

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

# **Charakterisierung der Rekrutierungsdomäne der kleinen Rho-GTPasen RhoA und RhoC**

zur Erlangung des akademischen Grades  
*Doctor medicinae* (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tilman Hans Huppertz  
aus Würzburg

Gutachter:      1. Priv.-Doz. Dr. Th. Adam  
                         2. Prof. Dr. rer. nat. H. Karch  
                         3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Sturm

Datum der Promotion: 18.09.2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1</b>	<b>Shigellose.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2</b>	<b>Die Virulenzfaktoren von <i>Shigella</i> sind auf einem Plasmid und chromosomal kodiert.....</b>	<b>9</b>
<b>1.3</b>	<b>Invasion als wesentlicher Schritt der Pathogenese von <i>Shigella</i> .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4</b>	<b>Molekulares Zusammenspiel von humanen und bakteriellen Faktoren bei der Invasion von <i>Shigella</i> in Kolonepithelzellen.....</b>	<b>12</b>
<b>1.5</b>	<b>Intra- und interzelluläre Motilität von Shigellen .....</b>	<b>16</b>
<b>1.6</b>	<b>Die Zellinvasion ist abhängig von den kleinen Rho-GTPase.....</b>	<b>16</b>
1.6.1	Rho-GTPasen.....	16
1.6.2	Familie der Rho-GTPasen.....	17
1.6.3	RhoA- und RhoC-Beteiligung im Rahmen von Erkrankungen .....	17
1.6.4	Rolle der Rho-GTPasen auf zellbiologischer Ebene.....	18
1.6.4.1	Rho reguliert Fokaladhäsionen und Stressfilamente.....	18
1.6.4.2	Rho beeinflusst Zell-Zell-Kontakte.....	19
1.6.4.3	Zell-Motilität und Migration werden von Rho reguliert .....	19
1.6.4.4	Rho bei der Zytokinese.....	20
1.6.4.5	Rho bei der Transkriptionskontrolle.....	20
1.6.5	Aufbau, Struktur und Regulation der Rho-Isoformen .....	20
1.6.5.1	Regulationsfaktoren und Interaktionspartner von RhoA und RhoC .....	22
1.6.6	Rho Funktion bei Shigelleninvasion .....	23
<b>1.7</b>	<b>Fragestellung .....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialliste, Geräte, Kits.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2</b>	<b>DNA Präparation .....</b>	<b>31</b>
2.2.1	Miniprep.....	31
2.2.2	Maxiprep.....	31
2.2.3	PCR – Polymerase Chain Reaction .....	31
2.2.4	Extraktion der mittels PCR gewonnenen DNA.....	32
2.2.5	Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA.....	33
2.2.6	DNA Präzipitation und anschließendes Waschen.....	33
2.2.7	DNA Restriktion .....	33
2.2.8	Dephosphorylierung .....	34

2.2.9	Agarosegele .....	34
2.2.10	Reinigung von DNA über Agarosegele und anschließende Gelextraktion .....	35
2.2.11	Messung der DNA Konzentration.....	36
2.2.12	Hybridisierung.....	36
2.2.13	Phosphorylierung doppelsträngiger DNA.....	36
<b>2.3</b>	<b>Klonierung.....</b>	<b>37</b>
2.3.1	Ligation .....	37
2.3.2	Kompetente Bakterienzellen .....	37
2.3.2.1	Herstellung elektrokompenter Bakterien .....	37
2.3.2.2	Herstellung chemisch kompetenter Rubidium/Chlorid-Bakterien.....	38
2.3.3	Transformation elektrokompenter Bakterien (Elektroporation) .....	38
2.3.4	Transformation mit Rubidium/Chlorid-Bakterien .....	39
2.3.5	Asservieren von Klonen .....	39
2.3.6	Screening mit Sonden-Hybridisierung.....	39
2.3.6.1	Herstellung der Hybridisierungssonde.....	40
2.3.6.2	Hybridisieren.....	40
<b>2.4</b>	<b>Sequenzierung.....</b>	<b>41</b>
2.4.1	Herstellung des Sequenziergels.....	42
2.4.2	Analyse der Daten mit HUSAR .....	42
<b>2.5</b>	<b>Expression und Darstellung der Proteine mit His-TAG.....</b>	<b>42</b>
2.5.1	Fermentierung .....	42
2.5.2	Gelelektrophorese zur Proteinauftrennung .....	43
2.5.3	Serva Blue G Färbung.....	43
2.5.4	Western Blot (Tank Blot) .....	43
2.5.5	Immundetektion nach Western Blot .....	44
2.5.6	Amidoschwarz-Färbung von Proteinblots .....	44
<b>2.6</b>	<b>Oligonukleotide.....</b>	<b>44</b>
<b>2.7</b>	<b>Verwendete Bakterienstämme .....</b>	<b>46</b>
<b>2.8</b>	<b>Eingesetzte Plasmide .....</b>	<b>46</b>
<b>2.9</b>	<b>Puffer und Medien .....</b>	<b>47</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>55</b>
<b>3.1</b>	<b>Konstrukte mit RhoA- und RhoC-Rekrutierungsdomäne.....</b>	<b>56</b>
3.1.1	Herstellen des Inserts mittels PCR.....	56
3.1.2	Herstellen des Klonierungsvektors pUC19 .....	58
3.1.3	Ligation und Transformation.....	59
3.1.4	Suche nach Klonen mit dem gewünschten Insert mittels Sonden-Hybridisierung....	61

3.1.5	Sequenzierung .....	61
3.1.6	Umklonierung in den Expressionsvektor pQE30.....	63
3.1.6.1	Präparation des Vektors .....	63
3.1.6.2	Präparation des Inserts.....	63
3.1.6.3	Ligation, Transformation und PCR-Kontrolle der hergestellten Konstrukte .....	64
<b>3.2</b>	<b>Konstrukt mit PDZ-Domäne.....</b>	<b>65</b>
3.2.1	Herstellen des Inserts.....	65
3.2.2	Herstellen des Vektors .....	65
3.2.3	Ligation, Transformation und PCR-Kontrolle .....	65
3.2.4	Umklonierung in Expressionsvektor pQE30.....	66
<b>3.3</b>	<b>Klonierung der Negativkontrolle.....</b>	<b>68</b>
3.3.1	Herstellen des Inserts.....	68
3.3.2	Herstellen des Vektors .....	68
3.3.3	Ligation, Transformation und PCR-Kontrolle .....	68
<b>3.4</b>	<b>Klonierung der RhoA- und RhoC-Konstrukte mit CAAX-Domäne .....</b>	<b>69</b>
3.4.1	Herstellen des Inserts.....	69
3.4.2	Herstellen eines Vektors .....	70
3.4.3	Ligation, Transformation und Kontrolle mit PCR.....	70
3.4.4	Sequenzierung .....	70
3.4.5	Umklonierung in den Expressionsvektor pQE30.....	71
<b>3.5</b>	<b>Expressionsexperimente mit allen hergestellten Konstrukten in zwei Expressionsstämmen .....</b>	<b>71</b>
<b>3.6</b>	<b>„Potentielle“ Bindungspartner von RhoA und RhoC aus den Overlay-Assays.....</b>	<b>76</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>84</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion der Gesamtstrategie.....</b>	<b>84</b>
4.1.1	Einleitung.....	84
4.1.2	Rekrutierungsdomäne .....	84
4.1.3	CAAX-Domäne .....	85
4.1.4	Herstellung von Rho-Konstrukten .....	85
4.1.5	Mögliche Bindungspartner von Rho .....	87
<b>4.2</b>	<b>Diskussion von Material und Methoden.....</b>	<b>88</b>
4.2.1	His-tag .....	88
4.2.2	Proteinkinase A (PKA, cAMP-abhängige Proteinkinase)-Site .....	88
4.2.3	Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP).....	88
4.2.4	PDZ-Domäne.....	89
4.2.5	Plasmidpräparation .....	89
4.2.6	Hybridisierung.....	89

4.2.7	Klonierung .....	90
4.2.8	Transformation .....	91
4.2.9	Expression.....	91
<b>4.3</b>	<b>Diskussion der Overlay- Assay- Ergebnisse .....</b>	<b>93</b>
4.3.1	Interaktionspartner von RhoA und RhoC .....	94
4.3.2	Interaktionspartner von RhoA, aber nicht RhoC .....	95
4.3.3	Interaktionspartner von RhoC, aber nicht RhoA .....	100
4.3.4	Zusammenfassende Beurteilung.....	102
<b>4.4</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>104</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGSANHANG.....</b>	<b>111</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENANHANG .....</b>	<b>113</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>115</b>

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Dr. Ulf B. Göbel danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut wissenschaftlich zu arbeiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Thomas Adam für die Überlassung des Themas und die Betreuung meiner Arbeit in seinem Labor. Er unterstützte diese Arbeit mit vielen wertvollen Anregungen und konstruktiver Kritik.

Danken möchte ich zudem unserem Kooperationspartner in der Proteinstrukturfabrik, Herrn Dr. Hedrik Weiner, für die hervorragende und produktive Zusammenarbeit sowie Herrn Dr. Konrad Büssow der als Arbeitsgruppenleiter in der Proteinstrukturfabrik diese Zusammenarbeit ermöglichte.

# 1 Einleitung

## 1.1 Shigellose

Shigellen sind Erreger einer Gastroenteritis und der klassischen bakteriellen Dysenterie (Ruhr), die vor allem in Entwicklungsländern endemisch auftritt. In Deutschland wurden 2004 1149 Fälle (Epidemiologisches Bulletin, RKI, 2. September 2005) [221] und 2005 1168 Fälle (RKI, Epidemiologisches Bulletin vom 31. März 2006) gemeldet, wobei Infektion, Erkrankung und Tod meldepflichtig sind. Weltweit treten geschätzte 163,2 Millionen Fälle von Shigellose auf, von denen ca. 1,1 Millionen Fälle tödlich verlaufen. Hierbei tragen Kinder bis zum 5. Lebensjahr die Hauptlast mit 69 % aller Infektionsfälle und 61 % aller Todesfälle [142].

Die Inkubationszeit beträgt ein bis sieben Tage, mit einer durchschnittlichen Inkubationszeit von drei Tagen, wobei die geringe Dosis von unter 100 Bakterien zur Infektion ausreicht [68]. Die Infektion erfolgt in der Regel als Schmierinfektion oder über kontaminierte Lebensmittel und Trinkwasser [15].

Klinische Zeichen einer Shigellendysenterie sind starke krampfartige Bauchschmerzen, muköse, blutige oder wässrige Diarrhoe, Fieber und Erbrechen [67, 166]. Besonders schwer betroffen sind Kleinkinder und alte Patienten. Bei sonst gesunden und gut ernährten Patienten ist die Shigellose selbstlimitierend und dauert nicht länger als sieben Tage.

Im Rahmen einer Infektion mit dem Ruhrerreger kann es zu lokalen Komplikationen wie toxischem Megakolon, intestinaler Obstruktion [16], Perforationen des Kolons oder zu systemischen Komplikationen wie Bakteriämie, metabolischen Störungen, zentralnervösen Störungen und dem Hämolytisch-Urämischen Syndrom kommen. Diese treten vor allem bei Kindern und Kleinkindern in Entwicklungsländern auf [15]. Nach Infektion besonders mit *S. flexneri* kann ein Reiter-Syndrom auftreten [76].

Erstmals beschrieben wurden Shigellen 1898 von dem japanischen Bakteriologen Kiyoshi Shiga [241]. Von diesen fakultativ anaeroben, unbegeißelten, Gram-negativen Stäbchen gibt es vier Serotypen: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*. Für eine Infektion beim Menschen sind vor allem *S. flexneri* und *S. sonnei* verantwortlich. Die schwerwiegendsten Infektionen werden von *S. dysenteriae* verursacht, welches auch das Shiga-Toxin produziert und epidemisch auftreten kann [197].

Neuere Untersuchungen des Shigellengenoms haben zu einer neuen Einordnung der Shigellen als „Cluster“ innerhalb der *E. coli*-Stämme geführt. Insgesamt haben sich verschiedene Shigellencluster siebenmal aus *E. coli* entwickelt [210].

Die meisten Untersuchungen zur Pathogenese wurden an *S. flexneri* durchgeführt, lassen sich aber vermutlich auch auf die anderen Serotypen übertragen.

Eine Infektion mit Shigellen erfolgt nach Inokulation einer geringen Menge Bakterien (10-200



Bakterien) [68]. Diese geringe Infektionsdosis ist ausreichend, da die Bakterien kurzzeitig säureresistent sind und den Magen unbeschadet passieren können [15]. Dies bedeutet, dass eine Vermehrung der Bakterien in Lebensmitteln oder im Trinkwasser nicht nötig ist, sondern es zu einer direkten fäkal-oralen Übertragung von Mensch zu Mensch kommen kann.

Anschließend vermehren sich die Shigellen im Dünndarm, ehe eine wesentlich höhere Zahl an Shigellen in das Kolon gelangt [101]. Die primäre Infektion der Dickdarmschleimhaut erfolgt im Rektosigmoid. Von hier aus kommt es zu einer retrograden Ausbreitung der Infektion, die in schweren Fällen bis zur Ileozökal-Klappe reichen kann [252].

Histologisch wird die Shigellose als eine entzündliche Erkrankung des Kolons beschrieben. Auf der luminalen Seite des befallenen Kolonepithels wird ein hämorrhagisches Exsudat beobachtet, das abgestoßene Epithelzellen, neutrophile Granulozyten, Erythrozyten, Fibrin sowie massenhaft Shigellen enthält. Die darunterliegende Epithelschicht zeigt ausgeprägte Nekrosen und Erosionen, oft sind große Epithelflächen abgelöst. Ulzera treten bereits in sehr frühen Stadien der Erkrankung, vor allem im Bereich der schleimhautassoziierten Lymphfollikel (Peyer-Plaques) auf. Die befallene Darmschleimhaut ist massiv mit neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen infiltriert und erscheint ödematös und hyperämisch. Die Interzellulärspalten zwischen den Epithelzellen sind verbreitert und werden durch transmigrierende Leukozyten noch stärker aufgeweitet. Die Kolonepithelzellen selbst zeigen häufig Degenerationszeichen. Shigellen sind in den Interzellulärspalten, in Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten zu sehen. Innerhalb der Epithelzellen sind sie sowohl in Vakuolen eingeschlossen, als auch frei im Zytoplasma zu finden [164, 165].

## **1.2 Die Virulenzfaktoren von *Shigella* sind auf einem Plasmid und chromosomal kodiert**

Die Pathogenitätsfaktoren von *Shigella* werden auf einem Virulenzplasmid sowie im Genom kodiert. Das Plasmid ist 200 kb lang, wobei ein 31 kb langer Abschnitt für die Infektiosität und Pathogenität von *Shigella* verantwortlich ist [169, 224, 233]. Dieser Abschnitt umfasst 34 Gene und kann in zwei Regionen eingeteilt werden, deren Gene in entgegengesetzter Richtung abgelesen werden [36]. Die Pathogenitätsfaktoren auf dem Plasmid umfassen Faktoren, die für die Invasion in Epithelzellen zuständig sind (*Invasion plasmid antigen IpaA-D*; *Invasion plasmid Gene IpgA-C* und *VirA*), solche, die für die inter- und intrazelluläre Motilität benötigt werden (*IcsA*, *IcsB*) und ein Typ III-Sekretionssystem (*membrane expression of invasion plasmid antigen, mxi-Locus* und *surface presentation of Ipa antigens, spa-Locus*). Auf dem Plasmid befinden sich außerdem Regulationsfaktoren (*VirF*, *VirB*) für die Expression der oben genannten plasmidkodierten Faktoren [36, 63, 103, 129, 151, 203, 276-278]. Zudem befindet sich auf dem Plasmid noch eine Vielzahl weiterer Gene bzw. möglicher Gene, deren Funktion bislang noch nicht geklärt ist [36, 278].

Ein Teil der genomischen Pathogenitätsfaktoren werden auf vier Pathogenitätsinseln (SHI-0 bis SHI-3) kodiert, die bei den jeweiligen *Shigella*-Spezies unterschiedlich lokalisiert und ausgeprägt sind [120, 129, 192, 288, 302]. Auf der *Shigella*-Pathogenitätsinsel 0 (SHI-0) befinden sich verschiedene Faktoren, die die Lipopolysaccharid (LPS)-Synthese kontrollieren [103, 184, 192, 203]. SHI-1 kodiert für die Proteasen Pic und SigA sowie das Enterotoxin ShET1 [105, 192, 302] und auf SHI-2 befindet sich Aerobactin, ein virulenzassoziiertes Eisentransportsystem [149, 184, 189]. Weitere chromosomale Pathogenitätsfaktoren kommen außerhalb der Pathogenitätsinseln des *Shigella*-Genoms vor. Dazu gehören VirR (auch Histone-like nucleoid structuring Protein (H-NS)), ein temperatursensibler Regulator für die Plasmid-Regulationsfaktoren VirB und VirF [170], der im Zusammenspiel mit temperaturinduziertem DNA-Supercoiling über die Bindung an VirF und VirB deren Aktivität bei 30 °C inhibiert [63, 203, 267] und der OmpR-envZ-Locus, ein osmolaritätssensibler Regulator der plasmidkodierten Vir Gene [18, 19, 62, 63].

Ebenfalls chromosomal kodiert wird das nur bei *S. dysenteriae* vorkommende Shiga-Toxin, ein Zytotoxin, das durch Gefäßschädigung zu einer Intensivierung der Koloninflammation mit Blutbeimengung im Stuhl führt [78, 172, 203, 302].

Die Virulenzfaktoren werden nicht konstitutiv exprimiert, sondern durch bestimmte Stimuli aktiviert. So werden sie bei 37 °C, bei einer Erhöhung der Osmolarität sowie bei Zellmembrankontakt eingeschaltet [169, 170, 174, 233]. Die Expression der Ipa-Invasine und damit die Invasivität der Shigellen sind zudem abhängig von dem Wachstumsstadium der Bakterien. Besonders hohe Titer werden von Shigellen während ihrer exponentiellen Wachstumsphase sezerniert [186].

### **1.3 Invasion als wesentlicher Schritt der Pathogenese von *Shigella***

Das Eindringen der Shigellen in Kolonzellen ist der wichtigste Schritt in der Pathogenese der Dysenterie, da es erst durch die Invasion zu den für die Dysenterie typischen Symptomen kommt. *Shigella* kann die Epithelzellen des Kolons nicht von apikal, sondern nur von basolateral infizieren, sodass es zunächst zu der basolateralen Membran gelangen muss [185].

Hierzu benutzt *Shigella* M-Zellen, die oberhalb des Follikel-assoziierten Epithels der Peyerschen Plaques vorkommen. M-Zellen sind endozytische Zellen, die Material von Proteinen bis zu ganzen Protozoen aus dem Kolonlumen aufnehmen, um es an das darunter liegende lymphatische Gewebe, besonders an Makrophagen, weiterzuleiten. Diese präsentieren das Material anderen Immunzellen, wodurch eine spezifische Immunantwort ausgelöst werden kann [190, 227, 228, 282] (Abb. 1, S. 12).

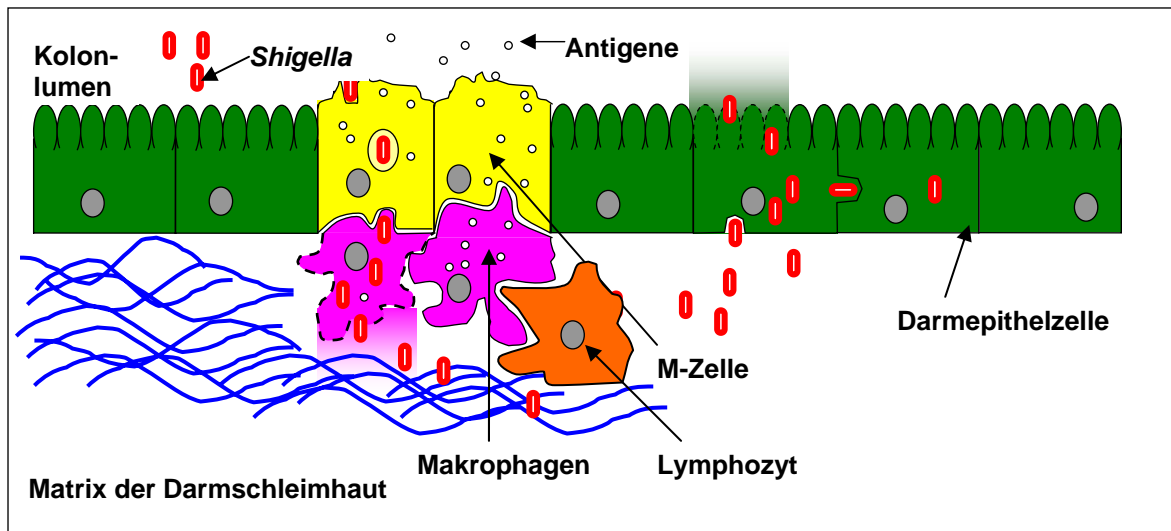
Shigellen werden, nach ihrem Transport durch die M-Zellen, ebenfalls von Makrophagen phagozytiert, sind jedoch in der Lage, das Phagosom zu lysieren und sich im Zytoplasma zu vermehren [225]. Anschließend kommt es zum Zelltod der Makrophagen, wobei es mehrere

Signalwege zu geben scheint, die zum Zelltod führen. Ein Signalweg führt zur Apoptose, ein anderer zur Nekrose der Zellen [261, 316, 317]. Bei dem Apoptoseweg spielt das Shigellenprotein IpaB eine wichtige Rolle, da es an Caspase1 (Casp1, auch Interleukin-1 $\beta$ -Converting-Enzyme, ICE), einen Bestandteil einer Apoptosekaskade bindet und diesen aktiviert [107, 108, 265]. Eine IpaB Mutante, die kein IpaB produziert, ist im Gegensatz zu IpaC und IpaD Mutanten nicht makrophagentoxisch [106]. Andere Signalwege führen zur Zellnekrose. Diese Wege werden über generelle Faktoren Gram-negativer Bakterien wie Lipid A ausgelöst und sind unabhängig von *Shigella*-spezifischen Faktoren [261].

Die bei der Apoptose freiwerdenden proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und IL-18, die von Casp1/ICE aktiviert werden, bewirken eine Aggravation der Infektion [226, 229]. Dabei wird das Gewebe aufgelockert und die Shigellen finden leichter Zugang zu der basolateralen Membran benachbarter Enterozyten [46, 316, 317]. Zudem locken die Interleukine neutrophile Granulozyten an, die transepithelial in das Darmlumen einwandern [204]. Dies führt initial zu einer Exazerbation der Infektion, da *Shigella* jetzt leichter über das geschädigte Epithel an die basolaterale Membran gelangen kann [205]. Im weiteren Verlauf der Infektion sind die neutrophilen Granulozyten allerdings für die Überwindung der Infektion von zentraler Bedeutung, da sie *Shigella* mit Hilfe einer extrazellulären Falle (sog. „Neutrophil Extracellular Trap“, NET), die aus DNA als Netzstoff und verschiedenen assoziierten Proteinen besteht, abtöten können [33, 162]. In diesem Zusammenhang ist die Neutrophilenelastase (NE) als Bestandteil der NET wichtig, da sie in der Lage ist, die Shigellen-Virulenzfaktoren IpaA, IpaB, IpaC und IcsA durch Degradation zu neutralisieren [290].

Eine interessante Rolle bei den Entzündungsprozessen, die *Shigella* auslöst, spielt das auf der Pathogenitätsinsel SHI-2 gelegene ShiA-Protein [184]. Es ist ein entzündungshemmendes Protein, das von *Shigella* produziert wird und die Entzündungsreaktion des Wirtsorganismus herunter regulieren kann, was sich bei ShiA-Überexpression durch einen verminderten Einstrom von neutrophilen Granulozyten und T-Zellen und geringere Zytokinkonzentrationen bemerkbar macht [121, 122].

Die Invasion in Kolonepithelzellen über deren basolaterale Membran erfolgt durch einen rezeptorvermittelten Macropinocytose-ähnlichen Prozess, bei dem bakteriellen und Wirtszell-Faktoren eine große Bedeutung zukommt [1, 230]. Die Invasion unterscheidet sich allerdings von den beiden bisher bekannten physiologischen Phagozytostypen, bei denen sich entweder eine becherförmige Vorwölbung bildet oder die Membran ins Zellinnere einsinkt und so eine Vakuole entsteht. Die bei der Shigelleninvasion auftretenden Membranveränderungen sind dagegen durch ein kräftiges, unspezifisches Kräuseln gekennzeichnet, das mit der Wellenbildung eines ins Wasser fallenden Steines verglichen wurde [35]. Diese Membranveränderungen werden durch eine komplexe molekulare Interaktion von *Shigella*-Proteinen mit Wirtszellfaktoren hervorgerufen, die im Folgenden beschrieben wird.



**Abb. 1** Invasion von *Shigella* vom Kolonlumen über M-Zellen in die Darmepithelzellen. *Shigella* kann in die Enterozyten nur über die basolaterale Seite eindringen, nicht direkt vom Kolonlumen aus.

#### 1.4 Molekulares Zusammenspiel von humanen und bakteriellen Faktoren bei der Invasion von *Shigella* in Kolonepithelzellen

Zur Vorbereitung der Invasion bringt *Shigella* eigene bakterielle Produkte in die Wirtszelle ein. Das Ausschleusen dieser für die Invasion nötigen Proteine aus Shigellen erfolgt über ein bakterielles Typ III-Sekretionssystem (TTSS), das auch von anderen Bakterien wie Salmonellen oder Yersinien verwendet wird. Dieses, in den *mxi*- und *spa*-Genen auf dem 31 kb Pathogenitätsfragment des Plasmids kodierte Sekretionssystem, ist bei *Shigella* als dreiteilige Struktur mit einer Nadel zur Penetration durch die bakterielle Membran, einem Hals und einer Aufblähung am Ende, die vermutlich im bakteriellen Zytoplasma liegt, beschrieben worden [23]. Die Nadel hat eine Länge von 50 nm, mit einem äußeren Durchmesser von 7 nm und einem Innendurchmesser von 2-3 nm [24, 53]. Die Aktivierung dieses TTSS erfolgt unter anderem bei Kontakt des Bakteriums mit lipid-rafts, cholesterin- und sphingolipidreichen Mikrodomänen der humanen Zellmembran [273].

Die in die Wirtszelle geschleusten bakteriellen Proteine induzieren in der Wirtszelle bei der Invasion einen Membrankomplex, der in zwei Regionen eingeteilt werden kann. Einen Bereich „unterhalb“ des infizierenden Bakteriums mit parallel zur Membran verlaufenden Aktinfasern und einen zweiten Bereich „seitlich“ des Bakteriums, der durch senkrecht zur Membran verlaufende Aktinfasern vorgewölbt wird und sich am Ende der Invasion zu einer Vakuole schließt. Wie wichtig die Rolle von Aktin für die Invasion von *Shigella* ist, wurde bereits 1979 beschrieben, als durch Inhibition der Aktinpolymerisation die Invasionseffizienz stark vermindert oder sogar aufgehoben werden konnte [102]. Die „seitlich“ und „oben“ liegenden, sich vorwölbenden Bereiche werden auch als „Ruffles“ bezeichnet, während die „unterhalb“ liegenden Bereiche auf Grund ihrer Becherform als „Cup“ bezeichnet werden.

Zunächst zu den bakteriellen Faktoren, die für die Invasion bedeutend sind. Dies sind vor allem

die bereits erwähnten plasmidkodierten Proteine IpaA-IpaD und VirA. Shigellen mit Mutationen in den IpaB-, IpaC- und IpaD-Genen sind invasionsinsuffizient, während IpaA-Mutanten eine herabgesetzte Invasionseffizienz haben [173, 233, 268] und bei IpgD-Mutanten der Invasionskomplex morphologisch verändert ist [193]. Die übrigen Proteine des Plasmids sind für die Invasion nicht essentiell.

IpaB und IpaC binden intrabakteriell beide an IpgC, ein molekulares Chaperon und werden so, wahrscheinlich über eine Konformationsänderung, inaktiviert [175]. Nach Sekretion in das extrabakterielle Milieu bilden IpaB und IpaC einen Komplex, der mit Hilfe des beschriebenen Typ III-Sekretionssystems in die Wirtszellmembran gebracht wird [175]. Dieser Komplex bildet in Erythrozytenmembranen Poren von ca. 2,5 nm (25A), die zur Hämolyse führen [23]. Der Komplex könnte bei der Invasion an der Spitze des Typ III-Sekretionssystems sitzen und bei Kontakt mit der Wirtszellmembran in sie eindringen. Damit gibt es einen Weg, auf dem weitere bakterielle Proteine gezielt in die Zelle geschleust werden könnten.

IpaB und IpaC haben neben der Porenbildung noch weitere Funktionen bei der Shigelleninvasion. So wurden Latexbeads, auf denen der Komplex immobilisiert wurde, in HeLa-Zellen aufgenommen [176]. IpaB bindet zudem an Oberflächenrezeptoren wie  $\alpha 5$ - $\beta 1$ -Integrin [284] und CD44 (Cluster of Differentiation), einen Hyaluronrezeptor [247], die die Invasionseffizienz von *Shigella* beeinflussen. IpaB vermittelt damit die Möglichkeit der Interaktion mit der Wirtszelle und der Steuerung von zellulären Prozessen. IpaC scheint für die Ausbildung der „Ruffles“ um *Shigella* bei der Invasion eine besondere Rolle zu spielen, da es alleine ausreichend ist, um Filopodien- und sich anschließende Lamellopodienbildung in HeLa-Zellen hervorzurufen. Filopodien sind fingerförmige Membranvorstülpungen, Lamellopodien sind pseudopodienartige Membranvorstülpungen, die breiter sind als Filopodien. Rekombinant hergestellt und mikroinjiziert führt IpaC zu ausgeprägter Filopodienbildung, die bei gleichzeitiger Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen den C-Terminus von IpaC blockiert wird. Ein zellulärer Interaktionspartner für diese Veränderungen könnte die kleine Rho-GTPase Cdc42 sein, die in konstitutiv aktiver Form ähnliche Veränderungen hervorruft. Außerdem konnte die Filopodienbildung durch Blockierung der Cdc42-Interaktionsdomäne mit einem Peptid verhindert werden [269].

Zwei weitere Shigellenproteine, die bei der Invasion eine Rolle spielen, sind IpaA und IpgD, die ebenfalls von aktivierten Shigellen sezerniert werden und über die von IpaB und IpaC gebildete Pore in das Zellinnere gelangen können. Sie bilden nach der Sekretion ebenfalls einen Komplex miteinander.

IpgD hat ähnlich wie IpaB ein intrabakterielles Chaperon, IpgE, das für eine vollständige und erfolgreiche Sekretion nötig ist. Bei Infektion von Zellen mit IpgD-Mutanten ist die Invasionseffizienz nicht erniedrigt, allerdings ist der Invasionskomplex verändert [5, 193]. IpgD fungiert als eine Phosphoinositidphosphatase, die Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat [PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>] zu Phosphatidylinositol 5-monophosphat [PtdIns(5)P] dephosphoryliert. Dies ist

für die Invasion von *Shigella* signifikant, da eine Abnahme von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> auch bei der Bildung von Phagozytosevakuolen beobachtet werden kann, die nach Internalisation zu PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-freien Vakuolen führt. Zudem sind PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> wichtige Regulatoren des Aktinzytoskeletts. Die Abnahme ihrer Konzentration in der Vakuole geht mit einem Rückbau des die Vakuole umgebenden Aktinzytoskeletts einher [26, 35, 48, 195]. Die Expression von IpgD führt so durch eine Abnahme der Haltekräfte zu Bläschenbildung an der Membran („membrane blebbing“) [194], ein früh in der *Shigella*-Invasion zu beobachtendes Phänomen.

Auch die Funktion von IpaA bei der Invasion konnte mit IpaA-Mutanten gezeigt werden, deren Invasivität ein Zehntel im Vergleich zu Wildtyp-Shigellen betrug. Die Bildung des Invasionskomplexes ist zudem morphologisch verändert und bleibt in einem unorganisierten „Wellenbildungsstadium“ stehen [268]. IpaA bindet direkt an Vinculin und bildet einen Komplex, der Aktinfasern depolymerisiert und damit für die Reifung des Invasionskomplexes durch eine Aktindepolymerisation unterhalb des eindringenden Bakteriums eine Rolle spielen könnte [28]. Darüber hinaus ist IpaA für die Rekrutierung von einigen Proteinen wie Vinculin und alpha-Aktinin an die Wirtszellmembran verantwortlich, auf deren Funktion noch später eingegangen wird [268].

Das *Shigella*-Protein VirA kann an Tubulin Hetero-Oligomere binden und zu Mikrotubulidestabilisation führen [307], die wiederum über eine Rac1-Aktivierung zu Aktinpolymerisation führen könnte. Da die VirA-Spiegel erst bei Invasionsbeginn durch Transkriptionssteigerung erhöht werden, spielt es vermutlich erst zu einem späteren Zeitpunkt der Invasion eine Rolle. Dies ist auch mit der Beobachtung vereinbar, dass das zu VirA homologe Protein EspG aus enteropathogenen *E.coli* (EPEC) mit der GTPase RhoA interagiert, die ebenfalls erst im Verlauf der Invasion rekrutiert wird [168].

Die beschriebenen Shigellenproteine interagieren mit verschiedenen Wirtszellproteinen und beeinflussen damit das Zytoskelett so, dass *Shigella* in die Zelle aufgenommen wird. Diese Vorgänge werden im Folgenden dargestellt. Wie oben bereits beschrieben, spielen bei der Invasion Alterationen des Aktinzytoskeletts eine zentrale Rolle. Ein Großteil der in den Invasionskomplex rekrutierten humanen Proteine sind deshalb als Zytoskelett-Regulatoren bekannt. Eine prominente Rolle als Zytoskelett-Regulatoren haben die kleinen Rho-GTPasen RhoA und RhoC. Werden sie durch Inhibition mit dem Toxin C3 gehemmt, ist die Invasionseffizienz von *Shigella* stark vermindert und der Invasionskomplex morphologisch verändert. Es kommt nicht mehr zur Ausbildung der langen Aktinfaserbündel, die sich in den Membranprotrusionen befinden [2, 285]. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die bei Rho-Inhibition verminderte Ezrinakkumulation an der Membran [66]. Ezrin gehört zur Gruppe der Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) -Proteine, die für die Verankerung von F-Aktin-Bündeln in der Membran verantwortlich sind [155]. Zellen mit einem dominant-negativen Ezrin-Allel zeigen bei der Shigelleninvasion einen ähnlichen Phänotyp wie bei Rho-Inhibition [246]. Dieser Proteinkomplex könnte also in den Protrusionen für eine Verankerung der Aktinbündel an der Membran verantwortlich sein und so die Bildung dieser Vorstülpungen ermöglichen. Zwei

andere Proteine die in den Invasionskomplex rekrutiert werden, sind T-Plastin und Myr5. T-Plastin ist ein aktinbindendes Protein, das Aktinfilamente in Bündeln zusammenhält und damit für die Stabilität der Protrusionen notwendig ist [1]. Myr5 ist ein Klasse IX-Myosin, das über eine GTPase-aktivierende Domäne eine inhibitorische Funktion auf Rho hat und dem deshalb eine regulatorische Funktion zukommen könnte [97].

Weitere für die Invasion wichtige Proteine sind Vinkulin [28, 284], Talin [284],  $\alpha$ -Actinin, Cortactin, die GTPasen Cdc42 und Rac1, der Aktinnukleationskomplex Arp2/3 und die Kinasen Src, Crk und Arg/Abl.

Vinkulin ist ein aktinbindendes Protein, das bei Aktivierung Bindungsstellen für Talin und  $\alpha$ -Actinin freigibt [255]. Für Vinkulin ist zudem eine direkte Interaktion mit IpaA beschrieben, die Vinkulin zu einem aktindepolymerisierenden Protein aktiviert [28, 268]. Dies ist interessant, da Vinkulin es damit ermöglicht, die Aktinpolymerisation unterhalb der „Cup“ zu verhindern. Talin, das ebenfalls Aktin bindet, könnte mit seinen vielen Proteinbindungsstellen (u.a. für Vinkulin,  $\beta$ -1-Integrin, Fokale-Adhäsions-Kinase FAK) eine zentrale Schaltrolle bei der Komplexbildung in der Cup, unterhalb des Bakteriums übernehmen. Vinkulin und Talin akkumulieren zusammen mit  $\beta$ -1-Integrin an der Invasionsstelle von *Shigella* [284].

Cortactin ist ein F-Aktin-bindendes Protein, das von der Kinase Src aktiviert wird und an die Membran rekrutiert werden kann. Dort kommt es zur Interaktion mit Crk, einer weiteren Kinase, die für die Membranlokalisierung von Cortactin notwendig zu sein scheint. Der Komplex aus Cortactin und Crk kann dann vermutlich über eine Cortactin-Bindungsstelle für den Aktinnukleationskomplex Arp2/3 eine Aktinnukleation bewirken [27, 270, 286, 287]. Dieser Komplex bildet die Basis für die Aktinpolymerisation neben *Shigella*.

Die beiden GTPasen Cdc42 und Rac1 werden vermutlich von der Arg/Abl-Kinase aktiviert, die unter anderem von Wachstumsfaktorrezeptoren aktiviert wird und deshalb möglicherweise in einer von *Shigella* ausgelösten Signalkaskade eine Position einnehmen könnte [207]. Bei Arg/Abl-Kinase defekten Zellen kommt es zu keiner effizienten Invasion von Shigellen in die Zellen, allerdings kann die Invasivität durch konstitutiv aktives Cdc42 bzw. Rac1 wiederhergestellt werden [37]. Cdc42 ist bei der Invasion für die Ausbildung der filopodienartigen Vorstülpungen notwendig, während Rac1 für die anschließende Verbindung zwischen den Vorstülpungen zur Vakuolenbildung zuständig ist [187, 269].

So sind eine Vielzahl von bakteriellen und humanen Faktoren, die bei der Invasion eine Rolle spielen, bekannt, das genaue Zusammenspiel ist allerdings bisher noch nicht geklärt. *Shigella* kann sich aus der entstandenen Vakuole, die die Zelle als Autophagosom bildet, um den Fremdkörper zu verdauen, befreien und sich dann im Zytoplasma vermehren. Hierzu ist der Virulenzfaktor IcsB notwendig, wie zunächst in Experimenten mit IcsB-Mutanten gezeigt wurde [106, 199]. IcsB bindet an das eigene Shigellenprotein VirG und verhindert damit, dass VirG an das zelluläre Autophagieprotein Atg5 bindet und damit eine Autophagiekaskade aktiviert, die zur Lyse des Bakteriums führen würde [200].

## 1.5 Intra- und interzelluläre Motilität von Shigellen

Sobald *Shigella* in die Kolonepithelzellen eingedrungen ist, kann sich das Bakterium innerhalb des Zellverbandes von Zelle zu Zelle bewegen, ohne in den Extrazellularraum zu gelangen. Dies bedeutet, dass *Shigella* nicht in Kontakt mit der Immunabwehr kommt. Zur Fortbewegung in der Zelle benutzen Shigellen, die eigentlich amotile Bakterien sind, das Aktinzytoskelett der Wirtszelle. Das äußere Membranprotein IcsA von *Shigella*, das vor allem am hinteren Bakterienpol lokalisiert ist, ist dabei mit seiner  $\alpha$ -Domäne für die Aktinnukleation und -polymerisation verantwortlich [17, 259]. IcsA bindet das New-Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (N-WASP) und aktiviert es, was wiederum zu einer Aktivierung des Aktinnukleationsproteins Arp-2/3 führt [71]. Dieser Aktivierungsweg ist also unabhängig von den kleinen GTPasen, die ihn aber eventuell beschleunigen können [42, 187, 260]. Durch die Nukleation entsteht ein sog. Aktinkomet am hinteren Pol des Bakteriums, der *Shigella* vorwärts schiebt [209].

Um von einer Kolonzelle in die nächste zu gelangen, benutzt *Shigella* eine Gruppe von zellulären Proteinen, die Cadherine, die normalerweise „Intermediate Junctions“ bilden. Die Cadherine wiederum binden an Catenine, die die Verbindung zum Zytoskelett herstellen [272]. Bei der Ausbreitung von Zelle zu Zelle bildet sich eine Membranprotrusion, die aus den Membranen beider Zellen besteht. Außerdem scheint Myosin bei der Ausbreitung von Zelle zu Zelle eine wichtige Rolle zu spielen, da durch Inhibition der Myosin-Phosphorylierung diese Ausbreitung stark abnimmt [212].

## 1.6 Die Zellinvasion ist abhängig von den kleinen Rho-GTPase

Die beschriebene Invasion von Shigellen in Wirtszellen ist abhängig von der GTPase Rho, einem kleinen G-Protein der Wirtszelle. Durch die Inaktivierung dieses Proteins mit dem Rho-spezifischen aber isoformunspezifischen Inhibitor C3, einem Toxin aus *Clostridium botulinum*, lässt sich die Invasion von Shigellen in HeLa-Zellen verhindern [2, 134, 285].

Im Folgenden soll diese GTPasen-Gruppe genauer beschrieben werden. Da ein Großteil der Untersuchungen mit C3-Toxin, das alle Rho-Isoformen unspezifisch durch ADP-Ribosylierung an Asparagin 41 inhibiert, durchgeführt wurde, wird im Folgenden von „Rho“ gesprochen, wenn keine Unterscheidung zwischen den Isoformen getroffen wurde. Eine genaue Zuordnung zu RhoA, RhoB oder RhoC steht also bei vielen Ergebnissen noch aus [236, 237, 294].

### 1.6.1 Rho-GTPasen

Die Rho-GTPasen gehören zu der Superfamilie der Ras-GTPasen, einer Gruppe von mehr als 100 monomeren 20-30 kDa großen Proteinen, die in Zellen als molekulare Schalter fungieren.



Diese Ras-Gene wurden zuerst als die v-Ha-Ras und v-Ki-Ras Onkogene von Sarkomaviren beschrieben. Die Superfamilie lässt sich strukturell in mindestens fünf Familien einteilen: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf und Ran. Sie kontrollieren verschiedene Funktionen in der Zelle wie die Genexpression, die Zytoskelettorganisation oder den Vesikeltransport [167, 263].

### 1.6.2 Familie der Rho-GTPasen

Die Subfamilie der Rho-GTPasen besteht aus 22 Mitgliedern und lässt sich in acht Gruppen einteilen, die überwiegend in mehreren Isoformen vorliegen: Rho (A, B und C); Rac (1, 2, 3 und RhoG); Cdc42 (Cdc42, TC10, TCL, Chp und Wrch1); Rnd (1, 2, 3 und RhoE); RhoD (RhoD und Rif); RhoH/TTF; RhoBTB (1 und 2) und Miro (1 und 2), wobei Rho, Rac und Cdc42 am besten charakterisiert sind [251]. Gemeinsam ist diesen GTPasen, dass sie meistens eine C-terminale Sequenz haben, die posttranslational mit einem Lipidrest modifiziert werden kann. Bei RhoA und RhoC handelt es sich um einen Geranylrest, eine andere Möglichkeit ist das Anhängen eines Farnesylrestes. Zudem besitzen die Rho-GTPasen oft am N-Terminus mindestens eine GTPase-Domäne [263].

### 1.6.3 RhoA- und RhoC-Beteiligung im Rahmen von Erkrankungen

Die beiden GTPasen RhoA und RhoC sind mit der Pathogenese einiger Erkrankungen assoziiert, die im Folgenden dargestellt werden sollen.

Besonders gut untersucht ist die Assoziation von RhoC mit Tumoren, vor allem mit dem Mammakarzinom. Aber auch eine Vielzahl anderer Tumore exprimiert erhöhte Level von RhoC: das duktales Adenokarzinom des Pankreas, das Ovarialkarzinom, das Harnblasenkarzinom, das Magenkarzinom, das nicht kleinzellige Lungenkarzinom, das hepatozelluläre Karzinom, das kutane Melanom und das Plattenepithelkarzinom von Mundhöhle und Pharynx [43, 113, 118, 133, 138-140, 242, 258, 281]. In einem Teil der Fälle ist RhoC ein Marker für gesteigerte Aggressivität, Invasion und Metastasierung der Tumoren. Zudem konnte gezeigt werden, dass Farnesyltransferaseinhibitoren und HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren, die die Lipidmodifizierung von RhoC behindern, die Invasivität und Metastasierungsneigung von RhoC-assoziierten Tumoren vermindern [52, 138, 274].

RhoA, bzw. eine Signalkaskade über RhoA und Rho-Kinase wird mit arterieller Hypertonie in Verbindung gesehen. In Hypertonie-Mausmodellen konnte zunächst eine gesteigerte RhoA-Aktivität in der Arterienwand nachgewiesen werden. Nach Gabe eines Rho-Kinase Inhibitors normalisierte sich die Hypertonie der Mäuse [154, 238].

#### 1.6.4 Rolle der Rho-GTPasen auf zellbiologischer Ebene

Die drei Rho-GTPasen A, B und C spielen bei verschiedenen Zellfunktionen eine wichtige Rolle. Ihr Einfluss auf das Zytoskelett ist besonders prominent und am besten untersucht. Aber auch bei der Transkription, im Rahmen der Zytokinese und bei der Embryogenese werden für diese kleinen G-Proteine Funktionen beschrieben.

Die Veränderungen am Zytoskelett beruhen auf einer Vielzahl von Interaktionen von Rho mit unterschiedlichen Effektorproteinen. Über diese kontrollieren sie die Zellform, Polarität und Lokomotion, wie später noch genauer ausgeführt wird. Die bisher bekannten Interaktionen von Rho mit seinen Effektorproteinen erfolgen über die sogenannten „Switch“ Regionen, zwei 13 bzw. 20 Aminosäuren lange Oberflächendomänen (Abb. 2, S.21). Bei Bindung von GTP-gebundenem Rho kommt es zu einer Konformationsänderung des Interaktionspartners, wodurch meistens eine Autoinhibition aufgehoben wird und das entsprechende Protein entweder seine Signal- oder Kinase-Aktivität ausüben kann [22].

Der wichtigste Zytoskelettbestandteil, an dessen Regulation Rho mitbeteiligt ist, ist Aktin. Aus dieser Regulation erklären sich die meisten der bisher bekannten Funktionen von RhoA und RhoC. Aktin ist in eukaryoten Zellen weit verbreitet und bildet die dünnen Filamente des Zytoskeletts. Diese Filamentform, die auch als F-Aktin bezeichnet wird, ist ein Polymer aus einzelnen G-Aktin Monomeren. G-Aktin hat eine ATPase Funktion, die an der Assoziation bzw. Dissoziation der Filamente mitwirkt. Die einzelnen Monomere lagern sich versetzt und gegeneinander verdreht zusammen, woraus das Bild von umeinander gewundenen Perlenketten entsteht. F-Aktin hat zwei unterschiedliche Enden, ein so genanntes „barbed end“, an dem das Filament vorzugsweise wächst und ein „pointed end“ an dem es eher zu einem Abspalten von Monomeren kommt [257]. Einer der wichtigsten Interaktionspartner von F-Aktin ist Myosin, ein Motorprotein, das eine aktive Beweglichkeit des Filamentnetzwerkes ermöglicht. Die Verteilung und Anpassungsfähigkeit dieses Myosin-Aktin Filamentnetzwerkes wird von verschiedenen Proteinen, unter anderem von Rho reguliert, das die Polymerisation von Aktin über die Aktivierung von Proteinen aus der Familie der Formine ermöglicht und durch Aktivierung der Myosin-Leichtkettenkinase Zellkontraktilität und Motilität erlaubt [8, 279, 283]. In den folgenden Abschnitten werden wichtige Beispiele für die zellbiologische Rolle von Rho beschrieben.

##### 1.6.4.1 Rho reguliert Fokaladhäsionen und Stressfilamente

Stressfilamente sind *in-vitro* auftretende Fasern aus Aktin und Myosin, die kontraktile sind und in Zellen durch mechanischen Stress oder bestimmte Faktoren wie Lysophosphat Säure (LPA) hervorgerufen werden können [132, 215]. Diese Stressfilamente haben ihre Membrananker in Fokaladhäsionen, die die Stressfilamente über Integrine an die extrazelluläre Matrix anheften. Weitere Bestandteile dieser Adhäsionen sind Vinkulin,  $\alpha$ -Actinin, Talin, Paxillin, Tensin und die Tyrosinkinasen pp125fak und Src [49]. Cortactin assoziiert nicht mit Stressfasern, sondern nur

mit Fokaladhäsionen [59]. Die Bildung sowohl von Fokaladhäsionen als auch von Stressfilamenten kann durch eine konstitutiv aktive Rho-Kinase induziert oder durch Rho-Inhibition verhindert werden [9, 124, 132].

#### 1.6.4.2 *Rho beeinflusst Zell-Zell-Kontakte*

Die Rho-GTPasen sind an der Regulierung von „Tight Junctions“ in polarisierten Epithelzellen beteiligt [198]. In Keratinozyten steuern Rho und Rac die Einrichtung von Zell-Zell-Kontakten über die lokale Anreicherung von Cadherinen in der Plasmamembran. Cadherine sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zell-Zell-Haftmoleküle, die über Catenine mit dem Aktinzytoskelett interagieren [30]. Ein anderes aktinbindendes Protein, das an Zell-Zell-Kontaktstellen in Epithelzellen konzentriert ist, ist  $\alpha$ -Adducin. Auch hier spielt die bereits im Zusammenhang mit der Induktion von Stressfilamenten erwähnte Rho-Kinase möglicherweise eine Rolle, indem sie  $\alpha$ -Adducin phosphoryliert. Diese Phosphorylierung verstärkt die Interaktion mit Aktinfilamenten *in-vitro*. Auch  $\alpha$ -Adducin kann durch Myosinphosphatase dephosphoryliert werden. Dieser Schritt scheint, ähnlich wie für „Myosin Light Chain“ (MLC) beschrieben, gleichzeitig von Rho gehemmt zu werden, sodass auch hier eine zweigleisige Regulation vorliegen könnte [136].

Auch bei der Regulation der „Adherence Junctions“ hat Rho Anteil. Interessanterweise scheint es dabei einen Unterschied zwischen RhoA und RhoC zu geben. RhoC scheint „Adherence Junctions“ in stärkerem Maße zu schwächen als RhoA, was auf die unterschiedliche Bindungsstärke von konstitutiv aktivem RhoA bzw. RhoC an die Rho-Kinase ROCK zurückgeführt wird [222].

#### 1.6.4.3 *Zell-Motilität und Migration werden von Rho reguliert*

Bei der Zell-Migration bzw. Motilität ist die Funktion der Rho-GTPasen noch nicht ganz geklärt, obwohl klar ist, dass sie eine wichtige Rolle spielen. Bei der Migration sind zwei Zellkompartimente von Bedeutung, die führende Membran, der Bug der Zelle („leading edge“) und die abschließende Membran, das Heck der Zelle, die nachgezogen werden muss („rear retraction“). In einem möglichen Modell spielt Rho hier eine zu Rac antagonistische Rolle. Rho überwiegt dabei in dem hinteren Bereich der Zelle und verhindert damit die von Rac hervorgerufene Protrusionsbildung, während Rac im vorderen Bereich der Zelle überwiegt und die Zelle voranschreibt [216, 294, 298, 299]. Es ist allerdings noch nicht klar, ob diese Unterteilung nicht eine zu starke Vereinfachung darstellt, zumal Rho die GTPase Rac aktivieren kann [271] und aktiviertes Rac bei der Loslösung von Anheftungen am Ende von migrierenden Zellen eine Rolle zu spielen scheint [85]. Andererseits wird RhoA bei der Zellmigration im vorderen Bereich der Zelle selektiv degradiert, womit eine Regulation gegeben ist, die das vereinfachte Modell stützt [280]. Eine weitere Rolle von Rho bei der Zellmigration wird über die Rho-Kinase ROCK vermittelt, die Myosin II durch Phosphorylierung aktivieren kann und damit die Kraft zur Verfügung stellt, um das Ende der Zelle in Migrationsrichtung zu ziehen [218] und andererseits durch die Aktivierung von mDia einen potenten Aktinpolymerisator stimuliert. Die

Regulation von Zell-Adhäsionen ist bei der Lokomotion ebenfalls sehr wichtig und wird, wie oben bereits beschrieben, von Rho mitreguliert.

#### 1.6.4.4 *Rho bei der Zytokinese*

Auch im Rahmen der Zytokinese spielt die Aktivierung der Rho-Kinase ROCK und daran anschließend die Phosphorylierung von Myosin II eine Rolle. Diese Phosphorylierung findet in der Teilungsfurche statt, an der Rho und ROCK zu finden sind [141, 264] und bewirkt die Kontraktion des innerhalb der Teilungsfurche liegenden, kontraktiven Ringes aus Aktin und Myosin [77]. Diese Kontraktion wird durch Inhibition von Rho durch C3-Toxin verhindert, während die Rho-unabhängige Kernteilung weiter voranschreitet [65, 132, 137]. Auch das Formin mDia, das mit Rho direkt interagiert, wird in die Teilungsfurche lokalisiert [279].

#### 1.6.4.5 *Rho bei der Transkriptionskontrolle*

Zusätzlich zu ihrer direkten Funktion bei der Regulation des Zytoskeletts haben die Rho-Proteine einen indirekten Einfluss über die Kontrolle der Transkription. RhoA aktiviert die Transkription über den Transkriptionsfaktor-Komplex „MAL/Serum response Factor“ (MAL/SRF) durch Veränderung der G-Aktin-Konzentration innerhalb der Zelle [179]. MAL bindet direkt an G-Aktin und fungiert als G-Aktin Sensor, der die SRF-vermittelte Transkription von Zytoskelett-Genen induziert. Ob RhoB die MAL/SRF-Aktivität verändert ist nicht bekannt. Interessanterweise kann RhoB im Gegensatz zu RhoA die Transkription des TGF $\beta$ -Rezeptors unterdrücken [3].

### 1.6.5 Aufbau, Struktur und Regulation der Rho-Isoformen

Bei Betrachtung der Aminosäuresequenz der drei Isoformen Rho A, B und C können drei Regionen unterschieden werden. Im ersten Abschnitt, der die Aminosäuren 1 bis 180 umfasst, finden sich kaum Unterschiede in der Sequenz. Die Isoformen RhoA und RhoC unterscheiden sich hier nur in acht Aminosäuren. In dieser ersten Region kann man zwei Domänen abgrenzen, Switch 1 und Switch 2, die Oberflächen-*loops* bilden und je nach Aktivationszustand, also GDP- oder GTP-gebunden, unterschiedlich zueinander stehen [117, 289]. An diese beiden Domänen binden die meisten Effektoren, wie mittels Mutationsstudien gezeigt wurde [22]. Bei Vergleich der Aminosäuresequenz der beiden Domänen mit anderen GTPasen fällt auf, dass sich die Switch 2 Domäne bei Cdc42 und Rac1 nur in einer Aminosäure und die Core-Region von Switch 1 in zwei Aminosäuren von RhoA und RhoC unterscheidet.

Die zweite Region, die abgegrenzt werden kann, umfasst die Aminosäuren 181-189 (RhoA, RhoC) bzw. 181-193 (RhoB). Diese Region wird auch als polybasische Region oder Rekrutierungsdomäne bezeichnet. Sie ist bei allen drei Proteinen unterschiedlich und unterscheidet sich auch bei den übrigen Mitgliedern der Rho-Familie. Eine gemeinsame Sequenz konnte bei keinem der Proteine gefunden werden. In der polybasischen Region von

RhoC kommt möglicherweise ein so genanntes Nukleäres-Lokalisations-Signal (NLS) vor, das sich auch bei Rac1 finden lässt [275, 295]. Michaelson et al. haben diese polybasische Region von RhoA bereits auf seine Funktion als Lokalisationssignal untersucht und dabei festgestellt, dass sie bei RhoA nicht für die Lokalisation innerhalb der Zelle notwendig ist, sondern ein N-terminal gelegener Teil des Proteins diese Funktion übernehmen muss [177, 275].

Die dritte Region wird CAAX-Domäne genannt. Die kleinen Rho-GTPasen RhoA, RhoB und RhoC werden, wie die übrigen kleinen G-Proteine, posttranslational modifiziert. Diese Modifikation findet C-terminal in diesem dritten Abschnitt statt, der so genannten CAAX-Domäne: das „C“ steht für ein konserviertes Cystein, die beiden „A“ stehen für je eine aliphatische und das „X“ für eine beliebige Aminosäure. Bei Leucin in Position des „X“ kommt es zur Geranylierung durch die Geranylgeranyltransferase I (GGTase I), bei Serin, Methionin oder Glutamin wird der Rest farnesyliert durch die Farnesyltransferase I (FTase I) [181, 311]. Bei RhoA und RhoC wird ein Geranylgeranylrest angehängt, bei RhoB kann es sowohl ein Geranylgeranylrest als auch ein Farnesylrest sein [22]. Für diese Prenylierung wird zunächst der Lipidrest an das Cystein angehängt. Dies führt zu einer erhöhten Affinität der prenylierten Proteine für das Endoplasmatische Retikulum [47], an dem die Protease Rce1 die drei letzten Aminosäuren A, A und X abspaltet [29, 234]. Anschließend wird, ebenfalls am Endoplasmatischen Retikulum, das jetzt endständige Cystein von der Isoprenylcystein Carboxyl-methyltransferase (Icmt) methyliert [57]. Diese posttranslationale Modifikation erhöht die Affinität zu Lipidmembranen beträchtlich [44], wobei für die Rho-GTPasen nur die Prenylierung, nicht jedoch Methylierung oder Proteolyse für ihre Funktion notwendig ist [178].

	----- Switch 1 -----
<b>RhoA</b>	MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFE
<b>RhoB</b>	MAAIRKKLVVVDGACGKTCLLIVFSKDEFPEVYVPTVFE
<b>RhoC</b>	MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFE
	----- Switch 2 -----
<b>RhoA</b>	NYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPDTDVI
<b>RhoB</b>	NYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPDTDVI
<b>RhoC</b>	NYIADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPDTDVI
<b>RhoA</b>	LMCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFPCNPVPIILVGNKKD
<b>RhoB</b>	LMCFSVDSPDSLENIPEKWWPEVKHFPCNPVPIILVANKKD
<b>RhoC</b>	LMCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFPCNPVPIILVGNKKD
<b>RhoA</b>	LRNDEHTRRELAKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGYMECS
<b>RhoB</b>	LRSDDEHVRTELARMKQEPVRTDDGRAMAVRIQAYDYLECS
<b>RhoC</b>	LRQDEHTRRELAKMKQEPVRSSEGRDMANRISAFGYLECS
	Rekrutierungsdomäne      Prenylierung
<b>RhoA</b>	AKTKDGVREVFEMATRAALQARRGKKKSG <i>CLVL</i>
<b>RhoB</b>	AKTKDGVREVFEMATRAALQKRYGSONGCINCKVL
<b>RhoC</b>	AKTKEGVREVFEMATRAGLOVRKNKRRRG <i>CPIL</i>

**Abb. 2** Vergleich der Aminosäuresequenzen von RhoA, RhoB und RhoC. Abweichende Aminosäuren sind Rot markiert. Die beiden Switch-Regionen sind eingezeichnet. Die Rekrutierungsdomäne ist hervorgehoben und die Prenylierungsdomäne ist abgesetzt (modifiziert nach [294]).

Ultrastrukturell ist bisher nur der genaue Aufbau von RhoA geklärt, wobei die letzten zwölf AS bisher nicht kristallisierbar und ihre Struktur deswegen auch nicht auflösbar war. Die Ergebnisse dieser Struktur sind vermutlich aufgrund der Sequenzhomologie auf RhoC übertragbar. Die Rho-Proteine bestehen, wie die meisten übrigen kleinen GTPasen, aus einem  $\beta$ -Faltblatt aus sieben  $\beta$ -Strängen in paralleler und antiparalleler Anordnung, fünf  $\alpha$ -Helices, drei  $3_{10}$  Helices, die das Grundgerüst bilden, sowie einigen *Loops*, von denen zwei die aktiven Domänen Switch 1 und Switch 2 bilden und sich bei den verschiedenen Rho-GTPasen jeweils stark unterscheiden [60, 117, 220, 249].

#### 1.6.5.1 Regulationsfaktoren und Interaktionspartner von RhoA und RhoC

Als GTP-bindende Proteine können die Rho-GTPasen in einer GTP-gebundenen, aktiven Form und einer GDP-gebundenen, inaktiven Form vorliegen. Die Aktivierung führt zu einer Konformationsänderung des aktiven Zentrums, wobei eine Proteinbindungsstelle freigelegt wird. Mit dieser können dann Effektorproteine aktiviert werden [167].

Der Wechsel zwischen aktiver und inaktiver Konformation wird einmal von der intrinsischen GTPase-Funktion reguliert, zusätzlich aber noch von drei Gruppen regulatorischer Proteine.

Die erste Gruppe sind die „guanin nucleotide exchange“-Faktoren (GEF), die auch „guanin nucleotide exchange“-Proteine (GEP) genannt werden. Dies sind Proteine, die G-Proteine aktivieren, indem sie den Austausch von GDP zu GTP beschleunigen. In der Rho-Familie sind bisher mehr als 30 verschiedene GEF bekannt, die alle eine Dbl-Homologie (DH) Domäne und eine Pleckstrin-Homologie (PH) Domäne besitzen, sowie meistens noch weitere Signalmodule [22, 111]. Die DH-Domäne ist 150 AS lang und stellt das aktive Zentrum der GEF dar, das den Nukleotid-Austausch (GDP zu GTP) katalysiert. Sie kann entweder spezifisch sein für ein Rho-Protein oder als Katalysator für eine Gruppe von Rho-Proteinen fungieren. Wichtig dabei sind drei hochkonservierte Regionen in der DH-Domäne, die den  $\alpha$ -Helix-Kern der Domäne formen und in denen Mutationen zum Funktionsverlust führen [111]. Die PH-Domäne ist eine 100 – 120 AS lange Struktur, die die Bindung von Proteinen an Phospholipide ermöglicht. Die Kerndomäne besteht aus einem konservierten  $\beta$ -Faltblatt-Paket, aus dem drei sequenzvariable *Loops* herausragen, die für die Interaktion mit den Phospholipiden zuständig sind [150]. Als Bestandteil der GEF könnte die PH-Domäne also verantwortlich sein für die Lokalisation der GEF innerhalb einer Zelle und damit zugleich den Aktivationsort der Rho-GTPasen bestimmen [111]. Die Funktion der GEF ist zudem mit einer (proto-) onkogenen Wirkung verbunden. Der Leukämie-assoziierte „Rho-guanine nucleotide exchange Factor“ (LARG) wurde zum Beispiel bei einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) als Teil eines Fusionsproteins gefunden [143, 217].

Eine zweite Gruppe von G-Protein regulierenden Faktoren sind die GTPase-aktivierenden Proteine (GAP), von denen etwa 20 bekannt sind. Diese Faktoren erhöhen die intrinsische GTPase-Aktivität der G-Proteine und beschleunigen so deren Inaktivierung. Kristall-Struktur-

Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Proteine einen „Arginin-Finger“ haben, mit dem sie einen Transitionszustand stabilisieren und so die Inaktivierung beschleunigen [188, 219].

Zusätzlich zu diesen beiden aktivierenden und inaktivierenden Faktoren existiert für die Rho-GTPasen noch eine dritte Gruppe von Regulationsfaktoren, die Rho-GDP-dissociation Inhibitoren (GDI), im Falle von RhoA in Form von GDI- $\alpha$ . GDI inhibieren die spontane Umwandlung von GDP zu GTP mit ihrem N-Terminus, indem sie die Dissoziation von GDP und Rho verhindern. Außerdem entfernen GDI zugleich die normalerweise membrangebundenen G-Proteine von der Membran. Dabei wird der C-terminale Lipidanker von Rho im Inneren des GDI in einer immunoglobulinartigen, C-terminalen, hydrophoben Tasche gebunden und der Komplex kann im Zytoplasma gelagert werden [95, 110].

Rho-GDI spielt bei der Regulation von Rho eine besondere Rolle, da es durch das Entfernen aus der Membran eine längerfristige Inaktivierung des Proteins erreichen kann und es durch die Bindung zudem möglich ist einen zytoplasmatischen Pool von Rho-GTPasen vorzuhalten, der im Falle einer Aktivierung schnell eine große Anzahl an GTPasen zur Verfügung stellt. Rho-GDI tritt also einerseits mit GEF in Konkurrenz um die Rho-Aktivierung und muss andererseits mit der Membran, an die die GTPasen über ihren C-Terminus gebunden sind, konkurrieren, um eine Inaktivierung der GTPase zu erreichen. Die genauen Mechanismen, die eine Inaktivierung von Rho durch Rho-GDI bewirken bzw. die eine Aktivierung von Rho-GDI gebundenem Rho ermöglichen, sind noch nicht genau geklärt. Für die Bindung von Rho an Rho-GDI scheint die Phosphorylierung der Rho-GTPase und von Rho-GDI eine Rolle zu spielen, die wiederum von anderen Faktoren reguliert wird [64]. Für die Dissoziation von Rho und Rho-GDI sind dagegen mehrere Regulationsmöglichkeiten beschrieben. Hier scheint auch eine Phosphorylierung eine Rolle zu spielen, aber auch eine Regulation durch Protein-Protein-Interaktionen und eine Regulation über Phospholipide sind beschrieben worden [64].

Andere Interaktionspartner der Rho-GTPasen sind Effektorproteine, die von aktiviertem Rho selbst aktiviert oder inaktiviert werden und dann die in den vorhergehenden Kapiteln beschriebenen Funktionen vermitteln. Wichtige bereits bekannte Interaktionspartner von Rho, die experimentell in „Yeast-Two Hybrid Assays“ oder in „Pull-down Assays“ gefunden wurden, sind in Tab. 64 (S. 93) zusammengefasst.

#### 1.6.6 Rho Funktion bei Shigelleninvasion

Die Rho-Proteine spielen bei der Invasion von *Shigella* in Epithelzellen eine wichtige Rolle. So wird bei der Inhibition der Rho-Isoformen durch das C3-Toxin die Shigelleninvasion gehemmt und auch die Rekrutierung von für die Invasion wichtigen Proteinen wie Aktin, Vinkulin oder Talin ist reduziert [285]. Die Ausbildung der Cdc42 und Rac1 abhängigen Nukleationskomplexe aus Arp2/3 ist damit aber nicht gestört [2].

In Invasionsexperimenten mit Shigellen konnte weiterhin eine differentielle Rekrutierung von RhoA und RhoC nachgewiesen werden. RhoA akkumuliert bei der Invasion in der Basis des Invasionskomplexes, also unter einem invadierenden *Shigella*-Bakterium. RhoC (zusammen mit RhoB) rekrutiert dagegen vor allem in die Spitze des sich bildenden Invasionskomplexes [2]. Andere GTPasen zeigen ebenfalls dieses unterschiedliche Verhalten. So werden Cdc42 und Rac genau wie RhoA in die Basis des Invasionskomplexes rekrutiert [97], während RhoD, ebenfalls eine Rho-GTPase, ebenso wie RhoB und RhoC in die Spitze rekrutiert wird. Es kann also von einem RhoC-Muster der Rekrutierung gesprochen werden, dem die Rekrutierung einiger weiterer Rho-GTPasen entspricht und von dem sich das Rekrutierungsmuster von RhoA unterscheidet.

In Mutationsassays konnte diese differentielle Rekrutierung weiter charakterisiert werden. Dazu wurden die polybasischen Regionen der Proteine ausgetauscht. Diese Proteine verhielten sich wie es ihre polybasische Region vorgab. Das RhoA-Molekül, mit der polybasischen Region von RhoC, rekrutierte in die Spitzen des Invasionskomplexes, verhielt sich also wie RhoC, während das RhoC-Molekül, mit der polybasischen Region von RhoA, in die Basis des Invasionskomplexes rekrutierte, sich also verhielt wie RhoA. Diese Ergebnisse wurden anschließend in Experimenten weiterentwickelt, in denen nur die polybasische Region mit den Aminosäuren 181-189, gebunden an ein fluoreszierendes Molekül, untersucht wurde. Auch diese Fusionsproteine rekrutierten wie es ihre polybasische Region erwarten ließ.

Eine weitere Untersuchung der polybasischen Region der Rho-GTPasen ergab, dass es durch den Tausch der Aminosäuren 186 und 187 in der polybasischen Region von RhoA von Lysin zu Arginin, das bei RhoC an diesen Stellen vorkommt, zu einer Änderung des RhoA-Rekrutierungsmusters hin zu einem RhoC-Rekrutierungsmuster erfolgt.



## 1.7 Fragestellung

Einer der wesentlichen Mechanismen der Pathogenese von Durchfallerkrankungen ist die Invasion bakterieller Erreger in Enterozyten. Einer der wichtigsten menschlichen Durchfallerreger, der diesem Pathogenitätsweg folgt, ist *Shigella*. Zur Vorbereitung der Invasion greift *Shigella* durch Injektion eigener Proteine in die Wirtszelle in deren Stoffwechsel ein und verändert die lokale Wirtszellmembran so, dass *Shigella* von der Wirtszellmembran umschlossen und über eine Vakuole in die Zelle aufgenommen werden kann. Bei der Ausbildung dieser lokalen Membranveränderung spielen die Regulationsfaktoren RhoA und RhoC der Wirtszelle eine herausragende Rolle. Diese beiden Regulationsfaktoren unterscheiden sich besonders in der polybasischen Rekrutierungsdomäne, die für die unterschiedliche Wirkung von RhoA (Einstülpung der Wirtszellmembran unter *Shigella*) und RhoC (Ausstülpung der Membran neben *Shigella*) verantwortlich zu sein scheint. Während bisherige Versuche überwiegend mit den vollständigen Molekülen von RhoA und RhoC durchgeführt wurden, sollten in den hier durchzuführenden Versuchen spezifisch die Rekrutierungsdomänen untersucht werden. Um die polybasischen Regionen von RhoA und RhoC näher untersuchen zu können, sollten in der vorliegenden Arbeit molekularbiologische Konstrukte hergestellt werden, die folgende Bedingungen erfüllen sollten:

- Die Konstrukte sollten sich an bereits in Rekrutierungsexperimenten verwendeten Proteinen orientieren.
- Die Konstrukte sollten die jeweilige polybasische Region von RhoA und RhoC enthalten.
- Weiter sollten sie das fluoreszierende Protein GFP tragen.
- Um diese Proteine reinigen zu können, sollte ein 6-His-*tag* angehängt werden.
- Um die Konstrukte radioaktiv markieren zu können, sollte eine PKA-*Site* eingefügt werden.
- Die polybasische Region sollte je einmal alleine und je einmal mit der folgenden CAAX-Domäne in die Konstrukte eingefügt werden. Damit sollte die polybasische Region alleine und in Kombination mit der CAAX-Domäne untersucht werden können.
- Um in den durchzuführenden Assays eine Positivkontrolle zu haben, sollte ein Konstrukt mit einer PDZ-Domäne hergestellt werden, von der bereits die Bindungspartner bekannt sind.
- Schließlich sollte als Negativkontrolle ein Konstrukt hergestellt werden, das keine Interaktionssequenz, also kein Rho, besitzt.

Das Ziel der Arbeit war also, mit der Herstellung und Aufreinigung der oben genannten Konstrukte eine spätere genauere Charakterisierung der Rekrutierungsdomäne der Rho-Proteine A und C zu ermöglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialliste, Geräte, Kits

Die in der Methodenbeschreibung verwendeten Materialien, Geräte und Kits sind in der folgenden Materialliste beschrieben, sofern sie nicht bei der Methodenbeschreibung näher erläutert werden.

Tab. 1 Geräteliste

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Abzug		Köttermann
Beads für Proteinreinigung		Chemicell
Brutschrank		Haraeus
Elektrophoresekammer	Unit Mupid-2 Mini-Protean II mit PowerPac 3000	Cosmo Bio/Eurogentec Biorad
Elektroporator	Pulse controller plus, Capacitance extender plus, Gene pulser	Biorad
Entwicklermaschine	Agfa Curix 60	Agfa
Film	X-OMAT	Kodak
Filter	Porengröße 0,2 µm	Schleicher und Schüll
Filter-Fritten	10 µm pore size, # M2210	MoBiTec
Filtertubes	Mobicols, # M1001	MoBiTec
Gel Blotting Papier		Schleicher und Schüll
Hybridisierungsöfen	Hybaid Mikro 4	MWG Biotech
Hybridisierungsröhre	HB-OV-BM	Hybaid
Klarsichtfolie		Roth
Kühlschrank	4 °C; -20 °C -80 °C	Liebherr Heraeus
Kunststofffilz		Biorad
Küvetten	Plexiglas: 1,5 ml halbmikro Quarz: 104B-QS (Schichtdicke 10 mm) Metallküvetten	Brand Hellma
Mikrowellengerät		Daewoo
Nitrozellulosemembran	Protran BA 83 (Porengröße: 0,2 µm)	Schleicher und Schüll
Nylonmembran	Nytran N (Porengröße: 0,45 µm)	Schleicher und Schüll
Parafilm		Pechiney Plastik Packaging
PCR-Gerät / Thermocycler	DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmer Cetus
Petrischalen		Sarstedt
pH-Meter	ATC Temp pH-Meter Piccolo plus	Beckman
Photometer	Spectronic 20+ Ultraspec III Spektralphotometer	Milton Ray + Pharmacia

Pipetten		Eppendorf
Reaktionsgefäße	0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml 15 ml; 50 ml	Eppendorf Falcon
Rühr- und Heizplatte	MR 3001	Heidolph
Scanner	Scanmaker Office Plus	Mikrotek
Schüttler	Inkubator 1000 und Unimax-Schüttler 1010 Multitron	Heidolph Infors
Schwenker	Polymax 2040, Polymax 1040	Heidolph
Sequenzierer	Licor, DNA sequencer model 4000L	MWG-Biotech
Sterile Bank	Autair	Heraeus
Thermogefäß	Isotherm	KGW
Ultraschallgerät	Sonoplus GM 70	Bandelin
UV-Transluminator	Eagle Eye II	Stratagene
Vortexer	REAX 2000	Heidolph
Waagen	A 120 S und LC 6201	Sartorius
Wärmeblock	Thermostat Techne-Dri-Block BD2A	Thermo-Dux
Wasserbad	Bioblock	Scientific
Western Blot-Kammer	Mini Trans-Blot Transfer Cell mit PowerPac 3000	Biorad
Zentrifugenbecher		Beckman

Tab. 2 Liste der verwendeten Zentrifugen

<b>Zentrifuge</b>	<b>Rotor</b>	<b>Gefäß</b>	<b>Radius</b>	<b>Hersteller</b>
Kühlzentrifuge Centrifuge 5402	(fest) F-45-18-11	0,5 ml 1,5 ml 2 ml	6,2 cm 7,2 cm 7,3 cm	Eppendorf
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C				
Labofuge 400 R	(Ausschwing-) 8179	15 ml 20 ml		Heraeus
J2-HS Centrifuge (Vakuum)	(fest) JA-14	250 ml	$r_{\min}$ : 3,5 cm $r_{\max}$ : 13,7 cm	Beckman
L8 70M Ultrazentrifuge	(fest) T-35 1- 25 Beckman- katalog 92	80 ml	$r_{\min}$ : 3,5 cm $r_{\max}$ : 10,4 cm	Beckman

Tab. 3 Auflistung der verwendeten Substanzen

<b>Substrat</b>	<b>Form</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Acrylamid/Bisacrylamid	29:1, 40 % in Wasser	Fluka, Roth
Agar Agar	Kobe I pulv.	Roth
Agarose		Difco
Agarose		Roth
Amidoschwarz		Schleicher & Schüll

Ampicillin	Trihydrat, 97 %	Aldrich
Anti-mouse-POD-Antikörper	0,8 mg/ml	Dianova
Anti-Penta-His-Antikörper	200 µg/ml	Qiagen
APS (Ammoniumpersulfat)		Fluka
Aqua bidest.		Braun
Blocking		Roche
Bromphenolblau (3'3''5'5''-Tetrabromphenolsulfonephtalein)	Na-Salz	Sigma
BSA (Bovines Serum Albumin)	Fraktion V, 98 %	Fluka, ICN Biomedicals
Casein	aus Kuhmilch, ~ 95 %	Fluka
Chloroform (Trichloromethan)	99 %	Roth
CSPD (disodium 3-(4-methoxy Spiro(1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1]decan)-4-yl)phenyl phosphate)		Roche
Desoxycholsäure	99 %	Fluka
DMSO (Dimethylsulfoxid)		Sigma
DNA-Marker	Ladder-Mix # SM0331	MBI
DTT	99,5 %	Fluka
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	≥ 99 %	Roth
Essigsäure	100 %	Merck
Ethanol	Vergällt, 96 %	Roth
Ethidiumbromid	1 % in Wasser	Roth
Formamid	≥ 99 %, + Ionenaustauscher (M-8032 Sigma)	Fluka
Glutathion	97,0 %	Roth
Glycerol	Wasserfrei, 99,5 %	Roth
Glycin (Glykokoll)	99 %	Roth
Harnstoff (Harnstoff)	≥ 99,7 %	Roth
HCl (Salzsäure)	≥ 25 %	Merck
Hefeextrakt		Sifin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid)	30 %	Merck
Imidazol (1,3-Diaza-2,4-cyclopentadien)	99 %	Sigma
IPTG (Isopropyl-beta-thiogalactopyranosid)	99,0 %	Appllichem
4-Jodophenol	99 %	Aldrich
Kanamycin	Sulfat	Fluka
KCl (Kaliumchlorid)	≥99,5 %	Roth
Loading Buffer		Fermentas
Long Ranger Gellösung		Cambrex

Luminol	98,0 %	Fluka
Lysozym	82800 U/mg;	Fluka
Magermilchpulver		Uelzena
Maleinsäure	99 %	Roth
2-Mercaptoethanol	14,3 M	Sigma
MgCl <sub>2</sub>	99 %	Applichem
Mg-sulfat	99,9 %	Fluka
Mineralöl, weiß		Sigma
MOPS (3-Morpholin-Propasulfonsäure)	≥ 99,5 %	Fluka
Natriumacetat	Trihydrat, ≥ 99,5 %	Roth
NaCl (Natriumchlorid)	≥ 99,5 %	Roth
Natriumcitrat	Dihydrat, 99 %	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Natriumdihydrogenphosphat)	Dihydrat	Fluka
NaOH (Natriumhydroxid)	Plätzchen, ≥ 99 %	Roth
Natriumlauroylsarcosin		Merck
dNTPs	2 mM	
Phenol	TE gelöst, pH 7,5-8,0	Roth
Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol	25:24:1,	Roth
α-Phosphorsäure	≥ 85 %	Roth
Proteinstandardmarker	23 µg/µl	Fluka
SDS (Natriumdodecylsulfat)	≥ 99 %	Roth
Serva Blue G		Serva
Stickstoff	Flüssig	
Streptavidin AP		Roche
Taq-Puffer	mit 15 mM MgCl <sub>2</sub>	Eppendorf
Taq-Polymerase	10 x, 5 U/µl	Eppendorf
TEMED	≥ 99 %	Fluka
Tricine	≥ 99 %	Roth
Tris Base	≥ 99,9 %	Roth
Tryptone / pankreatisches Pepton (Casein)		Sifin
Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan)	Monolaurat	Sigma
Xylencyanol FF	Farbanteil ca. 80 %	Sigma

Tab. 4 Liste der gekauften Kits

<b>Kits</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
QIAGEN Miniprep	Qiagen	27104

Peqlab Miniprep	Peqlab	12-6942-02
QIAGEN Maxiprep	Qiagen	12162
PCR-Purification-Kit	Qiagen	28104
Sequenzier-Kit; Thermo fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza	Amersham-Pharmacia biotech	RPN2438
Biotin-Chem-Link	Roche	1812149

**Tab. 5** Liste der verwendeten Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller und Konzentration</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Puffer</b>	<b>Schnittstelle</b>
BamHI	MBI Fermentas, 10 U/µl	37 °C	spezieller HindIII-Puffer von Fermentas	G GATCC
EcoRI	MBI Fermentas, 60 U/µl, 10 U/µl	37 °C	spezieller EcoRI-Puffer von Fermentas	G AATTC
HindIII	MBI Fermentas, 10 U/µl	37 °C	R von Fermentas	A AGCTT
SmaI	MBI Fermentas, 10 U/µl	30 °C	Tango 1 von Fermentas	CCC GGG
Cfr9I (XmaCI) (SmaI-Erkennungssequenz andere Schnittstelle)	MBI Fermentas, 10 U/µl Boehringer Mannheim, 10U/µl	37 °C	spezieller Cfr9I-Puffer von Fermentas	C CCGGG
XbaI	MBI Fermentas, 10 U/µl	37 °C	Tango 1 von Fermentas	T CTAGA
Ligase T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, 5 Weiss U/µl New England-Biolabs, 2.000.000 U/ml	16 °C	Ligationspuffer von Fermentas	
Phosphatase (CIAP)	New England Biolabs	37 °C	NEBuffer 3 von New England Biolabs	
Taq-Polymerase 10 x, 5 U/µl	Eppendorf		Taq-Puffer mit 15 mM MgCl <sub>2</sub>	
Polynukleotidkinase T4	MBI Fermentas, 10 U/µl	37 °C	10x Puffer	
DNase	Applichem, 3000 U/mg			

## 2.2 DNA Präparation

### 2.2.1 Miniprep

Für DNA Mengen bis 25 µg wurden kommerzielle Miniprep Kits von Qiagen oder PeqLab verwendet. Die in 7 ml LB Medium (Tab. 45, S.53) mit 100 µg/ml Ampicillin oder LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Kanamycin über Nacht gewachsenen Bakterien wurden 15 min bei 4500-4800 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in RNase Puffer aufgenommen, die Bakterien mit alkalischem Puffer lysiert und unerwünschte Bakterienbestandteile ausgefällt. Nach Abzentrifugieren wurde der Überstand auf Silicamembranen übertragen, an die die DNA bindet und in mehreren Waschschritten gereinigt. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde mit sterilem Aqua bidest. eluiert und bei -20 °C gelagert.

### 2.2.2 Maxiprep

Für die Präparation größerer Plasmidmengen wurden kommerzielle Maxiprep Kits von Qiagen verwendet. Das Verfahren entsprach dem der Miniprep. Ausgangsvolumen waren 400 ml LB Medium (Tab. 45, S.53). Die Zentrifugationsschritte nach der Bakterienernte wurden in einer Ultrazentrifuge bei 20 000 rpm und 4 °C durchgeführt. Eluiert wurde mit salzhaltigem Puffer. Die eluierte DNA wurde mit Propanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen, in Aqua bidest. aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### 2.2.3 PCR – Polymerase Chain Reaction

Die PCR wurde zur Vervielfältigung von DNA für Ligationen aber auch als schnelle Kontrolle zur Charakterisierung von Bakterienkolonien genutzt („Klon-Kontroll“-PCR).

Als Templates dienten bereits vorhandene Plasmide sowie die selbst klonierten Plasmide und bakterielle DNA. Die optimale Templatekonzentration wurde jeweils in Vorexperimenten ermittelt.

Tab. 6 bei der PCR eingesetzte Konzentrationen und Volumina

Konzentration und Volumina	dNTP 2 mM	10x PCR Puffer	Oligo 1 60 µM	Oligo 2 60 µM	Enzym Taq- polymerase 5 U/µl	Aqua bidest.	Template
End- konzentration im Ansatz	50 µM	1x	20 µM	20 µM	1 U		wechselnd

Einzelansatz in µl (für 100 µl)	2,5	10	0,3	0,3	0,2	ad 100	
---------------------------------------	-----	----	-----	-----	-----	--------	--

Bei der so genannten „Klon-Kontroll“-PCR wurde als Template die Plasmid-DNA einer Einzelkolonie verwendet. Diese PCR diente dem schnellen Nachweis nicht extra aufgereinigter Plasmide. Die zu untersuchenden Einzelkolonien wurden mit einer Öse gepickt und in 100 µl Aqua bidest. inokuliert. Mit derselben Öse wurde anschließend ein fraktionierter Ausstrich auf einer Agarplatte angefertigt, um die Klone bei Bedarf weiter verwenden zu können. Der Rest wurde für 15 min bei 100 °C gekocht und für 10 min bei 14 000 rpm abzentrifugiert. 0,5 µl des erhaltenen Überstandes wurden anschließend zu dem PCR-Ansatz gegeben.

Nach dem Zusammenpipettieren wurden die Reaktionsansätze mit je 70 µl Mineralöl überschichtet, um einer Probenverdunstung im Thermocycler entgegenzuwirken. Die anschließenden Reaktionsschritte sind Tab. 7, S.32 zu entnehmen.

Tab. 7 Thermocycler Programmwahl

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl	Reaktionsschritt
94 °C	4 min	1x	Denaturierung des DNA-Stranges
40 °C	1 min	1x	erstes Annealing Extension Denaturierung
72 °C	2 min		
94 °C	2 min		
60 °C	1 min	30-35x	Annealing Temp Extension Denaturierung
72 °C	2 min		
94 °C	2 min		
72 °C	10 min	1x	letzte Extension besonders lang, damit alle Stränge vervollständigt werden können
4 °C			Lagerung im Kühlschrank möglich

Nach der Amplifikation wurden die Produkte im –20 °C Eisschrank aufbewahrt.

#### 2.2.4 Extraktion der mittels PCR gewonnenen DNA

Die DNA-Aufreinigung wurde mit Hilfe eines Qiagen-PCR-Purifikation-Kits durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde in fünf Volumina Puffer aufgenommen, ohne vorher das Mineralöl zu



entfernen. Das erhaltene Gemisch wurde auf eine Qiaquick-Silicasäule aufgetragen und zentrifugiert, wobei die DNA an die Säule gebunden wurde. Die Säule wurde mit Puffer gewaschen, die DNA mit 45 µl Aqua bidest. eluiert und bei –20 °C gelagert.

### 2.2.5 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Die Extraktion von DNA nach Restriktionen, Ligationen oder nach Reinigung über ein Gel wurde in drei Schritten mit Phenol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform durchgeführt, um Protein- oder Gelverunreinigungen zu entfernen. Die Extraktion fand meist in 1,5 ml oder 2 ml Eppendorftubes statt, wobei Volumina die kleiner als 100 µl waren, aufgefüllt wurden.

Zu dem zu extrahierenden Volumen wurde ein Volumen Phenol gegeben und die beiden Phasen durch dreiminütiges Vortexen gut gemischt. Diese Mischung wurde 10 min bei 16 °C mit 14 000 rpm zentrifugiert und die obere wässrige Phase anschließend in ein neues Eppendorftube überführt.

Dieselben Schritte wurden mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform wiederholt. Nach dem letzten Reaktionsschritt mit Chloroform wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA präzipitiert.

### 2.2.6 DNA Präzipitation und anschließendes Waschen

Die durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigte DNA wurde mit 1/10tel ihres Volumens an 3 M Natrium-Acetat pH 5,2 und dem 2,5-fachen Volumen an 100%igem Ethanol gemischt und bei –20 °C über Nacht präzipitiert. Am nächsten Tag wurde die DNA durch eine 30 minütige Zentrifugation mit 14 000 rpm bei 4 °C pelletiert und der Überstand abpipettiert. Es wurde 1 ml 70%iger Ethanol zugegeben und nach vorsichtigem Mischen erneut 30 min zentrifugiert. Diese Waschschrte wurden mindestens dreimal wiederholt, um Phenolspuren und Salze zu entfernen. In einem letzten Schritt wurde die DNA mit 100%igem Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation getrocknet. Die DNA wurde daraufhin in einem geeigneten Volumen Aqua bidest. aufgenommen und bei –20 °C gelagert.

### 2.2.7 DNA Restriktion

Zur Restriktion wurden die folgenden Enzyme verwendet (Tab. 8, S.33):

**Tab. 8** Restriktionsenzyme

Enzym	Hersteller und Konzentration	Restriktions-temperatur	Puffer	Schnittstelle
BamHI	MBI Fermentas,	37 °C	spezieller HindIII-	G GATCC

	10 U/μl		Puffer von Fermentas	
EcoRI	MBI Fermentas, 60 U/μl / 10 U/μl	37 °C	spezieller EcoRI- Puffer von Fermentas	G AATTC
HindIII	MBI Fermentas, 10 U/μl	37 °C	R von Fermentas	A AGCTT
SmaI	MBI Fermentas, 10 U/μl	30 °C	Tango 1 von Fermentas	CCC GGG
Cfr9I/XmaCI (SmaI- Erkennungs- sequenz andere Schnittstelle)	MBI Fermentas, 10 U/μl  Boehringer Mannheim, 10 U/μl	37 °C	spezieller Cfr9I- Puffer von Fermentas	C CCGGG
XbaI	MBI Fermentas, 10 U/μl	37 °C	Tango 1 von Fermentas	T CTAGA

In der Regel lief die Reaktion in Volumina von 100 μl – 200 μl bei 37 °C im Brutschrank über Nacht in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern ab. Die Enzymmenge wurde mit 2 U/μg DNA berechnet. Bei Mehrfachrestriktionen wurden die einzelnen Restriktionsschritte fast immer nacheinander durchgeführt, getrennt durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation.

### 2.2.8 Dephosphorylierung

Um eine Religation von geschnittenen Plasmiden zu verhindern, wurden die Plasmide, die als Vektoren fungieren sollten, mit alkalischer Phosphatase in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer für vier Stunden oder über Nacht dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung wurde bei der Vektorherstellung nach jedem Restriktionsschritt ohne vorhergehende Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt und zum Abschluss der Restriktionen, nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Nach der letzten Dephosphorylierung wurde die DNA erneut mit Phenol/Chloroform gereinigt und ethanolpräzipitiert.

### 2.2.9 Agarosegele

Agarosegele wurden verwendet, um Restriktionsschritte zu kontrollieren, den Erfolg einer PCR zu überprüfen und um DNA nach einer Restriktion zu reinigen.

Es wurden je nach Hersteller der Agarose unterschiedlich konzentrierte Gele verwendet (1,2 %, Firma Roth, 1,5-1,8 % Firma Difco). Das jeweilige Agarosepulver wurde in 0,5x TAE gelöst und erhitzt bis die Suspension schlierenfrei war. Daraufhin wurde die Agarose in vorgesehene

Gelkammern gegossen (variabel je nach Gelgröße und gewünschter Taschengröße).

Nach dem Erkalten wurden die Gele in den Elektrophoreseapparat Mupid2 gelegt und mit 0,5x TAE bedeckt. Die aufzutragende DNA wurde in Loading Buffer (Tab. 16, S.47) aufgenommen und in die jeweiligen Geltaschen pipettiert. Da der Loading Buffer farblos war, wurden auf jedem Gel an den Seiten je eine Spur Bromophenolblau/Xylenzjanol Farbstoff (Tab. 17, S.47) sowie als Längenmaßstab ein DNA Marker mit definierten DNA-Fragmenten (Tab. 18, S.47) aufgetragen.

Nach dem Auftragen wurden 100 V Gleichspannung angelegt, wodurch die negativ geladene DNA und die Farbstoffe im Gel in Richtung Pluspol „wandern“. Als Orientierung für die Laufzeit diente die Bromophenolblau Bande, die ähnlich weit „wandert“ wie ein DNA Fragment mit 350 bp. Nachdem die Banden weit genug gelaufen waren, wurde das Gel in Ethidiumbromidlösung für 30 min gefärbt. Anschließend konnte die DNA unter UV-Beleuchtung im Transluminator EagleEye sichtbar gemacht werden.

#### 2.2.10 Reinigung von DNA über Agarosegele und anschließende Gelextraktion

Zur Reinigung von DNA über Agarosegele wurden größere Taschen benötigt, um ein größeres Probenvolumen auftragen zu können. Dafür wurden zwei oder drei Kammzacken mit Tesafilm zusammengeklebt und die DNA in Loading Buffer gelöst aufgetragen. Auch hier wurden Frontmarker und ein Längenmaßstab mitgeführt. Zusätzlich wurde in zwei Taschen neben der großen Tasche die gesuchte DNA aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die beiden randständigen Taschen abgeschnitten, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Beleuchtung die gesuchten Banden auf den Gelstücken markiert. Danach konnte die gesuchte Bande im Bereich der großen Tasche ausgeschnitten werden, ohne dass die erhaltene DNA mit Ethidiumbromid gefärbt werden musste. Die Gelreste wurden in Ethidiumbromid gefärbt, um zu kontrollieren, ob die DNA vollständig ausgeschnitten wurde. Das ausgeschnittene Gelfragment wurde in Stücke geschnitten und fakultativ über Nacht in einer einmolaren NaCl-Lösung aufbewahrt.

Extrahiert wurde die DNA mit einer zehnmütigen Zentrifugation durch einen Filter bei 14 000 rpm und Raumtemperatur und anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion. Als Filter wurden Mini Fritten von MoBiTec verwendet, die in Filtertubes von MoBiTec gesteckt wurden und in denen die größeren Agarosestückchen hängen blieben. Kleinere Agarose-Verunreinigungen wurden durch erneute Zentrifugation ohne Filter pelletiert und der Überstand durch sorgfältiges Abpipettieren gewonnen. Aus diesem Überstand wurde die DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation extrahiert.

### 2.2.11 Messung der DNA Konzentration

Die Messung der DNA-Konzentration wurde mittels UV-Photometer von Spectronic durch Absorptionsmessung (einer 1:200 verdünnten Lösung) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Dazu wurden 3,5 µl der DNA-Probe in 700 µl Aqua bidest. in eine Küvette gegeben und nach Nullpunkt-Tarierung des Photometers die Absorption gemessen.

### 2.2.12 Hybridisierung

Die Technik der Hybridisierung wurde verwendet um zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide zu einem Doppelstrang zu verknüpfen, um ihn anschließend in einen Vektor klonieren zu können. Der Hybridisierungsansatz (Tab. 9, S.36) wurde 10 min bei 95 °C im Wasserbad erhitzt, um intramolekulare Brücken zu lösen. Daraufhin wurde das Wasserbad auf die für das jeweilige Oligonukleotidpaar ausgerechnete Temperatur abgekühlt. Diese Temperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Oligonukleotide und sollte etwas unterhalb der berechneten  $T_m$  liegen. Die  $T_m$  der Oligonukleotide wird in Abhängigkeit des GC-Gehaltes berechnet und ist ein Maß für die Festigkeit der Bindung von komplementären DNA-Strängen. Nach Erreichen dieser Temperatur kam der Ansatz für 5 min in ein Eisbad, was zur Renaturierung führt. Anschließend wurde die hybridisierte DNA phosphoryliert.

Tab. 9 Hybridisierungsansatz

Oligo1 (200 µM) kodierender Strang	Oligo2 (200 µM) nicht kodierender Strang	NaCl (1 M)	Aqua bidest.	Gesamtansatz
3,5 µl	3,5 µl	5 µl	88 µl	100 µl
700 pmol	700 pmol	0,05 M		

### 2.2.13 Phosphorylierung doppelsträngiger DNA

Die hybridisierte DNA musste phosphoryliert werden, um eine Ligation mit dem dephosphorylierten Vektor zu ermöglichen. Hierzu wurde der Phosphorylierungsansatz (Tab. 10, S.36) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der Phosphorylierung wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion zur Enzyminaktivierung durchgeführt.

Tab. 10 Phosphorylierungsansatz

hybridisierte Oligos	Enzym T4- Polynukleotidk inase (10 U/µl)	10xPuffer	ATP (250 mM)	Aqua bidest.	DTT	Gesamtansatz
50 µl	1 µl	10 µl	1 µl	32 µl	5 µl	100 µl
350 pmol			Ad 1 mM	Ad 100 µl	Ad 50 mM	

Eine Einheit des Enzyms überträgt 1 nmol Phosphat von ATP auf das 5'-OH-Ende der DNA, in 30 min bei 37 °C; Berechnung der Menge an 5'-OH-Enden der eingesetzten DNA → Bestimmung der Enzymmenge (berechnete Enzymmenge etwa mit 10-15 multiplizieren).

## **2.3 Klonierung**

### **2.3.1 Ligation**

Die mit Restriktionsenzymen geschnittenen Vektoren und die durch Restriktion oder Hybridisierung hergestellten Inserts wurden mit T4-DNA-Ligase ligiert. Die Ligationen fanden in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern für 2-4 Stunden bei 16 °C im Thermocycler statt, normalerweise in 30 µl Endvolumen. Vektor- und Plasmidkonzentrationen wurden in Vorversuchen festgelegt.

Wenn sich an die Ligation eine Elektroporation anschließen sollte, wurden die Ansätze durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation von Salzen und Enzymen befreit, bei Transformation in chemisch kompetente Bakterien konnte der Ligationsansatz direkt, ohne vorherige Reinigung, verwendet werden.

Als Kontrolle wurde bei jeder Ligation ein Ansatz der nur Vektor-DNA und ein Ansatz der nur Insert-DNA enthielt mitgeführt, um bei der Auswertung eine Abschätzung vornehmen zu können, wie viele der entstandenen Klone das Plasmid mit dem gewünschten Insert und wie viele nur religierte Vektor- bzw. Insert-DNA enthielten.

### **2.3.2 Kompetente Bakterienzellen**

#### ***2.3.2.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien***

Zunächst wurden die Bakterien, die kompetent gemacht werden sollten, in LB Medium (Tab. 45, S.53) über Nacht kultiviert.

Von der Übernachtskultur wurden 20 ml abgenommen und in 1 000 ml LB Medium inokuliert. Die Suspension wurde, unter kontinuierlicher Messung der optischen Dichte, bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,7, gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm, wurde die Suspension auf Eis gekühlt, in 250 ml Zentrifugentubes (Beckmann) überführt und bei 5 000 rpm in der Beckmann JH-2S Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet im gleichen Volumen eiskaltem Aqua bidest. aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation mit 5 000 rpm wurde das Pellet in 1/10tel des Volumens Aqua bidest. gelöst und abzentrifugiert. Dies wurde wiederholt bis das Pellet in 1 ml Aqua bidest. aufgenommen werden konnte. Die entstandene

Menge an Bakteriensuspension wurde gemessen und 1/3tel des Volumens an Glycerol zugegeben. Diese Mischung wurde aliquotiert in 500 µl Eppendorftubes, einige Stunden im –20 °C Eisschrank eingefroren und anschließend bei –80 °C gelagert.

### 2.3.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Rubidium/Chlorid-Bakterien

Für die Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien wurden zunächst die kompetent zu machenden Bakterien in 20 ml PSI Medium (Tab. 46, S.53) über Nacht kultiviert.

Von der Übernachtskultur wurde 1 ml abgenommen und in 200 ml PSI Medium überführt. Diese 200 ml wurden unter regelmäßiger Messung der optischen Dichte bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 0,48, bei 550 nm Wellenlänge, wurde die Suspension auf Eis gekühlt, in 250 ml Zentrifugentubes (Beckmann) gefüllt und bei 5 000 rpm in der Beckmann JH-2S Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in 0,4 Volumina eiskalter TfbI Lösung (Tab. 19, S.47) aufgenommen und 15 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation mit 5 000 rpm wurde das Pellet in 0,04 Volumina eiskalter TfbII Lösung (Tab. 20, S.48) resuspendiert und 15 min auf Eis gestellt. Die entstandene Bakteriensuspension wurde in 500 µl Eppendorftubes aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um danach im –80 °C Eisschrank gelagert werden zu können.

### 2.3.3 Transformation elektrokompeterer Bakterien (Elektroporation)

Zur Transformation durch Elektroporation wurden 50 µl der kompetenten Bakterien mit den durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigten Ligationsansätzen 30 min auf Eis inkubiert. Die Reinigung mit Phenol/Chloroform und anschließende DNA-Präzipitation mit Ethanol war nötig, um Salze und Proteine aus dem Ansatz zu entfernen, die sonst dazu führten, dass die Ansätze sich beim Elektroporieren zu stark erhitzen und die Bakterien abstarben.

Für die Elektroporation wurde die Suspension in eisgekühlte Metallküvetten gefüllt. Diese Küvetten wurden in den Elektroporator gestellt und mit einer Spannung von 2,5 kV, bei einer Kondensator-Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ohm elektroporiert. Die Zeit, die bis zum Entladen des Kondensators verging, lag zwischen 4,96 ms und 5,02 ms. Anschließend wurden die Küvetten mit 800 µl 37 °C warmem SOC Medium (Tab. 49, S.54) gespült und die Suspension eine Stunde bei 37 °C auf einen Wärmeblock gestellt.

Nachdem sich die Bakterien von der Elektroporation erholt hatten, wurden sie abzentrifugiert, in 50 µl LB Medium resuspendiert, auf LB Agarplatten mit dem jeweils nötigen Antibiotikum ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Morgen konnten die Kolonien gezählt und mit einer PCR getestet werden. Bei jeder Transformation wurden eine Positivkontrolle mit einem Plasmid, das sicher transformiert wurde und eine Negativkontrolle, die keine DNA enthielt, mitgeführt.

### 2.3.4 Transformation mit Rubidium/Chlorid-Bakterien

Für die Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente Bakterien wurden 100 µl der kompetenten Bakterien mit dem Ligationsansatz in 1,5 ml Eppendorftubes 45 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch 2 minütiges Erhitzen der Suspension in einem 42 °C Wasserbad. Anschließend wurden 900 µl vorgewärmtes LB Medium zu der Suspension gegeben und für eine Stunde bei 37 °C im Wärmeblock inkubiert. Daraufhin wurden die Bakterien abzentrifugiert, in 50 µl LB Medium resuspendiert und auf LB Agarplatten mit dem erforderlichen Antibiotikum ausplattiert. Nach einer über Nacht Bebrütung bei 37 °C konnten die Kolonien gezählt und mit einer PCR getestet werden. Bei jeder Transformation wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt.

### 2.3.5 Asservieren von Klonen

Um Klone dauerhaft aufbewahren zu können, wurden sie bei –80 °C tiefgefroren. Dazu wurden die Klone in einigen Milliliter LB-Medium (Tab. 45, S.53) über Nacht fermentiert. Von der erhaltenen Suspension wurden 900 µl mit 300 µl Glycerol gemischt, langsam bei –20 °C eingefroren und nach drei Stunden bei –80 °C gelagert.

### 2.3.6 Screening mit Sonden-Hybridisierung

Diese Methode wurde benutzt, um aus einer Vielzahl von Klonen aus Transformationsexperimenten die gewünschten mit dem richtigen Insert herauszufinden. Die bei dem Transformationsexperiment gewonnenen Klone wurden auf Nylonmembranen aufgetupft, die mit einem beschrifteten Gitternetz und einem Asymmetriemarker versehen waren. Die betupften Membranen wurden auf Agarplatten gelegt und eine Nacht bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Morgen wurden die Membranen von den Platten entfernt und für zwei Stunden bei 80 °C im Trockenschrank getrocknet. Die Agarplatten wurden in Parafilm eingewickelt und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt, um weiteres Wachstum zu verhindern. Die getrockneten Membranen wurden durch Zellyse mit den in Tab. 11, S. 39 aufgeführten Lösungen vorbereitet.

Tab. 11 Lösungen für die Zellyse in benötigter Reihenfolge

Lösung	pH	Inkubation in min
1. 0,5 M NaOH		5
2. Membran mit Aqua bidest. waschen		
3. 1 M Tris-Cl	7,5	5
4. 0,5 M Tris-Cl 1,25 M NaCl	7,5	5

Nach den Lyseschritten wurde die Membran erst an der Luft und anschließend im Trockenschrank bei 80 °C für eine Stunde getrocknet.

Die getrockneten Membranen wurden mit einem entsprechenden Prähybridisierungspuffer (Tab. 21, S.48) prähybridisiert. Dafür wurden die Membranen zusammen mit dem Puffer in Hybridisiertubes (s. Tab. 1, S.26, Geräteliste) gegeben und bei 50 °C über Nacht in dem Hybridisierofen Hybaid Mikro 4 inkubiert.

#### *2.3.6.1 Herstellung der Hybridisierungssonde*

Um die Hybridisierungssonde herzustellen, wurden zunächst zwei PCR Produkte der gewünschten Sondensequenz mit dem Qiagen PCR-Purification-Kit gereinigt. Die erhaltene DNA wurde quantifiziert und mit dem Roche Biotin-Kit biotinyliert. Dazu wurde zu jedem µg DNA 1 µl Biotin-Chem-Link gegeben und der Ansatz bis 20 µl mit Aqua bidest. aufgefüllt. Nach sorgfältigem Mischen wurde der Ansatz 30 min bei 80 °C inkubiert, anschließend an zentrifugiert, um das Kondensat aus dem Deckel zu entfernen und die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Stopp-Reagenz aus dem Kit beendet. Die erhaltene biotinylierte Sonde wurde bei –20 °C aufbewahrt. Biotin-Chem-Link ist eine cis-Platin Verbindung, die an Position N7 von Guanosin- und Adenosin-Basen bindet und zur nicht radioaktiven Markierung und Detektion von DNA verwendet wird. An das Biotin der Sonde kann Streptavidin binden, welches über vier Biotinbindungsstellen verfügt. An eine dieser Bindungsstellen kann in einem letzten Schritt an Biotin gekoppelte alkalische Phosphatase binden, die ein Substrat (hier CSPD) in ein Licht-emittierendes Produkt umwandelt, das auf einem Film detektiert werden kann.

Für die Hybridisierung musste die Sonde vorbereitet werden. Dazu wurden 100 µl Formamid zu dem Ansatz gegeben, alles bei 100 °C für 10 min gekocht, in Eiswasser abgekühlt, zum Prähybridisierungspuffer, der auf 70 °C erhitzt wurde, zugegeben und gut gemischt. Dieser Puffer wurde dann als Hybridisierungspuffer weiterverwendet.

#### *2.3.6.2 Hybridisieren*

Für die eigentliche Hybridisierung wurde der Prähybridisierungspuffer aus den Hybridisierungskolben durch den 70 °C warmen Hybridisierungspuffer mit der biotinylierten Sonde ausgetauscht. Die Membranen wurden bei 70 °C im Hybridisierofen für 4 Stunden hybridisiert. Anschließend wurden die Membranen je einmal mit Puffer 1 und Puffer 2 gewaschen (Tab. 23, S.48, Tab. 24, S.48).

Für die sich anschließende Detektion der gebundenen Sonden wurden die Membranen zunächst mit Blockingpuffer (Tab. 25, S.49) für 30 min geblockt, dann mit Streptavidin-gekoppelter alkalischer Phosphatase (1:10 000 in Blockingpuffer) für 30 min inkubiert und zweimal 15 min mit Waschpuffer (Tab. 26, S.49) gewaschen. Das Streptavidin hat eine hohe Affinität zu dem Biotin der Sonde. Nach Äquilibrierung mit Detektionspuffer (Tab. 27, S.49)



wurde „CSPD ready to use“ tropfenweise zugegeben, bis die Membranen vollständig bedeckt waren. „CSPD ready to use“ (Disodium 3-(4-meth-oxyspiro ((1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3. 3.1.13,7] )) decan-4-yl)phenyl phosphate) ist ein Substrat für die alkalische Phosphatase und wird von diesem in ein Licht-emittierendes Produkt umgewandelt. Die Membranen wurden zunächst kurz bei Raumtemperatur und anschließend für 5-15 min bei 37 °C inkubiert.

Jetzt konnten die Membranen zum Belichten auf einen Film aufgelegt und positive Kolonien zugeordnet werden.

## 2.4 Sequenzierung

Sequenzierungsexperimente wurden durchgeführt, um die Sequenz der durch PCR oder Hybridisierung hergestellten Konstrukte zu verifizieren. Es wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger [223] verwendet.

Zunächst wurde die eigentliche Sequenzierreaktion durchgeführt. Hierzu wurden Plasmide aus Minipräparationen mit einem Kit von Amersham-Pharmacia Biotech sequenziert. Eine DNA Menge von 0,30 pmol wurde in einem 500 µl Eppendorftube mit Aqua bidest. auf 25 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 4 pmol des jeweils notwendigen mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Sequenzierungsprimers, wurde der entstandene Premix auf vier Tubes verteilt. Der verwendete Sequenzierungsprimer der Firma MWG war mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 markiert. Zu den vier Tubes wurde je ein Mikroliter Didesoxynucleotide (Abbruchnucleotide aus dem Kit) gegeben, der Reaktionsansatz mit 30 µl Mineralöl überschichtet und nach einem kurzen Anzentrifugieren in den Thermocycler gestellt (für Programmzyklus siehe Tab. 12, S.41).

**Tab. 12** Thermocycler Programmwahl für die Sequenzierung

Temperatur	Zeitdauer	Zyklusanzahl	Sequenzierschritt
95 °C	5 min	1x	Denaturierung
95 °C	30 sec	30x	Annealing
55 °C	30 sec	30x	Extension
70 °C	1 min	30x	Denaturierung
4 °C	Lagerung		Lagerung im Kühlschranks möglich

Im Anschluss an die Sequenzierung wurden je 6 µl Stoppreagenz (Tab. 28, S.49) unter das Öl pipettiert und der Ansatz für 5 min bei 95 °C denaturiert, um die Stränge zu trennen. Anschließend kamen die Proben in ein Eisbad. Das Stoppreagenz enthält Farbstoff und Formamid, das sich an die Einzelstrang DNA anlagert und das erneute Aneinanderlagern

während des Erkaltens verhindert.

#### 2.4.1 Herstellung des Sequenziergels

Die Darstellung des Sequenzierproduktes erfolgte mit einem Licor-Sequenzierer auf einem Long Ranger Gel, das zwischen zwei Glasplatten (225 mm x 1000 mm) mit einer Dicke von 0,25 mm gegossen wurde und 90 min polymerisieren musste (Tab. 29, S.49). Nach der Polymerisation wurden die Glasplatten mit dem Gel in den Sequenzierer eingebaut und auf 45 °C vorgewärmt, bevor die Proben aufgetragen werden konnten. Die entstandene Sequenz wurde von einem Laser erfasst und mit einem Computerprogramm dargestellt, mit dessen Hilfe auch das halbautomatische Lesen der Daten vorgenommen wurde. Da die Sequenzen von zwei Seiten gelesen wurden, erfolgte eine Kontrolle durch die 50-100%ige Überlappung der Sequenzen.

#### 2.4.2 Analyse der Daten mit HUSAR

Die Analyse der Sequenzdaten fand mit dem über telnet zugänglichen Programm HUSAR 2.0 (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) statt. Dieses Programm, das vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg und der Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt wird, umfasst verschiedene Sequenzanalyse-Programme.

### 2.5 Expression und Darstellung der Proteine mit His-TAG

Die Expressionsexperimente wurden durchgeführt, um die erfolgreiche Klonierung der Inserts in den Expressionsvektor pQE30, die Exprimierbarkeit der Konstrukte, deren richtige Größe und das Vorhandensein des 6-His-tag nachzuweisen.

#### 2.5.1 Fermentierung

Die in LB-Medium (Tab. 45, S.53) mit Ampicillin und Kanamycin über Nacht kultivierten Bakterien wurden 1:15 verdünnt und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,7 bei 550 nm fermentiert. Nach Erreichen dieser OD wurden von der Suspension 2 ml abgenommen und die Bakterien in einem 2 ml Eppendorftube bei 7 500 rpm und 16 °C für 8 min abzentrifugiert. Diese Probe bildete die nicht induzierte Kontrolle. Das Pellet wurde in 200 µl Aqua bidest. und 40 µl Protein Loading Buffer (Tab. 44, S.53) resuspendiert, die Mischung 15 min auf 95 °C erhitzt und erneut bei 14 000 rpm und 16 °C für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in Aliquots à 120 µl eingefroren.

Zu der restlichen Suspension wurde sofort Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) ad 1 mM für eine zweistündige oder längere Induktion gegeben. Nach der gewünschten Induktionszeit wurden diese Proben genauso aufbereitet wie die nicht induzierten Proben und aliquotiert eingefroren.

### 2.5.2 Gelelektrophorese zur Proteinauftrennung

Die Darstellung von Proteinen erfolgte mit 12,5%igen Acrylamidgelen.

Es wurde ein Elektrophoresesystem von Biorad verwendet. In der dafür vorgesehenen Kammer wurde ein 1,5 mm dickes Gel gegossen. Dies bestand aus einem Trenngel (Tab. 30, S.50) und einem darübergelassenen Sammelgel (Tab. 31, S.50), in das ein Kamm mit 20 Zähnen gesteckt wurde. Das Trenngel musste 40 min polymerisieren, das Sammelgel 20 min. Um eine möglichst gerade Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel zu erreichen, wurde etwas Aqua bidest. auf das Trenngel pipettiert, während dieses polymerisierte.

Das polymerisierte Gel wurde in einen Halteapparat eingebaut und in ein Tankgefäß gehängt, in dem die eigentliche Elektrophorese ablief. Bei diesem Zusammenbau musste auf die Abdichtung zwischen Anoden- und der Kathodenkammer geachtet werden. Die Kathodenkammer wurde mit Kathodenpuffer (Tab. 33, S.50) gefüllt, der Kamm gezogen und die einzelnen Taschen gespült. Die auf Eis aufgetauten Proben zu je 20  $\mu$ l wurden in die Taschen pipettiert und der Anodenpuffer (Tab. 32, S.50) in die Anodenkammer gefüllt. Die Kammer wurde geschlossen und die Elektrophorese mit einer konstanten Amperezahl von 70 mA gestartet. Die Elektrophorese wurde nach 2,5 bis 3 Stunden beendet.

### 2.5.3 Serva Blue G Färbung

Die Blaufärbung eines Gels erfolgte, um die aufgetrennten Proteinbanden darzustellen. Dazu wurde das Gel vorsichtig von den Glasplatten gelöst und über Nacht in eine Serva Blue G Färbelösung gelegt (Tab. 42, S.52). Daraufhin wurde das Gel in Entfärbe/Fixierungslösung (Tab. 43, S.52) gegeben, bis der optimale Färbungsgrad erreicht war und das Gel mit einem Photo dokumentiert werden konnte.

### 2.5.4 Western Blot (Tank Blot)

Der Western Blot wurde durchgeführt, um die mittels Elektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Membran zu übertragen und anschließend mit Hilfe von Antikörpern darzustellen.

Hierzu wurden die Gele auf Nitrozellulosemembranen Protran BA 83 gelegt, zwischen zwei Blottingpapiere und zwei Kunststofffilme geklemmt und in die Blottingkammer gestellt. Alle

Bestandteile außer dem Gel wurden vor dem Zusammenbau mit Transferpuffer (Tab. 35, S.51) durchtränkt. Nach jeder Lage wurden 2-3 ml Transferpuffer aufgetropft und mit einer Pipette glatt gestrichen, um kleine Luftblasen zu entfernen.

Die Tankkammer wurde mit Transferpuffer gefüllt und auf Eis gestellt. Der Blottingvorgang lief bei 100 V für eine Stunde.

### 2.5.5 Immundetektion nach Western Blot

Die Immundetektion wurde im Anschluss an einen Western Blot durchgeführt, um die auf die Membran geblotteten Proteine mit einem antikörpergebundenen Fluoreszenzfarbstoff darzustellen.

Zunächst wurde die Membran mit 10 % Magermilchpulver in TTBS-Puffer (Tab. 51, S.54) über Nacht geblockt, um alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran abzudecken. Die geblockte Membran wurde in TTBS gespült und zweimal 15 min in TTBS gewaschen.

Jetzt wurde die Membran mit dem ersten Antikörper eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (Tab. 38, S.51). Dieser Maus-Antikörper richtete sich gegen die 6-HIS Domäne, die Teil aller hergestellten Proteine war. Nach dieser ersten Inkubation wurde die Membran erneut mit TTBS gespült und zweimal 15 min in TTBS gewaschen. Die gewaschene Membran wurde mit einem zweiten Anti-Maus-Antikörper, an den eine Peroxidase gekoppelt (Tab. 39, S.52) war und der sich gegen den ersten Antikörper richtete, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen konnten die Peroxidase-gekoppelten Antikörper detektiert werden. Hierzu wurde die Membran 30 sek in Detektionslösung mit Luminol (Tab. 40, S.52) getaucht, die überschüssige Flüssigkeit entfernt und die entstehende Fluoreszenz auf einem Film festgehalten.

### 2.5.6 Amidoschwarz-Färbung von Proteinblots

Nach dem Photographieren der Membran wurde diese zusätzlich noch mit Amidoschwarz gefärbt, um die Bandenzuordnung zu erleichtern.

Dazu wurde die Membran mit Aqua bidest. dreimal je 5 min gewaschen und anschließend mit Amidoschwarz für 4 min gefärbt (Tab. 41, S.52). Nach kurzem Entfärben mit Eisessig wurde die Membran luftgetrocknet und photographiert.

## 2.6 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG oder Eurogentech synthetisiert und als PCR-Primer und Sequenzierprimer sowie für die Hybridisierung benutzt. (Tab. 13, S.45)

Tab. 13 Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid -nummer	Verwendung	Sequenz
194	PCR; <i>forward Oligo</i> ; Zus. mit Oligos 195 (RhoA) oder 196 (RhoC) zur PCR-Herstellung der Konstrukte: PKA- <i>site</i> - EGFP - rhoA/Crd	5' - GAT CGA ATT CGG ATC CCG CCG AGC CAG CGT GTC TAG AAT GGT GAG CAA GGG CGA GGA GCT GTT CA - 3'
195	PCR; <i>reverse Oligo</i> zusammen mit 194	5' - GCT AAA GCT TTC AAC CAG ATT TTT TCT TCC CAC GTC TAG CGC CCG GGC CAG CTT GAG CTC GAG ATC TGA GTC CGG ACT TGT A - 3'
196	PCR; <i>reverse Oligo</i> zusammen mit 194	5' - GTA CAA GCT TTC AGC CCC TCC GAC GCT TGT TCT TGC GGA CGC CCG GGC CAG CTT GAG CTC GAG ATC TGA GTC CGG ACT TGT A - 3'
199	PCR; PDZ-ncs bindet an die PDZ-Domäne	5' - CCT CCA GCC CCA CAC TGT TGA CCG CCA - 3'
208	pQE30-PCR-Oligo, downstream der MCS; bindet an bp 230-211 (ncs)	5' - TAC TGG ATC TAT CAA CAG GA - 3'
203 (kodierender Strang)	Hybridisierung; Oligo für das Konstrukt RhoA mit CAAX-Box	5' - CCG GGC GCT AGA CGT GGG AAG AAA AAA TCT GGT TGC CTT GTC TTG TGA A - 3'
204 (nicht kodierender Strang)	Hybridisierung; <i>reverse Oligo</i> zu 203 -ncs	5' - AGC TTT CAC AAG ACA AGG CAA CCA GAT TTT TTC TTC CCA CGT CTA GCG C - 3'
205 (kodierender Strang)	Hybridisierung; Oligo für das Konstrukt RhoC mit CAAX-Box	5' - CCG GGC GTC CGC AAG AAC AAG CGT CGG AGG GGC TGT CCC ATT CTC TGA A - 3'
206 (nicht kodierender Strang)	Hybridisierung; <i>reverse Oligo</i> zu 205 - ncs	5' - AGC TTT CAG AGA ATG GGA CAG CCC CTC CGA CGC TTG TTC TTG CGG ACG C - 3'
97	Sequenzierung von Klonen in pUC19 von 195/196er Seite; M13 <i>reverse Oligo</i>	5' - GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG A - 3'
198	Sequenzierung von Klonen in pUC19 von 194er Seite; M13 <i>forward Oligo</i>	5' - AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT - 3'
210	Sequenzierung der Promotorregion von pQE30, bindet an bp 3379-3402 des kodierenden Strangs von pQE30	5' - TGC CAC CTG ACG TCT AAG AAA CCA-3'

## 2.7 Verwendete Bakterienstämme

Klonierung: Für die Klonierungsexperimente wurde der Stamm DH5alpha verwendet.

Expression: Für die Expressionsexperimente wurden die Stämme M15 und SG13009 verwendet.

Genauere Informationen zu den verwendeten Stämmen sind Tab. 14, S.46 zu entnehmen.

Tab. 14 Verwendete Stämme

	Bakterienstamm	Beschreibung	Hersteller
Klonierung	DH5alpha	Rezeptor-Stamm für Klonierungen (ohne Plasmid)	
Expression	M15	enthält Plasmid pREP4 zur Expressionskontrolle	Qiagen
	SG13009	<i>E.coli</i> mit Mutationen in lon/sulA/sulB- Genen, Proteindegradation in diesem Stamm ist herabgesetzt. Enthält Plasmid pREP4 zur Expressionskontrolle	Qiagen

## 2.8 Eingesetzte Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind in Tab. 15, S.46 aufgelistet.

Tab. 15 Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Hersteller	Stamm mit „leerem“ Plasmid	Sequenz/Referenz
pUC19	Klonierungsvektor		DH5- $\alpha$	[305]
pQE30	Expressionsvektor	Qiagen	M15	QIAexpressio nist [211]
pEGFP mit RhoA/RhoC	Vektor für EGFP-Konstrukte	Labor AG Adam	DH5- $\alpha$	
pREP4	konstitutive Expression des Expressions-suppressors lac-R	Qiagen	in M15 und SG13009 enthalten	QIAexpressio nist [211]

## 2.9 Puffer und Medien

Tab. 16 6x DNA Loading Buffer

Komponente	Menge für 100 ml	Konzentration
Glycerin	30 ml	30 %
TAE (50x) ( Tab. 47, S.53)	6 ml	3x
Aqua bidest.	64 ml	ad 100 ml

(ergibt bei Mischen mit Probe zu 1x: 5 % Glycerin, 0,5x TAE)

Tab. 17 Agarosegel Farbstoff

Komponente	Menge für 100 ml
6x Loading Buffer ohne Farbe	30 µl
6x Loading Buffer mit Farbe (Fermentas)	10 µl
Aqua bidest.	200 µl

Tab. 18 1x DNA-Marker

Komponente	Menge für 200 µl Ansatz	Konzentration
Glycerol (100 % Lsg.)	10 µl	5 %
TAE (50x Lsg.)	2 µl	0,5x
Marker (Ladder-Mix)	5 µl	
Aqua bidest.	183 µl	ad 200 µl

Tab. 19 TfbI

Komponente	Menge für 200 ml Ansatz	Konzentration
Natriumacetat	0,588 g	30 mM
Rubidiumchlorid	2,42 g	100 mM
Kalziumchlorid	0,294 g	10 mM
Manganchlorid	2,0 g	50 mM
Glycerol	30 ml	15 % v/v

pH 5.8 mit verdünnter Essigsäure

Tab. 20 Tfbll

Komponente	Menge für 100 ml Ansatz	Konzentration
MOPS	0,21 g	10 mM
Kalziumchlorid	1,1 g	75 mM
Rubidiumchlorid	0,121 g	10 mM
Glycerol	15 ml	15 % v/v

Tab. 21 Prähybridisierungspuffer

Komponente	Menge für 50 ml Ansatz	Konzentration
SSC (Tab. 48, S.54)	12,5 ml	5x
N-Laryolsarcosin (5 % Lsg)	1 ml	0,1 %
SDS (10 % Lsg)	0,1 ml	0,02 %
Blocking (10 % Lsg)	5 ml	1 %
Aqua bidest.	31 ml	ad 50 ml

Tab. 22 Maleinsäure-Puffer

Komponente	Menge pro Liter	Konzentration
Maleinsäure	11,6 g	0,1 M
NaCl	8,7 g	0,15 M
NaOH		auf pH 7,5 titrieren

Tab. 23 Puffer 1

Komponente	Menge pro 600 ml	Konzentration
SSC (Tab. 48, S.54)	150 ml	5x
SDS	0,6 g SDS	0,1 %
Aqua bidest.		ad 600 ml

Tab. 24 Puffer 2

Komponente	Menge pro Liter	Konzentration
SSC (Tab. 48, S.54)	100 ml	2x
SDS (10 % SDS)	10 ml	0,1 %
Aqua bidest.		ad 1 Liter



Tab. 25 Blocking Reagenz

Komponente	Menge für 50 ml Ansatz	Konzentration
Blocking (10%ige Lsg)	5 g	1 %
Maleinsäurepuffer (pH 7,5)	50 ml	auf 60 °C erhitzen

Tab. 26 Waschpuffer

Komponente	Menge für 100 ml Ansatz	Konzentration
Maleinsäure	100 ml	
Tween20 (=Polyethylenesorbitan monolaurate)	300 µl	0,3 %

Tab. 27 Detektionspuffer

Komponente	Menge pro Liter	Konzentration
Tris-HCL (pH 9,5)	12,114 g	0,1 M
NaCl	5,844 g	0,1 M

Tab. 28 Stoppreagenz für Sequenzierung

Komponente	50 ml Gesamtvolumen
Bromphenolblau	50 mg
Xylencyanol	50 mg
EDTA 0,5 M	1 ml
Formamid	ad 50 ml

Tab. 29 5,5 %-Long Ranger Gel

Komponente	70 ml Gel
Harnstoff/Urea	29,4 g
TSB 10x	8,4 ml
Aqua bidest. ad 50 ml	Ca. 30 ml

In 37 °C Wasserbad legen, bis vollständig gelöst.

Long Ranger Gel Lösung 50 %	7,7 ml
DMSO	0,7 ml
Aqua bidest. ad	3 ml

60 ml	
-------	--

auf Eis stellen, wenn erkaltet ist:

TEMED	34 $\mu$ l
APS	340 $\mu$ l

**Tab. 30** 12,5 % Trenngel

Komponente	Einzelansatz für 2 Gele 1,5 mm-Kamm (15 ml)	Konzentration
Acrylamid / Bisacrylamid (40 %)	4,7 ml	12,5 %
Gelpuffer (Tab. 34, S.51)	5 ml	
Glycerol	1,5 ml	
TEMED	7,5 $\mu$ l	0,1 %
APS 10 %	75 $\mu$ l	0,1 %
Aqua bidest.	3,7 ml	ad 15 ml

**Tab. 31** 4 % Sammelgel

Komponente	Einzelansatz für 2 Gele 1,5 mm-Kamm	Konzentration
Acrylamid / Bisacrylamid (40 %)	0,75 ml	4 %
Gelpuffer (Tab. 34, S.51)	1,87 ml	
TEMED	5,7 $\mu$ l	0,1 %
APS 10 %	75 $\mu$ l	0,1 %
Aqua bidest.	4,9 ml	

**Tab. 32** Anodenpuffer

Komponente	Einzelansatz pro Liter	Konzentration
Tris	24,22 g	200 mM
Aqua bidest.		ad 1 Liter

**Tab. 33** Kathodenpuffer

Komponente	Einzelansatz pro Liter	Konzentration
Tris	12,11 g	100 mM
Tricine	17,92 g	100 mM

SDS	1 g	0,1 %
Aqua bidest.		ad 1 Liter

**Tab. 34** Gelpuffer

Komponente	Einzelansatz pro Liter	Konzentration
Tris	364 g	3 M
SDS	3 g	0,3 %
Aqua bidest.		ad 1 Liter

**Tab. 35** Transfer-Puffer

Komponente	Menge pro Liter	Konzentration
Tris	3,033 g	25 mM
Glycin	14,4 g	192 mM
Ethanol	200 ml	20 %
Aqua bidest.		ad 1 Liter

**Tab. 36** Aufschlusspuffer; 2 x 20 ml

Komponente	Menge für 20 ml Ansatz	Konzentration
2xTBS (Tab. 50, S.54) pH8,0	20 ml	ad 20 ml
Lysozym	20 mg	1 000 µg/ml
PMSF (100 mM)	100 µl	0,5 mM

**Tab. 37** TSB-Elutionspuffer

Komponente	Menge für 10 ml Ansatz	Konzentration
2xTBS (Tab. 50, S.54)	9 ml	Ad 10 ml
Gluthation (0,1 M)	1 ml	10 mM

**Tab. 38** Antikörperverdünnung für erste Inkubation (Anti-His AK)

Komponente	Menge für 10 ml Ansatz
TTBS (Tab. 51, S.54)	10 ml
BSA (Bovines Serumalbumin)	0,3 g
Penta HIS AK	4 µl (=1:5 000 Verdünnung)

**Tab. 39** Antikörperverdünnung für Zweit-Antikörper-Inkubation (Anti-Maus Peroxidase-gekoppelter AK)

Komponente	Menge für 10 ml Ansatz
TTBS (Tab. 51, S.54)	10 ml
Antimouse POD	1 µl (=1:10 000 Verdünnung)

**Tab. 40** Detektionslösung

Komponente	Menge für 100 ml Ansatz	Konzentration
DMSO	200 µl	
Luminol (=3-Aminophthalhydrazide) = 2,5 mg/ml	100 µl	10x
4-iodophenol (Pulver bei 4 °C) = 3,0 mg/ml in DMSO	100 µl	10x
Tris-HCl, pH 7,5	500 µl	100 mM
Wasserstoffperoxid	5 µl	3 % (w/v)
Aqua bidest.	95 µl	ad 1 ml

**Tab. 41** Amidoschwarz-Färbelösung

Komponente	Menge für 100 ml Ansatz	Konzentration
Amidoschwarz in Essigsäure	5 ml	0,1 % w/v in 10 % Essigsäure
Aqua bidest.	95 ml	ad 100 ml

**Tab. 42** Serva Blue G Färbung

Komponente	Menge für 100 ml Ansatz	Konzentration
Serva Blue G (Serva 35050)	0,05 g	
In Ethanol lösen	30 ml	30 %
Eisessig	10 ml	10 %
Aqua bidest.	60 ml	ad 100 ml

**Tab. 43** Entfärbefixierungslösung

Komponente	Menge für 500 ml Ansatz	Konzentration
Essigsäure	50 ml	10 %
100 % Ethanol	150 ml	30 %
Aqua bidest.	300 ml	Ad 500 ml

Tab. 44 6x Protein Loading Buffer für Tris/Tricine-Gele

Komponente	Menge für 20 ml Ansatz	Konzentration
Tris pH 6,8	6 ml einer 0,5 M Lösung	150 mM
SDS	2,4 g	12 %
Glycerol	6 ml	30 %
Serva Blue G	6 mg	0,03 %
Aqua bidest.		Ad 17 ml
2-Mercaptoethanol	Insgesamt 3 ml wird zu den einzelnen Aliquots bei Gebrauch zugegeben	15 %

aliquotieren á 850 µl und vor Gebrauch jeweils 150 µl 2-Mercaptoethanol zugeben

Tab. 45 LB Medium

Komponente	Menge pro Liter
Hefe Extrakt	5 g
Tryptone	10 g
NaCl	5 g
Aqua bidest.	1 Liter

pH 7,2 mit NaOH

Tab. 46 Psi Medium

Komponente	Menge pro Liter
Hefe Extrakt	5 g
Tryptone	20 g
Magnesiumsulfat	5 g
Aqua bidest.	1 Liter

pH 7,6 mit Kaliumhydroxid

Tab. 47 TAE-Puffer

Komponente	Menge pro Liter	Konzentration
Tris-acetat	4,84 g	40 mM
EDTA	0,292 g	1 mM
Aqua bidest.		ad 1 Liter

Tab. 48 SSC 20x

Komponente	Menge pro Liter	Konzentration
NaCl	175,32 g	3 M
Natriumcitrat	88,23 g	0,3 M

pH 7,0 mit 1 M HCl

Tab. 49 SOC Medium

Komponente (Stocklösung)	Menge pro 100 ml	Konzentration
Hefeextrakt	0,5 g	0,5 %
Tryptone	2 g	2 %
NaCl (1 M)	1 ml	10 mM
KCl (1 M)	0,25 ml	2,5 mM
MgCl (1 M)	1 ml	10 mM
MgSO <sub>4</sub> (1 M)	2 ml	20 mM
Glucose (1 M)	2 ml	20 mM
Aqua bidest.		ad 100 ml

Tab. 50 TBS-Puffer

Komponente	Menge pro Liter	Konzentration
Tris pH 8,0	12,1g/l	100 mM
NaCl	9 g/l	0,9 %
Aqua bidest.		ad 1 Liter

Tab. 51 TTBS-Puffer

Komponente	Menge pro Liter	Konzentration
TBS (Tab. 50, S.54)	999 ml	100 mM Tris- HCl , pH 7,5
Tween 20 (= Polyethylenesorbitan monolaurate)	1 ml	0,1 %(v/v)

Tab. 52 Tris-HCL

Komponente	Menge pro Liter	Konzentration
Tris	121,14 g	1 M
HCl		bis zum gewünschten pH

### 3 Ergebnisse

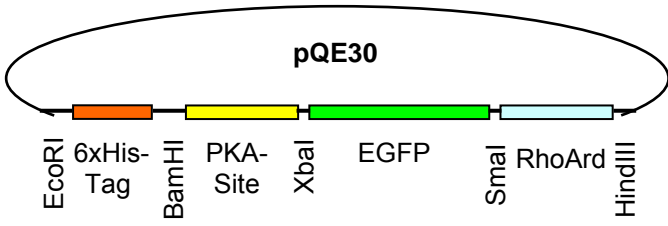
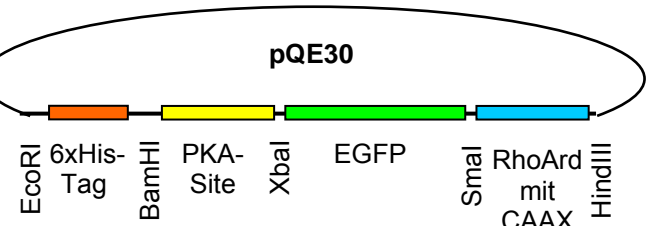
Um die in der Einleitung beschriebene Rekrutierungsdomäne oder polybasische Region von RhoA und RhoC näher charakterisieren zu können und mögliche Protein-Protein-Interaktionspartner für die Rekrutierungssequenz zu finden, wurden sechs Konstrukte hergestellt. Die exprimierten Proteine dieser Konstrukte sollten anschließend in einem Overlay-Assay auf Bindungspartner hin untersucht werden.

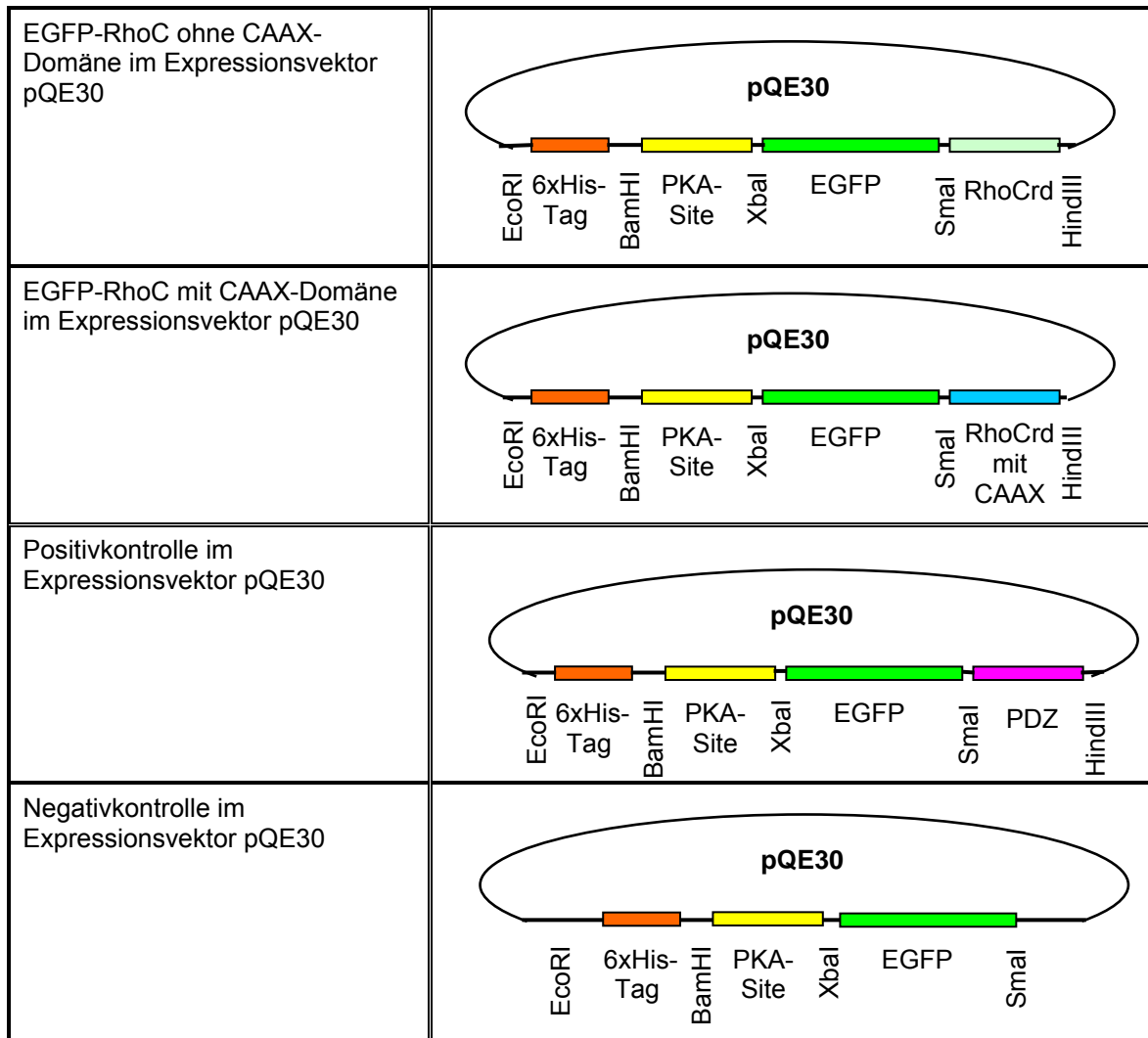
Die sechs hergestellten Konstrukte umfassten:

- zwei RhoA-Konstrukte, bestehend aus der RhoA-Rekrutierungsdomäne mit oder ohne der zur Geranylgeranylierung notwendigen CAAX-Domäne,
- zwei RhoC-Konstrukte, bestehend aus der RhoC-Rekrutierungsdomäne ebenfalls mit und ohne CAAX-Domäne,
- eine Positivkontrolle mit einer PDZ-Domäne (einer bekannten Protein-Interaktionsdomäne) und
- eine Negativkontrolle ohne eine der zu untersuchenden Rekrutierungsdomänen.

Die beiden Letzteren sollten bei den späteren Assays als Kontrollen eingesetzt werden. Die Konstrukte wurden in einen Expressionsvektor kloniert und kodierten alle für eine PKA-Site, die phosphoryliert werden konnte, um die Konstrukte radioaktiv zu markieren sowie für das *Green Fluorescent Protein* (GFP), das bereits Teil der in Vorexperimenten untersuchten Konstrukte war. In Abb. 3, S.55 sind die hergestellten Konstrukte schematisch dargestellt.

**Abb. 3** Darstellung des molekularen Aufbaus der 6 hergestellten Konstrukte:

Konstrukt	Schematische Darstellung
EGFP-RhoA ohne CAAX-Domäne im Expressionsvektor pQE30	 <p>The diagram shows a circular plasmid labeled pQE30. The genetic elements are arranged in a linear sequence: EcoRI, 6xHis-Tag, BamHI, PKA-Site, XbaI, EGFP, SmaI, RhoArd, and HindIII.</p>
EGFP-RhoA mit CAAX-Domäne im Expressionsvektor pQE30	 <p>The diagram shows a circular plasmid labeled pQE30. The genetic elements are arranged in a linear sequence: EcoRI, 6xHis-Tag, BamHI, PKA-Site, XbaI, EGFP, SmaI, RhoArd mit CAAX, and HindIII.</p>



Im Folgenden wird die Herstellung dieser sechs Konstrukte näher beschrieben.

### 3.1 Konstrukte mit RhoA- und RhoC-Rekrutierungsdomäne

#### 3.1.1 Herstellen des Inserts mittels PCR

Die Konstrukte mit der RhoA- und RhoC-Rekrutierungsdomäne ohne die zur Geranylgeranylierung notwendige CAAX-Domäne wurden mit einer PCR, ausgehend von vorhandenen Konstrukten, hergestellt. Diese vorhandenen Konstrukte bestanden aus den Rekrutierungsdomänen von RhoA bzw. RhoC mit ihrer CAAX-Domäne, also den Aminosäuren 181-193 der beiden Rho-Proteine und befanden sich in dem Vektor pEGFP von Clontech (siehe Abb. 4, S.56). Diese beiden Konstrukte wurden mit einer

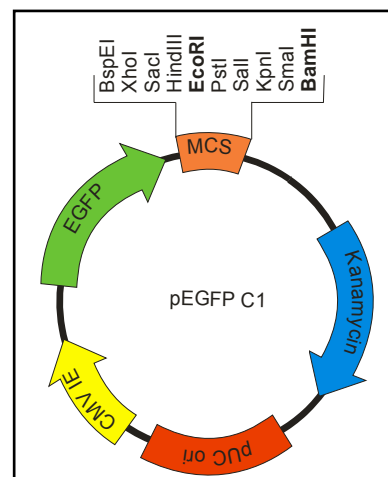
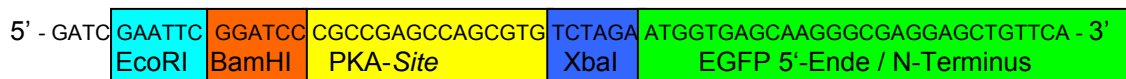


Abb. 4 pEGFP C1-Vektor, die Schnittstellen der Klonierung sind hervorgehoben.



Plasmidpräparation aus dem *E.coli*-Stamm DH5- $\alpha$  isoliert und dienten als Template für die PCR. Die beiden PCR-Primer kodierten für Bereiche, die, wie nachstehend beschrieben, verändert werden sollten.

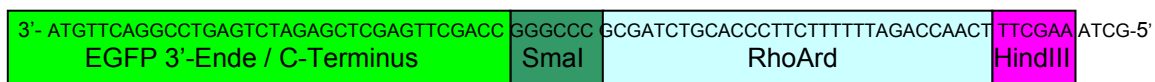
- Der Upstream-PCR-Primer 194 (siehe Abb. 5, S.57) kodiert für die Anfangsabschnitte von EGFP. Vor diesem Abschnitt besaß dieses Oligonukleotid (Oligo) noch Basen, die für eine EcoRI-, eine BamHI- und eine XbaI-Schnittstelle sowie für eine PKA-Site kodierten, die nicht in den beiden ursprünglichen Konstrukten enthalten waren. Die Überlappung mit EGFP betrug 28 bp, das freie Ende bestand aus 37 bp.



**Abb. 5** PCR-Primer 194 für das 5'-Ende des Konstruktes.

- Die beiden Downstream-PCR-Primer 195 und 196 (siehe Abb. 6, S.57) kodierten für die jeweiligen Abschnitte am 3'-Ende der Konstrukte. Sie umfassten Basen für einen Teil des C-Terminus von EGFP, eine neu eingefügte SmaI-Schnittstelle, die jeweilige Rekrutierungsdomäne und eine neue HindIII-Schnittstelle. Oligo 195 kodiert für die Rekrutierungsdomäne von RhoA (RhoArd) ohne die angehängte CAAX-Domäne und Oligo 196 für die von RhoC (RhoCrd), ebenfalls ohne die CAAX-Domäne. Diese Primer konnten an zwei Stellen an das Template binden. Zum einen mit einer Überlappung von 34 bp an EGFP und zum anderen mit einer Überlappung von 27 bp an die jeweilige Rekrutierungsdomäne.

195:



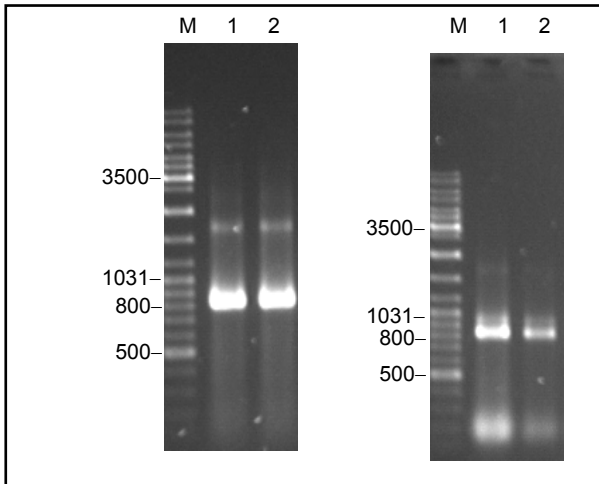
196:



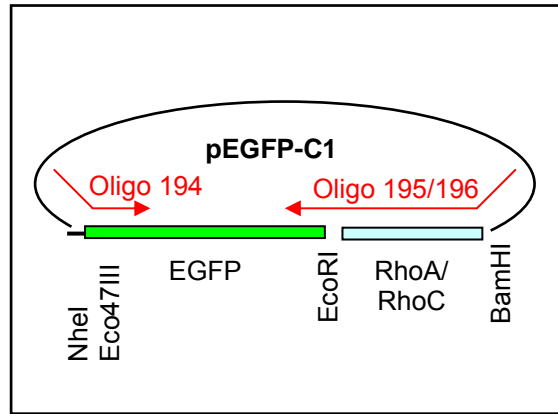
**Abb. 6** PCR-Primer 195 und 196 für die 3'-Enden der beiden Konstrukte.

Da die PCR-Primer beim ersten Annealing nicht vollständig binden konnten, wurde für das erste Annealing eine niedrigere Temperatur (40 °C) gewählt als bei den folgenden Schritten, bei denen die Annealingtemperatur 60 °C betrug.

Das erwartete PCR-Produkt sollte 822 bp lang sein und bestand aus EGFP mit 750 bp, der PKA-Site mit 15 bp und der Rekrutierungsdomäne mit 31 bp. In Abb. 8, S.57 ist ein Schema des PCR-Annealings und in Abb. 7, S.57 das Produkt einer RhoA- bzw. RhoC-PCR dargestellt.



**Abb. 7** Spuren 1 und 2 zeigen jeweils ein PCR-Produkt mit 820 bp. Links: RhoA-PCR; Rechts: RhoC-PCR; M: Marker.



**Abb. 8** Schema des RhoA- und RhoC-Konstruktes mit den PCR-Primern 194 und 195 bzw. 196. Da diese sich nicht vollständig anlagern können, stehen sie an den Enden ab.

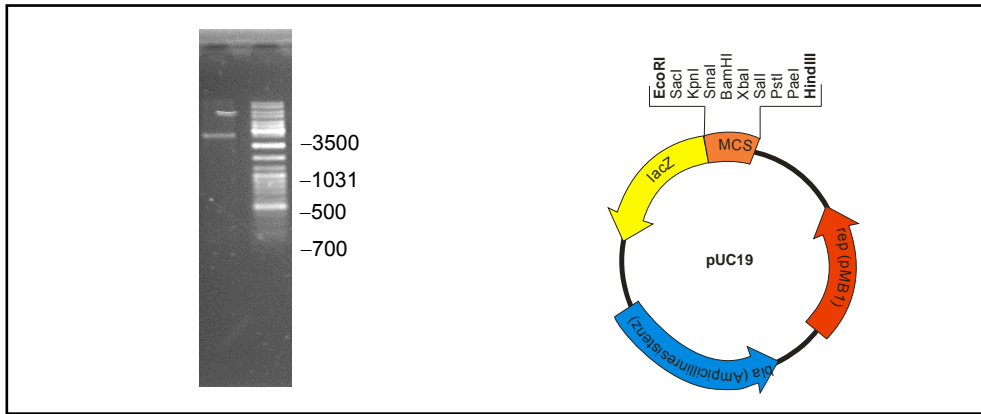
Dieses PCR-Produkt wurde mit einem PCR-Reinigungs-Kit von Qiagen aufgereinigt und anschließend mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII geschnitten. Die geschnittene DNA wurde über ein Agarosegel aufgetrennt, um nicht erwünschte DNA-Fragmente zu entfernen. Nach Filtration aus dem Gel wurde die DNA mit einer Phenol/Chloroform-Extraktion, gefolgt von einem Ethanolwaschschritt gereinigt (s.2.2.10, S.35). Die so gewonnenen DNA-Präzipitationen, die in Abb. 9, S.58 dargestellt sind, wurden in Ligationsexperimenten verwendet.



**Abb. 9** RhoA- bzw. RhoC-Insert nach Restriktionsverdau mit den Enzymen EcoRI und HindIII.

### 3.1.2 Herstellen des Klonierungsvektors pUC19

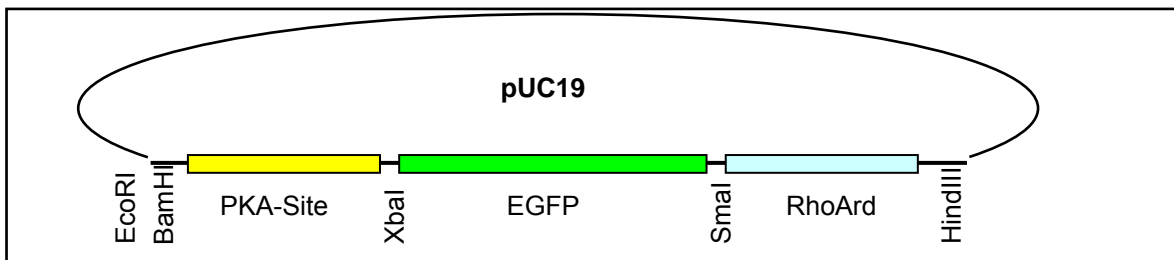
Für die Herstellung des Klonierungsvektors pUC19 wurde dieser mit einer Plasmidpräparation aus einem Stamm mit einem „leeren“ pUC19-Plasmid isoliert. Der Vektor pUC19 kodiert für eine Ampicillinresistenz und besitzt eine „Multiple Cloning Site“ (MCS), wie Abb. 10, S.59 rechts zu entnehmen ist. Nach der Plasmidpräparation wurde dieser Vektor ebenfalls mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII geschnitten. Der Vektor wurde anschließend dephosphoryliert, um eine Religation des ausgeschnittenen Fragments mit dem Plasmid zu verhindern. Eine Reinigung des Vektors über ein Gel konnte so vermieden werden. Anschließend wurde der Vektor mit einer Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt, mit Ethanol präzipitiert und gewaschen und auf einem Gel dargestellt, das in Abb. 10, S.59 links zu sehen ist.



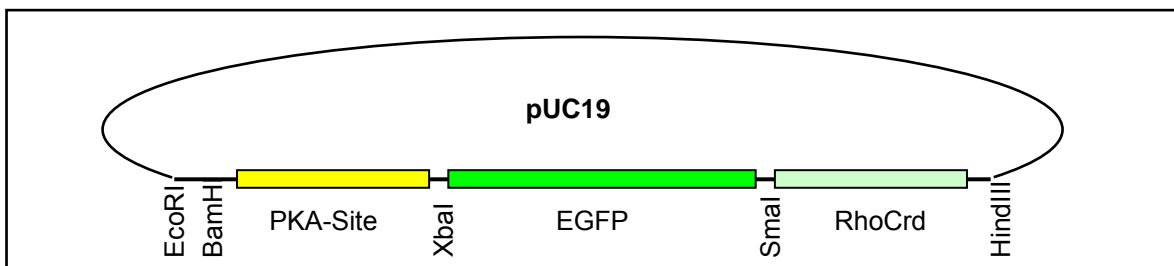
**Abb. 10** links: Der Vektor pUC19 nach Restriktion mit den Enzymen EcoRI und HindIII und Reinigung über ein Gel. Bei der oberen Bande handelt es sich um ein Artefakt.  
rechts: Schema von pUC19 mit der Multiple Cloning Site (MCS); die bei der Restriktion verwendeten Enzyme sind hervorgehoben.

### 3.1.3 Ligation und Transformation

Der gewonnene Vektor wurde mit je einem der beiden Inserts mit T4-DNA-Ligase für 2 Stunden bei 16 °C ligiert. Das ligierte Plasmid aus pUC19 und RhoA- oder RhoC-Insert wurde mit einer Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt, mit 100%igem Ethanol präzipitiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die erhaltenen Konstrukte sind in Abb. 11, S.59 und in Abb. 12, S.59 schematisch dargestellt.



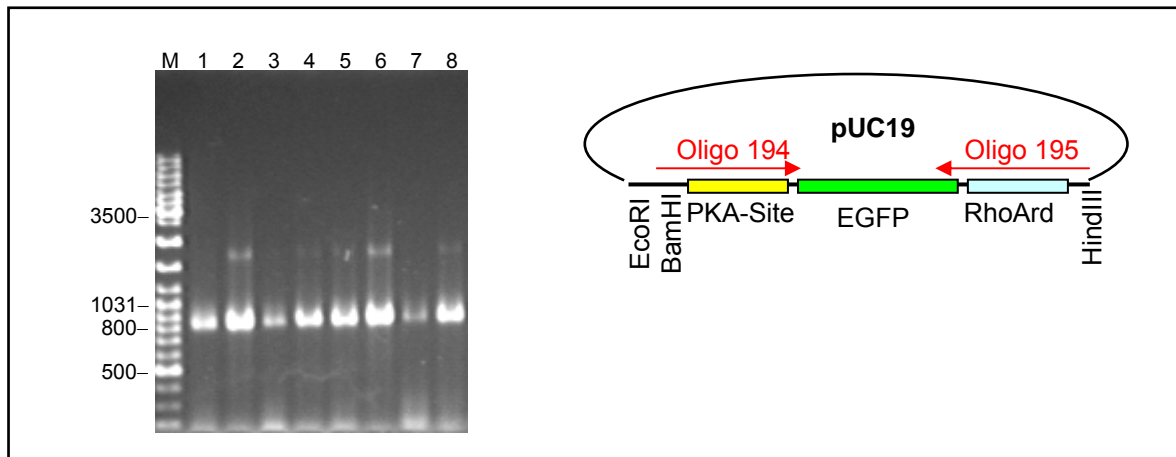
**Abb. 11** RhoA-Konstrukt in dem Vektor pUC19.



**Abb. 12** RhoC-Konstrukt nach Klonierung in den Vektor pUC19.

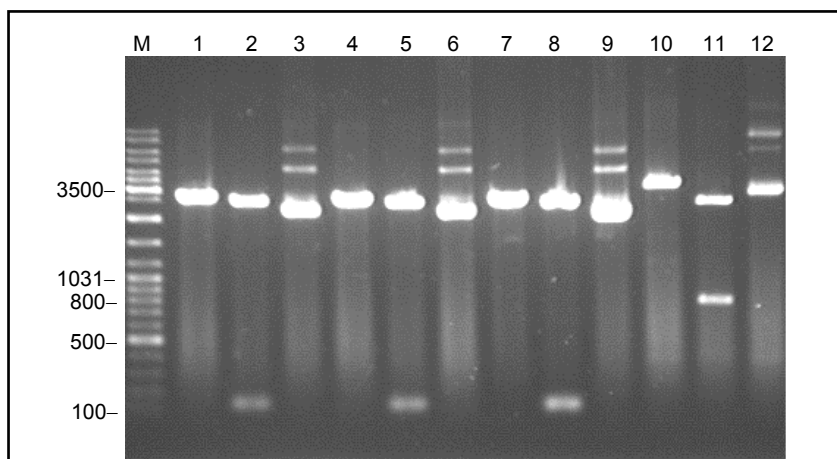
Die Transformation der ligierten Konstrukte erfolgte durch Elektroporation in kompetente DH5- $\alpha$ -Bakterien. Die transformierten Bakterien wurden auf Ampicillin-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37° C bebrütet. Bei den gewachsenen Klonen wurde mit einer „Klon-Kontroll-PCR“ (s. 2.2.3, S.31) überprüft, ob sie das gewünschte Insert von 822 bp Länge enthielten. Die verwendeten Primer entsprachen denen der Insert-PCR: Primer 194 und 195 bzw.196. Ein Schema der PCR sowie das Ergebnis einer RhoA-PCR sind in Abb. 13, S.60 zu sehen.

Die PCR-positiven Klone wurden anschließend asserviert und ihr Plasmid zur Sequenzierung isoliert.



**Abb. 13** PCR-Kontrolle der ligierten Klone aus RhoA-Insert und dem Vektor pUC19; in dem Schema rechts ist die Lage der Primer, auf dem Gel links, in den Spuren 1-8, das Ergebnis der PCR mit den 820 bp großen Produkten dargestellt.

Bei der Herstellung der RhoA- und RhoC-Konstrukte ohne CAAX-Region erfolgte die Reinigung der Insert-DNA zu Beginn der Klonierungsarbeiten nicht durch Auftrennen über ein Agarosegel, sondern nur mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und darauffolgender Ethanolpräzipitation. Bei der anschließenden Ligation und Transformation entstand eine Vielzahl von Klonen, von denen jedoch immer nur 5-10 % in der „Klon-Kontroll-PCR“ positiv waren. In einem anschließenden Restriktionsexperiment von PCR-negativen Klonen fand sich ein etwa 130 bp langes Insert statt des erwarteten Inserts von 820 bp Länge, wie in Abb. 14, S.60 zu sehen ist. Auf Grund seiner Kürze wurde es möglicherweise effektiver in den Vektor ligiert als das erwünschte Insert, sodass eine Vielzahl von Klonen mit „falschem“ Insert generiert wurde. Als bei den Folgeexperimenten die Insert-DNA über ein Agarosegel aufgetrennt und gereinigt wurde, trat dieses Problem nicht mehr auf.



**Abb. 14** Restriktionsexperiment von Plasmiden, die aus PCR-negativen RhoC-Klonen (Spuren 1-9) bzw. einem PCR-positiven RhoC-Klon (Spuren 10-12) isoliert wurden.  
 Spur 1-3 Klon 142: (1) Restriktion mit EcoRI, (2) Restriktion mit EcoRI und HindIII, (3) keine Restriktion  
 Spur 4-6 Klon 147 (1) Restriktion mit EcoRI, (2) Restriktion mit EcoRI und HindIII, (3) keine Restriktion  
 Spur 7-9 Klon 163 (1) Restriktion mit EcoRI, (2) Restriktion mit EcoRI und HindIII, (3) keine Restriktion  
 Spur 10-12 Klon 153 (1) Restriktion mit EcoRI, (2) Restriktion mit EcoRI und HindIII, (3) keine Restriktion. Das Insert dieses PCR-positiven Klons ist bei 820 bp gut zu sehen

### 3.1.4 Suche nach Klonen mit dem gewünschten Insert mittels Sonden-Hybridisierung

Bei einem Teil der RhoA-Klone wurde anfangs nicht mit einer PCR, sondern mittels Sonden-Hybridisierung nach Konstrukten mit dem richtigen Insert gesucht. Mit dieser Methode konnten wesentlich größere Klonzahlen untersucht werden, als mit der „Klon-Kontroll-PCR“. Mit der beschriebenen Methode wurden dabei in einem Experiment 260 Klone untersucht, von denen 45 positiv waren. Von diesen 45 wurden 24 in einer „Klon-Kontroll-PCR“ untersucht, von denen wiederum sieben auch in der PCR positiv waren. Insgesamt war die Methode als Screening von großen Klonzahlen gut geeignet, später war sie wegen der erhöhten Klonierungseffizienz, die durch die Reinigung der Inserts über ein Gel erreicht wurde, nicht mehr notwendig.

### 3.1.5 Sequenzierung

Die gewonnene DNA musste sequenziert werden, um eventuelle Taq-Polymerase Fehler sowie Fehler in den kommerziell erworbenen PCR-Primern zu finden. Hierzu wurde das Sequenzierverfahren nach Sanger (Kettenabbruchverfahren) verwendet, bei dem mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Primern in die zu sequenzierende DNA hineingelesen und die Strangverlängerung durch chemisch veränderte Nukleotide abgebrochen wird. Durch beidseitiges Sequenzieren wurde das Insert vollständig durchsequenziert, mit einer Überlappung der Sequenzen von 50 - 100 %. Das Sequenzierungsprodukt wurde mit einem Licor-Sequenzierer auf einem Gel dargestellt. Aus den erhaltenen Sequenzen wurden die „Fehlerlosen“ durch Vergleich mit der gewünschten Sequenz herausgesucht. Insgesamt wurden elf RhoA-Konstrukte und 19 RhoC-Konstrukte sequenziert, von denen jeweils drei fehlerfrei waren. Die auftretenden Fehler lagen bei sieben von acht fehlerhaften RhoA-Konstrukten in den Oligonukleotiden. Bei den RhoC-Konstrukten hatten zehn von 16 fehlerhaften Konstrukten den Fehler in den Oligonukleotiden, bei sechs der 16 fehlerhaften Konstrukten lag der Fehler im Bereich der restlichen Sequenz (interne Fehler). Die Oligonukleotidfehler waren meistens Nukleotid-Duplikationen oder Deletionen, im Gegensatz zu den internen Fehlern, die meist auf einem Basenaustausch beruhten. Die Fehler sind in Tab. 53, S.61 dargestellt. Die Tabelle zeigt auch, dass fast alle internen Fehler zu einer Abwandlung der AS-Sequenz geführt hätten und die Konstrukte damit nicht weiter verwendbar gewesen wären.

**Tab. 53** Auflistung der sequenzierten RhoA- und RhoC-Konstrukte mit internen Fehlern und Analyse der Basenfehlpaarungen. Konstrukte mit Fehlern in den Oligonukleotiden sind hier nicht aufgelistet; von RhoA wurden insgesamt elf Konstrukte sequenziert, von RhoC 19. Base 1 ist erste Base von Oligo 194. Fett sind die weiterverwendeten Klone. In der Spalte „interne Fehler“ sind auch die AS-Code-Änderungen aufgelistet.

<b>RhoA Klonnummer</b>	<b>Oligonukleotid 195</b>	<b>Oligonukleotid 194</b>	<b>Interne Fehler</b>
257	Richtig		Base 441 Tausch G gegen A (AS-Code: S statt N)
96	Richtig	Insertion Base 9 A	Kein Fehler

105	Richtig	Richtig	Kein Fehler
116	Richtig	Richtig	Kein Fehler
256	Base 779 Deletion G, 795 Insertion T		
263	Base 769 Insertion C		
264	ab Base 771 Deletion TTGA		
<b>265</b>	<b>Richtig</b>	<b>Richtig</b>	<b>Kein Fehler</b>
267	Base 788 (A statt G); AS V Statt A		
268	ab Base 818 AGC Deletion		
269	Base 814 T Deletion		
<b>RhoC Klonnummer</b>	<b>Oligonukleotid 196</b>	<b>Oligonukleotid 194</b>	<b>Interne Fehler</b>
218	Oligo 196 richtig	Oligo 194 richtig	Base 342 G statt A; AS G statt D
221	Oligo 196 richtig		Base 718 A statt G; AS R statt G
223	Oligo 196 richtig		Base 699 C statt T; AS P statt L, 457 T statt C; AS L
<b>224</b>	<b>Oligo 196 richtig</b>	<b>Oligo 194 richtig</b>	<b>Sequenz richtig</b>
225	Oligo 196 richtig	Oligo 194 richtig	Sequenz richtig
226	Oligo 196 richtig	Oligo 194 richtig	Sequenz richtig
216	Base 752 Insertion C		
217	Richtig	Base 27 Insertion G	
218	Richtig		Base 341 A statt G; AS G statt D
219	Base 806 Deletion C		
220	Richtig		Ab Base 231 kein Fehler
221	Richtig		Base 718 A statt G; AS R statt G
46	Base 754 Deletion G		
73	Base 806 Insertion G		
214	Base 809 Insertion G, 798 Insertion C		
215	Richtig	Base 17 Insertion G	

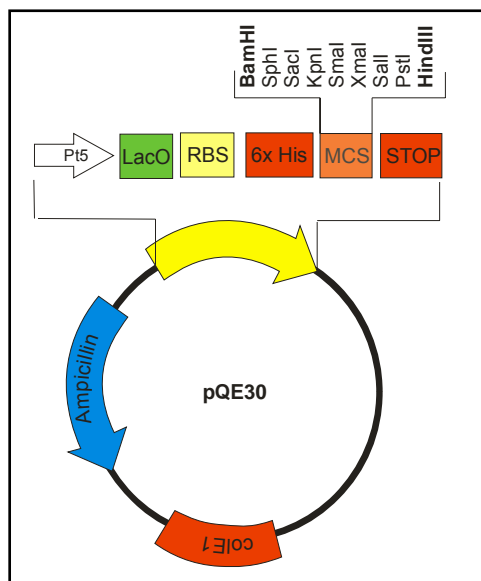
222	Base 789 Insertion C		
227	Base 814 Insertion T		
228	Base 809 Insertion G		

Die gefundenen Klone mit richtiger Sequenz wurden zur späteren Umklonierung in einen Expressionsvektor und zur weiteren Verwendung bei der Klonierung der übrigen Klone, bei – 80 °C asserviert.

### 3.1.6 Umklonierung in den Expressionsvektor pQE30

#### 3.1.6.1 Präparation des Vektors

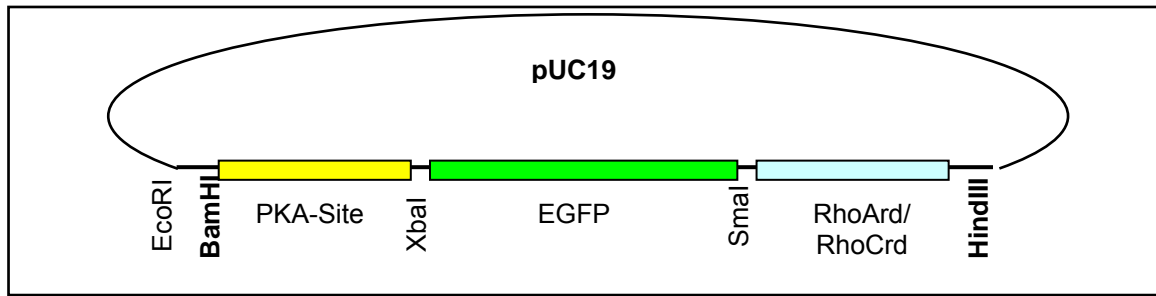
Um die Konstrukte exprimieren und reinigen zu können, wurden sie in den Expressionsvektor pQE30 umkloniert. Dieser wurde als „leeres“ Plasmid aus einem Stamm, der im Labor vorhanden war, präpariert. Das Plasmid wurde mit BamHI und HindIII geschnitten, dephosphoryliert und im Anschluss gereinigt. In Abb. 15, S.63 ist der ungeschnittene Vektor pQE30 mit seiner „Multiple Cloning Site“ dargestellt, in der die verwendeten Restriktionsschnittstellen hervorgehoben sind.



**Abb. 15** pQE30 Vektor (nach Qiagen, [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)), die Restriktionsschnittstellen für die Umklonierungen sind markiert.

#### 3.1.6.2 Präparation des Inserts

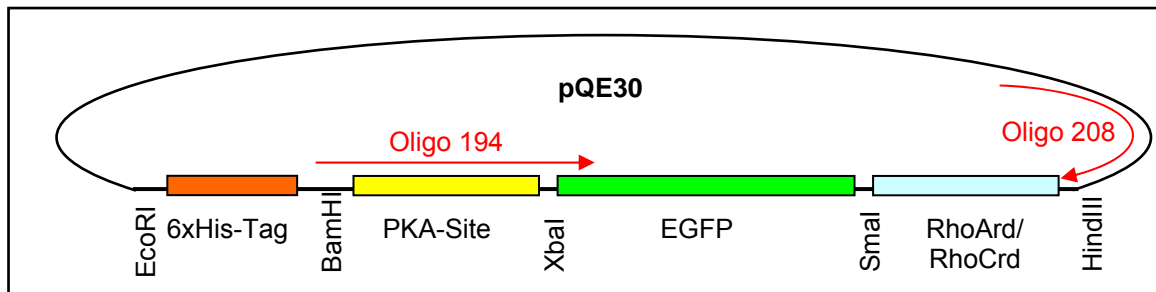
Zur Herstellung der Inserts für die Umklonierung in den pQE30-Vektor wurden die unter 3.1.5 sequenzierten Konstrukte in pUC19 ebenfalls mit BamHI und HindIII geschnitten, wie in Abb. 16, S.64 zu sehen ist. Die erhaltene DNA wurde über ein Agarosegel aufgetrennt, isoliert und mit einer Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation gereinigt.



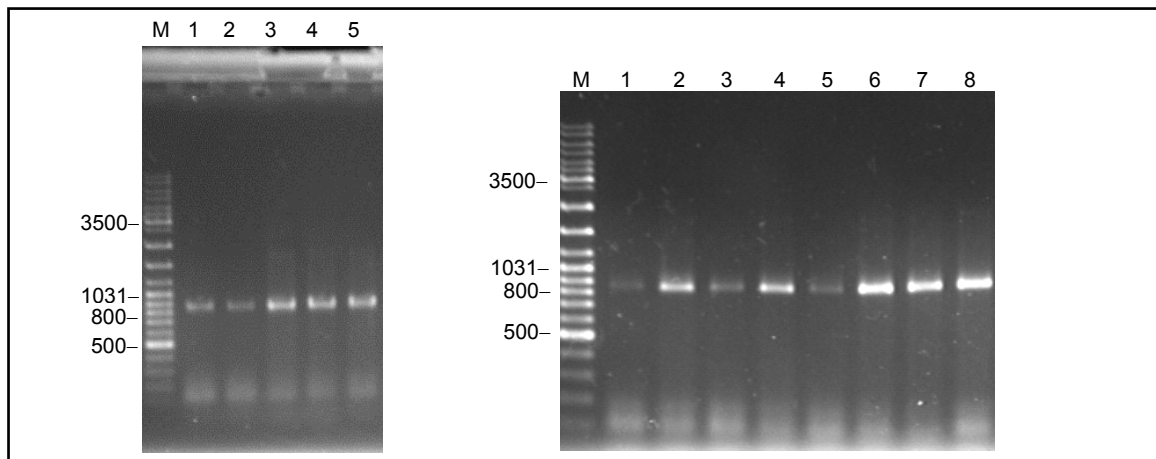
**Abb. 16** Herstellen der Inserts für die Umklonierung in den Expressionsvektor pQE30, durch Restriktion der sequenzierten Konstrukte mit den hervorgehobenen Restriktionsenzymen BamHI und HindIII.

### 3.1.6.3 Ligation, Transformation und PCR-Kontrolle der hergestellten Konstrukte

Die beiden gewonnenen Inserts mit RhoA- bzw. RhoC-Rekrutierungsdomäne wurden mit T4-DNA-Ligase in den Vektor pQE30 ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in chemisch kompetente *Rubidium/Chlorid*-Bakterien transformiert (s. 2.3.2.2, S.8). Die hier verwendeten chemisch kompetenten Bakterien waren kein spezieller Expressionsstamm, sondern der Klonierungsstamm DH5- $\alpha$ . Die erhaltenen Klone wurden mit einer „Klon-Kontroll-PCR“ auf das richtige Insert und den richtigen Vektor durchsucht. Dabei war einer der verwendeten Primer spezifisch für das Insert (Oligo 194), der andere spezifisch für den Expressionsvektor pQE30 (Oligo 208). In Abb. 17, S.64 ist ein Schema dieser PCR zu sehen, in Abb. 18, S.64 das Ergebnis der PCR auf einem Gel.



**Abb. 17** RhoA-Konstrukt nach der Umklonierung in den Expressionsvektor pQE30 mit den PCR-Primern 194 und 208 für die Kontroll-PCR.



**Abb. 18** links Spur 1-5: PCR-Kontrolle von RhoA in pQE30; Insert in allen Klonen enthalten; Länge: 861 bp. rechts Spur 1-8: PCR-Kontrolle von RhoC in pQE30; Insert in allen Klonen enthalten; Länge: 861 bp.



## 3.2 Konstrukt mit PDZ-Domäne

### 3.2.1 Herstellen des Inserts

Die PDZ-Domäne, die als Positivkontrolle für den Overlay-Assay dienen sollte, wurde von einem Kooperationspartner aus der Proteinstruktur-Fabrik zur Verfügung gestellt. Sie besitzt 318 bp und war schon in anderen Experimenten bei dem Kooperationspartner Hendrik Weiner (AG K. Büssow in der Proteinstrukturfabrik ([www.proteinstrukturfabrik.de](http://www.proteinstrukturfabrik.de))), auf Funktionalität und Bindungspartner untersucht worden.

Sie befand sich in einem pQE30 Vektor, der durch Plasmidpräparation aus einem DH5- $\alpha$ -Stamm gewonnen wurde und aus dem die PDZ-Domäne mit den Restriktionsenzymen SmaI und HindIII herausgeschnitten wurde, wie in Abb. 19, S.65 zu sehen ist. Die durch Restriktion erhaltene PDZ-Domäne wurde über ein Agarosegel gereinigt und durch Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanolpräzipitation aufbereitet.

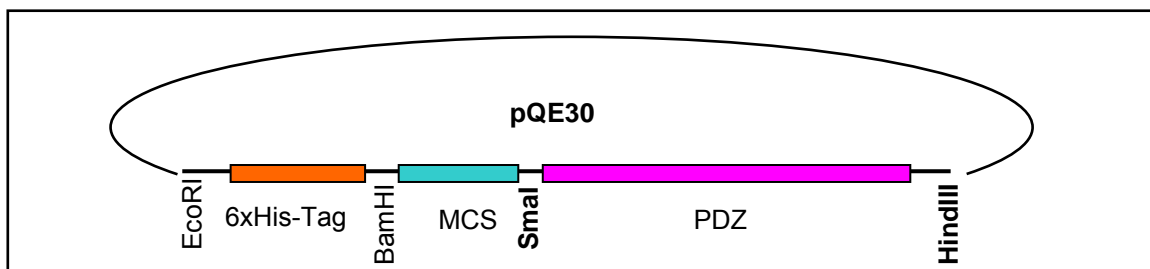


Abb. 19 PDZ-Domäne in pQE30; die Restriktionsstellen sind hervorgehoben.

### 3.2.2 Herstellen des Vektors

Als Vektor für die Klonierung wurde ein bereits sequenziertes RhoC-Konstrukt verwendet. Dieses Konstrukt wurde mit einer Plasmidpräparation isoliert und ebenfalls mit den Restriktionsenzymen SmaI und HindIII geschnitten. Dadurch wurde die Rekrutierungsdomäne von RhoC aus dem Konstrukt entfernt, wie in Abb. 20, S.65 zu sehen ist. Der Rest des Konstruktes mit PKA-Site, EGFP und den Restriktionsschnittstellen blieb erhalten und musste anschließend auch nicht erneut sequenziert werden.

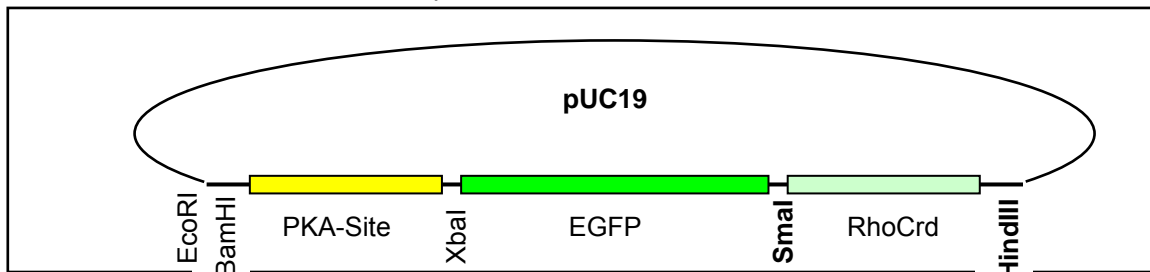
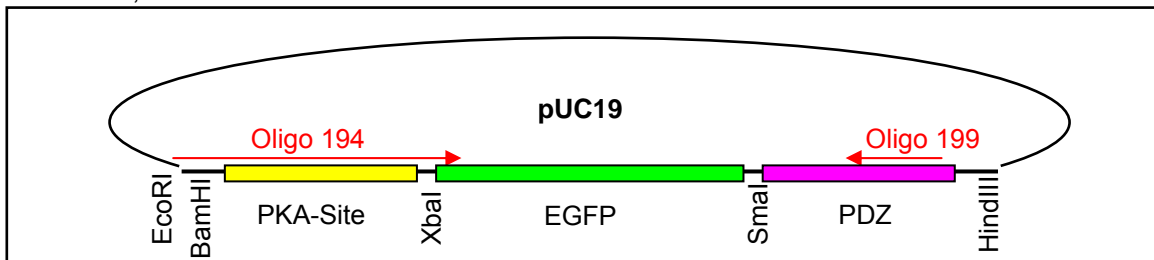


Abb. 20 Vektor für das PDZ-Konstrukt; die Restriktionsstellen sind hervorgehoben.

### 3.2.3 Ligation, Transformation und PCR-Kontrolle

Die beiden gewonnenen DNA-Fragmente wurden mit T4-DNA-Ligase verbunden und in

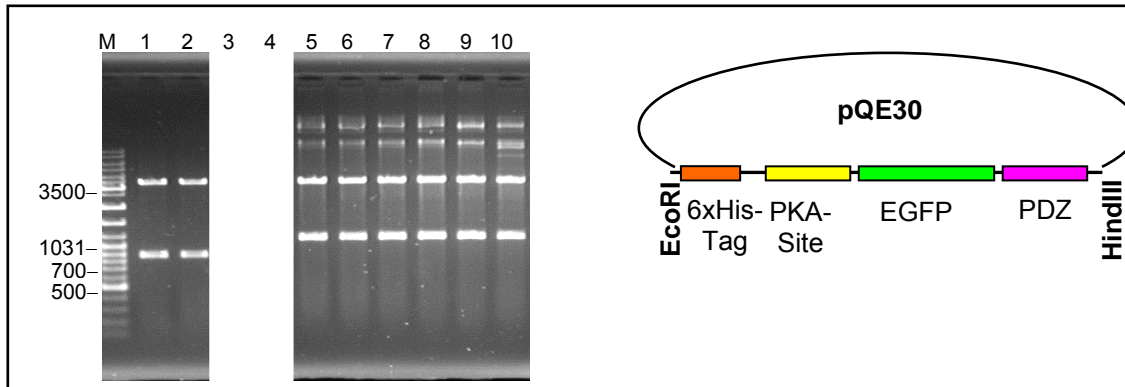
chemisch kompetente Rubidium/Chlorid-Bakterien transformiert. Die erfolgreiche Klonierung wurde mit einer „Klon-Kontroll-PCR“ überprüft. Die verwendeten Primer waren spezifisch für die PDZ-Domäne (Oligo 199) sowie für den Anfang des RhoC-Inserts aus dem Vektor (Oligo 194), wie Abb. 21, S.66 zu entnehmen ist.



**Abb. 21** PDZ-Konstrukt in pUC19 mit den Primern für die Kontroll-PCR.

### 3.2.4 Umklonierung in Expressionsvektor pQE30

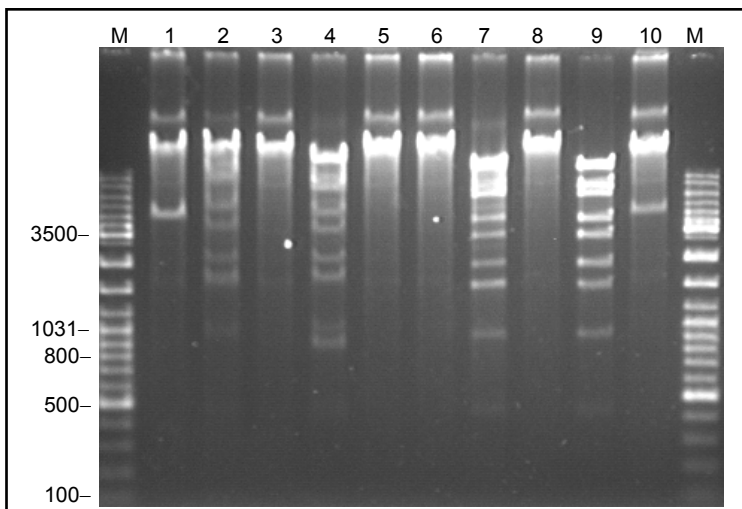
Die Inserts der PCR-positiven Klone wurden wie bei den oben beschriebenen Konstrukten durch Restriktion an den BamHI- und HindIII-Schnittstellen und anschließender Ligation in den Expressionsvektor pQE30 umkloniert. Die Transformation erfolgte bei diesem Klon direkt in den Expressionsstamm M15, der chemisch kompetent gemacht worden war. Aus diesem Stamm wurde das Plasmid anschließend isoliert und mit einem Restriktionsverdau mit den Enzymen EcoRI und HindIII kontrolliert. Das Ergebnis dieser Restriktion und ein Schema des Vektors sind in Abb. 22, S.66 zu sehen.



**Abb. 22** Spuren 5-10: Restriktionskontrolle der PDZ Konstrukte; die Restriktionsenzyme sind in dem nebenstehenden Schema hervorgehoben; das Insert sollte eine Länge von ca.1100 bp haben und der Vektor pQE30 eine Länge von ca.3500 bp; in den Spuren 1 und 2 sind zwei RhoA-Konstrukte dargestellt, die ein kürzeres Insert mit 820 bp haben.

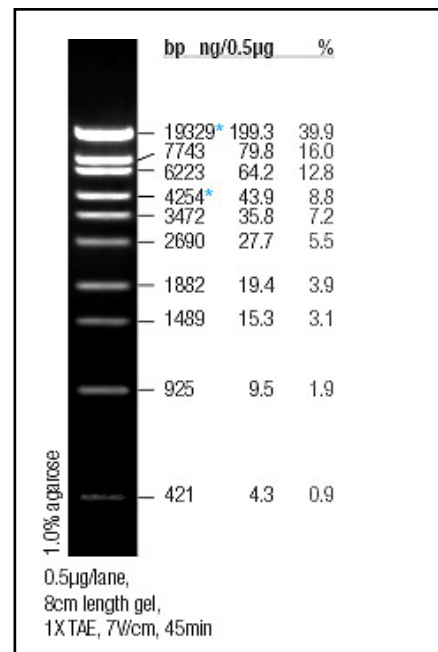
Bei der Herstellung der Konstrukte mit der PDZ-Domäne traten unerwartet Schwierigkeiten bei den Klonierungsexperimenten auf. Obwohl die DNA korrekt geschnitten und gereinigt war, wie anhand von Agarosegelen gezeigt wurde, kam es zu keiner effizienten Ligation und anschließender Transformation. Ein möglicher Grund dafür könnte die Verwendung unterschiedlicher Agarosepulver sein, da in den Experimenten für die RhoA- und RhoC-Konstrukte Agarosepulver der Firma Roth verwendet wurde, während für die Experimente mit der PDZ-Domäne zur Reinigung des Inserts Agarosepulver der Firma Difco zur Anwendung kam. Nach einem erneuten Umstieg auf Agarose der Firma Roth gelang die Klonierung der

PDZ-Konstrukte. Um diese Hypothese etwas zu festigen, wurde ein Religationsexperiment mit einem Lambda-DNA-Marker von Fermentas, der mit dem Enzym Eco130I mehrfach geschnitten worden war, durchgeführt, um Banden unterschiedlicher Länge zu erhalten. Diese Lambda-DNA ist in ungeschnittenem Zustand 48502 bp lang, nach Restriktion mit Eco130I entstehen zehn Banden wie in Abb. 24 Lambda DNA/Eco130I-MarkerSeite 67 (reproduziert von Fermentas) zu sehen ist. Zu den einzelnen Ansätzen wurden dann jeweils gereinigte DNA aus den beiden Gelarten zugegeben. Die Religationsexperimente zeigen eine Inhibition der Ligation durch die über Agarose der Firma Difco gereinigte DNA, wie in Abb. 23 , S.67 dargestellt ist. Der Ansatz ohne Ligase in Spur 9 zeigt den DNA-Marker mit seinen zehn Banden, wobei die zweite Bande von oben eine Doppelbande und die Bande bei 421 bp nur schwer zu erkennen ist. Nach der Ligation des Markers entsteht eine breite Bande, die oberhalb der 19329 bp Bande des Markers liegt und die zusammenligierte Lambda-DNA darstellt. In den Spuren, zu denen über Difco-Gele gereinigte DNA zugefügt wurde und bei denen es zu einer Inhibition gekommen ist, ist diese Bande entweder nicht vorhanden (Spuren 4, 7 und 9) oder die Ligation hat nicht vollständig stattgefunden, sodass noch Banden des geschnittenen Markers zu sehen sind (Spur 2). Die in den Spuren 1 und 10 bei ca. 5000 bp liegende Bande ist der jeweils zugefügte Vektor in seiner religierten Form.



**Abb. 23** Religationsexperiment eines Lambda-DNA-Längenmarkers mit Fermentas Ligase.

Spur 1: nicht über ein Gel gereinigte Vektor-DNA;  
 Spur 2: Vektor-DNA über ein Difco-Agarose Gel gereinigt;  
 Spur 3: Insert-DNA über ein Roth-Agarose Gel gereinigt;  
 Spur 4: Insert-DNA über ein Difco-Agarose Gel gereinigt;  
 Spur 5/6: Kein Zusatz;  
 Spur 7: Zugabe von 1 µl Phenol/Chloroform;  
 Spur 8: Zugabe von 2 µl 100%igem Ethanol;  
 Spur 9: Ohne Zusatz von Ligase;  
 Spur 10: nicht über ein Gel gereinigte Vektor-DNA;  
 M: Marker.

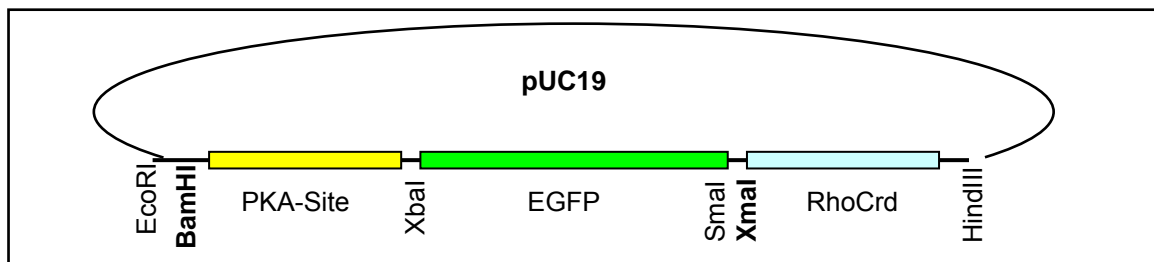


**Abb. 24** Lambda DNA/Eco130I-Marker von Fermentas

### 3.3 Klonierung der Negativkontrolle

#### 3.3.1 Herstellen des Inserts

Die Negativkontrolle sollte keine der zu untersuchenden Proteindomänen von RhoA oder RhoC besitzen. Sie bestand demzufolge nur aus der PKA-Site und EGFP. Das Insert wurde aus einem bereits sequenzierten RhoC-Klon durch Restriktion mit BamHI und XmaI gewonnen. Das entstehende DNA-Fragment bestand aus PKA-Site und EGFP, wie in Abb. 25, S.68 zu sehen ist. Es wurde über ein Agarosegel aufgetrennt und mit Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation gereinigt.



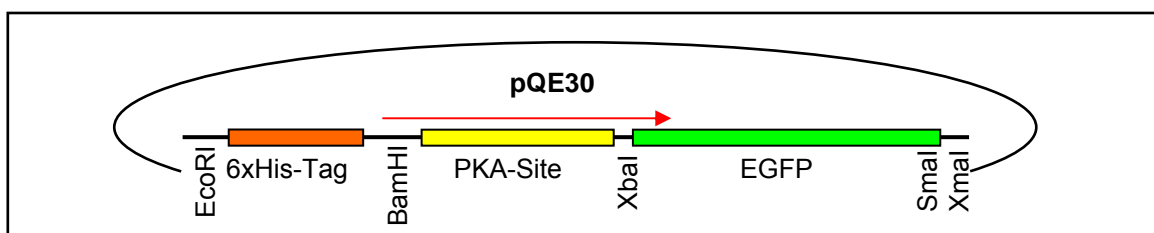
**Abb. 25** Herstellen des Inserts für die Negativkontrolle durch Restriktion mit den Enzymen BamHI und XmaI; das entstehende Insert besteht aus PKA-Site und EGFP.

#### 3.3.2 Herstellen des Vektors

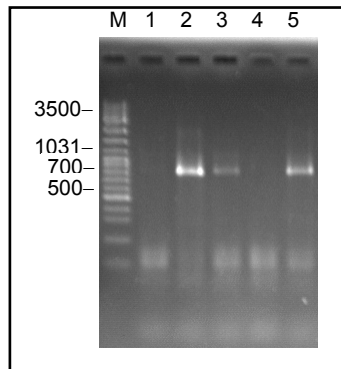
Als Klonierungsvektor wurde anders als bei den übrigen Konstrukten der Expressionsvektor pQE30 verwendet. Das gereinigte pQE30-Plasmid wurde mit BamHI und XmaI geschnitten und dephosphoryliert (siehe Abb. 15, S.63).

#### 3.3.3 Ligation, Transformation und PCR-Kontrolle

Das erhaltene Insert wurde mit T4-DNA-Ligase in den Vektor ligiert und anschließend in den Expressionsstamm M15 transformiert. Zur Kontrolle wurde eine PCR mit Primern, die für den Vektor pQE30 (Oligo 208) und das Insert (Oligo 194) spezifisch waren, eingesetzt. In Abb. 26, S.68 ist ein Schema der PCR dargestellt und in Abb. 27, S.69 das Ergebnis der PCR auf einem Gel. Das erhaltene PCR-Produkt sollte 843 bp lang sein. Nach einer Plasmidpräparation aus dem Stamm M15 wurde das Konstrukt in den zweiten Expressionsstamm SG13009 transformiert. Die erhaltenen Klone mit den richtigen Konstrukten wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  asserviert.



**Abb. 26** PCR-Kontrolle der Negativkontrolle schematisch nach Ligation in den Expressionsvektor pQE30; die beiden verwendeten Primer sind spezifisch für das Insert (194) und den Vektor (208).



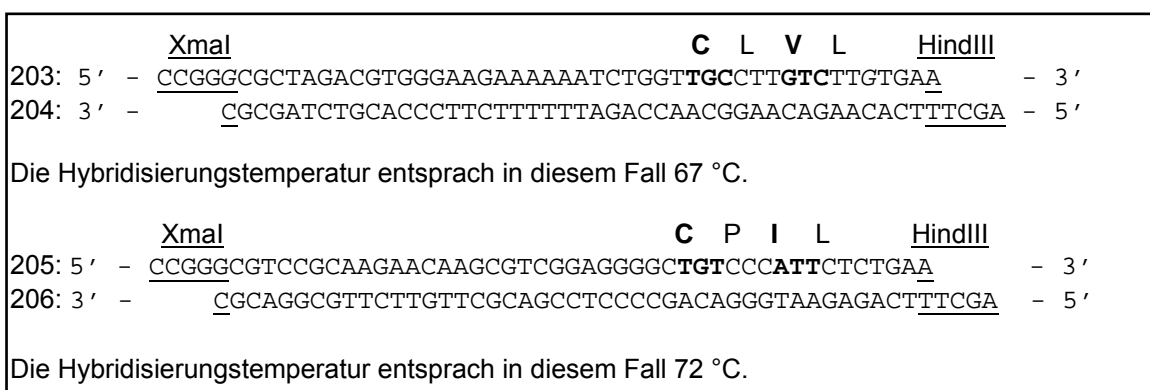
**Abb. 27** PCR-Kontrolle der Negativkontrolle; Konstrukte in Spur 2 und Spur 5 wurden weiter verwendet; die verwendeten PCR-Primer kodierten für das Insert und den Vektor (siehe Abb. 26, S.68; das Insert sollte 840 bp lang sein)

### 3.4 Klonierung der RhoA- und RhoC-Konstrukte mit CAAX-Domäne

Die Klone mit CAAX-Domäne wurden hergestellt, um zu zeigen, dass die Modifikationen an den Konstrukten das Rekrutierungsverhalten der Proteine nicht verändern und um nach Interaktionspartnern mit geranylgeranylierten Konstrukten zu suchen.

#### 3.4.1 Herstellen des Inserts

Das Insert für diesen Klon wurde durch Oligonukleotid-Hybridisierung hergestellt (s. 2.2.12, S.36). Je zwei der verwendeten Oligonukleotide waren dabei komplementär zueinander und bildeten an ihren Enden Überlappungen, die den Restriktionsschnittstellen für XmaI bzw. HindIII entsprachen. Die verwendeten Oligonukleotide 203-206 kodierten für die jeweilige Rekrutierungsdomäne RhoA oder RhoC und die folgende CAAX-Domäne, also die Aminosäuren 181-193 der Originalsequenz. In Abb. 28, S.69 ist ein Schema der hybridisierten Oligonukleotide zu sehen.

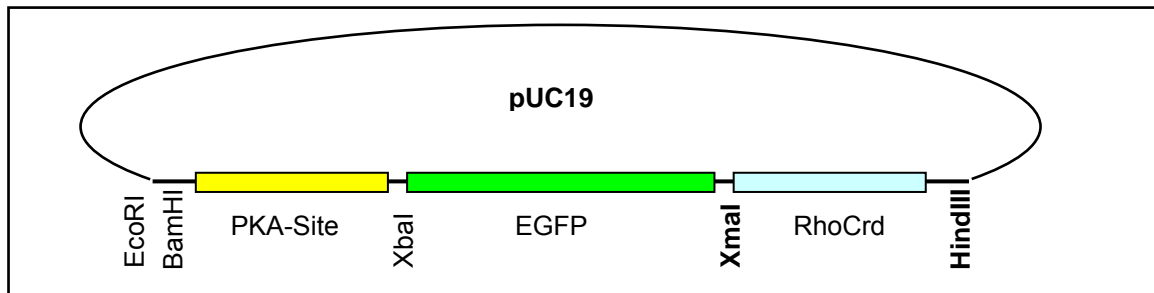


**Abb. 28** Schema der hybridisierten Oligonukleotide; zwei jeweils komplementäre Oligonukleotide wurden zusammen inkubiert; die entstehenden Doppelstränge besaßen an ihren Enden Überhänge mit denen sie an Restriktionsschnittstellen binden können; am 3'-Ende sind die CAAX-Domänen hervorgehoben und beschriftet.

Die erhaltene Doppelstrang-DNA wurde mit T4-Polynukleotidkinase unter Zugabe von ATP phosphoryliert, um eine Ligation zu ermöglichen, da der Vektor dephosphoryliert war.

### 3.4.2 Herstellen eines Vektors

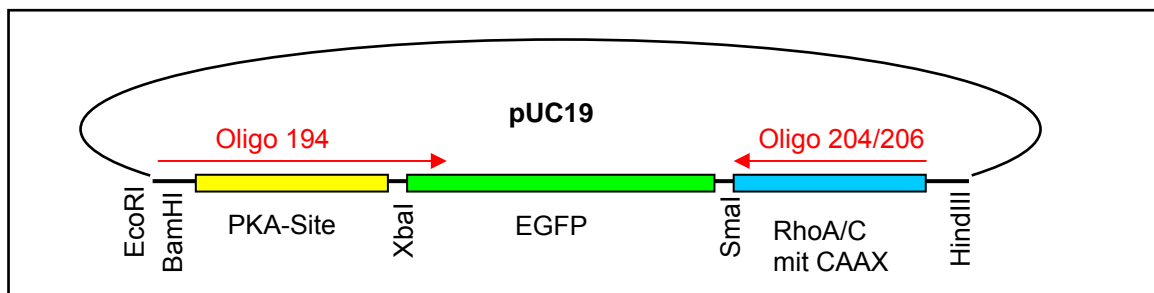
Die Herstellung des Klonierungsvektors verlief ähnlich wie bei dem PDZ-Konstrukt. Ausgehend von einem bereits sequenzierten RhoC-Konstrukt wurde ein Plasmid präpariert und die Rekrutierungsdomäne von RhoC mit den Restriktionsenzymen XmaI und HindIII entfernt, wie in Abb. 29, S.70 zu sehen ist. Der Vektor wurde dephosphoryliert, um eine Religation mit dem ausgeschnittenen RhoC-Fragment zu verhindern.



**Abb. 29** Zur Herstellung der Vektors für das PDZ-Konstrukt wurde ein sequenziertes Konstrukt mit den Restriktionsenzymen XmaI und HindIII geschnitten.

### 3.4.3 Ligation, Transformation und Kontrolle mit PCR

Insert und Vektor wurden bei 16 °C für zwei Stunden ligiert und in chemisch kompetente DH5- $\alpha$  Bakterien transformiert. Die erhaltenen Kolonien wurden mit einer „Klon-Kontroll-PCR“ untersucht. Die verwendeten Primer kodierten für den Vektor (Oligo 194) bzw. für das neu eingefügte Insert von RhoA und RhoC mit der CAAX-Domäne (Oligos 204 bzw. 206). In Abb. 30, S.70 ist ein Schema dieser PCR dargestellt.



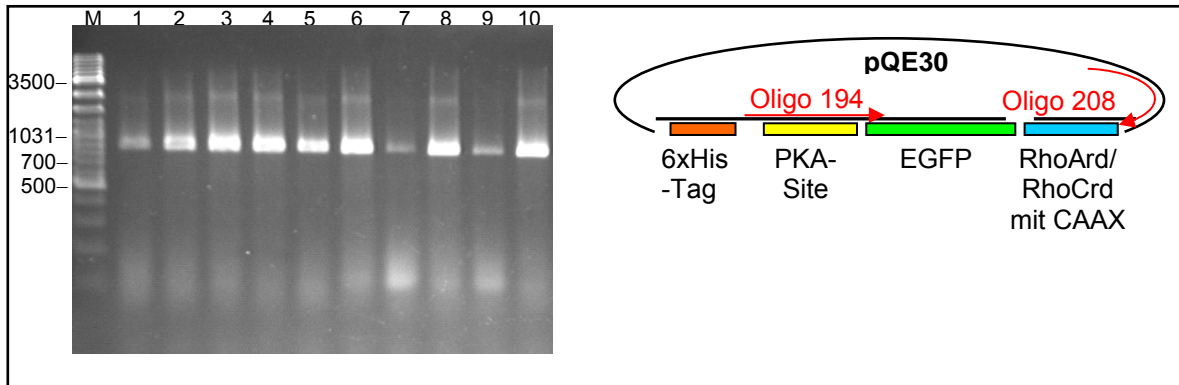
**Abb. 30** RhoA- und RhoC-Konstrukt mit der CAAX-Domäne nach Klonierung in den Vektor pUC19; die PCR-Primer 194 und 204 bzw. 206 wurden für die Kontroll-PCR eingesetzt.

### 3.4.4 Sequenzierung

Die erhaltenen PCR-positiven Klone wurden sequenziert, um Fehler in den Oligonukleotiden zu finden. Dabei wurde mit Oligo 97, das downstream der „Multiple Cloning Site“ (MCS) von pUC19 bindet, in das Konstrukt hineingelesen und nur der hintere Abschnitt des Konstrukts sequenziert, in dem sich die neuen Basen befanden. Hierbei reichte das Sequenzieren von je zwei Konstrukten aus, von denen je eines die gewünschte Sequenz enthielt.

### 3.4.5 Umklonierung in den Expressionsvektor pQE30

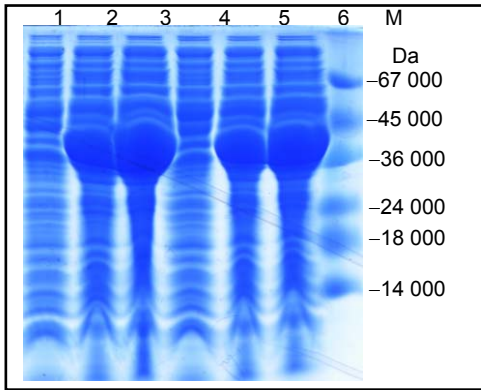
Die sequenzierten Klone wurden, wie die anderen Klone auch, mit BamHI und HindIII in pQE30 umkloniert, in die Expressionsstämme M15 und SG13009 umtransformiert und mit einer PCR kontrolliert. Die dabei verwendeten Primer banden an das Insert (Oligo194) und an den Vektor (Oligo208). Auf dem Gel in Abb. 31, S.71 ist die „Klon-Kontroll-PCR“ für RhoA und RhoC mit CAAX-Domäne aufgetragen. Das gewünschte Insert sollte bei beiden Konstrukten 826 bp lang sein. Die PCR war bei allen untersuchten Klonen erfolgreich. Die erhaltenen Klone mit den richtigen Plasmiden wurden asserviert.



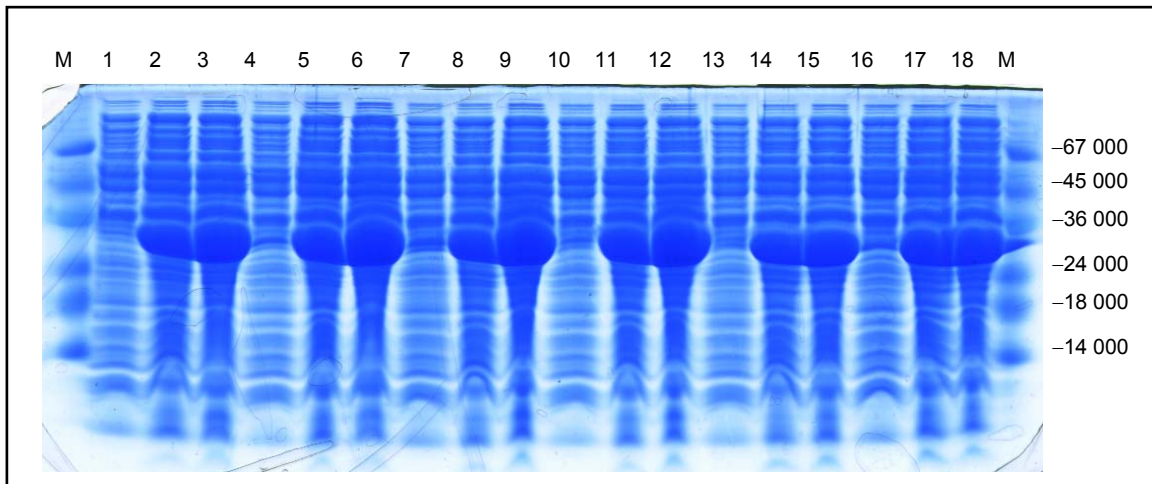
**Abb. 31** links: PCR-Kontrolle der RhoA- (Spur 1-5) und RhoC- (Spur 6-10) Konstrukte, mit CAAX-Domäne mit dem insertspezifischen Primer 194 und dem vektorspezifischen Primer 208; das erwartete PCR-Produkt ist 826 bp lang; rechts: Schema der Klon-Kontroll-PCR.

### 3.5 Expressionsexperimente mit allen hergestellten Konstrukten in zwei Expressionsstämmen

Die erhaltenen Konstrukte mussten für den Overlay-Assay gereinigt werden und sollten deshalb vorher auf Expressivität untersucht werden. Dazu wurden die Konstrukte in den beiden Expressionsstämmen M15 und SG13009 für zwei und vier Stunden induziert. Die induzierten Klone wurden lysiert, auf Gele aufgetragen und mit Western Blots und anschließender Immundetektion mit Anti-His-Antikörpern überprüft. Wie auf den Blaugelen in Abb. 32, S.72 und Abb. 33, S.72 dargestellt, war die Induktion bei den meisten Klonen erfolgreich. Es gab bereits nach zwei Stunden Induktion eine deutliche Expression, die nach vier Stunden kaum noch zunahm. Der Vergleich mit den Größenmarkern zeigte, dass die jeweiligen Proteine auch die jeweils erwartete Größe hatten. Ein Unterschied in der Expression zwischen den beiden Expressionsstämmen M15 und SG13009 konnte in diesen Experimenten nicht festgestellt werden.

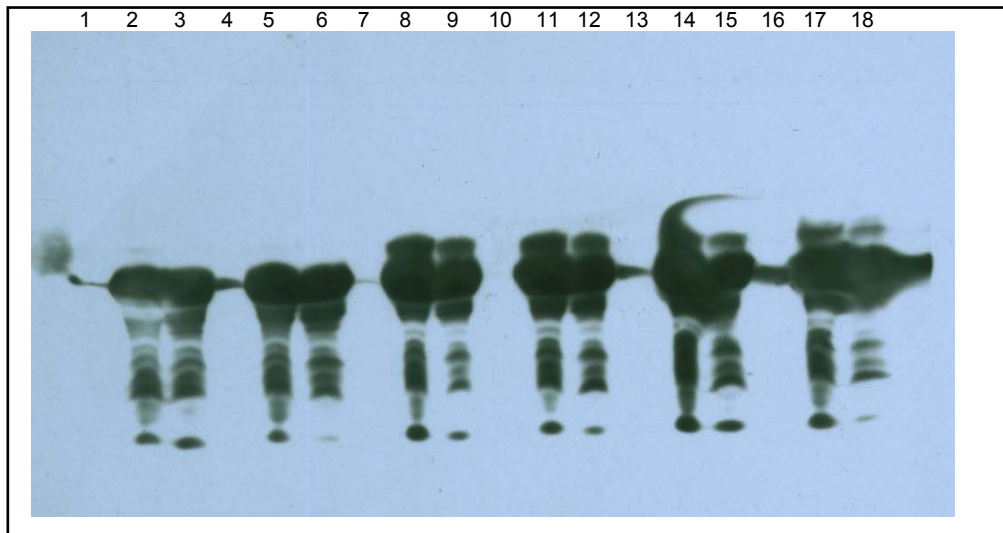


**Abb. 32** Expressionsexperiment mit der PDZ-Positivkontrolle (errechnete Sollgröße 38 kDa)  
 Spur 1-3 PDZ-Positivkontrolle in M15: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion  
 Spur 4-6 PDZ-Positivkontrolle in SG13009: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion.



**Abb. 33** Expressionsexperiment mit den Konstrukten RhoA und RhoC mit CAAX-Domäne und der Negativkontrolle. (errechnete Sollgröße 30 kDa).  
 Spur 1-3 RhoA mit CAAX-Domäne in M15: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion  
 Spur 4-6 RhoA mit CAAX-Domäne in SG13009: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion  
 Spur 7-9 RhoC mit CAAX-Domäne in M15: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion  
 Spur 10-12 RhoC mit CAAX-Domäne in SG13009: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion  
 Spur 13-15 RhoA mit CAAX-Domäne in M15: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion  
 Spur 16-18 RhoA mit CAAX-Domäne in SG13009: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion.



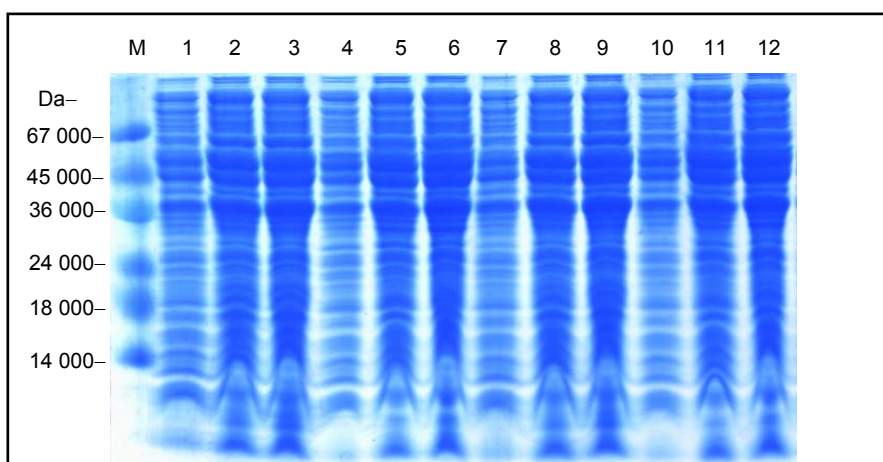


**Abb. 34** Expressionsexperiment mit den Konstrukten RhoA und RhoC mit CAAX-Domäne und der Negativkontrolle nach Western Blot und Immundetektion mit Anti-His-*tag* AK.

Spur 1-3 RhoA mit CAAX-Domäne in M15: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion  
 Spur 4-6 RhoA mit CAAX-Domäne in SG13009: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion  
 Spur 7-9 RhoC mit CAAX-Domäne in M15: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion  
 Spur 10-12 RhoC mit CAAX-Domäne in SG13009: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion  
 Spur 13-15 RhoA mit CAAX-Domäne in M15: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion  
 Spur 16-18 RhoA mit CAAX-Domäne in SG13009: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion.

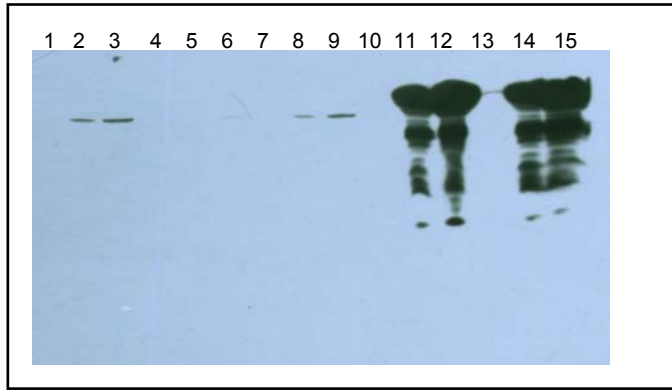
Bei den Western Blots mit Immundetektion mit Anti-His-Antikörpern sind außer den breiten Banden bei den gesuchten Proteinen noch viele Abbruchbanden unterhalb zu sehen. Da der Größenmarker nicht geblottet oder nicht detektiert wurde, kann zu der absoluten Größe der getagten Proteine keine Aussage getroffen werden.

Bei den Konstrukten mit der RhoA- und RhoC-Rekrutierungsdomäne ohne CAAX-Domäne ist die Induktion im ersten Versuch nur sehr schlecht oder gar nicht gelungen. Im Blaugel ist überhaupt keine Induktion zu sehen (siehe Abb. 35, S.73) und in den Western Blots nur eine sehr schmale Bande bei einigen Klonen (siehe Abb. 35, S.73).



**Abb. 35** Expressionsexperiment mit den Konstrukten RhoA und RhoC ohne CAAX-Domäne (errechnete Sollgröße 30 kDa).

Spur 1-3 RhoA ohne CAAX-Domäne in M15: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion  
 Spur 4-6 RhoA ohne CAAX-Domäne in SG13009: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion  
 Spur 7-9 RhoC ohne CAAX-Domäne in M15: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion  
 Spur 10-12 RhoC CAAX-Domäne in SG13009: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion.



**Abb. 36** Expressionsexperiment mit den Konstrukten RhoA und RhoC ohne CAAX-Domäne

Spur 1-3 RhoA ohne CAAX-Domäne in M15: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion

Spur 4-6 RhoA ohne CAAX-Domäne in SG13009: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion

Spur 7-9 RhoC ohne CAAX-Domäne in M15: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion

Spur 10-12 RhoC CAAX-Domäne in SG13009: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion

Spur 13-15 PDZ-Positivkontrolle in M15: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion

Spur 16-18 PDZ-Positivkontrolle in SG13009: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion, (3) nach 4 h Induktion

Diese Klone wurden nach der Umklonierung in den Expressionsvektor pQE30 erst in den Klonierungsstamm DH5- $\alpha$  transformiert, ehe sie nach einer Plasmidpräparation in die beiden Expressionsstämme umtransformiert wurden. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um die hergestellten Konstrukte leichter aufzureinigen zu können, ohne das in den Expressionsstämmen vorhandene zusätzliche Plasmid als Verunreinigung in den Präparationen zu haben. Eine erneute Induktion mit denselben Konstrukten war ebenfalls erfolglos, sodass die Konstrukte sequenziert wurden. Bei dieser Sequenzierung zeigte sich, dass die Konstrukte im Vergleich zu den Ausgangsplasmiden in ihrer Promotorregion verändert waren. Diesen Konstrukten fehlte ein Teil des Promotors, der vor der Umklonierung noch in dem Vektor vorhanden war. Von der –10-Konsensussequenz des T5-Promotors war nur noch das **T** vorhanden, die übrigen vier Basen der **TATAA**-Sequenz fehlten. Die –35-Konsensussequenz des T5-Promotors **TTGCTT** war unverändert [114]. Diese Veränderungen, die bei acht Klonen vollkommen gleich waren, sind in Abb. 37, S.74 und Abb. 38, S.75 dargestellt. In Abb. 37, S.74 ist die normale Sequenz des pQE30-Vektors abgebildet, auf der die wichtigsten Abschnitte farbig unterlegt oder unterstrichen sind. In Abb. 38, S.75 ist die veränderte Sequenz der Konstrukte gezeigt, die nicht exprimiert wurden.

```

CTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCA ATT
                                operator 1
GTG AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GAA TTC ATT AAA GAG GAG AAA TTA ACT ATG
AGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGCATGCGAGCTCGGTACCCCGGGTCGA
CCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTC
AGAACTCCATCTGGATTTGTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTT

```

**Abb. 37** Nukleotidsequenz der Promotorregion von pQE30; blau unterstrichen sind die beiden Operator-Regionen, an die der Transkriptionssinhibitor Lac bindet; pink geschrieben sind die beiden für die Promotorbindung notwendigen Regionen -35 und -10; grün geschrieben ist der Transkriptionsstart; rot geschrieben ist das Translations-Startkodon; teilweise blau geschrieben und mit einem roten Balken unterstrichen ist das 6-His-tag; mit orangenen Balken sind Restriktionsstellen versehen.

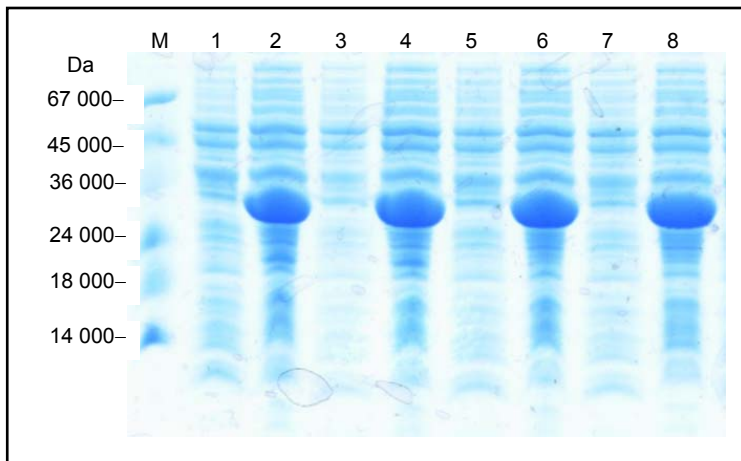
```

CTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGA
ATTCAATTAAGAGGAGAAATTAACTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCC
CGCCGAGCCAGCGTGTCTAGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGT
GCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGC

```

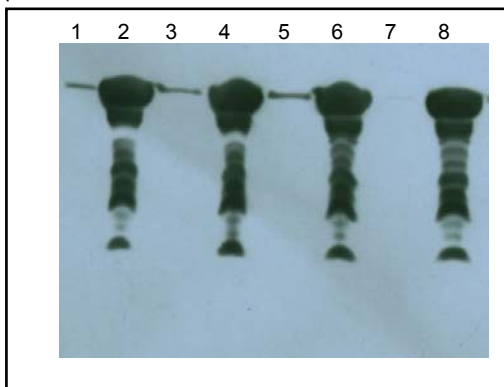
**Abb. 38** Nukleotidsequenz der Promotorregion der Konstrukte, die keine oder nur sehr schwache Induktion und Expression zeigten. Die Beschriftung entspricht der von Abb. 37, S.74; der Abbildung ist zu entnehmen, dass die zweite Operator-Region fehlt, ebenso wie die -10-Bindungsstelle des Promotors, von der nur noch ein T übrig ist (pink).

Diese Veränderungen sind die wahrscheinlichsten Erklärungen für die mangelnde Expression dieser Klone in den Induktionsexperimenten. Nachdem die Klonierungsexperimente wiederholt worden waren und diesmal die Transformation des Expressionsvektors direkt in einen Expressionsstamm erfolgte, waren die Induktionsexperimente erfolgreich, wie in Abb. 39, S.75 und Abb. 40, S.75 zu sehen ist.



**Abb. 39** Expressionsexperiment mit den Konstrukten RhoA und RhoC ohne CAAX-Domäne (errechnete Sollgröße 30k Da).

Spur 1 und 2 RhoA ohne CAAX-Domäne in M15: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion  
 Spur 3 und 4 RhoA ohne CAAX-Domäne in SG13009: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion  
 Spur 5 und 6 RhoC ohne CAAX-Domäne in M15: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion  
 Spur 7 und 8 RhoC ohne CAAX-Domäne in SG13009: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion



**Abb. 40** Expressionsexperiment mit den Konstrukten RhoA und RhoC ohne CAAX-Domäne (errechnete Sollgröße 30 kDa).

Spur 1 und 2 RhoA ohne CAAX-Domäne in M15: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion  
 Spur 3 und 4 RhoA ohne CAAX-Domäne in SG13009: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion  
 Spur 5 und 6 RhoC ohne CAAX-Domäne in M15: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion  
 Spur 7 und 8 RhoC ohne CAAX-Domäne in SG13009: (1) nicht induziert, (2) nach 2 h Induktion.

### 3.6 „Potentielle“ Bindungspartner von RhoA und RhoC aus den Overlay-Assays

Die klonierten Konstrukte wurden bei dem Kooperationspartner in der Protein-Struktur-Fabrik auf potentielle Bindungspartner untersucht. Dieser Overlay-Assay basiert auf Protein-Protein-Interaktionen. Anhand von ca. 35 000 auf Membranen immobilisierten Klonen, die humane Proteine exprimieren, werden Bindungspartner für das eingesetzte Protein gesucht. Zur Vorbereitung dieses Assays wurde eine cDNA-Bibliothek in einen Expressionsvektor kloniert, wobei den eingefügten Proteinen noch ein His-tag angehängt wurde. Die entstandenen Klone wurden in Mikrotiterplatten angeordnet und mit Robotertechnologie auf Membranen übertragen. Auf diesen Membranen können die exprimierten Proteine durch Zugabe des eigenen Proteins gescreent werden. Durch die Markierung des eigenen Proteins mit radioaktivem <sup>32</sup>P kann die Bindung auf Filmen nachgewiesen werden. Die gefundenen Bindungspartner werden durch Sequenzanalyse der Konstrukte und anschließenden Vergleich mit Datenbanken bestimmt.

Die in unseren Experimenten gefundenen potentiellen Bindungspartner können in neun Gruppen eingeteilt werden, die in Tab. 54, S.76 bis Tab. 62, S.82 aufgelistet sind. Einige der potentiellen Interaktionspartner sind genauer erklärt.

Tab. 54 Membranassoziierte potenzielle Interaktionspartner von RhoA/C:

Interaktions-partner	Interaktions-partner von RhoA oder RhoC	Kurzbeschreibung
Sapoin A-D	RhoA	Sapoin A-D sind Glycoproteine, die von einem Precursor ausgehen und in der Lysosomenmembran für den Sphingolipidabbau nötig sind. Der Precursor selbst wird sezerniert und kommt in Muttermilch, Samenflüssigkeit und im Liquor vor. Er ist ein neurotroper und myelinotroper Faktor. Außerdem spielt er bei der Entwicklung der männlichen Reproduktionsorgane, der Spermatogenese und Befruchtung eine wichtige Rolle. Bei Fehlen dieses Proteins kommt es v.a. zerebral zu Sphingolipidakkumulation [51].
Kalium-Kanal	RhoA	Kalium-Kanal, der v.a. im ZNS vorkommt und bei Hyperpolarisation öffnet. Er gehört zur Elk-Familie, der „ether-à-go-go-Kanäle“ [315]. Eine Interaktion von RhoA mit einem anderen Kalium-Kanal (Kv 1.2) ist bereits

		beschrieben, bei dem RhoA eine regulatorische Funktion für diesen Kanal zugesprochen wurde [41].
CAPDS (calcium-dependent activator protein for secretion isoform 1)	RhoA	CAPDS ist ein 145 kDa Kalzium-abhängiges Protein, das für die Exozytose von „large dense core Vesikeln“ (LDCV, für Peptid/Neuromodulator-Sekretion) und die Neurotransmittersekretion (evtl. Glutamat) notwendig ist. Es besitzt eine Pleckstrin-Homologie-Domäne zur Bindung an saure Phospholipide und eine C-Domäne zur Bindung an die LDCV-Membran. Die genaue Funktion ist unbekannt, zur schnellen, Ca <sup>2+</sup> abhängigen Sekretion ist es aber notwendig [253].
Annexin A6	RhoA	Annexin A6 gehört zu einer Gruppe von Membranproteinen. Bekannt sind Interaktionen mit Aktin und die Bindung an „membrane rafts“ in „membrane ruffles“. Sie beeinflussen die Fluidität und Permeabilität der Membran. A6 scheint v.a. für den endosomalen Transport wichtig zu sein [89, 214].

Tab. 55 Zytoplasmatische Interaktionspartner von RhoA/C:

Heat-shock-cognate 71 (HSP70/HSP73)	RhoA	Gehört zu einer Proteinfamilie, die zytoprotektive Aufgaben haben und die Zelle durch Chaperonen-Tätigkeit (also ATP-abhängige Faltungshilfe, auch bei der korrigierenden Faltung von falschgefalteten Proteinen), die Translokation von Proteinen über Membranen, Verhinderung von Proteinaggregation und den Abbau instabiler Proteine schützen [144]. Außerdem spielen die Proteine dieser Familie bei der Thermotoleranz eine Rolle und können die Immunantwort modulieren [183]. Für ein Mitglied der HSP-Familie (HSP72) ist bereits eine Interaktion mit RhoA beschrieben [153].
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GADPH)	RhoC	GADPH ist ein Enzym im Glucosestoffwechsel. Es ist der erste von zwei energieliefernden Schritten in der Glykolyse und ist für die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat in 1,3-Bisphosphoglycerat +NADH+H <sup>+</sup> verantwortlich. GADPH hat auch eine Funktion beim Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum und bindet dazu an Tubulinfilamente [69, 250, 266].

Fettsäure-Synthase (FAS Typ I)	RhoC	Fettsäuresynthese aus Malonyl-CoA, Dimer aus zwei 272 kDa Untereinheiten [12, 297].
--------------------------------	------	---

Tab. 56 Mitochondriale Interaktionspartner von RhoA/C:

Mitofusin 2 (Mfn2)	RhoA	Mfn2 spielt eine wichtige Rolle bei der Mitochondrienfusion. Es ist in der äußeren Mitochondrienmembran befestigt, ist allerdings nicht für das primäre Aneinanderheften nötig, sondern zu einem späteren Zeitpunkt der Fusion. Eine Mutation von Mfn2 führt zur hereditären motorisch-sensorischen Neuropathie, CharcotMarie-Tooth- Syndrom [123].
Mitochondriales-ribosomales Protein S23 (S23mt)	RhoA	Die rRNA der mitochondrialen Ribosomen stammt vom mitochondrialen Genom, während die zugehörigen ribosomalen Proteine von nukleärer DNA kodiert, an zytoplasmatischen Ribosomen produziert und anschließend in das Mitochondrium verlagert werden. Dort translatieren sie die mRNA des mitochondrialen Genoms. S23mt ist eines dieser Proteine. Eine Mutation von S23 ist assoziiert mit der Alzheimer Erkrankung und dem Silver-Russel Syndrom [116, 262].
Ubiquinol-Cytochrom C Reduktase Core 1	RhoA	Teil von Komplex III, einem zentralen Atmungskettenkomplex im Mitochondrium. Ubiquinol-cytochrom C Reduktase ist für die Elektronenübergabe von Ubiquinol zu Cytochrom C notwendig und schleust dabei ein Proton in den Intermembranraum (Oxidation von Ubiquinol + Reduktion von Cytochrom). Es gibt zwei Core-Proteine, deren Funktion unklar ist. Sie sind zur mitochondrialen Matrix hingewandt und homolog zu Mitochondrialen-Prozessierungs-Peptidasen (MPP), erfüllen also möglicherweise eine Atmungsketten-unabhängige Funktion. MPP schneiden die Targetingsequenz von Kern-kodierten mitochondrialen Proteinen bei deren Eintritt in die Organelle ab. In Kartoffeln ist die Peptidasefunktion der Core-Proteine noch vollständig erhalten [31, 87, 232, 248, 309].

**Tab. 57** Golgi-Apparat-assoziierte Interaktionspartner von RhoA/C:

Golgin 245	RhoA	Golgin 245 gehört zu einer Gruppe von Membran-assoziierten „tethering“-Molekülen, die für das Anheften und den Transport innerhalb des Golgi-Apparates oder von und zum Golgi-Apparat notwendig sind. Sie haben eine GRIP-Domäne am C-Terminus, die nötig und ausreichend ist für das Andocken von Vesikeln an das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Das TGN ist ein hochdynamisches und komplexes Netzwerk, das beim Sortieren und Verteilen von Proteinen eine wichtige Rolle spielt. Die im TGN hergestellten Proteine werden in eine Vielzahl unterschiedlicher Vesikel verteilt und zu ihrem jeweiligen Bestimmungsort geschickt [13, 34, 90, 308].
------------	------	--

**Tab. 58** Nukleäre Interaktionspartner von RhoA/C:

Splicing-Faktor 3B subunit 3	RhoA	Ein 450 kDa Komplex aus sieben Proteinen. Er ist Bestandteil von beiden bekannten Spliceosomen und essentiell für das Splicen. Zudem spielt er eine wichtige Rolle beim Zusammenbau des Pre-Spliceosomes [58, 99].
Histon- Deacetylase 3	RhoC	Die Histon-Deacetylase reguliert die Genexpression durch Deacetylierung der Lysinreste von Histonen und Nicht-Histonproteinen. Es unterdrückt die Transkription als Co-Repressor in einem Proteinkomplex (N-Cor), von dem es auch selbst reguliert wird. Es findet sich im Kern und im Cytoplasma (dort assoziiert mit z.B. HSP70) [160].

**Tab. 59** Sekretorischer Interaktionspartner von RhoA/C:

SPARC (Secreted protein acidic and rich in cysteine)	RhoA	SPARC ist ein extrazelluläres Matrixprotein, das aber keine strukturelle Bedeutung, sondern eher Signalfunktion hat. Es ist für die Interaktion zwischen extrazellulärer Membran und Zelle verantwortlich. SPARC besitzt zwei Kalziumbindungsstellen und ein Follistatin-ähnliches Modul. Es moduliert Wachstumsfaktoraktivität und inhibiert den Zellzyklus durch Arretierung in der G1-Phase. SPARC spielt eine Rolle bei der Linsentransparenz und ist bei Erwachsenen vor allem bei der Wundheilung erhöht.
---	------	---

		Außerdem ist es bei Krebsmetastasen, Arthritis, Diabetes mellitus und Nierenerkrankungen erhöht [32, 79] ). SPARC ist aber auch intrazellulär in Assoziation mit der Kernmatrix beschrieben worden [92].
--	--	--

Tab. 60 Signaltransduktion-assoziierte Interaktionspartner von RhoA/C:

MAPK 3 (Mitogen-activated protein kinase 3)	RhoC	MAPK 3 (ERK-1) ist regulatorisch tätig bei der Mitose und Meiose. Es wird aktiviert von G-Protein-Rezeptoren (Signaltransduktion von außen nach innen) z.B. bei Virusinfektionen; Die Aktivierung erfolgt durch die MAPK-Kinase, die wiederum von einer Kinase (MAPKKK) aktiviert wird. MAPK phosphoryliert anschließend Serin/Threonin/Tyrosin-Reste von Proteinen [131].
Pyruvat-Kinase	RhoC (3x)	M1 Subtyp, der vor allem in Muskelgewebe vorkommt. Die Pyruvat-Kinase katalysiert den letzten Schritt der Glykolyse, wobei ein Molekül ATP aus ADP entsteht.
Serine/Threonine Protein-Phosphatase 2A (PP2A)	RhoC	Diese Serin/Threonin-Phosphatase spielt bei Drosophila und in Mäusen bei der Zellzyklus-Regulation, Zell-Morphologie, Entwicklung und Apoptose eine Rolle. Außerdem hat sie eine prominente Rolle bei der Signaltransduktion. Das gefundene Protein ist die 65 kDa Untereinheit A (eine von 3 Untereinheiten). Die Untereinheiten A+C sind für die Grundstruktur notwendig. Die Untereinheit B, von der es verschiedene gibt, kommt als dritte hinzu und entscheidet über den Wirkort. Die Untereinheit A kann noch unterteilt werden in eine alpha- und eine beta-Isoform. RhoC hat an die alpha-Isoform gebunden. Die Untereinheit A besitzt ein HEAT-Motiv. PP2A moduliert verschiedene Kinasen, z.B. ERK/MAPK, PKA, PKB, PKC und die Calmodulin-abhängige Kinase [84, 126] .
Protein Phosphatase 1 regulatory subunit 10 (p99, PNUTS bei Ratten)	RhoC	PP1 ist eine Serin/Threonin-Phosphatase, die der Wirkung von Kinasen entgegenwirkt und so eine wichtige regulatorische Funktion bei Glykogenmetabolismus, Kalziumtransport, Muskelkontraktion, Proteinsynthese, intrazellulärem Transport und Mitose erfüllt [293]. Die PP1 Untereinheit 10 ist homolog zu der bei Ratten gefundenen



		PNUTS Untereinheit, einem von mehreren Lokalisationsproteinen von PP1. PNUTS ist für die Kernlokalisierung zuständig und besitzt eine putative RNA-Bindungsstelle, mit der es eine Kernfunktion von PP1 vermitteln könnte. Die Bindung an PP1 erfolgt über ein RVXF-Motiv [6, 145, 147].
--	--	--

**Tab. 61** Ribosomale Interaktionspartner von RhoA/C oder PDZ:

60S-Ribosomales Protein L11	RhoA	Das ribosomale Protein L11 ist Bestandteil der 60S-Ribosomen-Untereinheit. Es besteht aus einer C-terminalen und einer N-terminalen Domäne, die über eine kurze Verbindung zusammenhängen. Die C-terminale Domäne bindet an das rRNA-Rückgrat des Ribosoms, die N-terminale Domäne dagegen interagiert mit Elongationsfaktoren und ist Ansatzpunkt für einige Antibiotika [119, 208]. L11 ist zudem als indirekter Aktivator von p53 beschrieben. Diese Funktion erfüllt das Protein unabhängig von der 60S Untereinheit und soll bei Stress oder Mangelernährung die Zellzyklusprogression verlangsamen [21, 56].
60S-Ribosomales Protein P0	RhoC	Das P0-Protein bildet zusammen mit den Proteinen P1 und P2 einen Ausläufer an der großen Ribosomenuntereinheit, der für die Interaktion des Ribosoms mit löslichen Faktoren während der Proteinsynthese notwendig ist. Zellen mit einer Deletion dieses Proteins oder auch nur von Teilen, sind nicht lebensfähig [231].
Elongationsfaktor 1-alpha 1 (EF-Tu)	RhoA (6x) RhoC (4x) PDZ (1x)	Dieses G-Protein stellt bei jeder Elongation der sich an Ribosomen bildenden Peptidkette durch GTP-Hydrolyse Energie zur Verfügung, die die Elongation schneller, effizienter und genauer ablaufen lässt. Es gibt zwei wichtige Elongationsfaktoren. EF-Tu bindet an die tRNA, ehe diese an das Ribosom bindet und versteckt durch seine Bindung die einzufügende Aminosäure. Die GTP-Hydrolyse führt zu einer starken Konformationsänderung des Proteins, wodurch die einzufügende Aminosäure demaskiert wird und binden kann. Außerdem stellt EF-Tu zusammen mit EF-G die notwendige Energie für die Peptidbindung zur

		Verfügung [196].
Translations-Initiationsfaktor 3 Untereinheit 6 interacting protein (HSPC021)	RhoA	Der Translations-Initiationsfaktor 3 (eIF3) ist mit 700 kDa der größte Translations-Initiationsfaktor. Er bindet direkt an die 40S Ribosomuntereinheit und das Anfangskodon (methionyl-tRNA) und interagiert mit den übrigen eIF (1, 1A, 2GTP), die den Prä-Initiationskomplex bilden. Dieser erleichtert die Bindung der mRNA G-cap über eIF4G und scannt anschließend die mRNA nach dem Anfangskodon ab. Der humane eIF3 hat sechs Untereinheiten mehr als der Hefen-eIF, die für eine Regulation wichtig sein könnten. Die Funktion des „interacting protein“ ist bisher nicht geklärt, nur seine Bindung an die Int6-Untereinheit von eIF3 [182].

**Tab. 62** Zytoskelettassoziierte Interaktionspartner von RhoA/C oder PDZ:

Gamma-Actin	RhoA/C	Die monomere Form von G-Aktin reguliert den Transkriptionsfaktor SRF (bei Absinken der G-Aktinkonzentration kommt es zur Freigabe von sonst gebundenem Faktor MRTF, der SRF aktiviert). In dieser Kaskade scheint auch Rho eine Rolle zu spielen, da es ebenfalls zur Freigabe von MRTF über einen sinkenden G-Aktinspiegel führt [146].
Tubulin alpha 1	RhoA (2x) RhoC (4x) PDZ (1x)	Die Tubuline bilden das Grundgerüst einer Zelle und sind für Zellstabilität, intrazelluläre Mobilität etc. verantwortlich. Die unterschiedlichen Subtypen sind teilweise nicht austauschbar, wie mit Drosophila gezeigt wurde [70].

**Tab. 63** Bereits beschriebene PDZ-Interaktionen (Positiv-Kontrolle)

Lysyl-tRNA Synthetase	PDZ	TIP-15 PDZ-Bindungsstelle [73]
Adenomatous polyposis coli protein	PDZ	PDZ2-Domäne der Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP-BL) [72]
Diacylglycerol kinase	PDZ (5x)	TIP-15 PDZ-Bindungsstelle [73]; Gamma1- Syntrophin PDZ-Domäne [112].

Glutamate [NMDA] receptor subunit epsilon 4 precursor	PDZ	Interagiert mit den PDZ-Domänen von INADL und DLG4 (UniProtKB/Swiss-Prot Eintrag O15399)
G protein-coupled receptor 125 (Fragment) (5- TEM)	PDZ	Drosophila disc large tumor suppressor gene [300]

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Gesamtstrategie

#### 4.1.1 Einleitung

Die kleinen GTPasen RhoA und RhoC spielen bei der Invasion von *Shigella* in humane Zellen eine wichtige Rolle. So führt der Rho-spezifische Toxin-Inhibitor C3 aus *Clostridium botulinum* zu einer verminderten Ausbildung des *Shigella*-induzierten Invasionskomplexes und zu einer herabgesetzten Invasionseffizienz von *Shigella*. [2, 285].

Die kleinen Rho-GTPasen gehören zu der Ras-Superfamilie kleiner GTPasen. Sie fungieren als molekulare Schalter, die in einer aktiven GTP-gebundenen Form oder in einer inaktiven GDP-gebundenen Form vorliegen können. Die Superfamilie umfasst mehr als 100 Proteine, von denen 22 die Familie der Rho-GTPasen bilden. Diese Familie kann wiederum in 10 Gruppen eingeteilt werden, mit jeweils mehreren Mitgliedern, den Isoformen. Rho besteht im geranylgeranylierten Zustand aus 190 Aminosäuren (AS) und wird in die Isoformen A, B und C eingeteilt [167, 251, 263]. Die Isoformen von Rho können in drei Regionen eingeteilt werden (Abb. 2, Seite 21). RhoB wird im Folgenden nicht weiter betrachtet, da es sich in seiner AS-Sequenz von RhoA und RhoC stärker unterscheidet und für diese Arbeit keine Rolle spielt. Die Aminosäuren 1-180 umfassen die aktiven Zentren der Rho-Proteine, mit den Switch 1- und Switch 2- Regionen. RhoA und RhoC unterscheiden sich hier in acht Positionen ihrer Sequenz voneinander. Die Aminosäuren 181-189, die die polybasische Region umfassen und in dieser Arbeit als „Rekrutierungsdomäne“ bezeichnet werden, unterscheiden sich bei RhoA und RhoC in sechs von neun Positionen. Die letzten vier Aminosäuren, die zur Geranylgeranylierung, also zur Fettveresterung notwendig sind, unterscheiden sich in zwei von vier Positionen ihrer Aminosäuresequenz voneinander [294].

#### 4.1.2 Rekrutierungsdomäne

Die „Rekrutierungsdomäne“ der kleinen GTPasen RhoA und RhoC umfasst also eine Sequenz von neun Aminosäuren und befindet sich am C-Terminus der Moleküle (Abb. 2, Seite 21). Bei der Untersuchung des Rekrutierungsverhaltens von RhoA und RhoC im Rahmen der Shigelleninvasion fällt auf, dass RhoA bei der Invasion in die Basis, RhoC dagegen in die Spitzen der zellulären Protrusionen rekrutiert wird [2]. Diese Beobachtungen, zusammen mit dem in der Einleitung gezeigten Vergleich der Aminosäuresequenz von RhoA und RhoC (Abb. 2, Seite 21) legen nahe, dass das unterschiedliche Rekrutierungsverhalten von RhoA und RhoC mit ihrer polybasischen Region zusammenhängt. Um das Rekrutierungsverhalten von RhoA und RhoC weiter zu untersuchen, wurden in unserem Labor Mutationsexperimente durchgeführt, bei denen die polybasischen „Rekrutierungsdomänen“ von RhoA und RhoC ausgetauscht wurden. In Rekrutierungsexperimenten zur Invasion durch *Shigella* wurde gezeigt, dass diese Proteine sich so verhalten, wie ihre „Rekrutierungsdomäne“ es vorgibt. Eine RhoA-GTPase mit einer RhoC-„Rekrutierungsdomäne“ verhält sich wie RhoC (Rekrutierung in die

Spitzen des Invasionskomplexes) und eine RhoC-GTPase mit einer RhoA-„Rekrutierungsdomäne“ verhält sich wie RhoA (Konzentrierung an der Basis des Invasionskomplexes). In anschließenden Experimenten in unserem Labor wurde gezeigt, dass die polybasische Region hinreichend ist, um die Lokalisation eines daran gekoppelten, fluoreszierenden Proteins (EGFP) im Invasionskomplex festzulegen und das RhoA- oder RhoC-Muster zu imitieren. Weitere Untersuchungen zu dieser „Rekrutierungsdomäne“ konnten dies noch weiter einengen. So kam es beim Austausch von zwei RhoA-Lysinen an den Positionen 186 und 187 zu zwei Argininen, wie sie bei RhoC vorkommen, zu einem Wechsel des RhoA-Rekrutierungsmusters hin zu einem RhoC-Muster. Dies legt nahe, dass das zum RhoC-Rekrutierungsmuster führende Rekrutierungsmodul variabel ist. Das RhoA-Rekrutierungsmuster dagegen geht durch den Verlust der beiden Lysine verloren [80, 104].

#### 4.1.3 CAAX-Domäne

RhoA und RhoC weisen an ihrem C-terminalen Ende eine kurze, so genannte CAAX-Domäne auf, die zum Anhängen eines Lipidankers an das Protein notwendig ist, was als Geranylgeranylierung bezeichnet wird. Hier werden posttranslational drei spezifische C-terminale Veränderungen vorgenommen. Zunächst wird das Cystein geranylgeranyliert, also mit einem C-20 Fettsäurerest versehen, anschließend werden die drei C-terminalen Aminosäuren (AAX) abgespalten und als dritte Modifikation kommt es zu einer Carboxylmethylierung am Cystein. Das Ergebnis ist ein Lipidanker am C-Terminus des Proteins, mit dem dieses an eine Lipidmembran binden kann. Bei anderen Rho-GTPasen kann es alternativ zur Farnesylierung kommen, wobei hier ein C-15 Fettsäurerest angehängt wird. Das notwendige Motiv für das Anhängen des Lipidankers muss dabei nicht das CAAX-Motiv umfassen, sondern kann auch gekürzt oder abgewandelt vorliegen. Das Ziel ist immer eine Lipidmembraninteraktion zu ermöglichen, um so Zellmembran-assoziierte Funktionen erfüllen zu können. Bei RhoA und RhoC spielt dieser Lipidanker funktional eine zentrale Rolle, da er für die Rekrutierung der Rho-GTPasen im Shigella-Invasionskomplex notwendig ist [25]. Aber auch Protein-Protein-Interaktionen sind von diesem Lipidanker abhängig. So ist zum Beispiel die Interaktion von der GTPase Cdc42 mit Rho-GDI, einem Protein, das Rho-GTPasen aus der Membran entfernt und inaktiviert, nur mit angehängtem Geranylgeranylrest möglich [110].

#### 4.1.4 Herstellung von Rho-Konstrukten

In der vorliegenden Arbeit wurden die Grundlagen zur weiteren Untersuchung der polybasischen, prä-terminalen „Rekrutierungsdomäne“ der Rho-GTPasen RhoA und RhoC gelegt. Zur weiteren Charakterisierung wurden Interaktionspartner der beiden „Rekrutierungsdomänen“ gesucht. Dazu wurden sechs verschiedene Konstrukte hergestellt. Um die gewünschten Experimente durchzuführen, mussten die Konstrukte dabei einige strukturelle Vorgaben erfüllen, die aus Vorexperimenten vorgegeben waren oder für die Durchführung weiterführender Experimente notwendig waren. Daher mussten alle Konstrukte den

Fluoreszenzmarker GFP, eine PKA-*Site* und ein His-*tag* umfassen (siehe Abb. 3, Seite 55 für schematische Darstellung).

Zwei der hergestellten Konstrukte besaßen zudem die polybasischen „Rekrutierungsdomänen“ von RhoA oder RhoC, ohne die im natürlichen Protein folgende CAAX-Domäne. Diese Konstrukte sollten für die Suche nach Protein-Interaktionspartnern für die jeweilige „Rekrutierungsdomäne“ dienen. Die CAAX-Domäne entfiel, um die Bindungspartnersuche auf die eigentliche Rekrutierungsdomäne zu reduzieren und Bindungspartner der Kombination aus polybasischer Region und CAAX-Domäne oder der CAAX-Domäne allein auszuschließen. Hierin liegt aber auch ein Nachteil, da einige Interaktionspartner für das Erkennen der polybasischen Region das Cystein der CAAX-Domäne benötigen könnten.

Daher wurden zwei weitere Konstrukte kloniert, die die polybasische „Rekrutierungsdomänen“ von RhoA oder RhoC mit der im natürlichen Protein folgenden CAAX-Domäne umfassen. Diese Konstrukte entsprachen also in ihrem Aufbau in Teilen den in den Vorexperimenten verwendeten einfachen Konstrukten. Mit diesen beiden Konstrukten konnte gezeigt werden, dass die an die Proteine neu angehängten Bereiche, wie die PKA-*Site* und das 6-His-*tag*, das Rekrutierungsverhalten im Rahmen einer Shigelleninfektion nicht verändern. Diese Konstrukte können benutzt werden, um nach Interaktionspartnern zu suchen, die nur die Einheit von polybasischer Region und folgendem Cystein erkennen.

Die Geranylgeranylierung könnte auch die Tertiärstruktur der „Rekrutierungsdomäne“ beeinflussen. Dies ist für den C-Terminus von Cdc42 beschrieben. Ohne Geranylgeranylierung bindet das C-terminale Cystein 188 von Cdc42 über eine Disulfid-Brücke an das eigene Cystein 105 [188], eine Konformation, die nach Geranylgeranylierung des Cystein 188 nicht mehr möglich ist [110]. Ob eine analoge Stabilisierung durch intramolekulare Disulfid-Brückenbildung auch bei den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Konstrukten eine Rolle spielt, ist von uns nicht untersucht worden. Es könnte auch sein, dass Interaktionspartner nur mit dem geranylgeranylierten Protein interagieren können, da Teile des Fettsäurerestes für die Interaktion zur Verfügung stehen müssen. Schließlich könnte bei der Suche nach Protein-Interaktionspartnern mit diesem Konstrukt die vollständig vorkommende CAAX-Region ein Nachteil sein, die im natürlichen geranylgeranylierten Protein auf das Cystein reduziert ist, sodass der AAX-Rest die Interaktionen beeinflussen könnte. In der Arbeit wurden keine geranylgeranylierten Konstrukte hergestellt, da sie in weiterführenden Experimenten nicht verwendet werden können.

Ein fünftes Konstrukt diente als Positivkontrolle und besaß statt einer „Rekrutierungsdomäne“ eine so genannte PDZ-Domäne. Für PDZ-Domänen sind bereits eine Vielzahl von Bindungspartnern bekannt und näher charakterisiert, sodass dieses Konstrukt, bei einem funktionierenden Bindungs-Assay, eine Interaktion zeigen sollte [127]. Die verwendete PDZ-Domäne war außerdem bereits in „Overlay-Assays“ bei dem Kooperationspartner in der

Proteinstrukturfabrik Berlin, der die weiterführenden Interaktionsuntersuchungen durchführte, verwendet worden, sodass eine Kompatibilität mit dem Assay zu erwarten war.

Das sechste Konstrukt war eine Negativ-Kontrolle. Sie besaß keine „Rekrutierungsdomäne“ und diente dazu Bindungspartner des 6-His-tags, der PKA-Site und des Fluoreszenzmarkers GFP herauszufinden und auszuschließen.

#### 4.1.5 Mögliche Bindungspartner von Rho

In weiterführenden Experimenten sollten die hergestellten Konstrukte auf ihre Funktionstüchtigkeit untersucht werden. Dazu wurden vom Kooperationspartner dankenswerterweise einige „Overlay-Assay“-Experimente mit den Konstrukten ohne CAAX-Domäne durchgeführt (Konstrukte 1 und 2). Dabei konnte die Funktionstüchtigkeit dieser Konstrukte gezeigt werden, die Ergebnisse dieser Experimente werden in Abschnitt 4.3, S.93 noch diskutiert.

Der „Overlay-Assay“ wurde gegenüber anderen Methoden zur Interaktionsuntersuchung wie „Phage-Display“, „Two-Hybrid-Screen“ oder „Pulldown-Assay“ favorisiert. Ein Vorteil des „Overlay-Assays“ ist die Möglichkeit, eine ganze fetale cDNA-Bank schnell und leicht reproduzierbar zu „screenen“. Man erhält sofort eine DNA-Sequenz, die genau dem exprimierten Protein oder Proteinteil entspricht, das eine Interaktion eingegangen ist. Mit der gefundenen Sequenz kann anschließend anhand von Datenbanken das zugrunde liegende Protein gefunden und die erhaltenen Interaktionspartner, die als klonierte Konstrukte vorliegen und mit einem His-tag versehen sind, können schnell aufgereinigt und genauer untersucht werden [38-40]. Ein Nachteil des verwendeten „Overlay-Assays“ ist seine Inkompatibilität zu lipidhaltigen, membranbindenden Proteinen. Das ist vor allem im Zusammenhang mit einer Region wie der polybasischen von RhoA und RhoC ungünstig, da die Konformation dieser Region in dem Rho-Protein auch von dem angehängten Geranylgeranylrest abhängt [110]. Zudem könnte bei einem „Overlay-Assay“ eine *in-vitro* Situation konstruiert werden, die *in-vivo* eventuell gar nicht möglich ist, da bestimmte Proteinteile *in-vivo* gar nicht zu einer Interaktion bereitstehen.

Die gefundenen Interaktionspartner müssen in einem nächsten Schritt mit anderen Interaktionsassays verifiziert werden. Hierzu könnten zum einen die bereits genannten Methoden „Two-Hybrid-Screen“, „Phage-Display“ oder „Pulldown-Assay“ dienen. Andererseits bieten sich Methoden wie „Isothermal Titration Calorimetry“, „Surface Plasmon Resonance“, Immunopräzipitation und Mutationsexperimente an, um die gefundenen Interaktionen genauer zu charakterisieren.

## 4.2 Diskussion von Material und Methoden

### 4.2.1 His-tag

Das His-tag aus dem Expressionsvektor pQE30 ist Teil einer etablierten Reinigungsmethode für Proteine. Die kurze Sequenz aus sechs Aminosäuren, die in den von mir hergestellten Konstrukten N-terminal lokalisiert ist, bindet an Ni-Nitrilotriacetic acid (Ni-NTA)-Säulen oder -Beads und kann anschließend mit Imidazol von der Matrix eluiert werden. Das His-tag kann auch C-terminal oder innerhalb einer Proteinsequenz platziert werden. Da das His-tag kurz und bei pH 8,0 ungeladen ist, sollte es die Konformation und Funktionalität des Restproteins nur wenig verändern. Auch die Sekretion, Faltung und Kompartiment-Zuordnung sollten sich durch das Anhängen des His-tags nicht ändern [211]. Der besondere Vorteil dieses Systems ist die geringe Größe im Vergleich zu anderen zur Proteinreinigung verwendeten Fusionspartnern. So beträgt das Molekulargewicht des häufig zu Reinigungszwecken eingesetzten Protein-Fusionspartners Glutathion-S-Transferase (GST) 26 kDa.

### 4.2.2 Proteinkinase A (PKA, cAMP-abhängige Proteinkinase)-Site

Die gewählte PKA-Site befindet sich in den von mir klonierten Konstrukten zwischen His-tag und EGFP-Domäne (Abb. 3, Seite 55) und umfasst die Aminosäuren RRASV. Dies ist eine Konsensussequenz aus dem Phosphorylierungsbereich der Rattenleber-Pyruvatkinase [310], die von einer 38 kDa Untereinheit der Proteinkinase A erkannt und von dieser am Serin (S) phosphoryliert werden kann. Sie wurde schon in mehreren Arbeiten als tag verwendet [82, 109, 128] und ist die erste beschriebene Sequenz, die von PKA experimentell phosphoryliert wurde [310]. Die  $K_m$  wurde in diesen Experimenten mit 0,08 mM angegeben. Diese Konsensussequenz wurde aus einer Reihe anderer möglicher PKA-Sites ausgewählt, da sie in kommerziellen Kits verwendet wird, womit die Benutzung kommerzieller PKA möglich und damit eine gute Reproduzierbarkeit gegeben war. Andere beschriebene Sequenzen, die ebenfalls für die Phosphorylierung in Frage gekommen wären, sind beschrieben worden wie das Peptid „GRTGRRNSI“ von Mitchell RD et al. [180].

Diese Phosphorylierung wurde benutzt, um die gereinigten Proteine mit radioaktivem Phosphat  $^{32}\text{P}$  zu markieren und sie im „Overlay-Assay“ mit hoher Sensitivität nachweisen zu können.

Die Phosphorylierung könnte auch das innerhalb der RhoA-„Rekrutierungsdomäne“ gelegene Serin betreffen, das *in-vivo* durch die PKA phosphoryliert wird [148]. Bei der Suche nach Bindungspartnern sollte dies keine Rolle spielen, da das RhoA-typische Rekrutierungsmuster nicht beeinflusst wird [104].

### 4.2.3 Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)

Das in den Klonierungsexperimenten verwendete EGFP-Motiv stammte aus dem pEGFP-C1-Vektor der Firma Clontech und war in Vorversuchen bei Rekrutierungsexperimenten verwendet worden. In meinen Konstrukten liegt EGFP zwischen der PKA-Site und dem jeweiligen Rho-



Rest (Abb. 3, Seite 55). pEGFP-C1 ist ein 4,7 kbp Vektor, der für eine Variante des Wildtyp „Green-Fluorescent-Protein“ kodiert und durch Basenaustausch eine 35-fach höhere Fluoreszenzintensität bei 488 nm besitzt. Der Vektor besitzt zudem Resistenzgene für Kanamycin und Neomycin. Ein Nachteil dieses Vektors war der humane Kodongebrauch, der in *E.coli* kontraproduktiv sein könnte. Die Vorexperimente fanden jedoch in menschlichen HeLa Zellen statt, weshalb die Benutzung humaner Kodons erforderlich war [54, 100, 303].

Andere Fluoreszenzmoleküle, wie zum Beispiel die „Cyan Emission Variant“ (ECFP) oder „Yellow Emission Variant“ (EYFP), zwei Varianten von GFP, hätten ebenfalls verwendet werden können. Da die vorhergehenden Experimente zu der Rho-Rekrutierung allerdings mit EGFP erfolgt waren, wurde EGFP als Fusionspartner beibehalten.

#### 4.2.4 PDZ-Domäne

Die PDZ-Domäne wurde als Positivkontrolle verwendet, da für diese Domäne viele Bindungspartner bereits bekannt sind [127]. Sie wurde anstelle der RhoA- oder RhoC-Domäne in die von mir hergestellten Konstrukte eingefügt (Abb. 3, Seite 55). PDZ-Domänen sind die häufigsten bisher bekannten Proteininteraktionsdomänen [235]. Ursprünglich wurde sie in drei verschiedenen Proteinen gefunden, von deren Anfangsbuchstaben sich ihr Name herleitet. Ein Großteil der Proteine, die PDZ-Domänen enthalten, sind Membran-assoziiert und die PDZ-Domäne bindet meistens an die vier bis sechs C-terminalen AS eines anderen Proteins [20, 74]. Die Domänen bestehen aus 80 – 100 AS und kommen oft mehrfach hintereinander in Proteinen vor, weshalb sie auch als „Klebstoff“ für Proteinkomplexe bezeichnet werden [127]. PDZ-Domänen können anhand ihrer unterschiedlichen Proteinwechselwirkungen und anhand von konservierten AS in drei Gruppen klassifiziert werden, wobei diese Klassifikation nicht endgültig ist und auch nicht alle bisher bekannten PDZ-Domänen umfasst [20, 127].

Die in dieser Arbeit verwendete PDZ-Domäne, mit einer Länge von 318 bp, befand sich in einem pQE30 Expressionsvektor und stammte von unserem Kooperationspartner Hendrik Weiner in der Proteinstrukturfabrik. Dort wurde diese Domäne bereits in „Overlay-Assays“ erfolgreich verwendet [38-40] (mündliche Mitteilung Hendrik Weiner, AG K. Büsow, Proteinstrukturfabrik).

#### 4.2.5 Plasmidpräparation

Plasmidpräparationen wurden mit Hilfe von Kits durchgeführt, da die Ausbeute dabei höher ist als bei Reinigungen nach Standardprotokollen (laborinterne Ergebnisse). Durch die Verwendung des gleichen Materials konnten die einzelnen Reinigungsschritte außerdem besser verglichen und abgestimmt werden.

#### 4.2.6 Hybridisierung

Oligonukleotid-Hybridisierungen wurden benutzt, um die beiden RhoA- und RhoC-Konstrukte mit einer CAAX-Domäne herzustellen. Diese Technik wurde angewandt, da nur eine kurze

Sequenz in bereits vorhandenen Konstrukten ausgetauscht bzw. hinzugefügt werden musste. Da für diesen Austausch definierte Restriktionsschnittstellen vorhanden waren, die mit der Hybridisierung leicht nachgebildet werden konnten, bot sich diese Technik an. Bei der anschließenden Sequenzierung musste zudem jeweils nur ein kurzer Bereich im neuen Konstrukt betrachtet werden, da der Rest der Konstrukte bereits in dem sequenzierten Vektor in korrekter Form vorlag. Eine andere Methode diese Konstrukte herzustellen, wäre mittels PCR, wie sie bereits bei der Herstellung der anderen Konstruktteile erfolgreich zum Einsatz kam. Hierbei hätte allerdings das ganze erhaltene Konstrukt erneut sequenziert werden müssen, um Taq-Polymerasefehler auszuschließen.

#### 4.2.7 Klonierung

Für die Klonierungsexperimente wurde der Klonierungsvektor pUC19 verwendet, da die hergestellten Konstrukte sequenziert werden mussten und für pUC19 Standardsequenzierungsprimer im Labor vorhanden waren. Eine direkte Klonierung in einen Expressionsstamm wäre ungeschickt gewesen, da die Sequenzierung in einem Expressionsvektor durch die Anwesenheit eines zweiten Vektors in diesen Bakterien behindert und die notwendige Plasmidausbeute herabgesetzt gewesen wäre.

Bei der Klonierung der RhoA- und RhoC-Konstrukte ohne CAAX-Region war die Klonierungseffizienz zu Beginn, wie bereits unter 3.1.3 beschrieben, herabgesetzt. Die Insertaufreinigung erfolgte zu Beginn der Klonierungen nicht durch Auftrennen über ein Agarosegel, sondern nur mit Phenol/Chloroform-Extraktion und darauf folgender Ethanolpräzipitation. In einem Restriktionsexperiment von klonierten Vektoren ohne das richtige Insert konnte daraufhin gezeigt werden, dass die Ursache für die herabgesetzte Klonierungseffizienz vermutlich ein etwa 130 bp langes Insert war, das effektiver in den Vektor ligiert wurde als das gewünschte Insert von 820 bp Länge. Möglicherweise handelte es sich bei diesem kleinen Fragment um Primerdimere aus der PCR, die bei der Phenol/Chloroform-Extraktion mitgereinigt wurden und damit im Ligationsansatz zu finden waren. Dieses Fragment konnte durch die Reinigung der DNA über ein Agarosegel abgetrennt werden, wodurch die Klonierungseffizienz wesentlich erhöht wurde.

Bei der Klonierung der PDZ-Domäne kam es durch Ligationsprobleme ebenfalls zu einer verminderten Klonierungseffizienz, wie unter 3.2.4 bereits beschrieben. Dies ist eventuell auf die Verwendung einer speziellen Agarose zurückzuführen, da bei der Verwendung der Agarose einer anderen Firma diese Probleme nicht mehr auftraten. Bei einem Religationsexperiment konnte eine Inhibition der Ligation durch die über Agarose der Firma Difco gereinigte DNA gezeigt werden, wie in Abb. 23 (Seite 67) zu sehen ist, auf die bereits in Abschnitt 3.2.4 eingegangen wurde. Der Ansatz ohne Ligase in Spur 9 zeigt den DNA-Marker mit seinen zehn Banden wobei die zweite Bande von oben eine Doppelbande und die Bande bei 421 bp nur schwer zu erkennen ist. Der vollständige DNA-Marker ist außerdem in Abb. 23 (Seite 67) von Fermentas zu sehen. Nachdem dieser Marker mit Ligase behandelt worden war, entstand eine

breite Bande, die oberhalb der 19329 bp Bande des Markers liegt und die ligierte Lambda-DNA darstellt, wie in Spuren 5 und 6 zu sehen ist. In den Proben, in denen es zu einer Inhibition gekommen war, ist diese Bande entweder nicht vorhanden (Spuren 4, 7 und 9) oder die Ligation hat nicht vollständig stattgefunden, sodass noch Banden des ursprünglichen Markers zu sehen sind (Spur 2). Diese Inhibition trat dann auf, wenn DNA zugefügt wurde, die über Gele der Firma Difco gereinigt worden war, während sie bei DNA aus Gelen der Firma Roth nicht auftrat. In den Spuren 1 und 10 ist außer der Bande bei 19329 bp noch eine weitere, bei ca. 5000 bp gelegene Bande zu sehen, die den jeweils zugefügten über ein Gel gereinigten DNA-Vektoren in ihrer religierten Form entspricht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die verwendete inhibierende Agarose oder ein zusätzlicher Inhaltsstoff eine Rolle bei der initial deutlich herabgesetzten Klonierungseffizienz gespielt hat.

#### 4.2.8 Transformation

Für die Transformationsexperimente wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt. Zu Beginn der Arbeiten wurden die meisten Transformationen mittels Elektroporation durchgeführt, da hier laborintern eine höhere Transformationseffizienz berichtet worden war. In den später durchgeführten Transformationsexperimenten wurde in chemisch kompetente Zellen transformiert, da hierbei ein zeitaufwändiger Reinigungsschritt umgangen werden konnte und die Effizienz ausreichend war. Bei der Transformation in chemisch kompetente Bakterien war ein vorhergehendes Aufreinigen der Ansätze mit einer Phenol/Chloroform-Extraktion nicht notwendig.

#### 4.2.9 Expression

Als Expressionsvektor wurde pQE30 verwendet, der bei der Expression noch ein 6-His-tag an die Konstrukte anhängt. Zur Expressionsinduktion wurde Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid (IPTG) verwendet. IPTG bindet an das Lac Repressor Protein (Lac-R), das wiederum an den Expressionsvektor pQE30 gebunden ist und die Transkription durch Verdecken der Promotorregion verhindert. IPTG führt durch eine Konformationsänderung von Lac-R zur Dissoziation von der Promotorregion [14, 94, 152]. Im Gegensatz zu dem physiologischen Bindungspartner 1,6-Allolaktose wird IPTG nicht abgebaut, sodass der Suppressor Lac-R dauerhaft von der DNA dissoziiert ist. Nach der Bindung des Promotors beginnt die Transkription der DNA.

Die Expression erfolgte in den speziellen Expressionsstämmen M15 [pREP4] und SG13009 [pREP4] [96]. Diese beiden Stämme stammen beide von *E.coli* K12 ab und haben den Phänotyp  $\text{Nal}^S$ ,  $\text{Str}^S$ ,  $\text{Rif}^S$ ,  $\text{Thi}^-$ ,  $\text{Lac}^-$ ,  $\text{Ara}^+$ ,  $\text{Gal}^+$ ,  $\text{Mtl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{RecA}^+$ ,  $\text{Uvr}^+$ ,  $\text{Lon}^+$  [211]. Das Plasmid pREP4, das beide Stämme besitzen, enthält das Gen *lac 1* [75] und führt zu einer konstitutiven Expression des oben beschriebenen Lac-Suppressors Lac-R [211], womit eine starke Expressionssuppression der eingebrachten Expressionsvektoren wie pQE30 erreicht werden kann.

Die Expressionsexperimente mit den RhoA- und RhoC-Klonen ohne CAAX-Region in pQE30 waren zunächst nicht erfolgreich, wie bereits in 3.5 ausgeführt. Bei dem ersten Expressionsexperiment kam es zu keiner in den Blaugelen sichtbaren Expression. Diese Konstrukte waren nach Umklonierung in den Expressionsvektor pQE30 zunächst in den Klonierungsstamm DH5-alpha transformiert worden, ehe sie in den Expressionsstamm M15 umtransformiert wurden. Alle anderen Konstrukte, bei denen die Expression bereits im ersten Experiment erfolgreich war, waren sofort in den Expressionsstamm M15 transformiert worden. Nach einer erneuten Klonierung dieser beiden Konstrukte und der anschließenden Transformation in den Expressionsstamm M15 wurden auch diese Konstrukte ähnlich effizient wie die übrigen Konstrukte exprimiert. Der verminderten Expression lag also kein bakterielles Problem, wie eine Hemmung des Wachstums durch toxische oder den Zellstoffwechsel überlastende Produkte zu Grunde. Da die erneute Klonierung zudem mit denselben Vektor- und Insertpräparationen erfolgte wie bei den ursprünglichen Konstrukten, konnte ein Fehler in diesen Präparationen ausgeschlossen werden. Auch die Klonierung der PDZ-Konstrukte die sofort exprimierten, erfolgte in den gleichen Vektor.

Eine mögliche Erklärung für die Fehlinduktion könnte in der Transformation der Expressionskonstrukte in einen Klonierungsstamm statt in einen Expressionsstamm liegen. Der eigentlich für Klonierungsexperimente benutzte Stamm DH5-alpha ist nicht auf die gesteigerte Expression eines einzelnen, nicht bakteriellen Proteins, wie sie der pQE30-Expressionsvektor ermöglicht, vorbereitet. Die Expressionsstämme M15 und SG13009 besitzen, im Gegensatz zu DH5-alpha, das Plasmid pREP4, das den Expressionssuppressor Lac-R konstitutiv exprimiert. Dieser Suppressor bindet an die beiden Operatormodule des Expressionsvektors pQE30 und verhindert so die Bindung des Promotors, wodurch die Expression verhindert wird. Der Klonierungsstamm DH5-alpha besitzt dieses Plasmid nicht und kann deshalb diesen Suppressor nicht in dem Maße synthetisieren wie die Expressionsstämme. Der Klonierungsstamm DH5-alpha kann die Expression also nicht so gut unterdrücken wie ein Expressionsstamm. Die Folge ist die Überproduktion eines für das Bakterium nicht notwendigen Proteins. Da es jedoch zu einem Wachstum der Bakterien gekommen ist, allerdings ohne Expression des gewünschten Proteins, müssen diese Bakterien einen Weg gefunden haben, um die Expression zu unterdrücken. In den sequenzierten Konstrukten die keine Expression zeigten, war die Promotorregion des Expressionsvektors pQE30 verändert. Die eigentliche Bindungsstelle für den Promotor war aus dem Konstrukt deletiert und nur die -35-Bindungsstelle und die erste Base der -10-Bindungsstelle waren noch vorhanden, was die Verringerung der Expression durch eine fehlende oder herabgesetzte Promotorbindung erklären könnte [114, 211]. Für diese Verringerung wäre also kein Suppressor notwendig. Bei der Transformation des Expressionsvektors pQE30 in den Klonierungsstamm DH5-alpha könnte es also passiert sein, dass dieser Stamm auf pQE30-Plasmide selektionierte, die expressionsdefizient waren. Da diese Mutation zudem bei allen fraglichen klonierten Konstrukten an derselben Stelle auftrat, ist dies eine mögliche Erklärung für den systematischen Fehler, der durch die erneute modifizierte Transformation erfolgreich vermeiden werden konnte.

### 4.3 Diskussion der Overlay- Assay- Ergebnisse

Die hergestellten Konstrukte wurden in weiterführenden Experimenten auf ihre Funktionstüchtigkeit untersucht. Deshalb wurden von unserem Kooperationspartner Hendrik Weiner in der Proteinstrukturfabrik einige „Overlay-Assay“-Experimente mit den Konstrukten ohne CAAX-Domäne durchgeführt. Dabei konnten sowohl die Funktionstüchtigkeit dieser Konstrukte gezeigt, als auch interessante potentielle Interaktionspartner der „Rekrutierungsdomäne“ von RhoA und RhoC gefunden werden, die hier diskutiert werden sollen.

Da diese Experimente vom Kooperationspartner nur einmal durchgeführt wurden und bisher nicht auf anderem Wege verifiziert worden sind, kann dieses Experiment nur als Screening betrachtet werden, dessen Ergebnisse in weiteren Experimenten bestätigt werden müssen. Einige dieser Interaktionen sind allerdings mehrfach während des Experiments gefunden worden, was bereits eine Kontrolle darstellt, da diese Interaktionen offenbar reproduzierbar sind. Hierzu zählen die Pyruvatkinase, der Elongationsfaktor 1-alpha-1 sowie Gamma-Aktin und Tubulin alpha 1.

Eine Liste aller in dieser Arbeit gefundenen potentiellen Bindungspartner, eingeteilt nach Zellkompartiment oder Funktionsweise, findet sich in Tab. 54 bis Tab. 62 (Seite 76 bis Seite 82).

Wenn die Liste der in den „Overlay-Assays“ gefundenen Interaktionspartner mit bereits vorher bekannten Rho-Interaktionspartnern (Tab. 64, Seite 93) verglichen wird, fällt auf, dass es keine Übereinstimmung gibt. Allerdings sind die aufgelisteten, bisher untersuchten Rho-Interaktionen, immer mit den vollständigen Rho-Proteinen untersucht worden, während in der vorliegenden Untersuchung nur die C-terminale polybasische „Rekrutierungsdomäne“ für die Interaktionsuntersuchung benutzt wurde. Bei den in Tab. 64 aufgelisteten Interaktionsproteinen handelt es sich also um Proteine, die mit den aktiven „Switch-Domänen“ der Rho-Proteine interagieren und vermutlich nicht mit der „Rekrutierungsdomäne“ [22, 294].

**Tab. 64** In der Literatur beschriebene Interaktionen der Rho-Isoformen. Die hier dargestellten Interaktionspartner sind allerdings mit den vollständigen Rho-Proteinen gesucht worden, nicht mit der „Rekrutierungsdomäne“ (Adaptiert nach [294] und [22]).

	Proteinart	Funktion	RhoA	RhoC
Rho-Kinase ROCK	Ser/Thr Kinase	Aktin/Myosin Interaktion	++	+++
mDia / Formin	Zellgerüstprotein		++	++
PRK1/2 PKN	Ser/Thr Kinasen		++	++
Rhoteckin	Zellgerüstprotein		+++	+++
Rhophilin	Zellgerüstprotein		+++	++
Kinectin	Zellgerüstprotein		+++	?
Citron Kinase	Ser/Thr Kinase	Zytokinese	++	+++
MBS	Phosphatasen- Untereinheit	MLC Inaktivierung	+++	?
p76 RBE			+	?
PKC epsilon			++	+++
DBI transcription			+	?

factor				
PLD	Lipase	Reguliert über Saure Phosphatase Level Exozytose, Endozytose und Zytoskelett-Reorganisationen [201]		

+ = mäßige Interaktion, ++ = moderate Interaktion, +++ = starke Interaktion, ? = unbekannt.

Auffällig an der dargestellten Tab. 64 ist auch die nur graduelle Differenzierung der Funktionen von RhoA und RhoC. Bei vielen Interaktionen gibt es keine Unterscheidung zwischen den beiden, da sie beide gleich gut binden oder wirken. Bei einigen der aufgelisteten Interaktionspartner ist zudem gar nicht klar, mit welcher Rho-Isoform die Interaktion stattfand. Diese nur geringen Unterschiede im Interaktionsverhalten könnten mit den geringen Unterschieden in den aktiven Domänen zusammenhängen, die eine Unterscheidung zwischen den beiden Isoformen aufgrund ihres aktiven Zentrums nicht sinnvoll möglich macht. Stattdessen wäre es möglich, dass sich diese beiden Rho-GTPasen vor allem durch ihre Lokalisation innerhalb der Zelle unterscheiden und so distinkte Aufgaben erfüllen. Die Lokalisation innerhalb der Zelle könnte von der „Rekrutierungsdomäne“ festgelegt werden.

Bei den in dieser Arbeit gefundenen Interaktionspartnern lässt sich so eine Unterscheidung nach Wirkort bzw. Zellkompartiment treffen. Eine Vielzahl von RhoA Interaktionspartnern ist eher Zytoskelett- und Membran-assoziiert, während die RhoC Interaktionspartner eher zytosolisch zu finden sind oder funktionell dem Zellstoffwechsel zugeordnet werden können (siehe auch Tab. 54 auf S.76 bis Tab. 63 auf S.82).

Zunächst sollen Interaktionspartner diskutiert werden, die sowohl mit RhoA als auch mit RhoC interagieren, danach solche die mit einem der Beiden eine Bindung eingehen.

#### 4.3.1 Interaktionspartner von RhoA und RhoC

**Elongationsfaktor 1-alpha 1 (EF-Tu, eEF1A):** Eine Interaktion dieses Elongationsfaktors, der bei der Peptidkettenverlängerung am Ribosom eine zentrale Rolle spielt, mit einem der Rho-Proteine, ist bisher nicht beschrieben. Da eine Regulation der Transkription durch Rho-Proteine bekannt ist, erscheint eine Regulation auf Translationsebene ebenso möglich [179]. Für den bakteriellen Elongationsfaktor EF-Tu, der zugleich eine GTPase-Funktion hat, ist zudem eine strukturelle Rolle beim Zytoskelettaufbau beschrieben [171]. Für EF1A ist eine Interaktion mit dem Aktin-Zytoskelett bereits beschrieben, das einer zeitlichen und örtlichen Aufteilung der Translation dienen könnte. RhoA und RhoC könnten hier eine Rolle bei der örtlichen Aufteilung einnehmen und die Assoziation des Transkriptionsfaktors mit dem Zytoskelett regulieren [86, 245, 301].

**Gamma-Aktin:** G-Aktin, die monomere Form von Gamma-Aktin, reguliert den Transkriptionsfaktor SRF (bei Absinken der G-Aktinkonzentration kommt es zur Freigabe von sonst gebundenem Faktor MRTF, der SRF aktiviert). In dieser Kaskade scheint auch Rho eine

Rolle zu spielen, da es, über einen sinkenden G-Aktinspiegel, ebenfalls zur Aktivierung von MRTF führt [146]. Zudem ist Gamma-Aktin auch als Polymer an der Bildung von Filamenten beteiligt, besonders von Stressfasern [240]. Hier ist eine interessante Interaktion mit den beiden Rho-Molekülen gegeben, da bisher keine direkte Interaktion mit Aktin, sondern nur eine Kontrollfunktion bei der Stressfaserbildung beschrieben wurde [216]. Dass beide Rho-Moleküle eventuell an Gamma-Aktin binden, würde auch die Hypothese untermauern, dass sich RhoA und RhoC in ihrer Funktion nur wenig unterscheiden, die mit der Regulation von Filamentfasern zusammenhängt. RhoA und RhoC erfüllen vor allem durch ihre unterschiedliche Lokalisation in der Zelle unterscheidbare Aufgaben.

**Tubulin alpha-1 und Tubulin beta-2 chain:** Die aus Tubulinen gebildeten Mikrotubuli formen das Grundgerüst einer Zelle und sind für Zellstabilität, intrazelluläre Mobilität sowie eine Vielzahl anderer Funktionen verantwortlich. Eine direkte Interaktion mit Rho-GTPasen ist für Tubulin bisher noch nicht beschrieben, obwohl eine regulatorische Funktion der Rho-GTPasen bei Mikrotubuliauf- und -abbau bekannt ist [125]. Die Rolle der Rho-Bindung könnte hier, wie bei den Gamma-Aktinfasern, mit Regulationsprozessen im Zytoskelett zusammenhängen. Bei beiden Molekülen fällt bei Betrachtung der Aminosäuresequenz auf, dass sie eine stark saure Domäne (mehrere Glutaminsäuren) an ihrem C-Terminus beinhalten, die einerseits eine plausible *in-vivo* Interaktionsmöglichkeit bietet, andererseits aber auch für eine unspezifische Reaktion mit der polybasischen Region verantwortlich sein könnte.

**Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GADPH):** GADPH ist ein Enzym im Glucosestoffwechsel. Es katalysiert den ersten von zwei energieliefernden Schritten in der Glykolyse und ist für die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat in 1,3-Bisphosphoglycerat +NADH+H<sup>+</sup> verantwortlich. Die Funktion von GADPH beschränkt sich aber nicht nur auf diese enzymatische Funktion. Es spielt auch eine Rolle beim Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum, bei dem seine enzymatische, glykolytische Funktion nicht notwendig ist wozu GADPH an Tubulinfilamente bindet [69, 250, 266]. Interessanterweise wird GADPH hierbei von der Rho-GTPase Rab2 gebunden, wobei hier die Interaktion mit der aktiven „Switch-Domäne“ stattfindet [266]. Eine Interaktion mit Rho ist hier also plausibel und würde, wenn die Funktion der von Rab2 ähneln sollte, ein ganz neues Spektrum an RhoA/C-Funktionen im Rahmen des Vesikeltransportes beschreiben, die bisher nicht bekannt sind.

#### 4.3.2 Interaktionspartner von RhoA, aber nicht RhoC

Für die Shigelleninvasion am bedeutendsten erscheinen die Membran- und membranassoziierten Proteine, die auch die größte Gruppe der nach Zellkompartiment aufgeteilten, in dieser Arbeit gefundenen Interaktionspartner von RhoA bilden. Der auffälligste Vertreter diese Gruppe ist **Annexin A6**, ein Aktin-Interaktionspartner, der an Membran-Rafts bindet und in Membran-Ruffles zu finden ist.

Annexine umfassen eine Familie von bimodularen, kalziumbindenden Proteinen, die kalziumabhängig mit Phospholipiden interagieren und an der zytosolischen Membranseite zu finden sind [88]. Die Membraninteraktion wird von der Annexin-Core-Domäne vermittelt, einer Kalzium und Lipide bindenden Domäne, die aus vier oder acht homologen Segmenten besteht. Das zweite wichtige Modul der Annexine ist eine N-terminale Domäne, die eine in Länge und Sequenz hochvariable Region darstellt und für die einzelnen Annexine spezifisch ist. Diese N-terminale Sequenz kann ein Bindungsort für zelluläre Proteinliganden sein und auch eine Rolle beim interzellulären membranösen Targeting der einzelnen Annexine spielen. Zielmembranen für dieses Targeting sind die Plasmamembran sowie die Membranen des endosomalen und sekretorischen Apparates [55, 88, 98, 213].

Annexine spielen bei der Infektion von Enteropathogenen *Escherichia coli* (EPEC) eine Rolle. EPEC benutzt ein spezielles Sekretionssystem, um sekretorische Proteine (*E.coli*- secreted proteins / Esps) in die Wirtszelle zu transportieren. Darunter findet sich auch ein Rezeptor für ein Membranprotein der äußeren Membran von EPEC, der Translozierte Intimin Rezeptor (Tir). Tir ist jedoch nicht nur für die Anheftung von EPEC an die Wirtszelle zuständig, sondern rekrutiert auch verschiedene Zytoskelett-Regulatoren, unter anderem  $\alpha$ -Actinin, Ezrin, Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) und Actin related protein 2 und 3 (ARP2/3), die auch bei der Shigelleninvasion zu finden sind [91]. Eines der Annexine, Annexin 2, wird ebenfalls in diesen Komplex rekrutiert und bindet an ein cholesterinreiches Raft, das ebenfalls bei der Shigelleninvasion vorhanden ist [314]. Dieses Rekrutierungsmuster führt zur Bildung von aktinreichen, blütenblätterartigen Strukturen unter den angehefteten EPEC [81, 93].

Annexin 6 könnte bei der Shigelleninvasion eine ähnliche Rolle übernehmen wie Annexin 2 bei EPEC, also als eine Art Lipidanker für den Invasions-Proteinkomplex wirken. Die Bindung von RhoA an dieses Molekül, möglicherweise an der N-terminalen Domäne, wäre zudem mit der Zytoskelett-regulierenden Funktion von Rho gut zu vereinbaren und könnte zum Teil die differentielle Rekrutierung erklären, da nur RhoA Annexin 6 bindet, nicht aber RhoC. Dies würde bedeuten, dass der an Annexin 6 entstehende Komplex die Bildung der unter dem Bakterium befindlichen Blütenkonformation fördert, wohin RhoA rekrutiert wird, während RhoC an anderer Stelle zu einem späteren Zeitpunkt rekrutiert wird, eventuell von einem anderen Annexin.

Eine weitere interessante membranassoziierte Proteingruppe, mit der RhoA nach den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen interagieren könnte, sind die Golgine. RhoA interagiert möglicherweise mit **Golgin 245**.

Golgine sind membranassoziierte „tethering“-Moleküle, die für das Anheften und den Transport von Vesikeln innerhalb des Golgi-Apparates oder von und zum Golgi-Apparat wichtig sind. Sie haben eine GRIP-Domäne am C-Terminus, die nötig und hinreichend ist für das Andocken an das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Das TGN ist ein hochdynamisches und komplexes Netzwerk, das beim Sortieren und Verteilen von Proteinen eine wichtige Rolle spielt. TGN-assoziierte



Proteine werden in eine Vielzahl unterschiedlicher Vesikel verteilt und zu ihrem jeweiligen Bestimmungsort geschickt. Die genauen Mechanismen, die diese komplexe Funktion ermöglichen und Faktoren, die zu dieser dynamischen Stabilität befähigen, sind bisher nur wenig bekannt. Eine wichtige Rolle spielen dabei die Golgine [157-159].

Golgin 245 gehört zu einer Familie von Golgi Proteinen, die eine sog. „Coiled-Coil“ Struktur besitzen und denen eine C-terminale Protein-Protein-Interaktionsdomäne (GRIP-Domäne) gemeinsam ist. Für Golgin 245 wurde eine Rekrutierung zu einer Subdomäne des TGN gezeigt, die hochdynamische tubulovesikuläre Ausstülpungen bildet, die Charakteristika von Transportvesikeln haben [34, 90].

RhoA könnte in diesen Prozessen eine Rolle bei der Organisation, der Adressierung oder bei der Stabilitätsvermittlung spielen. Die Interaktion von Rab6, einer anderen Rho-GTPase, mit Golgin 245 wurde beschrieben, wobei dieses Zusammenspiel für das Aneinanderheften von Vesikelmembran und Golgimembran eine Rolle zu spielen scheint [13].

Auch mit der GTPase Arl1 ist eine Golgin 245-Interaktion beschrieben, wobei hier die Switch II-Region von Arl1 für die Interaktion notwendig zu sein scheint [157].

Zudem wurde indirekt eine Funktion von Golgin 245 für die Distribution und Struktur des Golgi-Apparates in der Zelle gefunden. Bei Depletion von Golgin 245 bildeten sich in der Peripherie Mini-Stapel aus Golgimaterial, die Stapel ähnelten, die sich bilden, wenn der Microtubuli-Apparat gestört ist. Der Transport erfolgt nicht mehr entlang der Microtubuli zum Tubuli-Bildungszentrum [308].

An dieser Stelle könnte der Transport von RhoA beeinflusst werden, da RhoA eine Interaktionsstelle zwischen den Vesikeln mit angeheftetem Golgin 245 und den Microtubuli bilden könnte. Es könnte aber auch als Adressmolekül fungieren und den Zielort eines Vesikels festlegen. Auf der anderen Seite ist auch eine Funktion von RhoA ähnlich der von Rab6 vorstellbar, also Anheften von Vesikelmembranen an Golgimembranen.

Auch bei der in dieser Arbeit gefundenen Interaktion von RhoA mit dem „**Calcium-dependent Activator Protein for Secretion isoform 1**“ (**CAPS 1**) könnte die oben erwähnte Funktion von RhoA als Adressierungsprotein eine Rolle spielen. CAPS 1 ist ein 145 kDa großes, Kalzium-abhängiges, fast ausschließlich zerebral vorkommendes Protein, das bei der Exozytose von „Large Dense Core Vesikel“ (LDCV) eine Rolle spielt. LDCV sind für die Peptid/Neuromodulator-Sekretion und die Neurotransmitter-Sekretion (evtl. von Glutamat) wichtig. CAPS 1 besitzt eine zentrale Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne zur Bindung an saure Phospholipide, eine Munc-Homologie (MH) -Domäne unbekannter Funktion, die auch in der Gruppe der die Vesikelreifung fördernden Munc-Proteine zu finden ist, sowie eine C-terminale Domäne zur LDCV-Bindung. Intrazellulär kommt CAPS 1 größtenteils gelöst im Zytoplasma oder vesikulär gebunden vor, ein kleiner Teil ist an synaptische Membranen gebunden. Der

zytosolische Pool von CAPS 1 ist bei der Auftrennung mit der Zentrifuge vor allem in der synaptischen Fraktion zu finden [253, 254].

CAPS 1 übernimmt bei der kalziumabhängigen Vesikelfusion eine Funktion, da diese bei Gabe von CAPS Antikörpern inhibiert ist [10]. In diesem Zusammenhang könnte CAPS als Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat [PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>]-Bindeprotein wirken, wie bereits beschrieben [156].

Eine Funktion von RhoA in diesem Zusammenhang könnte in der Regulation der Aktivität von CAPS 1 liegen, wie sie schon für Rab3 in der Regulation von VMAT 1, einem Katecholamintransporter beschrieben worden ist, das über eine Kinase die Flussgeschwindigkeit von VMAT 1 reguliert [4]. Andererseits könnte RhoA mit CAPS 1 an die Vesikelmembran rekrutieren und dort bei der Fusion von Vesikel und Plasmamembran eine Rolle bei den notwendigen Zytoskeletalterationen vor und während der Fusion spielen.

Ein anderes Protein von Interesse ist der „**Proactivator polypeptide Precursor**“, ein Glykoprotein-Precursor, der sich in vier Proteine (**Saposin A – D**) aufteilt. Diese sind in der Lysosomenmembran für den Sphingolipidabbau nötig. Bei Mutation eines dieser Proteine kommt es zu Lipidabbaustörungen, die sich in Erkrankungen wie der Globoidzelleukodystrophie, dem Morbus Krabbe oder dem Morbus Gaucher, einer Fettstoffwechselstörung mit Glukozerebrosidakkumulation, äußern. Der Precursor wird zudem sezerniert und kommt in Muttermilch, Samenflüssigkeit und Liquor vor. Er ist ein neurotroper und myelinotroper Faktor. Außerdem spielt er bei der Entwicklung der männlichen Reproduktionsorgane, der Spermatogenese und Befruchtung eine wichtige Rolle. Bei Fehlen dieses Proteins kommt es zur Sphingolipidakkumulation, v.a. zerebral und zu einem frühen Tod der Patienten [51]. Eine Interaktion mit RhoA erscheint in Zusammenhang mit diesem Enzym aus dem Lipidmetabolismus nicht unwahrscheinlich, da hier schon Regulationsfunktionen von Rho-Proteinen bekannt sind [125].

Ein sezerniertes und vor allem extrazellulär vorkommendes Protein, das als potentieller Interaktionspartner von RhoA gefunden wurde ist **SPARC (Secreted protein acidic and rich in cysteine)**, das auch Osteonectin (ON) oder „Basement membrane protein BM-40“ genannt wird. Dieses 43 kDa große extrazelluläre Matrixprotein hat eine Signalfunktion für die Interaktion zwischen der Extrazellulärmatrix (ECM) und der Zelle. Es besitzt zwei Kalziumbindungsstellen und ein Follistatin-ähnliches Modul. Dieses Glycoprotein kann als „Counteradhesive“ Fokaladhäsionen lösen, moduliert Wachstumsfaktoraktivitäten und inhibiert den Zellzyklus durch Arretierung in der G1-Phase. Außerdem ist es für die Linsentransparenz mitverantwortlich und bei Erwachsenen bei Wundheilung, Krebsmetastasen, Arthritis, Diabetes und Nierenerkrankungen erhöht [32, 79]. SPARC wird allerdings nicht nur sezerniert, sondern ist auch mit der Kernmatrix assoziiert [92]. Eine indirekte Interaktion von RhoA und SPARC ist bereits von Nguyen et. al. beschrieben worden, die eine Inhibition von RhoA in einem

Zellinvasionsmodell nach Kontakt der Zelle mit SPARC zeigten. Dieser Kontakt muss allerdings über die Zellmembran vermittelt werden und kann nicht durch eine direkte Interaktion erklärt werden, da SPARC sich extrazellulär befindet [191].

Da SPARC jedoch wie RhoA an der Modulierung von Fokaladhäsionen beteiligt ist, wäre eine Interaktion der beiden Proteine bei der Regulation der Fokaladhäsion denkbar, z.B. über die Steuerung der Sekretionsmenge oder des Sekretionsortes von SPARC [243].

Zudem ist eine Interaktion der beiden Proteine SPARC und RhoA im Kernskelett gut möglich.

Eine potentielle Interaktionsdomäne von SPARC mit RhoA wäre die saure N-terminale Domäne, die zur Kalzium-Bindung nötig ist. Diese Domäne wäre für eine Interaktion mit Bindungspartnern mit basischen Domänen, wie sie bei den Rho-Proteinen zu finden ist, geeignet. Eine ähnliche Interaktion ist bereits für Phospholipide mit polybasischen Domänen beschrieben worden [195].

Andere Proteine, die als potentielle Interaktionspartner von RhoA gefunden wurden, sind nicht oder nur indirekt membranassoziiert.

In diese Gruppe fällt „**Splicing factor 3B subunit 3**“ (**SAP130**), eine 130 kDa Untereinheit des Spliceosoms, die im Zellkern vorkommt und für die bisher keine Interaktion mit Rho-GTPasen beschrieben worden ist. Diese Interaktion ist insofern interessant, als RhoA bisher noch nicht mit intranukleären Funktionen in Verbindung gebracht worden ist. Splicing factor 3B ist ein ca. 450 kDa Protein, bestehend aus 7 Proteinen. Es ist Bestandteil der beiden bisher bekannten Spliceosomen und essentiell für den Splicevorgang. Zudem spielt SAP130 eine wichtige Rolle beim Zusammenbau des „Pre-Spliceosomes“ [58, 99]. Hier könnte RhoA in die Interaktion des Spliceosoms mit dem Kernaktin regulierend eingreifen und so möglicherweise die Lokalisation des Spliceosoms innerhalb des Kerns festlegen.

Die 130 kDa Untereinheit ist scheinbar die einzige Untereinheit ohne direkten mRNA-Kontakt [99], weshalb eine Interaktion von RhoA mit diesem Teil des Spliceosoms plausibel erscheint, zumal die Interaktion mit einem anderen Protein (STAGA für [SPT3-TAF(II)31-GCN5L-Acetylase]) ebenfalls für diese Untereinheit beschrieben ist [163].

Ein weiteres, mit RhoA in Verbindung tretendes Protein, ist die **Untereinheit HSPC021** des **Translations-Initiations-Faktor eIF3**. Dies ist der mit 700 kDa größte eukaryote Translations-Initiations-Faktor, der direkt an die 40S Ribosomenuntereinheit und das Anfangskodon aus Methionyl-tRNA bindet und so die wichtigsten zur Translation nötigen Faktoren zusammenbringt. Er interagiert mit anderen eIF (1, 4A, 4G-1, 5) die den Prä-Initiationskomplex bilden, erleichtert die Bindung der mRNA G-cap an eIF4G und scannt anschließend die mRNA nach dem Anfangskodon ab. Der humane eIF3 hat mehr Untereinheiten als der Hefen-eIF. Diese könnten für seine Regulation wichtig sein. Eine dieser Untereinheiten ist HSPC021, das

bei der Translations-Initiation selbst keine Rolle spielt, da diese auch ohne das Protein abläuft [182]. Im Translationskomplex bindet HSPC021 an Int-6 (auch Untereinheit e), ein Protein, dessen Gen ursprünglich als Insertionsstelle für das Maus-Mammatumortumor-Virus bekannt war, weshalb es für ein wachstumsregulierendes Gen gehalten wurde [11, 182], das im Translationskomplex aber eine regulatorische Funktion übernimmt. Int6 interagiert indirekt mit dem „nucleotide exchange Factor“ scd1, der die Rho-GTPase Cdc42 aktiviert [306]. In der Regulation dieser Untereinheiten, die für eine Feinregulation der Translation zuständig sind, könnte auch RhoA eine Funktion übernehmen, zumal eine Interaktion der Untereinheit Int6 bei Yersinien mit dem Mikrotubulinnetzwerk beschrieben ist. Auch in diesem Fall könnte RhoA durch lokalisationspezifische Aktivierung innerhalb der Zelle regulatorisch wirken [306].

#### 4.3.3 Interaktionspartner von RhoC, aber nicht RhoA

Im Weiteren sollen die wichtigen in dieser Studie gefundenen RhoC Interaktionspartner diskutiert werden. Hier fallen besonders die Kinasen und metabolisch wirkenden Proteine auf, mit denen RhoC interagiert. Membrangebundene Bindungspartner finden sich nicht unter den Interaktionspartnern der „Rekrutierungsdomäne“ von RhoC.

Die „**Mitogen-activated protein kinase 3**“ (MAPK3, auch ERK-1, MAPK 1, p44-ERK1, ERK2 oder p44-MAPK) ist eine bei der Mitose/Meiose regulatorisch tätige Kinase, die von G-Protein-Rezeptoren aktiviert wird und so bei der Signaltransduktion von extrazellulär nach intrazellulär eine wichtige Rolle spielt. Eine direkte Interaktion, allerdings von RhoA und eines Rho-Aktivators mit dem Amino-Terminus dieser Kinase, ist bereits beschrieben [83]. Diese Interaktion hängt allerdings, wie die bisher beschriebenen Interaktionen, mit der aktiven „Switch-Domäne“ von RhoA zusammen und nicht mit der „Rekrutierungsdomäne“. Ob eine Interaktion mit RhoC in diesem Fall möglich ist, wurde in der zitierten Arbeit nicht untersucht [83]. Da die Interaktion jedoch mit der „Switch-Region“ stattfand, die sich bei beiden GTPasen sehr ähnelt, ist dies gut möglich. Aber auch eine zusätzliche Interaktion von MAPK3 mit der „Rekrutierungsdomäne“ von RhoC ist vorstellbar. Um eine Aktivierung der MAPK zum richtigen Zeitpunkt zu ermöglichen, könnte RhoC mit seiner polybasischen „Rekrutierungsdomäne“ an MAPK3 binden und dann bei Bedarf durch den Rho-Aktivator eingeschaltet werden.

Ein weiterer interessanter Interaktionspartner von RhoC ist die **Fettsäure-Synthase (FAS Typ I)**. Diese ist bei Tieren ein Dimer aus zwei 272 kDa Untereinheiten, die jeweils sieben aktive Zentren zur Fettsäuresynthese aus Malonyl-CoA umfassen. Obwohl beide Untereinheiten dieses Proteins alle notwendigen aktiven Zentren zur Fettsäuresynthese enthalten, ist nur das Dimer katalytisch aktiv [12, 297]. An welches der aktiven Zentren RhoC bindet, ist den Overlay-Assay-Daten nicht zu entnehmen. Die Proteinstruktur von FAS wurde vor kurzem mit einer Auflösung von etwa 4,5 Å entschlüsselt [161]. Die Regulation von FAS wurde bisher vor allem

auf prätranslationaler Ebene erforscht. So führen hohe Fettsäurespiegel oder Glucagon zu einer Abnahme der Translation, während Nahrungsaufnahme nach Fasten, ebenso wie Insulin, zu einer Zunahme führt [239]. RhoC könnte also eine posttranslationale, regulatorische Funktion für FAS übernehmen, zum Beispiel eine Haltefunktion, die zu einer Aktivierung der Synthese bei Kontakt mit der Zellmembran führt, da eine Lipidproduktion in unmittelbarer Nähe einer Membran sehr sinnvoll erscheint. Eine Interaktion von RhoC und FAS ist auch wegen der erhöhten Konzentration beider Proteine in Brustkrebs-Tumorzellen möglich, die auf eine gegenseitige Beeinflussung zurückgeführt werden könnte [138, 239].

**Protein Phosphatase 1 regulatory subunit 10 (PP1)** ist eine Serin- und Threoninphosphatase, die der Wirkung von Proteinkinasen wie PKA und PKC entgegenwirkt und so eine wichtige regulatorische Funktion bei Glykogenmetabolismus, Kalziumtransport, Muskelkontraktion, Proteinsynthese, intrazellulärem Transport und Mitose erfüllt [6, 293].

Die PP1 Untereinheit 10, an die RhoC bindet, ist homolog zu der bei Ratten gefundenen PNUTS Untereinheit, einem von mehreren PP1-Bindeproteinen, die die intrazelluläre Lokalisation von PP1 bestimmen. PNUTS ist für die Kernlokalisierung zuständig und besitzt eine C-terminale RNA-Bindungsstelle aus RGG-Boxen und eine Histidin/Glycin-reiche Domäne, mit der es eine Kernfunktion von PP1 vermitteln könnte [6, 135]. Die Bindung an PP1 erfolgt über ein „RVXF-Motiv“ der Untereinheit [6, 145, 147]. Andererseits kann PP1 von dieser Untereinheit inhibiert werden. [135].

Die PP1 Untereinheiten sind für Interaktionen mit anderen Proteinen notwendig und ermöglichen der PP1 in verschiedene Kaskaden regulatorisch einzugreifen [115]. In diesem Zusammenhang erscheint eine Interaktion von RhoC mit dieser Untereinheit plausibel, um die Zytoskelett-Funktionen von PP1 zu regulieren, ähnlich wie es für die Regulation von MAPK3, ROCK oder PRK1/2 durch Rho beschrieben worden ist. [83].

Als letztes soll auf die Funktion des potentiellen RhoC-Interaktionspartners **Histon-Deacetylase 3 (HDAC3)** eingegangen werden. HDAC3 gehört zur Klasse I der Histondeacetylasen. Es ist ein 49 kDa Protein, das sich sowohl im Kern als auch im Cytoplasma (dort assoziiert mit z.B. HSP70) findet und die Genexpression durch Deacetylierung der Lysinreste von Histonen und Nicht-histonproteinen steuert. HDAC3 besitzt eine C-terminale Kernlokalisations-Sequenz und eine zentral gelegene Kernexport-Sequenz [304]. Es bildet zudem Di- und Trimere, deren Bindung über den N-Terminus erfolgt [160].

Von HDAC3 sind eine Vielzahl von Interaktionspartnern bekannt, bisher jedoch keine aus der Rho-Familie. HDAC3 bindet an Nicht-Histon-Proteine, wie das in dieser Arbeit als putativer RhoA Interaktionspartner gefundene „Heat Shock Protein 70“ [130], an andere HDAC der Klasse II, an die Protein Phosphatase 4 [312] und an MAP-Kinase 11 [160]. Zudem ist HDAC3

an der Regulation einiger Transkriptionsfaktoren wie einer NF- $\kappa$ B-Untereinheit (RelA), GATA2, und TFII-I beteiligt [202, 291].

Eine indirekte Interaktion von HDAC5, einem anderen Klasse I HDAC, mit RhoA und RhoC ist beschrieben worden, wobei dies nur in einem Screening gefunden wurde [45]. Eine weitere Interaktion ist von HDAC6, einer Tubulin-Deacetylase, mit dem Rho-Effektor mDia beschrieben. mDia und HDAC6 wurden in diesen Experimenten kopräzipitiert, wobei gezeigt wurde, dass vor allem die Deacetylase-Domänen von HDAC6 für die Interaktion mit mDia wichtig sind [61].

Die Interaktion von RhoC mit HDAC3 könnte bei verschiedenen Kernprozessen eine Rolle spielen, zumal RhoC auch eine Nukleäre-Lokalisations-Sequenz besitzt (AS 185-188) [295]. Es könnte bei der Interaktion von HDAC3 mit den Histonen eine Verbindung zum Kernaktin herstellen und so eine genaue Lokalisation der Genexpression innerhalb des Kerns ermöglichen. Da HDAC3 auch zytosolisch vorkommt, könnte RhoC auch bei der lokalisationsabhängigen Aktivierung der Deacetylase eine Funktion übernehmen.

#### 4.3.4 Zusammenfassende Beurteilung

Die gefundenen potentiellen Interaktionspartner lassen sich, wie in Tab. 54 auf S.76 bis Tab. 63 auf S.82 dargestellt, in unterschiedliche Gruppen aufteilen. Dabei lassen sich einige bekannte Funktionen von Rho bestätigen: Die Interaktion mit Annexin A6, Gamma-Aktin, den Tubulinen, der MAP-Kinase3, dem Saposin-Precursor und der Fettsäure-Synthase im weiteren Sinn fallen in diese Gruppe. Auch wenn für keines dieser Proteine bisher eine Interaktion mit RhoA oder RhoC beschrieben wurde, passen sie in das bisher bekannte Interaktionsmuster von Rho. Dies umfasst vor allem Zytoskelett-assoziierte Interaktionen bei Morphogenese, Aktin-Regulation und Zellmigration, also strukturelle Prozesse, die mit dem Zytoskelett zusammenhängen sowie Funktionen im Lipidmetabolismus und der indirekten Genexpressionskontrolle [125]. Die direkte Bindung, vor allem von RhoC, an Enzyme wie Proteinphosphatase1, Serin/Threonin Protein-Phosphatase 2A oder die Pyruvat-Kinase ist bisher nicht beschrieben. Allerdings ist für RhoA die Interaktion mit MAPK3 beschrieben und auch die Regulation von anderen Kinasen durch Rho, vor allem aus dem Lipidmetabolismus ist bekannt.

Andere potentielle Interaktionspartner dagegen erfüllen Funktionen, die bisher nicht mit Rho in Zusammenhang gebracht wurden. CAPS1, Golgin 245, SPARC und GAPDH sind Interaktionspartner die mit Vesikeltransport im weiteren Sinne zu tun haben und daher eher in die Domäne der Rab-GTPasen fallen oder als Interaktionspartner von Rab bekannt sind. Interaktionspartner wie die Splicingfaktor-Untereinheit oder die Histon-Deacetylase sind kernassoziierte Proteine, bei denen eher eine Assoziation mit den für den Kerntransport zuständigen Ran-GTPasen erwartet worden wäre. Bei diesen Proteinen könnten RhoA und RhoC einerseits als „Backups“ für die eigentlich zuständigen GTPasen wirken, andererseits ist auch eine parallele Funktion denkbar, um eine genaue Abstimmung und Regulation

gewährleisten zu können.

Aber auch bisher nicht mit der Familie der Rho-GTPasen in Verbindung gebrachte Interaktionen und Funktionen finden sich unter den Interaktionspartnern. So ist die Interaktion mit dem Translations-Initiationsfaktor eIF3, den ribosomalen Proteinen (60S-Ribosomales Protein L11, 60S-Ribosomales Protein P0) oder mit mitochondrialen Proteinen (Mitofusin, Mitochondriales-ribosomales Protein S23) keiner der bisher bekannten Rho-Funktionen zuzuordnen und bisher auch nicht beschrieben.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass das durchgeführte Overlay-Screening Interaktionen von Rho gefunden hat, die

- bekannte Partner bestätigen
- neue Partner gefunden haben, die allerdings bereits von der Interaktion mit anderen GTPasen bekannt waren
- neue Partner möglich erscheinen lassen, die bisher nicht mit GTPasen in Verbindung gebracht wurden.

Die zu bestätigenden Befunde erweitern das Spektrum der möglichen Rho-Wirkungen erheblich und weisen Rho eine bedeutsame Rolle in der Regulation einer Vielzahl von Zellfunktionen zu, eine Rolle, die weit über den ursprünglichen Ansatz, Aufklärung der Invasion von *Shigella* in menschliche Darmzellen, hinausgeht und allgemeine Bedeutung für die molekulare Zytologie hat.

Aus den unterschiedlichen Interaktionspartnern, die sich RhoA und RhoC nicht teilen, sind die RhoA-Partner eher Zytoskelett- und Membran-assoziiert, während die RhoC Interaktionspartner eher zytosolisch bzw. nukleär oder perinukleär zu finden sind oder funktionell dem Zellstoffwechsel zugeordnet werden können. Dies korreliert mit mikroskopischen Befunden laut denen RhoA vor allem an der Zellmembran und im Zytoplasma zu finden ist und RhoC eher perinukleär vorkommt [292].

Bei den gemeinsamen Interaktionspartnern dagegen fällt auf, dass drei von vier selber eine GTPase-Funktion besitzen, sodass eine gegenseitige Beeinflussung zur Regulation möglich ist. Zudem erscheint eine Interaktion mit beiden Rho-GTPasen aufgrund des ubiquitären Vorkommens (GAPDH) oder der Zytoskelettassoziation (Gamma-Aktin, Tubulin alpha-1 und Tubulin beta-2 chain) möglich und sinnvoll.

Die gefundenen Interaktionspartner müssen in einem nächsten Schritt mit anderen Interaktionsassays verifiziert werden. Hierzu bieten sich die schon genannten Methoden „Two-Hybrid-Screen“, „Phage-Display“, „Pulldown-Assay“, „Isothermal Titration Calorimetry“, „Surface Plasmon Resonance“, Immunopräzipitation oder Mutationsexperimente an. Zwei Methoden sollen aufgrund ihrer universellen Einsetzbarkeit bei der Interaktionssuche, auch mit membran- und lipidassoziierten Molekülen, hier kurz vorgestellt werden.

Die „surface plasmon resonance“ (SPR) ist eine Methode, bei der die Eigenschaften von oberflächlichen elektromagnetischen Wellen genutzt werden, um die Bindung von Biomolekülen an einen SPR-Kristall festzustellen. Dazu werden ein bekanntes Protein oder eine Lipidmembran auf der Oberfläche des SPR-Kristalls immobilisiert. Mit Hilfe eines Mikroflusssystems kann eine Lösung mit dem zweiten potentiellen Bindungspartner (ein Protein oder ein Lipid) über den Kristall fließen und binden. Bei Bindung verändert sich das SPR-Signal. Anschließend wird eine Lösung ohne Bindungspartner appliziert, wodurch die Bindung getrennt wird und sich das Signal erneut ändert. Aus der Assoziations- und der Dissoziations-Geschwindigkeit kann nun die Bindungskonstante der beiden Bindungspartner berechnet werden [7, 244, 256, 296].

Bei der „Isothermal Titration Calorimetry“ (ITC) wird die bei einer Proteininteraktion freiwerdende oder verbrauchte Energie gemessen. Dies wird über eine puffergefüllte ITC-Zelle erreicht, die eine bestimmte Temperatur hat und in der sich eines der zu untersuchenden Proteine befindet. Dann wird das zweite Protein der Zelle zugefügt. Die bei der Bindung der beiden Proteine abgegebene oder verbrauchte Energie wird von der Zelle gemessen, indem sie die benötigte Wärmeenergie misst, die gebraucht wird, um die Zelle auf derselben Temperatur zu halten. Der Vorteil dieses Systems ist seine Unabhängigkeit von der Funktion des Proteins in der Zelle bzw. dessen Kompartimentierung und es kommt ohne Markierungen der Proteine aus. Zudem können Interaktionen von Proteinen mit Lipidmembranen untersucht werden, die für membranassoziierte Proteine wie die Rho-GTPasen wichtig sind [50, 206, 313].

Während der in den Versuchen dieser Arbeit verwandte Overlay-Assay eine große Fülle von Interaktionen aufspüren kann, sind die beiden vorgestellten Alternativen SPR und ITC Bindungspartnerspezifisch, d.h. sie können einen der vielen im Overlay-Assay gefundenen Partner spezifisch bestätigen oder unwahrscheinlich machen.

#### **4.4 Ausblick**

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit dem „Overlay-Assay“ eine interessante Vielfalt von möglichen Interaktionspartnern gefunden wurde, die bekannte Funktionen von RhoA und RhoC bestätigen, aber auch über das bisher bekannte Spektrum hinausreichende mögliche Funktionen dieser beiden GTPasen beschreiben.

In weiterführenden Experimenten müssten diese gefundenen Interaktionspartner bestätigt werden. Hierzu kann das breite Spektrum der Protein-Interaktions-Assays angewandt werden. Andererseits können, da die Konstrukte in klonierter Form und alle Proteine in leicht aufzureinigender Form vorliegen, Mutationsassays oder NMR-Strukturanalysen durchgeführt werden, um Interaktionsbereiche oder -sequenzen der polybasischen Region zu finden und zu charakterisieren. Diese Interaktionsbereiche könnten dann eventuell auch auf andere, bei den Rho-GTPasen vorkommende polybasische Regionen, übertragen werden.



Bei der Shigellen-Invasion scheinen die Rho-Isoformen A und C an verschiedenen Orten des Invasionskomplexes ihre jeweiligen Funktionen zu erfüllen. Da sie sich in ihren aktiven Zentren, den Switch-Regionen, kaum unterscheiden, wird diese Funktion bei beiden ähnlich oder sogar gleich sein. Aufgrund der unterschiedlichen polybasischen Regionen können sie diese ähnliche Funktion aber an verschiedenen Orten der Zelle und mit unterschiedlichen Interaktionspartnern erfüllen. So ist eine örtlich und möglicherweise auch zeitlich getrennte Wirkung der Rho-GTPasen gut denkbar. RhoA ist also zusammen mit Cdc42 und Rac an einem Ort der Zelle für Zytoskeletalterationen nötig, die RhoC mit anderen Interaktionspartnern an einem anderen Ort und möglicherweise auch zu einem anderen Zeitpunkt ermöglicht. Um diese unterschiedlichen Orte auseinander halten zu können und gleichzeitig aber die gleichen Rho-Funktionen vermitteln zu können, sind die Unterschiede in der polybasischen „Rekrutierungsdomäne“ der Rho-GTPasen notwendig.

Auch potentielle klinische Anwendungen der gefundenen Interaktionspartner lassen sich ausmachen. Ein Teil der RhoC-Interaktionspartner (v.a. die Kinasen) könnte als Ansatzpunkt für die Tumorforschung und –therapie von Bedeutung sein. Da RhoC bereits bei mehreren Tumoren als Aggressivitätsmarker gefunden wurde, könnten Interaktionspartner von RhoC die tumorauslösend oder –fördernd wirken als neue, eventuell genauere Marker dienen oder sogar als spezifische Ansatzstellen für eine Tumorthherapie dienen, wie es für Farnesyltransferase-Inhibitoren schon vorgeschlagen wurde [138].

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen der Aufklärung der Pathogenese zellinvasiver Erreger wie *Shigella* fand man einen Phagozytose-ähnlichen Prozess. Bei diesem kommt es zu einer charakteristischen Reorganisation des Zytoskeletts der Zelle mit Ausbildung von blütenartigen Membranstrukturen an der bakteriellen Eintrittsstelle. Zum Abschluss der Invasion konfluieren diese Membranstrukturen über *Shigella* und internalisieren das Bakterium, ohne es dabei abzutöten.

Als wichtige Glieder einer dafür notwendigen bakteriell induzierten zellulären Signalkaskade erwiesen sich die kleinen G-Proteine RhoA und RhoC, die an den bakteriellen Invasionslocus rekrutiert werden. Trotz der hohen Sequenzhomologie dieser beiden Rho-Isoformen untereinander (85 %) gibt es unterschiedliche Isoform spezifische Rekrutierungsmuster: RhoA akkumuliert vorwiegend an die Basis der bakteriellen Eintrittsstelle während RhoC in die bakterieninduzierten zellulären Protrusionen rekrutiert wird, die sich über dem Bakterium schließen, wodurch es in die Zelle aufgenommen wird.

In Vorexperimenten konnte gezeigt werden, dass die allen Rho-GTPasen gemeinsame C-terminale CAAX-Region (C = Cystein, A = aliphatische Aminosäure, X = beliebige AS) eine wesentliche Voraussetzung für die Rekrutierung von RhoA und RhoC darstellt, da eine Deletion die Rekrutierung verhinderte. Am bedeutsamsten für die differentielle Rekrutierung der Isoenzyme ist jedoch die polybasische, prä-terminale Region der GTPasen, die in dieser Arbeit so genannte „Rekrutierungsdomäne“, wie ebenfalls in Vorexperimenten gezeigt werden konnte. Die jeweiligen Bindungspartner von RhoA und RhoC an der Innenseite Zellmembran sind jedoch unbekannt.

Um Bindungsproteine von RhoA und RhoC näher zu charakterisieren wurden in der vorliegenden Arbeit sechs exprimierbare Konstrukte hergestellt.

Die jeweilige polybasische Region von RhoA oder RhoC kam je einmal alleine und je einmal mit der folgenden CAAX-Domäne in den Konstrukten vor, sodass die polybasische Region alleine und in geranylgeranyliertem Zustand untersucht werden konnte.

Zur weiteren Verwendung der Konstrukte in Rekrutierungsexperimenten wurden alle Konstrukte als Fusionsproteine mit dem fluoreszierenden Protein GFP hergestellt. Ein 6-His-*tag* diente zur Reinigung der Proteine, über die eingefügte PKA-*Site* konnten die Konstrukte radioaktiv markiert werden.

Als Positivkontrolle wurde ein fünftes Konstrukt mit einer PDZ-Domäne kloniert, von der mehrere Bindungspartner bereits bekannt waren. Schließlich wurde als Negativkontrolle ein sechstes Konstrukt hergestellt, das keine Interaktionssequenz besaß, also keine polybasische Region von Rho.

In einem weiteren Schritt, der von unserem Kooperationspartner Hendrik Weiner (AG K. Büssow, Proteinstrukturfabrik) dankenswerterweise durchgeführt wurde, sollte die

Funktionsfähigkeit der Konstrukte überprüft werden. Dazu suchten wir mittels „Protein-Overlay-Assay“ mögliche Interaktionspartner von RhoA und RhoC. In einer vorläufigen Auswertung fanden sich eine Fülle von Proteinen: Fast alle Zellkompartimente waren vertreten, Einschränkungen hinsichtlich der Proteinfunktion waren nicht ersichtlich. Die Ergebnisse sprechen für eine pleiotrope Wirkung von RhoA und RhoC auf verschiedene Funktionen und Bereiche der Zelle. RhoA scheint dabei eher membranassoziierte Wirkungen zu haben, RhoC eher stoffwechselassoziierte Funktionen.

Die in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte und die Kenntnis der durch die Overlay-Experimente gefundenen Interaktionspartner der beiden Rho-GTPasen sind wichtige Hilfsmittel für die weitere Aufklärung der molekularen Interaktionsmechanismen von RhoA und RhoC. Die beschriebenen Beobachtungen könnten weitreichende Konsequenzen für die funktionelle Rolle von Rho über die Epithelzellinvasion durch *Shigella* hinaus haben. Die Ergebnisse dürften auch über die beiden untersuchten Moleküle hinaus von Bedeutung sein für die Steuerung von Zytoskelettfunktionen durch andere Rho-GTPasen.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AML	Akute Myeloische Leukämie
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
AP	Alkalische Phosphatase
ARM	Armadillo-Sequenz
ARP2/3	Actin Related Protein 2 und 3
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
CAPS	Calcium-dependent Activator Protein for Secretion isoform 1
CD	Cluster of Differentiation
Cdc42	Cell-division-cycle-gene 42 von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
cDNA	complementary DNA
Da	Dalton
DBI	Diazepam binding inhibitor
DH	Dbl-Homologie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFP	Enhanced Green-Fluorescent-Protein, grün fluoreszierendes Protein
eIF3	eukaryoter Translations-Initiationsfaktor 3
EPEC	Enteropathogenen <i>Escherichia coli</i>
ERK	Extracellular-Signal-regulated Kinase
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin-Proteine
FAS	Fettsäure-Synthase
GADPH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GATA2	GATA binding protein 2, (GATA = DNA Konsensussequenz)
GDI	Rho-GDP-dissociation Inhibitoren
GEF	guanin nucleotide exchange-factor
GFP	Green Fluorescent Protein
HDAC3	Histon-Deacetylase 3
HEAT	Huntington, Elongation Factor 3, PR 65/A, TOR
ICT	Isothermal Titration Calorimetry
Int6	integration site 6 (mouse mammary tumor virus insertional mutation)
lpa	Invasion plasmid antigen
lpg	Invasions plasmid Genes
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactoside
k	kilo

K <sub>m</sub>	Michaeliskonstante
KO	Knockout
LARG	Leukämie-Assoziierte Rho Guanine nucleotide exchange factor
LB	Luria-Bertani-Medium
LDCV	Large Dense Core Vesikeln
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK3	Mitogen-Activated Protein Kinase 3
MBS	Myosin binding subunit
MCS	Multiple Cloning Site
Mfn2	Mitofusin 2
min	Minuten
MLC	Myosin Light Chain
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRTF	Myocardin-related Transcription Factor
mxi	membrane expression of invasion plasmid antigen,
NaCl	Natriumchlorid
Ncs	Non coding sequence, Nicht kodierender Strang
NLS	Nukleäres-Lokalisations-Signal
Oligos	Oligonukleotide
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDZ	<b>PSD-95/SAP90, Discs-large, ZO-1</b> (initial bekannte Proteine mit PDZ)
PH	Pleckstrin-Homologie
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKN	Proteinkinase N
PLD	Phospholipase D
PNUTS	Phosphatase 1 nuclear targeting subunit
PP1	Protein Phosphatase 1
PRK 1,2	Protein kinase C-related kinase 1, 2
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PtdIns(5)P	Phosphatidylinositol 5-monophosphat
Rab	Ras genes from rat brain
Rac	Ras-verwandtes C3-Botulinumtoxinsubstrat1
Ran	Ras-related nuclear protein
Ras	Genprodukte des Harvey-Rattensarkom-Onkogens
RBE	RhoB effector protein
RGG-Box	Arginin- und Glyzinreiche Proteinregion mit hoher Affinität zu RNA
Rho	Ras-Homologie
RhoArd	RhoA-Rekrutierungsdomäne

RhoCrd	RhoC-Rekrutierungsdomäne
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-Kinase
RVXF Sequence	Protein-Interaktionssequenz von PP1
SAP130	Splicing factor 3B subunit 3
Ser	Serin
spa	surface presentation of antigens
SPARC	Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine
SPR	Surface Plasmon Resonance
SRF	Serum Response Factor
Tab	Tabelle
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Thr	Threonin
Tir	Translozierten Intimin Rezeptor
tRNA	Transfer-RNA
TTSS	Typ III-Sekretionssystem
UV	Ultraviolett
V	Volt
VMAT	Vesicular monoamine transporter
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
YopT	Yersinienprotease T

## 7     **Abbildungsanhang**

<b>Abb. 1</b> Invasion von <i>Shigella</i> vom Kolonlumen über M-Zellen in die Darmepithelzellen. ....	12
<b>Abb. 2</b> Vergleich der Aminosäuresequenzen von RhoA, RhoB und RhoC .....	21
<b>Abb. 3</b> Darstellung des molekularen Aufbaus der 6 hergestellten Konstrukte .....	55
<b>Abb. 4</b> pEGFP C1-Vektor, die Schnittstellen der Klonierung sind hervorgehoben.....	56
<b>Abb. 5</b> PCR-Primer 194 für das 5'-Ende des Konstruktes.....	57
<b>Abb. 6</b> PCR-Primer 195 und 196 für die 3'-Enden der beiden Konstrukte. ....	57
<b>Abb. 7</b> Spuren 1 und 2 zeigen jeweils ein PCR-Produkt mit 820 bp. ....	58
<b>Abb. 8</b> Schema des RhoA- und RhoC-Konstruktes mit den PCR-Primern. ....	58
<b>Abb. 9</b> RhoA- bzw. RhoC-Insert nach Restriktionsverdau mit EcoRI und HindIII. ....	58
<b>Abb. 10</b> Der Vektor pUC19 nach Restriktion mit den Enzymen EcoRI und HindIII.....	59
<b>Abb. 11</b> RhoA-Konstrukt in dem Vektor pUC19.....	59
<b>Abb. 12</b> RhoC-Konstrukt nach Klonierung in den Vektor pUC19. ....	59
<b>Abb. 13</b> PCR-Kontrolle der ligierten Klone aus RhoA-Insert und dem Vektor pUC19 .....	60
<b>Abb. 14</b> Restriktionsexperiment von Plasmiden .....	60
<b>Abb. 15</b> pQE30 Vektor (nach Qiagen, <a href="http://www.qiagen.com">www.qiagen.com</a> ) .....	63
<b>Abb. 16</b> Herstellen der Inserts für die Umklonierung in den Expressionsvektor pQE30 .....	64
<b>Abb. 17</b> RhoA-Konstrukt nach der Umklonierung in den Expressionsvektor pQE30.....	64
<b>Abb. 18</b> PCR-Kontrolle von RhoA in pQE30.....	64
<b>Abb. 19</b> PDZ-Domäne in pQE30; die Restriktionsstellen sind hervorgehoben. ....	65
<b>Abb. 20</b> Vektor für das PDZ-Konstrukt; die Restriktionsstellen sind hervorgehoben. ....	65
<b>Abb. 21</b> PDZ-Konstrukt in pUC19 mit den Primern für die Kontroll-PCR. ....	66
<b>Abb. 22</b> Restriktionskontrolle der PDZ Konstrukte. ....	66
<b>Abb. 23</b> Religationsexperiment eines Lambda-DNA-Längenmarkers.....	67
<b>Abb. 24</b> Lambda DNA/Eco130I-Marker von Fermentas .....	67
<b>Abb. 25</b> Herstellen des Inserts für die Negativkontrolle.....	68
<b>Abb. 26</b> PCR-Kontrolle der Negativkontrolle schematisch. ....	68
<b>Abb. 27</b> PCR-Kontrolle der Negativkontrolle .....	69
<b>Abb. 28</b> Schema der hybridisierten Oligonukleotide.....	69
<b>Abb. 29</b> Zur Herstellung der Vektors für das PDZ-Konstrukt wurde ein sequenziertes Konstrukt mit den Restriktionsenzymen XmaI und HindIII geschnitten.....	70
<b>Abb. 30</b> RhoA- und RhoC-Konstrukt mit der CAAX-Domäne nach Klonierung.....	70
<b>Abb. 31</b> PCR-Kontrolle der RhoA- und RhoC-Konstrukte, mit CAAX-Domäne.....	71
<b>Abb. 32</b> Expressionsexperiment mit der PDZ-Positivkontrolle (errechnete Sollgröße 38 kDa) .	72
<b>Abb. 33</b> Expressionsexperiment mit den Konstrukten RhoA und RhoC mit CAAX-Domäne und der Negativkontrolle. (errechnete Sollgröße 30 kDa).....	72

<b>Abb. 34</b>	Expressionsexperiment mit den Konstrukten RhoA und RhoC mit CAAX-Domäne.....	73
<b>Abb. 35</b>	Expressionsexperiment mit den Konstrukten RhoA und RhoC ohne CAAX-Domäne..	73
<b>Abb. 36</b>	Expressionsexperiment mit den Konstrukten RhoA und RhoC ohne CAAX-Domäne..	74
<b>Abb. 37</b>	Nukleotidsequenz der Promotorregion von pQE30.....	74
<b>Abb. 38</b>	Nukleotidsequenz der Promotorregion der Konstrukte. ....	75
<b>Abb. 39</b>	Expressionsexperiment mit den Konstrukten RhoA und RhoC ohne CAAX-Domäne..	75
<b>Abb. 40</b>	Expressionsexperiment mit den Konstrukten RhoA und RhoC ohne CAAX-Domäne..	75



## 8 Tabellenanhang

<b>Tab. 1</b> Geräteliste .....	26
<b>Tab. 2</b> Liste der verwendeten Zentrifugen .....	27
<b>Tab. 3</b> Auflistung der verwendeten Substanzen .....	27
<b>Tab. 4</b> Liste der gekauften Kits .....	29
<b>Tab. 5</b> Liste der verwendeten Enzyme.....	30
<b>Tab. 6</b> bei der PCR eingesetzte Konzentrationen und Volumina.....	31
<b>Tab. 7</b> Thermocycler Programmwahl .....	32
<b>Tab. 8</b> Restriktionsenzyme.....	33
<b>Tab. 9</b> Hybridisierungsansatz.....	36
<b>Tab. 10</b> Phosphorylierungsansatz.....	36
<b>Tab. 11</b> Lösungen für die Zellyse in benötigter Reihenfolge.....	39
<b>Tab. 12</b> Thermocycler Programmwahl für die Sequenzierung.....	41
<b>Tab. 13</b> Verwendete Oligonukleotide .....	45
<b>Tab. 14</b> Verwendete Stämme .....	46
<b>Tab. 15</b> Verwendete Plasmide .....	46
<b>Tab. 16</b> 6x DNA Loading Buffer .....	47
<b>Tab. 17</b> Agarosegel Farbstoff.....	47
<b>Tab. 18</b> 1x DNA-Marker .....	47
<b>Tab. 19</b> TfbI .....	47
<b>Tab. 20</b> TfbII .....	48
<b>Tab. 21</b> Prähybridisierungspuffer .....	48
<b>Tab. 22</b> Maleinsäure-Puffer .....	48
<b>Tab. 23</b> Puffer 1.....	48
<b>Tab. 24</b> Puffer 2.....	48
<b>Tab. 25</b> Blocking Reagenz .....	49
<b>Tab. 26</b> Waschpuffer .....	49
<b>Tab. 27</b> Detektionspuffer .....	49
<b>Tab. 28</b> Stoppreagenz für Sequenzierung .....	49
<b>Tab. 29</b> 5,5 %-Long Ranger Gel .....	49
<b>Tab. 30</b> 12,5 % Trenngel.....	50
<b>Tab. 31</b> 4 % Sammelgel.....	50
<b>Tab. 32</b> Anodenpuffer.....	50
<b>Tab. 33</b> Kathodenpuffer.....	50

<b>Tab. 34</b> Gelpuffer .....	51
<b>Tab. 35</b> Transfer-Puffer .....	51
<b>Tab. 36</b> Aufschlusspuffer; 2 x 20 ml .....	51
<b>Tab. 37</b> TSB-Elutionspuffer .....	51
<b>Tab. 38</b> Antikörperverdünnung für erste Inkubation (Anti-His AK).....	51
<b>Tab. 39</b> Antikörperverdünnung für Zweit-Antikörper-Inkubation .....	52
<b>Tab. 40</b> Detektionslösung.....	52
<b>Tab. 41</b> Amidoschwarz-Färbelösung .....	52
<b>Tab. 42</b> Serva Blue G Färbung .....	52
<b>Tab. 43</b> Entfärbe/Fixierungslösung .....	52
<b>Tab. 44</b> 6x Protein Loading Buffer für Tris/Tricine-Gele .....	53
<b>Tab. 45</b> LB Medium .....	53
<b>Tab. 46</b> Psi Medium .....	53
<b>Tab. 47</b> TAE-Puffer .....	53
<b>Tab. 48</b> SSC 20x.....	54
<b>Tab. 49</b> SOC Medium.....	54
<b>Tab. 50</b> TBS-Puffer .....	54
<b>Tab. 51</b> TTBS-Puffer .....	54
<b>Tab. 52</b> Tris-HCL.....	54
<b>Tab. 53</b> Auflistung der sequenzierten RhoA- und RhoC-Konstrukte .....	61
<b>Tab. 54</b> Membranassoziierte potenzielle Interaktionspartner von RhoA/C:.....	76
<b>Tab. 55</b> Zytoplasmatische Interaktionspartner von RhoA/C: .....	77
<b>Tab. 56</b> Mitochondriale Interaktionspartner von RhoA/C: .....	78
<b>Tab. 57</b> Golgi-Apparat-assoziierte Interaktionspartner von RhoA/C:.....	79
<b>Tab. 58</b> Nukleäre Interaktionspartner von RhoA/C: .....	79
<b>Tab. 59</b> Sekretorischer Interaktionspartner von RhoA/C: .....	79
<b>Tab. 60</b> Signaltransduktion-assoziierte Interaktionspartner von RhoA/C: .....	80
<b>Tab. 61</b> Ribosomale Interaktionspartner von RhoA/C oder PDZ:.....	81
<b>Tab. 62</b> Zytoskelettassoziierte Interaktionspartner von RhoA/C oder PDZ: .....	82
<b>Tab. 63</b> Bereits beschriebene PDZ-Interaktionen (Positiv-Kontrolle) .....	82
<b>Tab. 64</b> In der Literatur beschriebene Interaktionen der Rho-Isoformen (nach [294] und [22]).	93

## 9 Literaturverzeichnis

1. Adam, T., et al., *Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of Shigella flexneri into HeLa cells*. J Cell Biol, 1995. **129**(2): p. 367-81.
2. Adam, T., et al., *Rho-dependent membrane folding causes Shigella entry into epithelial cells*. Embo J, 1996. **15**(13): p. 3315-21.
3. Adnane, J., et al., *RhoB, not RhoA, represses the transcription of the transforming growth factor beta type II receptor by a mechanism involving activator protein 1*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 8500-7.
4. Ahnert-Hilger, G., et al., *Regulation of vesicular neurotransmitter transporters*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2003. **150**: p. 140-60.
5. Allaoui, A., et al., *Characterization of the Shigella flexneri ipgD and ipgF genes, which are located in the proximal part of the mxi locus*. Infect Immun, 1993. **61**(5): p. 1707-14.
6. Allen, P.B., et al., *Isolation and characterization of PNUTS, a putative protein phosphatase 1 nuclear targeting subunit*. J Biol Chem, 1998. **273**(7): p. 4089-95.
7. Alves, I.D., C.K. Park, and V.J. Hruby, *Plasmon resonance methods in GPCR signaling and other membrane events*. Curr Protein Pept Sci, 2005. **6**(4): p. 293-312.
8. Amano, M., et al., *Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20246-9.
9. Amano, M., et al., *Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase*. Science, 1997. **275**(5304): p. 1308-11.
10. Ann, K., et al., *Novel Ca<sup>2+</sup>-binding protein (CAPS) related to UNC-31 required for Ca<sup>2+</sup>-activated exocytosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(32): p. 19637-40.
11. Asano, K., W.C. Merrick, and J.W. Hershey, *The translation initiation factor eIF3-p48 subunit is encoded by int-6, a site of frequent integration by the mouse mammary tumor virus genome*. J Biol Chem, 1997. **272**(38): p. 23477-80.
12. Asturias, F.J., et al., *Structure and molecular organization of mammalian fatty acid synthase*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(3): p. 225-32.
13. Barr, F.A., *A novel Rab6-interacting domain defines a family of Golgi-targeted coiled-coil proteins*. Curr Biol, 1999. **9**(7): p. 381-4.
14. Bell, C.E. and M. Lewis, *The Lac repressor: a second generation of structural and functional studies*. Curr Opin Struct Biol, 2001. **11**(1): p. 19-25.
15. Bennish, M.L., *Potentially lethal complications of shigellosis*. Rev Infect Dis, 1991. **13 Suppl 4**: p. S319-24.
16. Bennish, M.L., A.K. Azad, and D. Yousefzadeh, *Intestinal obstruction during shigellosis: incidence, clinical features, risk factors, and outcome*. Gastroenterology, 1991. **101**(3): p. 626-34.
17. Bernardini, M.L., et al., *Identification of icsA, a plasmid locus of Shigella flexneri that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(10): p. 3867-71.
18. Bernardini, M.L., A. Fontaine, and P.J. Sansonetti, *The two-component regulatory system ompR-envZ controls the virulence of Shigella flexneri*. J Bacteriol, 1990. **172**(11): p. 6274-81.
19. Bernardini, M.L., et al., *OmpC is involved in invasion of epithelial cells by Shigella flexneri*. Infect Immun, 1993. **61**(9): p. 3625-35.
20. Bezprozvanny, I. and A. Maximov, *Classification of PDZ domains*. FEBS Lett, 2001. **509**(3): p. 457-62.
21. Bhat, K.P., et al., *Essential role of ribosomal protein L11 in mediating growth inhibition-induced p53 activation*. Embo J, 2004. **23**(12): p. 2402-12.
22. Bishop, A.L. and A. Hall, *Rho GTPases and their effector proteins*. Biochem J, 2000.

- 348 Pt 2:** p. 241-55.
23. Blocker, A., et al., *The tripartite type III secretin of Shigella flexneri inserts IpaB and IpaC into host membranes.* J Cell Biol, 1999. **147**(3): p. 683-93.
  24. Blocker, A., et al., *Structure and composition of the Shigella flexneri "needle complex", a part of its type III secretin.* Mol Microbiol, 2001. **39**(3): p. 652-63.
  25. Bohm, B., *Differentielle Rekrutierung der Isoformen des kleinen G-Proteins Rho bei der Invasion von Shigellen in Epithelzellen.* Vol. <http://edoc.hu-berlin.de/docviews/abstract.php?id=10156>. 1999: Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät - Universitätsklinikum Charité.
  26. Botelho, R.J., et al., *Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis.* J Cell Biol, 2000. **151**(7): p. 1353-68.
  27. Bougneres, L., et al., *Cortactin and Crk cooperate to trigger actin polymerization during Shigella invasion of epithelial cells.* J Cell Biol, 2004. **166**(2): p. 225-35.
  28. Bourdet-Sicard, R., et al., *Binding of the Shigella protein IpaA to vinculin induces F-actin depolymerization.* Embo J, 1999. **18**(21): p. 5853-62.
  29. Boyartchuk, V.L., M.N. Ashby, and J. Rine, *Modulation of Ras and a-factor function by carboxyl-terminal proteolysis.* Science, 1997. **275**(5307): p. 1796-800.
  30. Braga, V.M., et al., *The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts.* J Cell Biol, 1997. **137**(6): p. 1421-31.
  31. Braun, H.P. and U.K. Schmitz, *Are the 'core' proteins of the mitochondrial bc1 complex evolutionary relics of a processing protease?* Trends Biochem Sci, 1995. **20**(5): p. 171-5.
  32. Brekken, R.A. and E.H. Sage, *SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication.* Matrix Biol, 2001. **19**(8): p. 816-27.
  33. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria.* Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
  34. Brown, D.L., et al., *The GRIP domain is a specific targeting sequence for a population of trans-Golgi network derived tubulo-vesicular carriers.* Traffic, 2001. **2**(5): p. 336-44.
  35. Brumell, J.H. and S. Grinstein, *Role of lipid-mediated signal transduction in bacterial internalization.* Cell Microbiol, 2003. **5**(5): p. 287-97.
  36. Buchrieser, C., et al., *The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of Shigella flexneri.* Mol Microbiol, 2000. **38**(4): p. 760-71.
  37. Burton, E.A., R. Plattner, and A.M. Pendergast, *Abl tyrosine kinases are required for infection by Shigella flexneri.* Embo J, 2003. **22**(20): p. 5471-9.
  38. Bussow, K., et al., *A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library.* Nucleic Acids Res, 1998. **26**(21): p. 5007-8.
  39. Bussow, K., et al., *A human cDNA library for high-throughput protein expression screening.* Genomics, 2000. **65**(1): p. 1-8.
  40. Bussow, K., et al., *A catalog of human cDNA expression clones and its application to structural genomics.* Genome Biol, 2004. **5**(9): p. R71.
  41. Cachero, T.G., A.D. Morielli, and E.G. Peralta, *The small GTP-binding protein RhoA regulates a delayed rectifier potassium channel.* Cell, 1998. **93**(6): p. 1077-85.
  42. Carrier, M.F., et al., *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, 2000. **275**(29): p. 21946-52.
  43. Carr, K.M., M. Bittner, and J.M. Trent, *Gene-expression profiling in human cutaneous melanoma.* Oncogene, 2003. **22**(20): p. 3076-80.
  44. Casey, P.J. and M.C. Seabra, *Protein prenyltransferases.* J Biol Chem, 1996. **271**(10): p. 5289-92.
  45. Chang, S., et al., *An expression screen reveals modulators of class II histone deacetylase phosphorylation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(23): p. 8120-5.
  46. Chen, Y., et al., *A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to*

- ICE*. *Embo J*, 1996. **15**(15): p. 3853-60.
47. Choy, E., et al., *Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi*. *Cell*, 1999. **98**(1): p. 69-80.
  48. Cicchetti, G., P.G. Allen, and M. Glogauer, *Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly*. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2002. **13**(3): p. 220-8.
  49. Clark, E.A. and J.S. Brugge, *Integrins and signal transduction pathways: the road taken*. *Science*, 1995. **268**(5208): p. 233-9.
  50. Cliff, M.J., A. Gutierrez, and J.E. Ladbury, *A survey of the year 2003 literature on applications of isothermal titration calorimetry*. *J Mol Recognit*, 2004. **17**(6): p. 513-23.
  51. Cohen, T., et al., *The exon 8-containing prosaposin gene splice variant is dispensable for mouse development, lysosomal function, and secretion*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(6): p. 2431-40.
  52. Collisson, E.A., et al., *Atorvastatin prevents RhoC isoprenylation, invasion, and metastasis in human melanoma cells*. *Mol Cancer Ther*, 2003. **2**(10): p. 941-8.
  53. Cordes, F.S., et al., *Helical structure of the needle of the type III secretion system of Shigella flexneri*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(19): p. 17103-7.
  54. Cormack, B.P., R.H. Valdivia, and S. Falkow, *FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)*. *Gene*, 1996. **173**(1 Spec No): p. 33-8.
  55. Creutz, C.E., *The annexins and exocytosis*. *Science*, 1992. **258**(5084): p. 924-31.
  56. Dai, M.S., et al., *Regulation of the MDM2-p53 pathway by ribosomal protein L11 involves a post-ubiquitination mechanism*. *J Biol Chem*, 2006.
  57. Dai, Q., et al., *Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(24): p. 15030-4.
  58. Das, B.K., et al., *Characterization of a protein complex containing spliceosomal proteins SAPs 49, 130, 145, and 155*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(10): p. 6796-802.
  59. Dehio, C., M.C. Prevost, and P.J. Sansonetti, *Invasion of epithelial cells by Shigella flexneri induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60c-src-mediated signalling pathway*. *Embo J*, 1995. **14**(11): p. 2471-82.
  60. Derewenda, U., et al., *The crystal structure of RhoA in complex with the DH/PH fragment of PDZRhoGEF, an activator of the Ca(2+) sensitization pathway in smooth muscle*. *Structure*, 2004. **12**(11): p. 1955-65.
  61. Destaing, O., et al., *A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 13): p. 2901-11.
  62. Dorman, C.J. and M.E. Porter, *The Shigella virulence gene regulatory cascade: a paradigm of bacterial gene control mechanisms*. *Mol Microbiol*, 1998. **29**(3): p. 677-84.
  63. Dorman, C.J., S. McKenna, and C. Beloin, *Regulation of virulence gene expression in Shigella flexneri, a facultative intracellular pathogen*. *Int J Med Microbiol*, 2001. **291**(2): p. 89-96.
  64. Dovas, A. and J.R. Couchman, *RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities*. *Biochem J*, 2005. **390**(Pt 1): p. 1-9.
  65. Drechsel, D.N., et al., *A requirement for Rho and Cdc42 during cytokinesis in Xenopus embryos*. *Curr Biol*, 1997. **7**(1): p. 12-23.
  66. Dumenil, G., P. Sansonetti, and G. Tran Van Nhieu, *Src tyrosine kinase activity down-regulates Rho-dependent responses during Shigella entry into epithelial cells and stress fibre formation*. *J Cell Sci*, 2000. **113** ( Pt 1): p. 71-80.
  67. DuPont, H.L., et al., *The response of man to virulent Shigella flexneri 2a*. *J Infect Dis*, 1969. **119**(3): p. 296-9.
  68. DuPont, H.L., et al., *Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission*. *J Infect Dis*, 1989. **159**(6): p. 1126-8.
  69. Durrieu, C., F. Bernier-Valentin, and B. Rousset, *Microtubules bind glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and modulate its enzyme activity and quaternary structure*. *Arch Biochem Biophys.*, 1987. **252**(1): p. 32-40.
  70. Dutcher, S.K., *The tubulin fraternity: alpha to eta*. *Curr Opin Cell Biol*, 2001. **13**(1): p.

- 49-54.
71. Egile, C., et al., *Activation of the CDC42 effector N-WASP by the Shigella flexneri IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility.* J Cell Biol, 1999. **146**(6): p. 1319-32.
  72. Erdmann, K.S., et al., *The Adenomatous Polyposis Coli-protein (APC) interacts with the protein tyrosine phosphatase PTP-BL via an alternatively spliced PDZ domain.* Oncogene, 2000. **19**(34): p. 3894-901.
  73. Fabre, S., C. Reynaud, and P. Jalinot, *Identification of functional PDZ domain binding sites in several human proteins.* Mol Biol Rep, 2000. **27**(4): p. 217-24.
  74. Fanning, A.S. and J.M. Anderson, *Protein-protein interactions: PDZ domain networks.* Curr Biol, 1996. **6**(11): p. 1385-8.
  75. Farabaugh, P.J., *Sequence of the lacI gene.* Nature, 1978. **274**(5673): p. 765-9.
  76. Finch, M., et al., *Epidemic Reiter's syndrome following an outbreak of shigellosis.* Eur J Epidemiol, 1986. **2**(1): p. 26-30.
  77. Fishkind, D.J. and Y.L. Wang, *New horizons for cytokinesis.* Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(1): p. 23-31.
  78. Fontaine, A., J. Arondel, and P.J. Sansonetti, *Role of Shiga toxin in the pathogenesis of bacillary dysentery, studied by using a Tox- mutant of Shigella dysenteriae 1.* Infect Immun, 1988. **56**(12): p. 3099-109.
  79. Francki, A. and E.H. Sage, *SPARC and the kidney glomerulus: matricellular proteins exhibit diverse functions under normal and pathological conditions.* Trends Cardiovasc Med, 2001. **11**(1): p. 32-7.
  80. Friedrich, A., *Dissertation.*
  81. Frischknecht, F. and M. Way, *Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization.* Trends Cell Biol, 2001. **11**(1): p. 30-38.
  82. Fuse, N., et al., *Sonic hedgehog protein signals not as a hydrolytic enzyme but as an apparent ligand for patched.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 10992-9.
  83. Gallagher, E.D., et al., *RhoA binds to the amino terminus of MEKK1 and regulates its kinase activity.* J Biol Chem., 2004. **279**(3): p. 1872-7. Epub 2003 Oct 27.
  84. Garcia, A., et al., *Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis.* Biochimie, 2003. **85**(8): p. 721-6.
  85. Gardiner, E.M., et al., *Spatial and temporal analysis of Rac activation during live neutrophil chemotaxis.* Curr Biol, 2002. **12**(23): p. 2029-34.
  86. Gaucher, E.A., M.M. Miyamoto, and S.A. Benner, *Function-structure analysis of proteins using covarion-based evolutionary approaches: Elongation factors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(2): p. 548-52.
  87. Gencic, S., H. Schagger, and G. von Jagow, *Core I protein of bovine ubiquinol-cytochrome-c reductase; an additional member of the mitochondrial-protein-processing family. Cloning of bovine core I and core II cDNAs and primary structure of the proteins.* Eur J Biochem, 1991. **199**(1): p. 123-31.
  88. Gerke, V. and S.E. Moss, *Annexins and membrane dynamics.* Biochim Biophys Acta, 1997. **1357**(2): p. 129-54.
  89. Gerke, V., C.E. Creutz, and S.E. Moss, *Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(6): p. 449-61.
  90. Gleeson, P.A., et al., *p230 is associated with vesicles budding from the trans-Golgi network.* J Cell Sci, 1996. **109** ( Pt 12): p. 2811-21.
  91. Goldberg, M.B., *Actin-based motility of intracellular microbial pathogens.* Microbiol Mol Biol Rev, 2001. **65**(4): p. 595-626, table of contents.
  92. Gooden, M.D., et al., *Cell cycle-dependent nuclear location of the matricellular protein SPARC: association with the nuclear matrix.* J Cell Biochem, 1999. **74**(2): p. 152-67.
  93. Goosney, D.L., S. Gruenheid, and B.B. Finlay, *Gut feelings: enteropathogenic E. coli (EPEC) interactions with the host.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 173-89.
  94. Gossen, M., A.L. Bonin, and H. Bujard, *Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements.* Trends Biochem Sci, 1993. **18**(12): p. 471-5.

95. Gosser, Y.Q., et al., *C-terminal binding domain of Rho GDP-dissociation inhibitor directs N-terminal inhibitory peptide to GTPases*. Nature, 1997. **387**(6635): p. 814-9.
96. Gottesman, S., E. Halpern, and P. Trisler, *Role of sulA and sulB in filamentation by lon mutants of Escherichia coli K-12*. J Bacteriol, 1981. **148**(1): p. 265-73.
97. Graf, B., et al., *Functional role for the class IX myosin myr5 in epithelial cell infection by Shigella flexneri*. Cell Microbiol, 2000. **2**(6): p. 601-16.
98. Gruenberg, J. and N. Emans, *Annexins in membrane traffic*. Trends Cell Biol, 1993. **3**(7): p. 224-7.
99. Guo, T.B., et al., *Spermatogenic expression of RNA-binding motif protein 7, a protein that interacts with splicing factors*. J Androl, 2003. **24**(2): p. 204-14.
100. Haas, J., E.C. Park, and B. Seed, *Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein*. Curr Biol, 1996. **6**(3): p. 315-24.
101. Hahn, H., et al., *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 4. Auflage ed. 2000, Berlin, Heidelberg, New York: Springer. 1037.
102. Hale, T.L., R.E. Morris, and P.F. Bonventre, *Shigella infection of henle intestinal epithelial cells: role of the host cell*. Infect Immun, 1979. **24**(3): p. 887-94.
103. Hale, T.L., *Genetic basis of virulence in Shigella species*. Microbiol Rev, 1991. **55**(2): p. 206-24.
104. Hausteil, T., *Epithelzellinvasion durch Shigella flexneri*. Vol. <http://edoc.hu-berlin.de/docviews/abstract.php?id=10420>. 2002: Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät - Universitätsklinikum Charité.
105. Henderson, I.R., et al., *Characterization of pic, a secreted protease of Shigella flexneri and enteroaggregative Escherichia coli*. Infect Immun, 1999. **67**(11): p. 5587-96.
106. High, N., et al., *IpaB of Shigella flexneri causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole*. Embo J, 1992. **11**(5): p. 1991-9.
107. Hilbi, H., et al., *The interleukin 1beta-converting enzyme, caspase 1, is activated during Shigella flexneri-induced apoptosis in human monocyte-derived macrophages*. Infect Immun, 1997. **65**(12): p. 5165-70.
108. Hilbi, H., et al., *Shigella-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32895-900.
109. Ho, C.K., K. Lehman, and S. Shuman, *An essential surface motif (WAQKW) of yeast RNA triphosphatase mediates formation of the mRNA capping enzyme complex with RNA guanylyltransferase*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(24): p. 4671-8.
110. Hoffman, G.R., N. Nassar, and R.A. Cerione, *Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI*. Cell, 2000. **100**(3): p. 345-56.
111. Hoffman, G.R. and R.A. Cerione, *Signaling to the Rho GTPases: networking with the DH domain*. FEBS Lett, 2002. **513**(1): p. 85-91.
112. Hogan, A., et al., *Interaction of gamma 1-syntrophin with diacylglycerol kinase-zeta. Regulation of nuclear localization by PDZ interactions*. J Biol Chem, 2001. **276**(28): p. 26526-33.
113. Horiuchi, A., et al., *Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma*. Lab Invest, 2003. **83**(6): p. 861-70.
114. Hsu, L.M., et al., *In vitro studies of transcript initiation by Escherichia coli RNA polymerase. 1. RNA chain initiation, abortive initiation, and promoter escape at three bacteriophage promoters*. Biochemistry, 2003. **42**(13): p. 3777-86.
115. Hubbard, M.J. and P. Cohen, *On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation*. Trends Biochem Sci, 1993. **18**(5): p. 172-7.
116. Hutchin, T. and G. Cortopassi, *A mitochondrial DNA clone is associated with increased risk for Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 6892-5.
117. Ihara, K., et al., *Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue*. J Biol Chem, 1998. **273**(16): p. 9656-66.
118. Ikoma, T., et al., *A definitive role of RhoC in metastasis of orthotopic lung cancer in mice*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(3): p. 1192-200.

119. Ilin, S., et al., *NMR assignment of the full-length ribosomal protein L11 from Thermotoga maritima*. J Biomol NMR, 2003. **25**(2): p. 163-4.
120. Ingersoll, M., E.A. Groisman, and A. Zychlinsky, *Pathogenicity islands of Shigella*. Curr Top Microbiol Immunol, 2002. **264**(1): p. 49-65.
121. Ingersoll, M.A., et al., *The ShiA protein encoded by the Shigella flexneri SHI-2 pathogenicity island attenuates inflammation*. Cell Microbiol, 2003. **5**(11): p. 797-807.
122. Ingersoll, M.A. and A. Zychlinsky, *ShiA abrogates the innate T-cell response to Shigella flexneri infection*. Infect Immun, 2006. **74**(4): p. 2317-27.
123. Ishihara, N., Y. Eura, and K. Mihara, *Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 26): p. 6535-46.
124. Ishizaki, T., et al., *p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions*. FEBS Lett, 1997. **404**(2-3): p. 118-24.
125. Jaffe, A.B. and A. Hall, *RHO GTPases: Biochemistry and Biology*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004.
126. Janssens, V. and J. Goris, *Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling*. Biochem J, 2001. **353**(Pt 3): p. 417-39.
127. Jelen, F., et al., *PDZ domains - common players in the cell signaling*. Acta Biochim Pol, 2003. **50**(4): p. 985-1017.
128. Jensen, T.H., A. Jensen, and J. Kjems, *Tools for the production and purification of full-length, N- or C-terminal 32P-labeled protein, applied to HIV-1 Gag and Rev*. Gene, 1995. **162**(2): p. 235-7.
129. Jin, Q., et al., *Genome sequence of Shigella flexneri 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of Escherichia coli K12 and O157*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(20): p. 4432-41.
130. Johnson, C.A., et al., *Human class I histone deacetylase complexes show enhanced catalytic activity in the presence of ATP and co-immunoprecipitate with the ATP-dependent chaperone protein Hsp70*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9590-7.
131. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1911-2.
132. Kaibuchi, K., S. Kuroda, and M. Amano, *Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 459-86.
133. Kamai, T., et al., *Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(7): p. 2632-41.
134. Kikuchi, A., et al., *ADP-ribosylation of the bovine brain rho protein by botulinum toxin type C1*. J Biol Chem, 1988. **263**(31): p. 16303-8.
135. Kim, Y.M., et al., *PNUTS, a protein phosphatase 1 (PP1) nuclear targeting subunit. Characterization of its PP1- and RNA-binding domains and regulation by phosphorylation*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13819-28.
136. Kimura, K., et al., *Regulation of the association of adducin with actin filaments by Rho-associated kinase (Rho-kinase) and myosin phosphatase*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5542-8.
137. Kishi, K., et al., *Regulation of cytoplasmic division of Xenopus embryo by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI)*. J Cell Biol, 1993. **120**(5): p. 1187-95.
138. Kleer, C.G., et al., *RhoC-GTPase is a novel tissue biomarker associated with biologically aggressive carcinomas of the breast*. Breast Cancer Res Treat, 2005. **93**(2): p. 101-10.
139. Kleer, C.G., et al., *RhoC GTPase expression as a potential marker of lymph node metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(15): p. 4485-90.



140. Kondo, T., et al., *Expression of RHOC is associated with metastasis of gastric carcinomas*. Pathobiology, 2004. **71**(1): p. 19-25.
141. Kosako, H., et al., *Specific accumulation of Rho-associated kinase at the cleavage furrow during cytokinesis: cleavage furrow-specific phosphorylation of intermediate filaments*. Oncogene, 1999. **18**(17): p. 2783-8.
142. Kotloff, K.L., et al., *Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies*. Bull World Health Organ, 1999. **77**(8): p. 651-66.
143. Kourlas, P.J., et al., *Identification of a gene at 11q23 encoding a guanine nucleotide exchange factor: evidence for its fusion with MLL in acute myeloid leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(5): p. 2145-50.
144. Kregel, K.C., *Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance*. J Appl Physiol, 2002. **92**(5): p. 2177-86.
145. Kreivi, J.P., et al., *Purification and characterisation of p99, a nuclear modulator of protein phosphatase 1 activity*. FEBS Lett, 1997. **420**(1): p. 57-62.
146. Kuwahara, K., et al., *Muscle-specific signaling mechanism that links actin dynamics to serum response factor*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(8): p. 3173-81.
147. Landsverk, H.B., et al., *PNUTS enhances in vitro chromosome decondensation in a PP1-dependent manner*. Biochem J, 2005. **390**(Pt 3): p. 709-17.
148. Lang, P., et al., *Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes*. Embo J, 1996. **15**(3): p. 510-9.
149. Lawlor, K.M., et al., *Virulence of iron transport mutants of Shigella flexneri and utilization of host iron compounds*. Infect Immun, 1987. **55**(3): p. 594-9.
150. Lemmon, M.A. and K.M. Ferguson, *Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains*. Biochem J, 2000. **350 Pt 1**: p. 1-18.
151. Lett, M.C., et al., *virG, a plasmid-coded virulence gene of Shigella flexneri: identification of the virG protein and determination of the complete coding sequence*. J Bacteriol, 1989. **171**(1): p. 353-9.
152. Lewis, M., et al., *Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer*. Science, 1996. **271**(5253): p. 1247-54.
153. Liu, T.S., et al., *Protective role of HSP72 against Clostridium difficile toxin A-induced intestinal epithelial cell dysfunction*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(4): p. C1073-82.
154. Loirand, G., M. Rolli-Derkinderen, and P. Pacaud, *RhoA and resistance artery remodeling*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(3): p. H1051-6.
155. Louvet-Vallee, S., *ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling*. Biol Cell, 2000. **92**(5): p. 305-16.
156. Loyet, K.M., et al., *Specific binding of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to calcium-dependent activator protein for secretion (CAPS), a potential phosphoinositide effector protein for regulated exocytosis*. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 8337-43.
157. Lu, L. and W. Hong, *Interaction of Arl1-GTP with GRIP domains recruits autoantigens Golgin-97 and Golgin-245/p230 onto the Golgi*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(9): p. 3767-81.
158. Lu, L., G. Tai, and W. Hong, *Autoantigen Golgin-97, an effector of Arl1 GTPase, participates in traffic from the endosome to the trans-golgi network*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(10): p. 4426-43.
159. Luke, M.R., et al., *GRIP domain-mediated targeting of two new coiled-coil proteins, GCC88 and GCC185, to subcompartments of the trans-Golgi network*. J Biol Chem, 2003. **278**(6): p. 4216-26.
160. Mahlknecht, U., et al., *Histone deacetylase 3, a class I histone deacetylase, suppresses MAPK11-mediated activating transcription factor-2 activation and represses TNF gene expression*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 3979-90.
161. Maier, T., S. Jenni, and N. Ban, *Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution*. Science, 2006. **311**(5765): p. 1258-62.

162. Mandic-Mulec, I., J. Weiss, and A. Zychlinsky, *Shigella flexneri* is trapped in polymorphonuclear leukocyte vacuoles and efficiently killed. *Infect Immun*, 1997. **65**(1): p. 110-5.
163. Martinez, E., et al., *Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(20): p. 6782-95.
164. Mathan, M.M. and V.I. Mathan, *Ultrastructural pathology of the rectal mucosa in Shigella dysentery*. *Am J Pathol*, 1986. **123**(1): p. 25-38.
165. Mathan, M.M. and V.I. Mathan, *Morphology of rectal mucosa of patients with shigellosis*. *Rev Infect Dis*, 1991. **13 Suppl 4**: p. S314-8.
166. Mathan, V.I. and M.M. Mathan, *Intestinal manifestations of invasive diarrheas and their diagnosis*. *Rev Infect Dis*, 1991. **13 Suppl 4**: p. S311-3.
167. Matozaki, T., H. Nakanishi, and Y. Takai, *Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades*. *Cell Signal*, 2000. **12**(8): p. 515-24.
168. Matsuzawa, T., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli activates the RhoA signaling pathway via the stimulation of GEF-H1*. *Embo J*, 2004. **23**(17): p. 3570-82.
169. Maurelli, A.T., et al., *Cloning of plasmid DNA sequences involved in invasion of HeLa cells by Shigella flexneri*. *Infect Immun*, 1985. **49**(1): p. 164-71.
170. Maurelli, A.T. and P.J. Sansonetti, *Identification of a chromosomal gene controlling temperature-regulated expression of Shigella virulence*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(8): p. 2820-4.
171. Mayer, F., *Cytoskeletons in prokaryotes*. *Cell Biol Int*, 2003. **27**(5): p. 429-38.
172. McDonough, M.A. and J.R. Butterton, *Spontaneous tandem amplification and deletion of the shiga toxin operon in Shigella dysenteriae 1*. *Mol Microbiol*, 1999. **34**(5): p. 1058-69.
173. Menard, R., P.J. Sansonetti, and C. Parsot, *Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of Shigella flexneri entry into epithelial cells*. *J Bacteriol*, 1993. **175**(18): p. 5899-906.
174. Menard, R., P. Sansonetti, and C. Parsot, *The secretion of the Shigella flexneri Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD*. *Embo J*, 1994. **13**(22): p. 5293-302.
175. Menard, R., et al., *Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of S. flexneri*. *Cell*, 1994. **79**(3): p. 515-25.
176. Menard, R., et al., *The secreted Ipa complex of Shigella flexneri promotes entry into mammalian cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(3): p. 1254-8.
177. Michaelson, D., et al., *Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding*. *J Cell Biol*, 2001. **152**(1): p. 111-26.
178. Michaelson, D., et al., *Postprenylation CAAX processing is required for proper localization of Ras but not Rho GTPases*. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(4): p. 1606-16.
179. Miralles, F., et al., *Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL*. *Cell*, 2003. **113**(3): p. 329-42.
180. Mitchell, R.D., et al., *Heat-stable inhibitor protein derived peptide substrate analogs: phosphorylation by cAMP-dependent and cGMP-dependent protein kinases*. *Biochemistry*, 1995. **34**(2): p. 528-34.
181. Moores, S.L., et al., *Sequence dependence of protein isoprenylation*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(22): p. 14603-10.
182. Morris-Desbois, C., et al., *The human protein HSPC021 interacts with Int-6 and is associated with eukaryotic translation initiation factor 3*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(49): p. 45988-95.
183. Moseley, P.L., *Exercise, stress, and the immune conversation*. *Exerc Sport Sci Rev*, 2000. **28**(3): p. 128-32.
184. Moss, J.E., et al., *The selC-associated SHI-2 pathogenicity island of Shigella flexneri*. *Mol Microbiol*, 1999. **33**(1): p. 74-83.
185. Mounier, J., et al., *Shigella flexneri enters human colonic Caco-2 epithelial cells through*

- the basolateral pole*. Infect Immun, 1992. **60**(1): p. 237-48.
186. Mounier, J., F.K. Bahrani, and P.J. Sansonetti, *Secretion of Shigella flexneri Ipa invasins on contact with epithelial cells and subsequent entry of the bacterium into cells are growth stage dependent*. Infect Immun, 1997. **65**(2): p. 774-82.
  187. Mounier, J., et al., *Rho family GTPases control entry of Shigella flexneri into epithelial cells but not intracellular motility*. J Cell Sci, 1999. **112 ( Pt 13)**: p. 2069-80.
  188. Nassar, N., et al., *Structures of Cdc42 bound to the active and catalytically compromised forms of Cdc42GAP*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(12): p. 1047-52.
  189. Nassif, X., et al., *Evaluation with an iuc::Tn10 mutant of the role of aerobactin production in the virulence of Shigella flexneri*. Infect Immun, 1987. **55**(9): p. 1963-9.
  190. Neutra, M.R., A. Frey, and J.P. Kraehenbuhl, *Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization*. Cell, 1996. **86**(3): p. 345-8.
  191. Nguyen, Q.D., et al., *Commutators of PAR-1 signaling in cancer cell invasion reveal an essential role of the Rho-Rho kinase axis and tumor microenvironment*. Oncogene, 2005. **24**(56): p. 8240-51.
  192. Nie, H., et al., *Complete genome sequence of Shigella flexneri 5b and comparison with Shigella flexneri 2a*. BMC Genomics, 2006. **7**: p. 173.
  193. Niebuhr, K., et al., *IpgD, a protein secreted by the type III secretion machinery of Shigella flexneri, is chaperoned by IpgE and implicated in entry focus formation*. Mol Microbiol, 2000. **38**(1): p. 8-19.
  194. Niebuhr, K., et al., *Conversion of PtdIns(4,5)P(2) into PtdIns(5)P by the S.flexneri effector IpgD reorganizes host cell morphology*. Embo J, 2002. **21**(19): p. 5069-78.
  195. Niggli, V., *Regulation of Protein Activities by Phosphoinositide Phosphates*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005.
  196. Nilsson, J. and P. Nissen, *Elongation factors on the ribosome*. Curr Opin Struct Biol, 2005. **15**(3): p. 349-54.
  197. Niyogi, S.K., *Shigellosis*. J Microbiol, 2005. **43**(2): p. 133-43.
  198. Nusrat, A., et al., *Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(23): p. 10629-33.
  199. Ogawa, M., et al., *IcsB, secreted via the type III secretion system, is chaperoned by IpgA and required at the post-invasion stage of Shigella pathogenicity*. Mol Microbiol, 2003. **48**(4): p. 913-31.
  200. Ogawa, M., et al., *Escape of intracellular Shigella from autophagy*. Science, 2005. **307**(5710): p. 727-31.
  201. Oude Weernink, P.A., M. Lopez de Jesus, and M. Schmidt, *Phospholipase D signaling: orchestration by PIP2 and small GTPases*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2007. **374**(5-6): p. 399-411.
  202. Ozawa, Y., et al., *Histone deacetylase 3 associates with and represses the transcription factor GATA-2*. Blood, 2001. **98**(7): p. 2116-23.
  203. Parsot, C., *Shigella flexneri: genetics of entry and intercellular dissemination in epithelial cells*. Curr Top Microbiol Immunol, 1994. **192**: p. 217-41.
  204. Perdomo, J.J., P. Gounon, and P.J. Sansonetti, *Polymorphonuclear leukocyte transmigration promotes invasion of colonic epithelial monolayer by Shigella flexneri*. J Clin Invest, 1994. **93**(2): p. 633-43.
  205. Perdomo, O.J., et al., *Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis*. J Exp Med, 1994. **180**(4): p. 1307-19.
  206. Pierce, M.M., C.S. Raman, and B.T. Nall, *Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions*. Methods., 1999. **19**(2): p. 213-21.
  207. Plattner, R., et al., *c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF*. Genes Dev, 1999. **13**(18): p. 2400-11.
  208. Porse, B.T. and R.A. Garrett, *Ribosomal mechanics, antibiotics, and GTP hydrolysis*. Cell, 1999. **97**(4): p. 423-6.
  209. Prevost, M.C., et al., *Unipolar reorganization of F-actin layer at bacterial division and*

- bundling of actin filaments by plastin correlate with movement of Shigella flexneri within HeLa cells.* Infect Immun, 1992. **60**(10): p. 4088-99.
210. Pupo, G.M., R. Lan, and P.R. Reeves, *Multiple independent origins of Shigella clones of Escherichia coli and convergent evolution of many of their characteristics.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(19): p. 10567-72.
  211. Qiagen, *Qiaexpressionist*. 2003.
  212. Rathman, M., et al., *Myosin light chain kinase plays an essential role in S. flexneri dissemination.* J Cell Sci, 2000. **113 Pt 19**: p. 3375-86.
  213. Raynal, P. and H.B. Pollard, *Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins.* Biochim Biophys Acta, 1994. **1197**(1): p. 63-93.
  214. Rescher, U. and V. Gerke, *Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions.* J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 13): p. 2631-9.
  215. Ridley, A.J. and A. Hall, *The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors.* Cell, 1992. **70**(3): p. 389-99.
  216. Ridley, A.J., et al., *Cell migration: integrating signals from front to back.* Science, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.
  217. Ridley, A.J., *Rho proteins and cancer.* Breast Cancer Res Treat, 2004. **84**(1): p. 13-9.
  218. Riento, K. and A.J. Ridley, *Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(6): p. 446-56.
  219. Rittinger, K., et al., *Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP.* Nature, 1997. **388**(6643): p. 693-7.
  220. Rittinger, K., et al., *Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue.* Nature, 1997. **389**(6652): p. 758-62.
  221. RKI, *Epidemiologisches Bulletin*, 2005. **35**: p. 317 - 322.
  222. Sahai, E. and C.J. Marshall, *ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho.* Nat Cell Biol, 2002. **4**(6): p. 408-15.
  223. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
  224. Sansonetti, P.J., D.J. Kopecko, and S.B. Formal, *Involvement of a plasmid in the invasive ability of Shigella flexneri.* Infect Immun, 1982. **35**(3): p. 852-60.
  225. Sansonetti, P.J., et al., *Multiplication of Shigella flexneri within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis.* Infect Immun, 1986. **51**(2): p. 461-9.
  226. Sansonetti, P.J., et al., *Role of interleukin-1 in the pathogenesis of experimental shigellosis.* J Clin Invest, 1995. **96**(2): p. 884-92.
  227. Sansonetti, P.J., et al., *Infection of rabbit Peyer's patches by Shigella flexneri: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium.* Infect Immun, 1996. **64**(7): p. 2752-64.
  228. Sansonetti, P.J. and A. Phalipon, *M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process.* Semin Immunol, 1999. **11**(3): p. 193-203.
  229. Sansonetti, P.J., et al., *Caspase-1 activation of IL-1beta and IL-18 are essential for Shigella flexneri-induced inflammation.* Immunity, 2000. **12**(5): p. 581-90.
  230. Sansonetti, P.J., *Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(3): p. G319-23.
  231. Santos, C. and J.P. Ballesta, *The highly conserved protein P0 carboxyl end is essential for ribosome activity only in the absence of proteins P1 and P2.* J Biol Chem, 1995. **270**(35): p. 20608-14.
  232. Saraste, M., *Oxidative phosphorylation at the fin de siecle.* Science, 1999. **283**(5407): p. 1488-93.
  233. Sasakawa, C., et al., *Virulence-associated genetic regions comprising 31 kilobases of*

- the 230-kilobase plasmid in Shigella flexneri 2a*. J Bacteriol, 1988. **170**(6): p. 2480-4.
234. Schmidt, W.K., et al., *Endoplasmic reticulum membrane localization of Rce1p and Ste24p, yeast proteases involved in carboxyl-terminal CAAX protein processing and amino-terminal a-factor cleavage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(19): p. 11175-80.
235. Schultz, J., et al., *SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 5857-64.
236. Sehr, P., et al., *Glucosylation and ADP ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling*. Biochemistry, 1998. **37**(15): p. 5296-304.
237. Sekine, A., M. Fujiwara, and S. Narumiya, *Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase*. J Biol Chem, 1989. **264**(15): p. 8602-5.
238. Seko, T., et al., *Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle*. Circ Res, 2003. **92**(4): p. 411-8.
239. Semenkovich, C.F., *Regulation of fatty acid synthase (FAS)*. Prog Lipid Res., 1997. **36**(1): p. 43-53.
240. Sheterline, P., J. Clayton, and J. Sparrow, *Actin*. Protein Profile., 1995. **2**(1): p. 1-103.
241. Shiga, K., *Ueber den Dysenterie bacillus (Bacillus dysenteriae)*. Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, 1898. **24**: p. 817-824, 870-874, 913-918.
242. Shikada, Y., et al., *Higher expression of RhoC is related to invasiveness in non-small cell lung carcinoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(14): p. 5282-6.
243. Shimmura, S., et al., *Proteomic analysis of soluble factors secreted by limbal fibroblasts*. Mol Vis, 2006. **12**: p. 478-84.
244. Shin, H.W., et al., *Roles of ARFRP1 (ADP-ribosylation factor-related protein 1) in post-Golgi membrane trafficking*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 17): p. 4039-48.
245. Singer, R.H., G.L. Langevin, and J.B. Lawrence, *Ultrastructural visualization of cytoskeletal mRNAs and their associated proteins using double-label in situ hybridization*. J Cell Biol., 1989. **108**(6): p. 2343-53.
246. Skoudy, A., et al., *A functional role for ezrin during Shigella flexneri entry into epithelial cells*. J Cell Sci, 1999. **112** ( Pt 13): p. 2059-68.
247. Skoudy, A., et al., *CD44 binds to the Shigella IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells*. Cell Microbiol, 2000. **2**(1): p. 19-33.
248. Smith, J.L., et al., *Cytochrome bc complexes: a common core of structure and function surrounded by diversity in the outlying provinces*. Curr Opin Struct Biol, 2004. **14**(4): p. 432-9.
249. Snyder, J.T., et al., *Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(6): p. 468-75.
250. Somers, M., Y. Engelborghs, and J. Baert, *Analysis of the binding of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to microtubules, the mechanism of bundle formation and the linkage effect*. Eur J Biochem., 1990. **193**(2): p. 437-44.
251. Sorokina, E.M. and J. Chernoff, *Rho-GTPases: new members, new pathways*. J Cell Biochem, 2005. **94**(2): p. 225-31.
252. Speelman, P., I. Kabir, and M. Islam, *Distribution and spread of colonic lesions in shigellosis: a colonoscopic study*. J Infect Dis, 1984. **150**(6): p. 899-903.
253. Speidel, D., et al., *A family of Ca<sup>2+</sup>-dependent activator proteins for secretion: comparative analysis of structure, expression, localization, and function*. J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52802-9.
254. Speidel, D., et al., *CAPS1 regulates catecholamine loading of large dense-core vesicles*. Neuron, 2005. **46**(1): p. 75-88.
255. Steimle, P.A., et al., *Polyphosphoinositides inhibit the interaction of vinculin with actin filaments*. J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18414-20.
256. Stenlund, P., et al., *Capture and reconstitution of G protein-coupled receptors on a*

- biosensor surface. *Anal Biochem*, 2003. **316**(2): p. 243-50.
257. Stryer, L., *Biochemie*. 2003, Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akad. Verl.
258. Suwa, H., et al., *Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas*. *Br J Cancer*, 1998. **77**(1): p. 147-52.
259. Suzuki, T., S. Saga, and C. Sasakawa, *Functional analysis of Shigella VirG domains essential for interaction with vinculin and actin-based motility*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(36): p. 21878-85.
260. Suzuki, T., et al., *Rho family GTPase Cdc42 is essential for the actin-based motility of Shigella in mammalian cells*. *J Exp Med*, 2000. **191**(11): p. 1905-20.
261. Suzuki, T., et al., *A novel caspase-1/toll-like receptor 4-independent pathway of cell death induced by cytosolic Shigella in infected macrophages*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(14): p. 14042-50.
262. Sylvester, J.E., et al., *Mitochondrial ribosomal proteins: candidate genes for mitochondrial disease*. *Genet Med*, 2004. **6**(2): p. 73-80.
263. Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki, *Small GTP-binding proteins*. *Physiol Rev*, 2001. **81**(1): p. 153-208.
264. Takaishi, K., et al., *Translocation of activated Rho from the cytoplasm to membrane ruffling area, cell-cell adhesion sites and cleavage furrows*. *Oncogene*, 1995. **11**(1): p. 39-48.
265. Thirumalai, K., K.S. Kim, and A. Zychlinsky, *IpaB, a Shigella flexneri invasin, colocalizes with interleukin-1 beta-converting enzyme in the cytoplasm of macrophages*. *Infect Immun*, 1997. **65**(2): p. 787-93.
266. Tisdale, E.J., C. Kelly, and C.R. Artalejo, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with Rab2 and plays an essential role in endoplasmic reticulum to Golgi transport exclusive of its glycolytic activity*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(52): p. 54046-52.
267. Tobe, T., et al., *Transcriptional control of the invasion regulatory gene virB of Shigella flexneri: activation by virF and repression by H-NS*. *J Bacteriol*, 1993. **175**(19): p. 6142-9.
268. Tran Van Nhieu, G., A. Ben-Ze'ev, and P.J. Sansonetti, *Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin and the Shigella IpaA invasin*. *Embo J*, 1997. **16**(10): p. 2717-29.
269. Tran Van Nhieu, G., et al., *IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during Shigella entry into epithelial cells*. *Embo J*, 1999. **18**(12): p. 3249-62.
270. Tran Van Nhieu, G., et al., *Tyrosine kinase signaling and type III effectors orchestrating Shigella invasion*. *Curr Opin Microbiol*, 2005. **8**(1): p. 16-20.
271. Tsuji, T., et al., *ROCK and mDia1 antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts*. *J Cell Biol*, 2002. **157**(5): p. 819-30.
272. Tsukita, S., A. Nagafuchi, and S. Yonemura, *Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions*. *Curr Opin Cell Biol*, 1992. **4**(5): p. 834-9.
273. van der Goot, F.G., et al., *Rafts can trigger contact-mediated secretion of bacterial effectors via a lipid-based mechanism*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(46): p. 47792-8.
274. van Golen, K.L., et al., *Reversion of RhoC GTPase-induced inflammatory breast cancer phenotype by treatment with a farnesyl transferase inhibitor*. *Mol Cancer Ther*, 2002. **1**(8): p. 575-83.
275. van Hennik, P.B., et al., *The C-terminal domain of Rac1 contains two motifs that control targeting and signaling specificity*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(40): p. 39166-75.
276. Venkatesan, M.M., J.M. Buysse, and D.J. Kopecko, *Characterization of invasion plasmid antigen genes (ipaBCD) from Shigella flexneri*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(23): p. 9317-21.
277. Venkatesan, M.M. and J.M. Buysse, *Nucleotide sequence of invasion plasmid antigen gene ipaA from Shigella flexneri 5*. *Nucleic Acids Res*, 1990. **18**(6): p. 1648.
278. Venkatesan, M.M., et al., *Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of Shigella flexneri*. *Infect Immun*, 2001. **69**(5): p. 3271-85.
279. Wallar, B.J. and A.S. Alberts, *The formins: active scaffolds that remodel the*

- cytoskeleton. *Trends Cell Biol*, 2003. **13**(8): p. 435-46.
280. Wang, H.R., et al., *Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation*. *Science*, 2003. **302**(5651): p. 1775-9.
281. Wang, W., et al., *Expression and significance of RhoC gene in hepatocellular carcinoma*. *World J Gastroenterol*, 2003. **9**(9): p. 1950-3.
282. Wassef, J.S., D.F. Keren, and J.L. Mailloux, *Role of M cells in initial antigen uptake and in ulcer formation in the rabbit intestinal loop model of shigellosis*. *Infect Immun*, 1989. **57**(3): p. 858-63.
283. Watanabe, N., et al., *p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin*. *Embo J*, 1997. **16**(11): p. 3044-56.
284. Watarai, M., S. Funato, and C. Sasakawa, *Interaction of Ipa proteins of Shigella flexneri with alpha5beta1 integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells*. *J Exp Med*, 1996. **183**(3): p. 991-9.
285. Watarai, M., et al., *rho, a small GTP-binding protein, is essential for Shigella invasion of epithelial cells*. *J Exp Med*, 1997. **185**(2): p. 281-92.
286. Weaver, A.M., et al., *Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation*. *Curr Biol*, 2001. **11**(5): p. 370-4.
287. Weed, S.A., et al., *Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex*. *J Cell Biol*, 2000. **151**(1): p. 29-40.
288. Wei, J., et al., *Complete genome sequence and comparative genomics of Shigella flexneri serotype 2a strain 2457T*. *Infect Immun*, 2003. **71**(5): p. 2775-86.
289. Wei, Y., et al., *Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications*. *Nat Struct Biol*, 1997. **4**(9): p. 699-703.
290. Weinrauch, Y., et al., *Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria*. *Nature*, 2002. **417**(6884): p. 91-4.
291. Wen, Y.D., et al., *Histone deacetylase 3 binds to and regulates the multifunctional transcription factor TFII-I*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(3): p. 1841-7.
292. Wennerberg, K. and C.J. Der, *Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it)*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 8): p. 1301-12.
293. Wera, S. and B.A. Hemmings, *Serine/threonine protein phosphatases*. *Biochem J*, 1995. **311** ( Pt 1): p. 17-29.
294. Wheeler, A.P. and A.J. Ridley, *Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility*. *Exp Cell Res*, 2004. **301**(1): p. 43-9.
295. Williams, C.L., *The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: a regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences*. *Cell Signal*, 2003. **15**(12): p. 1071-80.
296. Wiltschi, B., W. Knoll, and E.K. Sinner, *Binding assays with artificial tethered membranes using surface plasmon resonance*. *Methods*, 2006. **39**(2): p. 134-46.
297. Witkowski, A., et al., *Head-to-head coiled arrangement of the subunits of the animal fatty acid synthase*. *Chem Biol*, 2004. **11**(12): p. 1667-76.
298. Worthylake, R.A. and K. Burridge, *RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(15): p. 13578-84.
299. Xu, J., et al., *Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils*. *Cell*, 2003. **114**(2): p. 201-14.
300. Yamamoto, Y., et al., *Direct binding of the human homologue of the Drosophila disc large tumor suppressor gene to seven-pass transmembrane proteins, tumor endothelial marker 5 (TEM5), and a novel TEM5-like protein*. *Oncogene*, 2004. **23**(22): p. 3889-97.
301. Yang, F., et al., *Identification of an actin-binding protein from Dictyostelium as elongation factor 1a*. *Nature*, 1990. **347**(6292): p. 494-6.
302. Yang, F., et al., *Genome dynamics and diversity of Shigella species, the etiologic agents of bacillary dysentery*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(19): p. 6445-58.
303. Yang, T.T., L. Cheng, and S.R. Kain, *Optimized codon usage and chromophore*

- mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein.* Nucleic Acids Res, 1996. **24**(22): p. 4592-3.
304. Yang, W.M., et al., *Functional domains of histone deacetylase-3.* J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9447-54.
305. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing, *Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.* Gene, 1985. **33**(1): p. 103-19.
306. Yen, H.C. and E.C. Chang, *Yin6, a fission yeast Int6 homolog, complexes with Moe1 and plays a role in chromosome segregation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14370-5.
307. Yoshida, S., et al., *Shigella deliver an effector protein to trigger host microtubule destabilization, which promotes Rac1 activity and efficient bacterial internalization.* Embo J, 2002. **21**(12): p. 2923-35.
308. Yoshino, A., et al., *tGolgin-1 (p230, golgin-245) modulates Shiga-toxin transport to the Golgi and Golgi motility towards the microtubule-organizing centre.* J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 10): p. 2279-93.
309. Zara, V., et al., *Further insights into the assembly of the yeast cytochrome bc1 complex based on analysis of single and double deletion mutants lacking supernumerary subunits and cytochrome b.* Eur J Biochem, 2004. **271**(6): p. 1209-18.
310. Zetterqvist, O., et al., *The minimum substrate of cyclic AMP-stimulated protein kinase, as studied by synthetic peptides representing the phosphorylatable site of pyruvate kinase (type L) of rat liver.* Biochem Biophys Res Commun, 1976. **70**(3): p. 696-703.
311. Zhang, F.L. and P.J. Casey, *Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences.* Annu Rev Biochem, 1996. **65**: p. 241-69.
312. Zhang, X., et al., *Histone deacetylase 3 (HDAC3) activity is regulated by interaction with protein serine/threonine phosphatase 4.* Genes Dev, 2005. **19**(7): p. 827-39.
313. Ziegler, A., et al., *Protein transduction domains of HIV-1 and SIV TAT interact with charged lipid vesicles. Binding mechanism and thermodynamic analysis.* Biochemistry, 2003. **42**(30): p. 9185-94.
314. Zobiack, N., et al., *Cell-surface attachment of pedestal-forming enteropathogenic E. coli induces a clustering of raft components and a recruitment of annexin 2.* J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 1): p. 91-8.
315. Zou, A., et al., *Distribution and functional properties of human KCNH8 (Elk1) potassium channels.* Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(6): p. C1356-66.
316. Zychlinsky, A., M.C. Prevost, and P.J. Sansonetti, *Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages.* Nature, 1992. **358**(6382): p. 167-9.
317. Zychlinsky, A., et al., *In vivo apoptosis in Shigella flexneri infections.* Infect Immun, 1996. **64**(12): p. 5357-65.



## **Lebenslauf**

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

## **Erklärung**

„Ich, Tilman Huppertz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Charakterisierung der Rekrutierungsdomäne der kleinen Rho-GTPasen RhoA und RhoC, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift