996). The Dbl family of oncogenes. *Curr Opin Cell Biol* 8, 216-222.
- Cesareni, G., Panni, S., Nardelli, G., and Castagnoli, L. (2002). Can we infer peptide recognition specificity mediated by SH3 domains? *FEBS Lett* 513, 38-44.
- Chardin, P. (2003). GTPase regulation: getting aRnd Rock and Rho inhibition. *Curr Biol* 13, R702-704.
- Chaudhary, A., King, W.G., Mattaliano, M.D., Frost, J.A., Diaz, B., Morrison, D.K., Cobb, M.H., Marshall, M.S., and Brugge, J.S. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. *Curr Biol* 10, 551-554.
- Cheadle, C., Ivashchenko, Y., South, V., Searfoss, G.H., French, S., Howk, R., Ricca, G.A., and Jaye, M. (1994). Identification of a Src SH3 domain binding motif by screening a random phage display library. *J Biol Chem* 269, 24034-24039.
- Chen, M., She, H., Kim, A., Woodley, D.T., and Li, W. (2000). Nckbeta adapter regulates actin polymerization in NIH 3T3 fibroblasts in response to platelet-derived growth factor bb. *Mol Cell Biol* 20, 7867-7880.

- Chenette, E.J., Abo, A., and Der, C.J. (2005). Critical and distinct roles of amino- and carboxyl-terminal sequences in regulation of the biological activity of the Chp atypical Rho GTPase. *J Biol Chem* 280, 13784-13792.
- Chenette, E.J., Mitin, N.Y., and Der, C.J. (2006). Multiple sequence elements facilitate Chp Rho GTPase subcellular location, membrane association, and transforming activity. *Mol Biol Cell* 17, 3108-3121.
- Cheng, A.M., Saxton, T.M., Sakai, R., Kulkarni, S., Mbamalu, G., Vogel, W., Tortorice, C.G., Cardiff, R.D., Cross, J.C., Muller, W.J., *et al.* (1998). Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. *Cell* 95, 793-803.
- Chook, Y.M., Gish, G.D., Kay, C.M., Pai, E.F., and Pawson, T. (1996). The Grb2-mSos1 complex binds phosphopeptides with higher affinity than Grb2. *J Biol Chem* 271, 30472-30478.
- Chou, H.C., Anton, I.M., Holt, M.R., Curcio, C., Lanzardo, S., Worth, A., Burns, S., Thrasher, A.J., Jones, G.E., and Calle, Y. (2006). WIP regulates the stability and localization of WASP to podosomes in migrating dendritic cells. *Curr Biol* 16, 2337-2344.
- Choudhury, G.G., Marra, F., and Abboud, H.E. (1996). Thrombin stimulates association of src homology domain containing adaptor protein Nck with pp125FAK. *Am J Physiol* 270, F295-300.
- Chuang, T.H., Xu, X., Kaartinen, V., Heisterkamp, N., Groffen, J., and Bokoch, G.M. (1995). Abr and Bcr are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10282-10286.
- Chuang, Y.Y., Valster, A., Coniglio, S.J., Backer, J.M., and Symons, M. (2007). The atypical Rho family GTPase Wrch-1 regulates focal adhesion formation and cell migration. *J Cell Sci* 120, 1927-1934.
- Clark, S.G., Stern, M.J., and Horvitz, H.R. (1992). *C. elegans* cell-signalling gene sem-5 encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature* 356, 340-344.
- Colicelli, J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* 2004, RE13.
- Compton, S.J., and Jones, C.G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 151, 369-374.
- Cooper, J.A., Gould, K.L., Cartwright, C.A., and Hunter, T. (1986). Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science* 231, 1431-1434.
- Cory, G.O., Garg, R., Cramer, R., and Ridley, A.J. (2002). Phosphorylation of tyrosine 291 enhances the ability of WASp to stimulate actin polymerization and filopodium formation. Wiskott-Aldrich Syndrome protein. *J Biol Chem* 277, 45115-45121.
- Cox, A.D., and Der, C.J. (2002). Farnesyltransferase inhibitors: promises and realities. *Curr Opin Pharmacol* 2, 388-393.
- Cussac, D., Frech, M., and Chardin, P. (1994). Binding of the Grb2 SH2 domain to phosphotyrosine motifs does not change the affinity of its SH3 domains for Sos proline-rich motifs. *Embo J* 13, 4011-4021.
- Cussac, D., Vidal, M., Leprince, C., Liu, W.Q., Cornille, F., Tiraboschi, G., Roques, B.P., and Garbay, C. (1999). A Sos-derived peptidimer blocks the Ras signaling pathway by binding both Grb2 SH3 domains and displays antiproliferative activity. *Faseb J* 13, 31-38.
- Daigo, Y., Takayama, I., Ponder, B.A., Caldas, C., Ward, S.M., Sanders, K.M., and Fujino, M.A. (2004). Novel human, mouse and xenopus genes encoding a member of the RAS superfamily of low-molecular-weight GTP-binding proteins and its downregulation in WWV mouse jejunum. *J Gastroenterol Hepatol* 19, 211-217.

- Daly, R.J., Binder, M.D., and Sutherland, R.L. (1994). Overexpression of the Grb2 gene in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 9, 2723-2727.
- de la Fuente, M.A., Sasahara, Y., Calamito, M., Anton, I.M., Elkhail, A., Gallego, M.D., Suresh, K., Siminovitch, K., Ochs, H.D., Anderson, K.C., *et al.* (2007). WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 926-931.
- DerMardirossian, C., and Bokoch, G.M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* 15, 356-363.
- Derry, J.M., Ochs, H.D., and Francke, U. (1994). Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 78, 635-644.
- Dharmawardana, P.G., Peruzzi, B., Giubellino, A., Burke, T.R., Jr., and Bottaro, D.P. (2006). Molecular targeting of growth factor receptor-bound 2 (Grb2) as an anti-cancer strategy. *Anticancer Drugs* 17, 13-20.
- Dikic, I., Tokiwa, G., Lev, S., Courtneidge, S.A., and Schlessinger, J. (1996). A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* 383, 547-550.
- Doherty, J.T., Lenhart, K.C., Cameron, M.V., Mack, C.P., Conlon, F.L., and Taylor, J.M. (2011). Skeletal muscle differentiation and fusion are regulated by the BAR-containing Rho-GTPase-activating protein (Rho-GAP), GRAF1. *J Biol Chem* 286, 25903-25921.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 11-22.
- Drugan, J.K., Rogers-Graham, K., Gilmer, T., Campbell, S., and Clark, G.J. (2000). The Ras/p120 GTPase-activating protein (GAP) interaction is regulated by the p120 GAP pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 275, 35021-35027.
- Duchesne, M., Schweighoffer, F., Parker, F., Clerc, F., Frobert, Y., Thang, M.N., and Tocque, B. (1993). Identification of the SH3 domain of GAP as an essential sequence for Ras-GAP-mediated signaling. *Science* 259, 525-528.
- Dutartre, H., Davoust, J., Gorvel, J.P., and Chavrier, P. (1996). Cytokinesis arrest and redistribution of actin-cytoskeleton regulatory components in cells expressing the Rho GTPase CDC42Hs. *J Cell Sci* 109 (Pt 2), 367-377.
- Dutta, K., Shi, H., Cruz-Chu, E.R., Kami, K., and Ghose, R. (2004). Dynamic influences on a high-affinity, high-specificity interaction involving the C-terminal SH3 domain of p67phox. *Biochemistry* 43, 8094-8106.
- Eberth, A., Dvorsky, R., Becker, C.F., Beste, A., Goody, R.S., and Ahmadian, M.R. (2005). Monitoring the real-time kinetics of the hydrolysis reaction of guanine nucleotide-binding proteins. *Biol Chem* 386, 1105-1114.
- Eberth, A., Lundmark, R., Gremer, L., Dvorsky, R., Koessmeier, K.T., McMahon, H.T., and Ahmadian, M.R. (2009). A BAR domain-mediated autoinhibitory mechanism for RhoGAPs of the GRAF family. *Biochem J* 417, 371-377.
- Eblen, S.T., Slack, J.K., Weber, M.J., and Catling, A.D. (2002). Rac-PAK signaling stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation by regulating formation of MEK1-ERK complexes. *Mol Cell Biol* 22, 6023-6033.
- Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M., and Gill, G.N. (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* 1, 253-259.
- Eerola, I., Boon, L.M., Mulliken, J.B., Burrows, P.E., Domp Martin, A., Watanabe, S., Vanwijck, R., and Viskula, M. (2003). Capillary malformation-arteriovenous malformation, a new clinical and genetic disorder caused by RASA1 mutations. *Am J Hum Genet* 73, 1240-1249.

- Egan, S.E., Giddings, B.W., Brooks, M.W., Buday, L., Sizeland, A.M., and Weinberg, R.A. (1993). Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* **363**, 45-51.
- Ehresmann, B., Imbault, P., and Weil, J.H. (1973). Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. *Anal Biochem* **54**, 454-463.
- Ellenbroek, S.I., and Collard, J.G. (2007). Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin Exp Metastasis* **24**, 657-672.
- Ellis, C., Measday, V., and Moran, M.F. (1995). Phosphorylation-dependent complexes of p120 Ras-specific GTPase-activating protein with p62 and p190. *Methods Enzymol* **255**, 179-192.
- Ellis, C., Moran, M., McCormick, F., and Pawson, T. (1990). Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature* **343**, 377-381.
- Endo, M., and Yamashita, T. (2009). Inactivation of Ras by p120GAP via focal adhesion kinase dephosphorylation mediates RGMa-induced growth cone collapse. *J Neurosci* **29**, 6649-6662.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635.
- Fazi, B., Cope, M.J., Douangamath, A., Ferracuti, S., Schirwitz, K., Zucconi, A., Drubin, D.G., Wilmanns, M., Cesareni, G., and Castagnoli, L. (2002). Unusual binding properties of the SH3 domain of the yeast actin-binding protein Abp1: structural and functional analysis. *J Biol Chem* **277**, 5290-5298.
- Feller, S.M. (2001). Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene* **20**, 6348-6371.
- Feller, S.M., Ren, R., Hanafusa, H., and Baltimore, D. (1994). SH2 and SH3 domains as molecular adhesives: the interactions of Crk and Abl. *Trends Biochem Sci* **19**, 453-458.
- Feng, S., Chen, J.K., Yu, H., Simon, J.A., and Schreiber, S.L. (1994). Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science* **266**, 1241-1247.
- Fiegen, D., Blumenstein, L., Stege, P., Vetter, I.R., and Ahmadian, M.R. (2002). Crystal structure of Rnd3/RhoE: functional implications. *FEBS Lett* **525**, 100-104.
- Finan, P.M., Soames, C.J., Wilson, L., Nelson, D.L., Stewart, D.M., Truong, O., Hsuan, J.J., and Kellie, S. (1996). Identification of regions of the Wiskott-Aldrich syndrome protein responsible for association with selected Src homology 3 domains. *J Biol Chem* **271**, 26291-26295.
- Frame, M.C. (2004). Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it. *J Cell Sci* **117**, 989-998.
- Frost, J.A., Steen, H., Shapiro, P., Lewis, T., Ahn, N., Shaw, P.E., and Cobb, M.H. (1997). Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. *Embo J* **16**, 6426-6438.
- Fukuoka, M., Miki, H., and Takenawa, T. (1997). Identification of N-WASP homologs in human and rat brain. *Gene* **196**, 43-48.
- Fukuoka, M., Suetsugu, S., Miki, H., Fukami, K., Endo, T., and Takenawa, T. (2001). A novel neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) binding protein, WISH, induces Arp2/3 complex activation independent of Cdc42. *J Cell Biol* **152**, 471-482.
- Gale, N.W., Kaplan, S., Lowenstein, E.J., Schlessinger, J., and Bar-Sagi, D. (1993). Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras. *Nature* **363**, 88-92.

- Galisteo, M.L., Chernoff, J., Su, Y.C., Skolnik, E.Y., and Schlessinger, J. (1996). The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine-threonine kinase Pak1. *J Biol Chem* 271, 20997-21000.
- Garavini, H., Riento, K., Phelan, J.P., McAlister, M.S., Ridley, A.J., and Keep, N.H. (2002). Crystal structure of the core domain of RhoE/Rnd3: a constitutively activated small G protein. *Biochemistry* 41, 6303-6310.
- Garcia-Mata, R., Boulter, E., and Burridge, K. (2011). The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 493-504.
- Garrett, M.D., Self, A.J., van Oers, C., and Hall, A. (1989). Identification of distinct cytoplasmic targets for ras/R-ras and rho regulatory proteins. *J Biol Chem* 264, 10-13.
- Gatti, A., Huang, Z., Tuazon, P.T., and Traugh, J.A. (1999). Multisite autophosphorylation of p21-activated protein kinase gamma-PAK as a function of activation. *J Biol Chem* 274, 8022-8028.
- Geyer, M., and Wittinghofer, A. (1997). GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* 7, 786-792.
- Ghose, R., Shekhtman, A., Goger, M.J., Ji, H., and Cowburn, D. (2001). A novel, specific interaction involving the Csk SH3 domain and its natural ligand. *Nat Struct Biol* 8, 998-1004.
- Gigoux, V., L'Hoste, S., Raynaud, F., Camonis, J., and Garbay, C. (2002). Identification of Aurora kinases as RasGAP Src homology 3 domain-binding proteins. *J Biol Chem* 277, 23742-23746.
- Giubellino, A., Burke, T.R., Jr., and Bottaro, D.P. (2008). Grb2 signaling in cell motility and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 12, 1021-1033.
- Goicoechea, S.M., Tu, Y., Hua, Y., Chen, K., Shen, T.L., Guan, J.L., and Wu, C. (2002). Nck-2 interacts with focal adhesion kinase and modulates cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 791-805.
- Goody, R.S., and Hofmann-Goody, W. (2002). Exchange factors, effectors, GAPs and motor proteins: common thermodynamic and kinetic principles for different functions. *Eur Biophys J* 31, 268-274.
- Gosser, Y.Q., Nomanbhoy, T.K., Aghazadeh, B., Manor, D., Combs, C., Cerione, R.A., and Rosen, M.K. (1997). C-terminal binding domain of Rho GDP-dissociation inhibitor directs N-terminal inhibitory peptide to GTPases. *Nature* 387, 814-819.
- Gotoh, T., Hattori, S., Nakamura, S., Kitayama, H., Noda, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Matsui, H., Hatase, O., Takahashi, H., *et al.* (1995). Identification of Rap1 as a target for the Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor C3G. *Mol Cell Biol* 15, 6746-6753.
- 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 aluminum fluoride. *Biochemistry* 38, 985-991.
- Grizot, S., Faure, J., Fieschi, F., Vignais, P.V., Dagher, M.C., and Pebay-Peyroula, E. (2001). Crystal structure of the Rac1-RhoGDI complex involved in nadph oxidase activation. *Biochemistry* 40, 10007-10013.
- Gutierrez, L., Magee, A.I., Marshall, C.J., and Hancock, J.F. (1989). Post-translational processing of p21ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis. *Embo J* 8, 1093-1098.
- Hake, M.J., Choowongkamon, K., Kostenko, O., Carlin, C.R., and Sonnichsen, F.D. (2008). Specificity determinants of a novel Nck interaction with the juxtamembrane domain of the epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 47, 3096-3108.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.

- Hancock, J.F., Cadwallader, K., and Marshall, C.J. (1991). Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21K-ras(B). *Embo J* 10, 641-646.
- Harkiolaki, M., Lewitzky, M., Gilbert, R.J., Jones, E.Y., Bourette, R.P., Mouchiroud, G., Sondermann, H., Moarefi, I., and Feller, S.M. (2003). Structural basis for SH3 domain-mediated high-affinity binding between Mona/Gads and SLP-76. *Embo J* 22, 2571-2582.
- 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. *J Biol Chem* 269, 62-65.
- Harte, M.T., Hildebrand, J.D., Burnham, M.R., Bouton, A.H., and Parsons, J.T. (1996). p130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 271, 13649-13655.
- Hasegawa, H., Kiyokawa, E., Tanaka, S., Nagashima, K., Gotoh, N., Shibuya, M., Kurata, T., and Matsuda, M. (1996). DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane. *Mol Cell Biol* 16, 1770-1776.
- Healy, K.D., Hodgson, L., Kim, T.Y., Shutes, A., Maddileti, S., Juliano, R.L., Hahn, K.M., Harden, T.K., Bang, Y.J., and Der, C.J. (2008). DLC-1 suppresses non-small cell lung cancer growth and invasion by RhoGAP-dependent and independent mechanisms. *Mol Carcinog* 47, 326-337.
- Hemsath, L., and Ahmadian, M.R. (2005). Fluorescence approaches for monitoring interactions of Rho GTPases with nucleotides, regulators, and effectors. *Methods* 37, 173-182.
- Hemsath, L., Dvorsky, R., Fiegen, D., Carlier, M.F., and Ahmadian, M.R. (2005). An electrostatic steering mechanism of Cdc42 recognition by Wiskott-Aldrich syndrome proteins. *Mol Cell* 20, 313-324.
- Herrmann, C. (2003). Ras-effector interactions: after one decade. *Curr Opin Struct Biol* 13, 122-129.
- Hiipakka, M., and Saksela, K. (2007). Versatile retargeting of SH3 domain binding by modification of non-conserved loop residues. *FEBS Lett* 581, 1735-1741.
- Hildebrand, J.D., Taylor, J.M., and Parsons, J.T. (1996). An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* 16, 3169-3178.
- Hoffman, G.R., Nassar, N., and Cerione, R.A. (2000). Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell* 100, 345-356.
- Hoffman, G.R., Nassar, N., Oswald, R.E., and Cerione, R.A. (1998). Fluoride activation of the Rho family GTP-binding protein Cdc42Hs. *J Biol Chem* 273, 4392-4399.
- Hofmann, C., Shepelev, M., and Chernoff, J. (2004). The genetics of Pak. *J Cell Sci* 117, 4343-4354.
- Howe, A.K., and Juliano, R.L. (2000). Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase. *Nat Cell Biol* 2, 593-600.
- Hu, Q., Milfay, D., and Williams, L.T. (1995). Binding of NCK to SOS and activation of ras-dependent gene expression. *Mol Cell Biol* 15, 1169-1174.
- Huebner, K., Kastury, K., Druck, T., Salcini, A.E., Lanfrancone, L., Pelicci, G., Lowenstein, E., Li, W., Park, S.H., Cannizzaro, L., et al. (1994). Chromosome locations of genes encoding human signal transduction adapter proteins, Nck (NCK), Shc (SHC1), and Grb2 (GRB2). *Genomics* 22, 281-287.
- Huveneers, S., and Danen, E.H. (2009). Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* 122, 1059-1069.

- Ihara, K., Muraguchi, S., Kato, M., Shimizu, T., Shirakawa, M., Kuroda, S., Kaibuchi, K., and Hakoshima, T. (1998). Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J Biol Chem* **273**, 9656-9666.
- Imai, K., Nonoyama, S., Miki, H., Morio, T., Fukami, K., Zhu, Q., Aruffo, A., Ochs, H.D., Yata, J., and Takenawa, T. (1999). The pleckstrin homology domain of the Wiskott-Aldrich syndrome protein is involved in the organization of actin cytoskeleton. *Clin Immunol* **92**, 128-137.
- Ingham, R.J., Krebs, D.L., Barbazuk, S.M., Turck, C.W., Hirai, H., Matsuda, M., and Gold, M.R. (1996). B cell antigen receptor signaling induces the formation of complexes containing the Crk adapter proteins. *J Biol Chem* **271**, 32306-32314.
- Irby, R.B., Mao, W., Coppola, D., Kang, J., Loubeau, J.M., Trudeau, W., Karl, R., Fujita, D.J., Jove, R., and Yeatman, T.J. (1999). Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nat Genet* **21**, 187-190.
- Irvine, R. (1998). Inositol phospholipids: translocation, translocation, translocation. *Curr Biol* **8**, R557-559.
- Iwanicki, M.P., Vomastek, T., Tilghman, R.W., Martin, K.H., Banerjee, J., Wedegaertner, P.B., and Parsons, J.T. (2008). FAK, PDZ-RhoGEF and ROCKII cooperate to regulate adhesion movement and trailing-edge retraction in fibroblasts. *J Cell Sci* **121**, 895-905.
- Jackson, C.L., and Casanova, J.E. (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol* **10**, 60-67.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-269.
- Jaiswal, M., Dubey, B.N., Koessmeier, K.T., Gremer, L., and Ahmadian, M.R. (2012a). Biochemical assays to characterize Rho GTPases. *Methods Mol Biol* **827**, 37-58.
- Jaiswal, M., Dvorsky, R., and Ahmadian, M.R. (2012b). Deciphering the molecular and functional basis of Dbl family proteins: A novel systematic approach towards classification of selective activation of the Rho family proteins. *J Biol Chem*.
- Jaiswal, M., Kalawy Fansa, E., Dvorsky, R., and Ahmadian, R. (2012c). New insight into the molecular switch mechanism of human Rho family proteins: shifting a paradigm. *Biol Chem*.
- John, J., Sohmen, R., Feuerstein, J., Linke, R., Wittinghofer, A., and Goody, R.S. (1990). Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21. *Biochemistry* **29**, 6058-6065.
- Jove, R., and Hanafusa, H. (1987). Cell transformation by the viral src oncogene. *Annu Rev Cell Biol* **3**, 31-56.
- Kahn, S., Yamamoto, F., Almoguera, C., Winter, E., Forrester, K., Jordano, J., and Perucho, M. (1987). The c-K-ras gene and human cancer (review). *Anticancer Res* **7**, 639-652.
- Kaneko, T., Li, L., and Li, S.S. (2008). The SH3 domain--a family of versatile peptide- and protein-recognition module. *Front Biosci* **13**, 4938-4952.
- Karlsson, R., Pedersen, E.D., Wang, Z., and Brakebusch, C. (2009). Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* **1796**, 91-98.
- Karnoub, A.E., and Weinberg, R.A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 517-531.
- Katoh, M. (2002). Molecular cloning and characterization of WRCH2 on human chromosome 15q15. *Int J Oncol* **20**, 977-982.
- Kawashima, T., Hirose, K., Satoh, T., Kaneko, A., Ikeda, Y., Kaziro, Y., Nosaka, T., and Kitamura, T. (2000). MgcRacGAP is involved in the control of growth and differentiation of hematopoietic cells. *Blood* **96**, 2116-2124.

- Keep, N.H., Barnes, M., Barsukov, I., Badii, R., Lian, L.Y., Segal, A.W., Moody, P.C., and Roberts, G.C. (1997). A modulator of rho family G proteins, rhoGDI, binds these G proteins via an immunoglobulin-like domain and a flexible N-terminal arm. *Structure* *5*, 623-633.
- Kieken, F., Jovic, M., Tonelli, M., Naslavsky, N., Caplan, S., and Sorgen, P.L. (2009). Structural insight into the interaction of proteins containing NPF, DPF, and GPF motifs with the C-terminal EH-domain of EHD1. *Protein Sci* *18*, 2471-2479.
- Kim, A.S., Kakalis, L.T., Abdul-Manan, N., Liu, G.A., and Rosen, M.K. (2000). Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* *404*, 151-158.
- Kim, T.Y., Vigil, D., Der, C.J., and Juliano, R.L. (2009). Role of DLC-1, a tumor suppressor protein with RhoGAP activity, in regulation of the cytoskeleton and cell motility. *Cancer Metastasis Rev* *28*, 77-83.
- King, C.C., Gardiner, E.M., Zenke, F.T., Bohl, B.P., Newton, A.C., Hemmings, B.A., and Bokoch, G.M. (2000). p21-activated kinase (PAK1) is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1). *J Biol Chem* *275*, 41201-41209.
- Kintscher, C., Wuertenberger, S., Eysten, R., Uhlendorf, T., and Groemping, Y. (2010). Autoinhibition of GEF activity in Intersectin 1 is mediated by the short SH3-DH domain linker. *Protein Sci* *19*, 2164-2174.
- Kirikoshi, H., and Katoh, M. (2002). Expression of WRCH1 in human cancer and down-regulation of WRCH1 by beta-estradiol in MCF-7 cells. *Int J Oncol* *20*, 777-783.
- Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Sugimura, H., Kurata, T., and Matsuda, M. (1998). Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev* *12*, 3331-3336.
- Knaus, U.G., Morris, S., Dong, H.J., Chernoff, J., and Bokoch, G.M. (1995). Regulation of human leukocyte p21-activated kinases through G protein-coupled receptors. *Science* *269*, 221-223.
- Knighton, D.R., Xuong, N.H., Taylor, S.S., and Sowadski, J.M. (1991). Crystallization studies of cAMP-dependent protein kinase. Cocrystals of the catalytic subunit with a 20 amino acid residue peptide inhibitor and MgATP diffract to 3.0 Å resolution. *J Mol Biol* *220*, 217-220.
- Knudsen, B.S., Feller, S.M., and Hanafusa, H. (1994). Four proline-rich sequences of the guanine-nucleotide exchange factor C3G bind with unique specificity to the first Src homology 3 domain of Crk. *J Biol Chem* *269*, 32781-32787.
- Kobashigawa, Y., Sakai, M., Naito, M., Yokochi, M., Kumeta, H., Makino, Y., Ogura, K., Tanaka, S., and Inagaki, F. (2007). Structural basis for the transforming activity of human cancer-related signaling adaptor protein CRK. *Nat Struct Mol Biol* *14*, 503-510.
- Koehler, J.A., and 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 Differ* *12*, 551-561.
- Konno, A., Wada, T., Schurman, S.H., Garabedian, E.K., Kirby, M., Anderson, S.M., and Candotti, F. (2004). Differential contribution of Wiskott-Aldrich syndrome protein to selective advantage in T- and B-cell lineages. *Blood* *103*, 676-678.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* *15*, 1942-1952.
- Krzewski, K., Chen, X., Orange, J.S., and Strominger, J.L. (2006). Formation of a WIP-, WASp-, actin-, and myosin IIA-containing multiprotein complex in activated NK cells and its alteration by KIR inhibitory signaling. *J Cell Biol* *173*, 121-132.

- Kulkarni, S.V., Gish, G., van der Geer, P., Henkemeyer, M., and Pawson, T. (2000). Role of p120 Ras-GAP in directed cell movement. *J Cell Biol* 149, 457-470.
- Kuroiwa, M., Oneyama, C., Nada, S., and Okada, M. (2011). The guanine nucleotide exchange factor Arhgef5 plays crucial roles in Src-induced podosome formation. *J Cell Sci* 124, 1726-1738.
- Kypta, R.M., Goldberg, Y., Ulug, E.T., and Courtneidge, S.A. (1990). Association between the PDGF receptor and members of the src family of tyrosine kinases. *Cell* 62, 481-492.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lancaster, C.A., Taylor-Harris, P.M., Self, A.J., Brill, S., van Erp, H.E., and Hall, A. (1994). Characterization of rhoGAP. A GTPase-activating protein for rho-related small GTPases. *J Biol Chem* 269, 1137-1142.
- Lazer, G., and Katzav, S. (2011). Guanine nucleotide exchange factors for RhoGTPases: good therapeutic targets for cancer therapy? *Cell Signal* 23, 969-979.
- Le, L.Q., and Parada, L.F. (2007). Tumor microenvironment and neurofibromatosis type 1: connecting the GAPs. *Oncogene* 26, 4609-4616.
- Leblanc, V., Tocque, B., and Delumeau, I. (1998). Ras-GAP controls Rho-mediated cytoskeletal reorganization through its SH3 domain. *Mol Cell Biol* 18, 5567-5578.
- Lee, C.H., Saksela, K., Mirza, U.A., Chait, B.T., and Kuriyan, J. (1996). Crystal structure of the conserved core of HIV-1 Nef complexed with a Src family SH3 domain. *Cell* 85, 931-942.
- Lee, M.J., and Stephenson, D.A. (2007). Recent developments in neurofibromatosis type 1. *Curr Opin Neurol* 20, 135-141.
- Leeuw, T., Wu, C., Schrag, J.D., Whiteway, M., Thomas, D.Y., and Leberer, E. (1998). Interaction of a G-protein beta-subunit with a conserved sequence in Ste20/PAK family protein kinases. *Nature* 391, 191-195.
- Lehmann, J.M., Riethmuller, G., and Johnson, J.P. (1990). Nck, a melanoma cDNA encoding a cytoplasmic protein consisting of the src homology units SH2 and SH3. *Nucleic Acids Res* 18, 1048.
- Lei, M., Lu, W., Meng, W., Parrini, M.C., Eck, M.J., Mayer, B.J., and Harrison, S.C. (2000). Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell* 102, 387-397.
- Lemmon, M.A., and Ferguson, K.M. (2000). Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* 350 Pt 1, 1-18.
- Lemmon, M.A., Ladbury, J.E., Mandiyan, V., Zhou, M., and Schlessinger, J. (1994). Independent binding of peptide ligands to the SH2 and SH3 domains of Grb2. *J Biol Chem* 269, 31653-31658.
- Lettau, M., Pieper, J., and Janssen, O. (2009). Nck adapter proteins: functional versatility in T cells. *Cell Commun Signal* 7, 1.
- Lewitzky, M., Harkiolaki, M., Domart, M.C., Jones, E.Y., and Feller, S.M. (2004). Mona/Gads SH3C binding to hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) combines an atypical SH3 binding motif, R/KXXK, with a classical PXXP motif embedded in a polyproline type II (PPII) helix. *J Biol Chem* 279, 28724-28732.
- Li, S.S. (2005). Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J* 390, 641-653.
- Li, W., Hu, P., Skolnik, E.Y., Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing Nck protein is oncogenic and a common target for phosphorylation by different surface receptors. *Mol Cell Biol* 12, 5824-5833.

- Lian, L.Y., Barsukov, I., Golovanov, A.P., Hawkins, D.I., Badii, R., Sze, K.H., Keep, N.H., Bokoch, G.M., and Roberts, G.C. (2000). Mapping the binding site for the GTP-binding protein Rac-1 on its inhibitor RhoGDI-1. *Structure* 8, 47-55.
- Lim, W.A., Richards, F.M., and Fox, R.O. (1994). Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature* 372, 375-379.
- Lim, Y., Lim, S.T., Tomar, A., Gardel, M., Bernard-Trifilo, J.A., Chen, X.L., Uryu, S.A., Canete-Soler, R., Zhai, J., Lin, H., *et al.* (2008). PyK2 and FAK connections to p190Rho guanine nucleotide exchange factor regulate RhoA activity, focal adhesion formation, and cell motility. *J Cell Biol* 180, 187-203.
- Linardopoulou, E.V., Parghi, S.S., Friedman, C., Osborn, G.E., Parkhurst, S.M., and Trask, B.J. (2007). Human subtelomeric WASH genes encode a new subclass of the WASP family. *PLoS Genet* 3, e237.
- Linder, M.E., and Deschenes, R.J. (2003). New insights into the mechanisms of protein palmitoylation. *Biochemistry* 42, 4311-4320.
- Liu, J., Li, M., Ran, X., Fan, J.S., and Song, J. (2006). Structural insight into the binding diversity between the human Nck2 SH3 domains and proline-rich proteins. *Biochemistry* 45, 7171-7184.
- Liu, Q., Berry, D., Nash, P., Pawson, T., McGlade, C.J., and Li, S.S. (2003). Structural basis for specific binding of the Gads SH3 domain to an RxxK motif-containing SLP-76 peptide: a novel mode of peptide recognition. *Mol Cell* 11, 471-481.
- Liu, X., Marengere, L.E., Koch, C.A., and Pawson, T. (1993). The v-Src SH3 domain binds phosphatidylinositol 3'-kinase. *Mol Cell Biol* 13, 5225-5232.
- Longenecker, K., Read, P., Derewenda, U., Dauter, Z., Liu, X., Garrard, S., Walker, L., Somlyo, A.V., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.P., *et al.* (1999). How RhoGDI binds Rho. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55, 1503-1515.
- Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D., and Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70, 431-442.
- Machesky, L.M., and Insall, R.H. (1998). Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol* 8, 1347-1356.
- Machesky, L.M., Mullins, R.D., Higgs, H.N., Kaiser, D.A., Blanchoin, L., May, R.C., Hall, M.E., and Pollard, T.D. (1999). Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3739-3744.
- Mackay, D.J., and Hall, A. (1998). Rho GTPases. *J Biol Chem* 273, 20685-20688.
- Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z.S., and Lim, L. (1994). A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* 367, 40-46.
- Manser, E., Loo, T.H., Koh, C.G., Zhao, Z.S., Chen, X.Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T., and Lim, L. (1998). PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell* 1, 183-192.
- Martin, G.A., Bollag, G., McCormick, F., and Abo, A. (1995). A novel serine kinase activated by rac1/CDC42Hs-dependent autophosphorylation is related to PAK65 and STE20. *Embo J* 14, 4385.
- Matsuda, M., Hashimoto, Y., Muroya, K., Hasegawa, H., Kurata, T., Tanaka, S., Nakamura, S., and Hattori, S. (1994). CRK protein binds to two guanine nucleotide-releasing proteins for the Ras family and modulates nerve growth factor-induced activation of Ras in PC12 cells. *Mol Cell Biol* 14, 5495-5500.
- Mayer, B.J. (2001). SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci* 114, 1253-1263.

- Mayer, B.J., and Eck, M.J. (1995). SH3 domains. Minding your p's and q's. *Curr Biol* 5, 364-367.
- Mayer, B.J., Hamaguchi, M., and Hanafusa, H. (1988). Characterization of p47gag-crk, a novel oncogene product with sequence similarity to a putative modulatory domain of protein-tyrosine kinases and phospholipase C. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 53 Pt 2, 907-914.
- McCormick, F. (1989). ras GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator. *Cell* 56, 5-8.
- McDonald, C.B., Seldeen, K.L., Deegan, B.J., Bhat, V., and Farooq, A. (2010). Assembly of the Sos1-Grb2-Gab1 ternary signaling complex is under allosteric control. *Arch Biochem Biophys* 494, 216-225.
- McDonald, C.B., Seldeen, K.L., Deegan, B.J., and Farooq, A. (2009). SH3 domains of Grb2 adaptor bind to PXpsiPXR motifs within the Sos1 nucleotide exchange factor in a discriminate manner. *Biochemistry* 48, 4074-4085.
- McDonell, 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. *J Mol Biol* 110, 119-146.
- Meisner, H., Conway, B.R., Hartley, D., and Czech, M.P. (1995). Interactions of Cbl with Grb2 and phosphatidylinositol 3'-kinase in activated Jurkat cells. *Mol Cell Biol* 15, 3571-3578.
- Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M., and Philips, M.R. (2001). Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol* 152, 111-126.
- Miki, H., Miura, K., and Takenawa, T. (1996). N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *Embo J* 15, 5326-5335.
- Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y., and Takenawa, T. (1998a). Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* 391, 93-96.
- Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (1998b). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo J* 17, 6932-6941.
- Miki, H., and Takenawa, T. (1998). Direct binding of the verprolin-homology domain in N-WASP to actin is essential for cytoskeletal reorganization. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 73-78.
- Mitin, N., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol* 15, R563-574.
- Mitra, S.K., and Schlaepfer, D.D. (2006). Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol* 18, 516-523.
- Moarefi, I., LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Huse, M., Lee, C.H., Kuriyan, J., and Miller, W.T. (1997). Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* 385, 650-653.
- Mongiovi, A.M., Romano, P.R., Panni, S., Mendoza, M., Wong, W.T., Musacchio, A., Cesareni, G., and Di Fiore, P.P. (1999). A novel peptide-SH3 interaction. *Embo J* 18, 5300-5309.
- Moore, M.S. (1998). Ran and nuclear transport. *J Biol Chem* 273, 22857-22860.
- Moore, S.L., Schaber, M.D., Mosser, S.D., Rands, E., O'Hara, M.B., Garsky, V.M., Marshall, M.S., Pompliano, D.L., and Gibbs, J.B. (1991). Sequence dependence of protein isoprenylation. *J Biol Chem* 266, 14603-14610.
- Morreale, A., Venkatesan, M., Mott, H.R., Owen, D., Nietlispach, D., Lowe, P.N., and Laue, E.D. (2000). Structure of Cdc42 bound to the GTPase binding domain of PAK. *Nat Struct Biol* 7, 384-388.

- Moss, J., and Vaughan, M. (1998). Molecules in the ARF orbit. *J Biol Chem* 273, 21431-21434.
- 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. 1986. *Biotechnology* 24, 17-27.
- Muralidharan, V., Dutta, K., Cho, J., Vila-Perello, M., Raleigh, D.P., Cowburn, D., and Muir, T.W. (2006). Solution structure and folding characteristics of the C-terminal SH3 domain of c-Crk-II. *Biochemistry* 45, 8874-8884.
- Murphy, G.A., Solski, P.A., Jillian, S.A., Perez de la Ossa, P., D'Eustachio, P., Der, C.J., and Rush, M.G. (1999). Cellular functions of TC10, a Rho family GTPase: regulation of morphology, signal transduction and cell growth. *Oncogene* 18, 3831-3845.
- Musacchio, A., Gibson, T., Lehto, V.P., and Saraste, M. (1992). SH3--an abundant protein domain in search of a function. *FEBS Lett* 307, 55-61.
- Nakamura, I., Duong le, T., Rodan, S.B., and Rodan, G.A. (2007). Involvement of alpha(v)beta3 integrins in osteoclast function. *J Bone Miner Metab* 25, 337-344.
- Neudauer, C.L., Joberty, G., Tatsis, N., and Macara, I.G. (1998). Distinct cellular effects and interactions of the Rho-family GTPase TC10. *Curr Biol* 8, 1151-1160.
- Newcombe, A.R., Stockley, R.W., Hunter, J.L., and Webb, M.R. (1999). The interaction between rac1 and its guanine nucleotide dissociation inhibitor (GDI), monitored by a single fluorescent coumarin attached to GDI. *Biochemistry* 38, 6879-6886.
- Nguyen, J.T., and Lim, W.A. (1997). How Src exercises self-restraint. *Nat Struct Biol* 4, 256-260.
- Nishimura, R., Li, W., Kashishian, A., Mondino, A., Zhou, M., Cooper, J., and Schlessinger, J. (1993). Two signaling molecules share a phosphotyrosine-containing binding site in the platelet-derived growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 13, 6889-6896.
- 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.
- Nolan, K.M., Barrett, K., Lu, Y., Hu, K.Q., Vincent, S., and Settleman, J. (1998). Myoblast city, the Drosophila homolog of DOCK180/CED-5, is required in a Rac signaling pathway utilized for multiple developmental processes. *Genes Dev* 12, 3337-3342.
- Nomanbhoy, T., and Cerione, R.A. (1999). Fluorescence assays of Cdc42 interactions with target/effector proteins. *Biochemistry* 38, 15878-15884.
- Ohba, T., Ishino, M., Aoto, H., and Sasaki, T. (1998). Interaction of two proline-rich sequences of cell adhesion kinase beta with SH3 domains of p130Cas-related proteins and a GTPase-activating protein. *Graf. Biochem J* 330 (Pt 3), 1249-1254.
- Okada, M. (2012). Regulation of the SRC family kinases by csk. *Int J Biol Sci* 8, 1385-1397.
- Okada, M., Nada, S., Yamanashi, Y., Yamamoto, T., and Nakagawa, H. (1991). CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases. *J Biol Chem* 266, 24249-24252.
- Okigaki, M., Davis, C., Falasca, M., Harroch, S., Felsenfeld, D.P., Sheetz, M.P., and Schlessinger, J. (2003). Pyk2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10740-10745.
- Olofsson, B. (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* 11, 545-554.
- Ong, C.C., Jubb, A.M., Zhou, W., Haverty, P.M., Harris, A.L., Belvin, M., Friedman, L.S., Koeppen, H., and Hoeflich, K.P. (2011). p21-activated kinase 1: PAK'ed with potential. *Oncotarget* 2, 491-496.

- Ory, S., Brazier, H., and Blangy, A. (2007). Identification of a bipartite focal adhesion localization signal in RhoU/Wrch-1, a Rho family GTPase that regulates cell adhesion and migration. *Biol Cell* 99, 701-716.
- Owen, D.J., Vallis, Y., Noble, M.E., Hunter, J.B., Dafforn, T.R., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (1999). A structural explanation for the binding of multiple ligands by the alpha-adaptin appendage domain. *Cell* 97, 805-815.
- Owen, K.A., Pixley, F.J., Thomas, K.S., Vicente-Manzanares, M., Ray, B.J., Horwitz, A.F., Parsons, J.T., Beggs, H.E., Stanley, E.R., and Bouton, A.H. (2007). Regulation of lamellipodial persistence, adhesion turnover, and motility in macrophages by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 179, 1275-1287.
- Pamonsinlapatham, P., Hadj-Slimane, R., Lepelletier, Y., Allain, B., Toccafondi, M., Garbay, C., and Raynaud, F. (2009). p120-Ras GTPase activating protein (RasGAP): a multi-interacting protein in downstream signaling. *Biochimie* 91, 320-328.
- Pamonsinlapatham, P., Hadj-Slimane, R., Raynaud, F., Bickle, M., Corneloup, C., Barthelaix, A., Lepelletier, Y., Mercier, P., Schapira, M., Samson, J., *et al.* (2008). A RasGAP SH3 peptide aptamer inhibits RasGAP-Aurora interaction and induces caspase-independent tumor cell death. *PLoS One* 3, e2902.
- Panni, S., Dente, L., and Cesareni, G. (2002). In vitro evolution of recognition specificity mediated by SH3 domains reveals target recognition rules. *J Biol Chem* 277, 21666-21674.
- Park, D., and Rhee, S.G. (1992). Phosphorylation of Nck in response to a variety of receptors, phorbol myristate acetate, and cyclic AMP. *Mol Cell Biol* 12, 5816-5823.
- Parsons, S.J., and Parsons, J.T. (2004). Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23, 7906-7909.
- Pawson, T. (2004). Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* 116, 191-203.
- Pawson, T., and Scott, J.D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278, 2075-2080.
- Pisabarro, M.T., and Serrano, L. (1996). Rational design of specific high-affinity peptide ligands for the Abl-SH3 domain. *Biochemistry* 35, 10634-10640.
- Pisabarro, M.T., Serrano, L., and Wilmanns, M. (1998). Crystal structure of the abl-SH3 domain complexed with a designed high-affinity peptide ligand: implications for SH3-ligand interactions. *J Mol Biol* 281, 513-521.
- Praefcke, G.J., Ford, M.G., Schmid, E.M., Olesen, L.E., Gallop, J.L., Peak-Chew, S.Y., Vallis, Y., Babu, M.M., Mills, I.G., and McMahon, H.T. (2004). Evolving nature of the AP2 alpha-appendage hub during clathrin-coated vesicle endocytosis. *Embo J* 23, 4371-4383.
- Prehoda, K.E., Scott, J.A., Mullins, R.D., and Lim, W.A. (2000). Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Science* 290, 801-806.
- Puto, L.A., Pestonjamas, K., King, C.C., and Bokoch, G.M. (2003). p21-activated kinase 1 (PAK1) interacts with the Grb2 adapter protein to couple to growth factor signaling. *J Biol Chem* 278, 9388-9393.
- Ramesh, N., Anton, I.M., Hartwig, J.H., and Geha, R.S. (1997). WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14671-14676.
- Rathinam, R., Berrier, A., and Alahari, S.K. (2011). Role of Rho GTPases and their regulators in cancer progression. *Front Biosci* 16, 2561-2571.
- Rebecchi, M.J., and Scarlata, S. (1998). Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27, 503-528.

- Reebye, V., Frilling, A., Hajitou, A., Nicholls, J.P., Habib, N.A., and Mintz, P.J. (2012). A perspective on non-catalytic Src homology (SH) adaptor signalling proteins. *Cell Signal* **24**, 388-392.
- Reiss, Y., Stradley, S.J., Gierasch, L.M., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1991). Sequence requirement for peptide recognition by rat brain p21ras protein farnesyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 732-736.
- Ren, R., Mayer, B.J., Cicchetti, P., and Baltimore, D. (1993). Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* **259**, 1157-1161.
- Ren, R., Ye, Z.S., and Baltimore, D. (1994). Abl protein-tyrosine kinase selects the Crk adapter as a substrate using SH3-binding sites. *Genes Dev* **8**, 783-795.
- Ren, X.R., Du, Q.S., Huang, Y.Z., Ao, S.Z., Mei, L., and Xiong, W.C. (2001). Regulation of CDC42 GTPase by proline-rich tyrosine kinase 2 interacting with PSGAP, a novel pleckstrin homology and Src homology 3 domain containing rhoGAP protein. *J Cell Biol* **152**, 971-984.
- Resh, M.D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* **1451**, 1-16.
- Ridley, A.J. (2004). Rho proteins and cancer. *Breast Cancer Res Treat* **84**, 13-19.
- Ridley, A.J., and 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., and Ellis, C. (1993). rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *Embo J* **12**, 5151-5160.
- Risse, S.L., Vaz, B., Burton, M.F., Aspenstrom, P., Piekorz, R.P., Brunsveld, L., and Ahmadian, M.R. (2012). SH3-mediated targeting of Wrch1/RhoU by multiple adaptor proteins. *Biol Chem*.
- 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.
- Rivera, G.M., Antoku, S., Gelkop, S., Shin, N.Y., Hanks, S.K., Pawson, T., and Mayer, B.J. (2006). Requirement of Nck adaptors for actin dynamics and cell migration stimulated by platelet-derived growth factor B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9536-9541.
- Rivera, G.M., Vasilescu, D., Papayannopoulos, V., Lim, W.A., and Mayer, B.J. (2009). A reciprocal interdependence between Nck and PI(4,5)P(2) promotes localized N-WASP-mediated actin polymerization in living cells. *Mol Cell* **36**, 525-535.
- Rivero-Lezcano, O.M., Marcilla, A., Sameshima, J.H., and Robbins, K.C. (1995). Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains. *Mol Cell Biol* **15**, 5725-5731.
- Roche, S., McGlade, J., Jones, M., Gish, G.D., Pawson, T., and Courtneidge, S.A. (1996). Requirement of phospholipase C gamma, the tyrosine phosphatase Syp and the adaptor proteins Shc and Nck for PDGF-induced DNA synthesis: evidence for the existence of Ras-dependent and Ras-independent pathways. *Embo J* **15**, 4940-4948.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M.W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**, 221-231.

- Rohatgi, R., Nollau, P., Ho, H.Y., Kirschner, M.W., and Mayer, B.J. (2001). Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J Biol Chem* 276, 26448-26452.
- Rosen, M.K., Yamazaki, T., Gish, G.D., Kay, C.M., Pawson, T., and Kay, L.E. (1995). Direct demonstration of an intramolecular SH2-phosphotyrosine interaction in the Crk protein. *Nature* 374, 477-479.
- Roskoski, R., Jr., and Ritchie, P. (1998). Role of the carboxyterminal residue in peptide binding to protein farnesyltransferase and protein geranylgeranyltransferase. *Arch Biochem Biophys* 356, 167-176.
- Rossmann, K.L., Der, C.J., and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 167-180.
- Rozakis-Adcock, M., Fernley, R., Wade, J., Pawson, T., and Bowtell, D. (1993). The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* 363, 83-85.
- Ruusala, A., and Aspenstrom, P. (2008). The atypical Rho GTPase Wrch1 collaborates with the nonreceptor tyrosine kinases Pyk2 and Src in regulating cytoskeletal dynamics. *Mol Cell Biol* 28, 1802-1814.
- Sahai, E., and Marshall, C.J. (2002). RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 133-142.
- Sakai, R., Iwamatsu, A., Hirano, N., Ogawa, S., Tanaka, T., Mano, H., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1994). A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *Embo J* 13, 3748-3756.
- Saksela, K., and Permi, P. (2012). SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity? *FEBS Lett* 586, 2609-2614.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Second edn (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sander, E.E., and Collard, J.G. (1999). Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. *Eur J Cancer* 35, 1905-1911.
- Sanders, L.C., Matsumura, F., Bokoch, G.M., and 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Santiveri, C.M., Borroto, A., Simon, L., Rico, M., Alarcon, B., and Jimenez, M.A. (2009). Interaction between the N-terminal SH3 domain of Nck-alpha and CD3-epsilon-derived peptides: non-canonical and canonical recognition motifs. *Biochim Biophys Acta* 1794, 110-117.
- Saras, J., Wollberg, P., and Aspenstrom, P. (2004). Wrch1 is a GTPase-deficient Cdc42-like protein with unusual binding characteristics and cellular effects. *Exp Cell Res* 299, 356-369.
- Saraste, M., Sibbald, P.R., and Wittinghofer, A. (1990). The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 15, 430-434.
- Sarkar, P., Reichman, C., Saleh, T., Birge, R.B., and Kalodimos, C.G. (2007). Proline cis-trans isomerization controls autoinhibition of a signaling protein. *Mol Cell* 25, 413-426.
- Sarkar, P., Saleh, T., Tzeng, S.R., Birge, R.B., and Kalodimos, C.G. (2011). Structural basis for regulation of the Crk signaling protein by a proline switch. *Nat Chem Biol* 7, 51-57.
- Sasahara, Y., Rachid, R., Byrne, M.J., de la Fuente, M.A., Abraham, R.T., Ramesh, N., and Geha, R.S. (2002). Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation. *Mol Cell* 10, 1269-1281.

- Sawa, M., and Takenawa, T. (2006). *Caenorhabditis elegans* WASP-interacting protein homologue WIP-1 is involved in morphogenesis through maintenance of WSP-1 protein levels. *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 709-717.
- Scaplehorn, N., Holmstrom, A., Moreau, V., Frischknecht, F., Reckmann, I., and Way, M. (2002). Grb2 and Nck act cooperatively to promote actin-based motility of vaccinia virus. *Curr Biol* **12**, 740-745.
- Schagger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-379.
- Schaller, M.D. (2010). Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci* **123**, 1007-1013.
- Schaller, M.D., and Parsons, J.T. (1995). pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Mol Cell Biol* **15**, 2635-2645.
- Scheffzek, K., and Ahmadian, M.R. (2005). GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. *Cell Mol Life Sci* **62**, 3014-3038.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmuller, 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* **277**, 333-338.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., and Wittinghofer, A. (1998). GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site. *Trends Biochem Sci* **23**, 257-262.
- Scheffzek, K., Stephan, I., Jensen, O.N., Illenberger, D., and Gierschik, P. (2000). The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. *Nat Struct Biol* **7**, 122-126.
- Schiavone, D., Dewilde, S., Vallania, F., Turkson, J., Di Cunto, F., and Poli, V. (2009). The RhoU/Wrch1 Rho GTPase gene is a common transcriptional target of both the gp130/STAT3 and Wnt-1 pathways. *Biochem J* **421**, 283-292.
- Schimmoller, F., Simon, I., and Pfeffer, S.R. (1998). Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J Biol Chem* **273**, 22161-22164.
- Schlessinger, J., and Lemmon, M.A. (2003). SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci STKE* **2003**, RE12.
- Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **16**, 1587-1609.
- Schubbert, S., Shannon, K., and Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 295-308.
- Scott, J.D., and Pawson, T. (2009). Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. *Science* **326**, 1220-1224.
- Seals, D.F., Azucena, E.F., Jr., Pass, I., Tesfay, L., Gordon, R., Woodrow, M., Resau, J.H., and Courtneidge, S.A. (2005). The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer Cell* **7**, 155-165.
- Sebti, S.M., and Hamilton, A.D. (2000). Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors and cancer therapy: lessons from mechanism and bench-to bedside translational studies. *Oncogene* **19**, 6584-6593.
- Shapiro, A.L., Vinuela, E., and Maizel, J.V., Jr. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* **28**, 815-820.
- She, H.Y., Rockow, S., Tang, J., Nishimura, R., Skolnik, E.Y., Chen, M., Margolis, B., and Li, W. (1997). Wiskott-Aldrich syndrome protein is associated with the adapter protein Grb2 and the epidermal growth factor receptor in living cells. *Mol Biol Cell* **8**, 1709-1721.

- Shor, A.C., Keselman, E.A., Lee, F.Y., Muro-Cacho, C., Letson, G.D., Trent, J.C., Pledger, W.J., and Jove, R. (2007). Dasatinib inhibits migration and invasion in diverse human sarcoma cell lines and induces apoptosis in bone sarcoma cells dependent on SRC kinase for survival. *Cancer Res* 67, 2800-2808.
- Shutes, A., Berzat, A.C., Cox, A.D., and Der, C.J. (2004). Atypical mechanism of regulation of the Wrch-1 Rho family small GTPase. *Curr Biol* 14, 2052-2056.
- Simon, J.A., and Schreiber, S.L. (1995). Grb2 SH3 binding to peptides from Sos: evaluation of a general model for SH3-ligand interactions. *Chem Biol* 2, 53-60.
- Slack-Davis, J.K., Eblen, S.T., Zecevic, M., Boerner, S.A., Tarcsafalvi, A., Diaz, H.B., Marshall, M.S., Weber, M.J., Parsons, J.T., and Catling, A.D. (2003). PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation. *J Cell Biol* 162, 281-291.
- Somsel Rodman, J., and Wandinger-Ness, A. (2000). Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci* 113 Pt 2, 183-192.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R.J., *et al.* (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72, 767-778.
- Sorokin, A., Reed, E., Nnkemere, N., Dulin, N.O., and Schlessinger, J. (1998). Crk protein binds to PDGF receptor and insulin receptor substrate-1 with different modulating effects on PDGF- and insulin-dependent signaling pathways. *Oncogene* 16, 2425-2434.
- Sparks, A.B., Quilliam, L.A., Thorn, J.M., Der, C.J., and Kay, B.K. (1994). Identification and characterization of Src SH3 ligands from phage-displayed random peptide libraries. *J Biol Chem* 269, 23853-23856.
- Sriram, G., and Birge, R.B. (2012). Commentary: The carboxyl-terminal Crk SH3 domain: Regulatory strategies and new perspectives. *FEBS Lett* 586, 2615-2618.
- Sriram, G., Reichman, C., Tunceroglu, A., Kaushal, N., Saleh, T., Machida, K., Mayer, B., Ge, Q., Li, J., Hornbeck, P., *et al.* (2011). Phosphorylation of Crk on tyrosine 251 in the RT loop of the SH3C domain promotes Abl kinase transactivation. *Oncogene* 30, 4645-4655.
- Stein, E., Huynh-Do, U., Lane, A.A., Cerretti, D.P., and Daniel, T.O. (1998). Nck recruitment to Eph receptor, EphB1/ELK, couples ligand activation to c-Jun kinase. *J Biol Chem* 273, 1303-1308.
- Suetsugu, S., Hattori, M., Miki, H., Tezuka, T., Yamamoto, T., Mikoshiba, K., and Takenawa, T. (2002). Sustained activation of N-WASP through phosphorylation is essential for neurite extension. *Dev Cell* 3, 645-658.
- Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T. (1998). The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *Embo J* 17, 6516-6526.
- Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T. (1999). Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex. *Biochem Biophys Res Commun* 260, 296-302.
- Summy, J.M., and Gallick, G.E. (2003). Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 22, 337-358.
- Symons, M., Derry, J.M., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U., and Abo, A. (1996). Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* 84, 723-734.
- Symons, M., and Settleman, J. (2000). Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends Cell Biol* 10, 415-419.
- Szymkiewicz, I., Shupliakov, O., and Dikic, I. (2004). Cargo- and compartment-selective endocytic scaffold proteins. *Biochem J* 383, 1-11.

- Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* *81*, 153-208.
- Takeuchi, K., Yang, H., Ng, E., Park, S.Y., Sun, Z.Y., Reinherz, E.L., and Wagner, G. (2008). Structural and functional evidence that Nck interaction with CD3epsilon regulates T-cell receptor activity. *J Mol Biol* *380*, 704-716.
- Tanaka, M., Gupta, R., and Mayer, B.J. (1995). Differential inhibition of signaling pathways by dominant-negative SH2/SH3 adapter proteins. *Mol Cell Biol* *15*, 6829-6837.
- Tanaka, S., Morishita, T., Hashimoto, Y., Hattori, S., Nakamura, S., Shibuya, M., Matuoka, K., Takenawa, T., Kurata, T., Nagashima, K., *et al.* (1994). C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 3443-3447.
- Tang, Y., Zhou, H., Chen, A., Pittman, R.N., and Field, J. (2000). The Akt proto-oncogene links Ras to Pak and cell survival signals. *J Biol Chem* *275*, 9106-9109.
- Tao, W., Pennica, D., Xu, L., Kalejta, R.F., and Levine, A.J. (2001). Wrch-1, a novel member of the Rho gene family that is regulated by Wnt-1. *Genes Dev* *15*, 1796-1807.
- Tari, A.M., and Lopez-Berestein, G. (2001). GRB2: a pivotal protein in signal transduction. *Semin Oncol* *28*, 142-147.
- Tcherkezian, J., and Lamarche-Vane, N. (2007). Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell* *99*, 67-86.
- Thomas, S.M., and Brugge, J.S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* *13*, 513-609.
- Thompson, G., Owen, D., Chalk, P.A., and Lowe, P.N. (1998). Delineation of the Cdc42/Rac-binding domain of p21-activated kinase. *Biochemistry* *37*, 7885-7891.
- Tomar, A., Lim, S.T., Lim, Y., and Schlaepfer, D.D. (2009). A FAK-p120RasGAP-p190RhoGAP complex regulates polarity in migrating cells. *J Cell Sci* *122*, 1852-1862.
- Tomasevic, N., Jia, Z., Russell, A., Fujii, T., Hartman, J.J., Clancy, S., Wang, M., Beraud, C., Wood, K.W., and Sakowicz, R. (2007). Differential regulation of WASP and N-WASP by Cdc42, Rac1, Nck, and PI(4,5)P2. *Biochemistry* *46*, 3494-3502.
- Torres, E., and Rosen, M.K. (2003). Contingent phosphorylation/dephosphorylation provides a mechanism of molecular memory in WASP. *Mol Cell* *11*, 1215-1227.
- Torres, E., and Rosen, M.K. (2006). Protein-tyrosine kinase and GTPase signals cooperate to phosphorylate and activate Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)/neuronal WASP. *J Biol Chem* *281*, 3513-3520.
- Toure, A., Dorseuil, O., Morin, L., Timmons, P., Jegou, B., Reibel, L., and Gacon, G. (1998). MgcRacGAP, a new human GTPase-activating protein for Rac and Cdc42 similar to *Drosophila rotundRacGAP* gene product, is expressed in male germ cells. *J Biol Chem* *273*, 6019-6023.
- Tsakiridis, T., Taha, C., Grinstein, S., and Klip, A. (1996). Insulin activates a p21-activated kinase in muscle cells via phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* *271*, 19664-19667.
- Tsyba, L., Nikolaienko, O., Dergai, O., Dergai, M., Novokhatska, O., Skrypkina, I., and Rynditch, A. (2011). Intersectin multidomain adaptor proteins: regulation of functional diversity. *Gene* *473*, 67-75.
- Tucker, J., Sczakiel, G., Feuerstein, J., John, J., Goody, R.S., and Wittinghofer, A. (1986). Expression of p21 proteins in *Escherichia coli* and stereochemistry of the nucleotide-binding site. *Embo J* *5*, 1351-1358.
- Van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* *11*, 2295-2322.

- van der Geer, P., Henkemeyer, M., Jacks, T., and Pawson, T. (1997). Aberrant Ras regulation and reduced p190 tyrosine phosphorylation in cells lacking p120-Gap. *Mol Cell Biol* 17, 1840-1847.
- Vaughan, E.M., Miller, A.L., Yu, H.Y., and Bement, W.M. (2011). Control of local Rho GTPase crosstalk by Abr. *Curr Biol* 21, 270-277.
- Vega, F.M., and Ridley, A.J. (2008). Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett* 582, 2093-2101.
- Verbeek, B.S., Adriaansen-Slot, S.S., Rijksen, G., and Vroom, T.M. (1997). Grb2 overexpression in nuclei and cytoplasm of human breast cells: a histochemical and biochemical study of normal and neoplastic mammary tissue specimens. *J Pathol* 183, 195-203.
- Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299-1304.
- Vindis, C., Teli, T., Cerretti, D.P., Turner, C.E., and Huynh-Do, U. (2004). EphB1-mediated cell migration requires the phosphorylation of paxillin at Tyr-31/Tyr-118. *J Biol Chem* 279, 27965-27970.
- Vojtek, A.B., and Der, C.J. (1998). Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* 273, 19925-19928.
- Wei, Y., Zhang, Y., Derewenda, U., Liu, X., Minor, W., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P., and Derewenda, Z.S. (1997). Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nat Struct Biol* 4, 699-703.
- Weisz Hubsman, M., Volinsky, N., Manser, E., Yablonski, D., and Aronheim, A. (2007). Autophosphorylation-dependent degradation of Pak1, triggered by the Rho-family GTPase, Chp. *Biochem J* 404, 487-497.
- Welch, M.D., Mallavarapu, A., Rosenblatt, J., and Mitchison, T.J. (1997). Actin dynamics in vivo. *Curr Opin Cell Biol* 9, 54-61.
- Wennerberg, K., and Der, C.J. (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* 117, 1301-1312.
- Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118, 843-846.
- Whitehead, I.P., Campbell, S., Rossman, K.L., and Der, C.J. (1997). Dbl family proteins. *Biochim Biophys Acta* 1332, F1-23.
- Wilde, A., Beattie, E.C., Lem, L., Riethof, D.A., Liu, S.H., Mobley, W.C., Soriano, P., and Brodsky, F.M. (1999). EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake. *Cell* 96, 677-687.
- Winter, D., Lechler, T., and Li, R. (1999). Activation of the yeast Arp2/3 complex by Bee1p, a WASP-family protein. *Curr Biol* 9, 501-504.
- Wittekind, M., Mapelli, C., Lee, V., Goldfarb, V., Friedrichs, M.S., Meyers, C.A., and Mueller, L. (1997). Solution structure of the Grb2 N-terminal SH3 domain complexed with a ten-residue peptide derived from SOS: direct refinement against NOEs, J-couplings and ¹H and ¹³C chemical shifts. *J Mol Biol* 267, 933-952.
- Wittinghofer, A., Scheffzek, K., and Ahmadian, M.R. (1997). The interaction of Ras with GTPase-activating proteins. *FEBS Lett* 410, 63-67.
- Wu, X., Knudsen, B., Feller, S.M., Zheng, J., Sali, A., Cowburn, D., Hanafusa, H., and Kuriyan, J. (1995). Structural basis for the specific interaction of lysine-containing proline-rich peptides with the N-terminal SH3 domain of c-Crk. *Structure* 3, 215-226.
- Wunderlich, L., Farago, A., and Buday, L. (1999a). Characterization of interactions of Nck with Sos and dynamin. *Cell Signal* 11, 25-29.

- Wunderlich, L., Goher, A., Farago, A., Downward, J., and Buday, L. (1999b). Requirement of multiple SH3 domains of Nck for ligand binding. *Cell Signal* *11*, 253-262.
- Xiao, G.H., Beeser, A., Chernoff, J., and Testa, J.R. (2002). p21-activated kinase links Rac/Cdc42 signaling to merlin. *J Biol Chem* *277*, 883-886.
- Yablonski, D., Kane, L.P., Qian, D., and Weiss, A. (1998). A Nck-Pak1 signaling module is required for T-cell receptor-mediated activation of NFAT, but not of JNK. *Embo J* *17*, 5647-5657.
- Yamane, H.K., Farnsworth, C.C., Xie, H.Y., Evans, T., Howald, W.N., Gelb, M.H., Glomset, J.A., Clarke, S., and Fung, B.K. (1991). Membrane-binding domain of the small G protein G25K contains an S-(all-trans-geranylgeranyl)cysteine methyl ester at its carboxyl terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 286-290.
- Yang, X.Y., Guan, M., Vigil, D., Der, C.J., Lowy, D.R., and Popescu, N.C. (2009). p120Ras-GAP binds the DLC1 Rho-GAP tumor suppressor protein and inhibits its RhoA GTPase and growth-suppressing activities. *Oncogene* *28*, 1401-1409.
- Yart, A., Mayeux, P., and Raynal, P. (2003). Gab1, SHP-2 and other novel regulators of Ras: targets for anticancer drug discovery? *Curr Cancer Drug Targets* *3*, 177-192.
- Yeatman, T.J. (2004). A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* *4*, 470-480.
- Yokote, K., Hellman, U., Ekman, S., Saito, Y., Ronnstrand, L., Heldin, C.H., and Mori, S. (1998). Identification of Tyr-762 in the platelet-derived growth factor alpha-receptor as the binding site for Crk proteins. *Oncogene* *16*, 1229-1239.
- Yokoyama, K., Goodwin, G.W., Ghomashchi, F., Glomset, J.A., and Gelb, M.H. (1991). A protein geranylgeranyltransferase from bovine brain: implications for protein prenylation specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 5302-5306.
- Yuzawa, S., Yokochi, M., Hatanaka, H., Ogura, K., Kataoka, M., Miura, K., Mandiyan, V., Schlessinger, J., and Inagaki, F. (2001). Solution structure of Grb2 reveals extensive flexibility necessary for target recognition. *J Mol Biol* *306*, 527-537.
- Zandy, N.L., and Pendergast, A.M. (2008). Abl tyrosine kinases modulate cadherin-dependent adhesion upstream and downstream of Rho family GTPases. *Cell Cycle* *7*, 444-448.
- Zandy, N.L., Playford, M., and Pendergast, A.M. (2007). Abl tyrosine kinases regulate cell-cell adhesion through Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 17686-17691.
- Zarrinpar, A., Bhattacharyya, R.P., and Lim, W.A. (2003). The structure and function of proline recognition domains. *Sci STKE* *2003*, RE8.
- Zeke, A., Lukacs, M., Lim, W.A., and Remenyi, A. (2009). Scaffolds: interaction platforms for cellular signalling circuits. *Trends Cell Biol* *19*, 364-374.
- Zhai, J., Lin, H., Nie, Z., Wu, J., Canete-Soler, R., Schlaepfer, W.W., and Schlaepfer, D.D. (2003). Direct interaction of focal adhesion kinase with p190RhoGEF. *J Biol Chem* *278*, 24865-24873.
- Zhang, J.S., Koenig, A., Young, C., and Billadeau, D.D. (2011). GRB2 couples RhoU to epidermal growth factor receptor signaling and cell migration. *Mol Biol Cell* *22*, 2119-2130.
- Zhao, Z.S., Manser, E., Chen, X.Q., Chong, C., Leung, T., and Lim, L. (1998). A conserved negative regulatory region in alphaPAK: inhibition of PAK kinases reveals their morphological roles downstream of Cdc42 and Rac1. *Mol Cell Biol* *18*, 2153-2163.
- Zuchero, J.B., Coutts, A.S., Quinlan, M.E., Thangue, N.B., and Mullins, R.D. (2009). p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nat Cell Biol* *11*, 451-459.
- Zwang, Y., and Yarden, Y. (2009). Systems biology of growth factor-induced receptor endocytosis. *Traffic* *10*, 349-363.

Erklärung

Ehrenwörtliche Erklärung zu meiner Dissertation mit dem Titel:

„Regulatorische Mechanismen der unkonventionellen Rho-GTPase Wrch1 in der Signaltransduktion“

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation eigenständig verfasst und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe, wobei die inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet sind.

Die beigefügte Dissertation ist bei keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht worden und ihm gehen keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren voraus.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich danke Jürgen Scheller für wertvolle Diskussionen und Unterstützung zur Fertigstellung dieser Arbeit und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Ganz besonders danke ich Reza Ahmadian für das interessante Thema, die Betreuung dieser Arbeit und gute Diskussionen bei kniffligen Fragen. Ich habe von ihm während der Promotionsarbeit gelernt Experimente kritisch zu hinterfragen, Ergebnisse in Form von ansprechenden Abbildungen zu erstellen und wissenschaftliche Texte zu verfassen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Roland Piekorz für gute Diskussionen und Anregungen zu interessanten Experimenten.

Von meinen Kollegen danke ich Mamta, die mir vor allem zu Beginn meiner Arbeit bei Fragen im Labor zur Seite stand und für den Basiskurs in der indischen Küche. Lothar danke ich für seine uneingeschränkte Hilfe und Diskussionen vor allem bei schwierigen Fragen. Bei Ion möchte ich mich dafür bedanken, dass ich von ihm die zellbiologischen Methoden lernen konnte und ein stets offenes Ohr und Diskussionsbereitschaft in vielen Fragen. Ich danke allen jetzigen und früheren Bürokollegen, vor allem Katja und Ion für ihre Hilfe bei fachlichen Fragen und auch viele lustige Momente im „PCR-Office“.

Außerdem danke ich allen anderen jetzigen und früheren Kollegen der Arbeitsgruppe Ahmadian, sowie allen Mitarbeitern des Instituts für die Hilfe und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich möchte mich bei Belen Vaz, Matthew Burton und Luc Brunsveld bedanken für die Synthetisierung von Peptiden und gute Zusammenarbeit.

Ich möchte Hannes, meinen Geschwistern und Freunden danken, die im Hintergrund ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben, vor allem Hannes und meinem Bruder Arno, die mir in Form von Korrekturlesen und bei Formatierungsfragen zur Seite standen.

Zuletzt möchte ich mich insbesondere bei meinen Eltern bedanken, die mich stets gefördert und in allen Entscheidungen unterstützt haben.