

Universität Ulm

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Leiter: Prof. Dr. Peter Gierschik

Regulation der Phospholipase C- γ -Isoenzyme

PLC γ_1 und PLC γ_2 durch den

Rho-Guaninnukleotidaustauschfaktor Vav1

und die Rho-GTPase Rac2

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Ulm

Vorgelegt von

Manuel Krämer,

geb. in Regensburg

2015

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Gierschick

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Schumacher

Tag der Promotion: 09.07.2015

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung.....	1
1.1. Allgemeine Einführung.....	1
1.2. Transmembranrezeptoren.....	1
1.2.1. Ligandengesteuerte Ionenkanäle.....	2
1.2.2. Proteintyrosinkinasen.....	2
1.2.3. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	3
1.2.4. Guaninnukleotid-bindende-Proteine.....	5
1.3. Inositphospholipid-spezifische Phospholipase - C – Enzyme.....	6
1.3.1. Allgemeine Einführung.....	6
1.3.2. Einteilung und Struktur der Phospholipase - C – Isoenzyme.....	7
1.3.3. Regulation von Phospholipase- C- γ -Isoenzymen.....	10
1.3.4. Expression und Funktionen von PLC γ_1	13
1.3.5. Expression und Funktionen von PLC γ_2	14
1.4. Rho-GTPasen.....	16
1.4.1. Struktur und Regulation.....	16
1.4.2. Biologische Funktionen von Rho-GTPasen.....	18
1.5. Rho-Guaninnukleotidaustauschfaktoren.....	20
1.5.1. Allgemeine Einführung.....	20
1.5.2. Vav-Proteine.....	21
1.5.3. Struktur und Regulation von Vav1.....	24
1.6. Ziele der Arbeit.....	27
2. Material und Methoden.....	29
2.1. Material.....	29
2.1.1. Chemikalien und biochemische Reagenzien.....	29
2.1.2. Radioaktiv markierte Chemikalien.....	31
2.1.3. Enzyme, Kits und molekularbiologische Materialien.....	31
2.1.4. Verbrauchsmaterialien.....	31
2.1.5. Pro- und eukaryotische Zellstämme.....	32
2.1.6. Oligonukleotide.....	32

2.1.7. Vorhandene Plasmide-DNA-Konstrukte.....	34
2.1.8. Antikörper.....	34
2.1.9. Geräte.....	35
2.1.10. Elektronische Datenverarbeitung.....	36
2.2. Methoden.....	37
2.2.1. Mikrobiologische Methoden.....	37
2.2.2. Molekularbiologische Methoden.....	40
2.2.3. Eukaryotische Zellen.....	47
2.2.4. SDS-PAGE.....	50
2.2.5. Immunblotting von Proteinen (<i>Western blotting</i>).....	53
2.2.6. Bestimmung der Phospholipase - C - Aktivität in COS-7- und HEK293-Zellen.....	54
2.3. Darstellung der Ergebnisse.....	57
3. Ergebnisse.....	58
3.1. Herstellung von Vektoren zur Expression der Fremdproteine Vav1 ^{ΔN} , Vav1 ^{ΔN/Q331A} , Vav1 ^{ΔN/D376A} , Vav1 ^{ΔN/E378A} und Vav1 ^{ΔN/T617} in eukaryotischen Zellen.....	58
3.2. Einfluss von Vav1 ^{ΔN} auf die Aktivität der Phospholipase- C-γ ₁ und Phospholipase- C-γ ₂ in COS-7-Zellen.....	63
3.3. Einfluss von Rac2 auf die Vav1 ^{ΔN} -vermittelte Stimulation von PLCγ ₂ und PLCγ ₁ in Abhängigkeit von der Menge an Rac2.....	66
3.4. Einfluss von Vav1 ^{ΔN} und der Mutanten Vav1 ^{ΔN/Q331A} , Vav1 ^{ΔN/D376A} , Vav1 ^{ΔN/E378A} und Vav1 ^{ΔN/T617} auf die Aktivität der Isoenzyme PLCγ ₁ und PLCγ ₂ in An- und Abwesenheit von Rac2 in COS-7-Zellen.....	72
3.5. Einfluss von Vav1 ^{ΔN} und der Mutanten Vav1 ^{ΔN/Q331A} , Vav1 ^{ΔN/D376A} , Vav1 ^{ΔN/E378A} und Vav1 ^{ΔN/T617} auf die Aktivität der Isoenzyme PLCγ ₁ und PLCγ ₂ in An- und Abwesenheit von Rac2 in HEK293-Zellen.....	81
4. Diskussion.....	89
5. Zusammenfassung.....	100
6. Literaturverzeichnis.....	102
Danksagung	116
Lebenslauf.....	117

Abkürzungsverzeichnis

λ	Wellenlänge
°C	Grad Celsius
5-HT	Serotonin
Abb.	Abbildung
Abl	<i>abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
ABP	Aktin-bindendes Protein
Ach	Acetylcholin
Ack	<i>activated CDC 42 kinase</i>
Amp.	Ampicillin
AML	akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCR	<i>B-cell receptor</i>
Blk	<i>B lymphoid tyrosine kinase</i>
BLNK	B-Zell-Linker-Protein
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
Ca^{2+}	Calciumion(en)
Cdc	<i>celldivision cycle protein</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Cl^-	Chloridion(en)
CO_2	Kohlendioxid
COS-7-Zellen	<i>African green monkey kidney cells</i> (Zelllinie)
cpm	<i>counts per minute</i>
C-terminal	carboxyterminal
CR3	<i>conserved region 3</i>
Crk	Adaptermolekül
Csk	<i>C-Scr kinase</i>
Da	Dalton
DAG	1,2-Diacyl-sn-glycerin
Dbl	<i>diffuse B-cell-lymphoma</i>

DH	<i>Dbl-homology</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	2'- 3'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EcoRI	ein Restriktionsenzym
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EPO	Erythropoetin
Fak	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
Fes	<i>feline sarcoma oncogene</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FRG	<i>rho guanine nucleotide exchange factor FRG</i>
Frk	<i>Fyn-related kinase</i>
Fyn	Tyrosinkinase
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
GABA	Gammaaminobuttersäure
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GDI	<i>GDP dissociation inhibitor</i>
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GH	growth hormone
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
Grb2	<i>growth factor receptor bound protein 2</i>
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
Gβγ	βγ-Dimer eines heterotrimeren G-Proteins
Gα	α-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins

Gβ	β-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
h	<i>hour</i>
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HindIII	Restriktionsenzym
HMW	<i>high molecular weight</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP ₃	D- <i>myo</i> -Inosit-1,4,5-trisphosphat
IQGAP	<i>IQ-motif-containing GTPase-activating protein</i>
	<i>homologue</i>
Jak	Januskinase
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
K ⁺	Kaliumion(en)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LiCl	Lithiumchlorid
LMW	<i>low molecular weight</i>
Lyn	<i>Lck/Yes-related novel tyrosine kinase</i>
M	Mol pro Liter
m/V	Masse pro Volumen
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Mg ²⁺	Magnesiumion(en)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
Na ⁺	Natriumion(en)
NADPH	reduziertes Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nck	<i>non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein</i>
ng	Nanogramm

NGFR	<i>nerve growth factor receptor</i>
nm	Nanometer
NRPTKs	Nichtrezeptor-Proteintyrosinkinasen
N-terminal	aminoterminal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	<i>p21-activated protein kinase</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
pcDNA	Expressionsvektor für Säugetierzellen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
pH	pH-Wert
PH	<i>pleckstrin homology</i>
Phe	Phenylalanin
P _i	anorganisches Phosphat
PI3K	Phosphatidylinosit-3-Kinase
PIP	Phosphatidylinosit-3-phosphat
PIP ₂	Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinosit-3,4,5-triphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PTB	<i>phosphotyrosine binding domain</i>
Rab	Ras in the brain
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
Ran	<i>Ras-related nuclear protein</i>
Ras	<i>rat sarcoma protein</i>
Rho	<i>Ras-homologous protein</i>
Rho-GAPs	<i>Rho-GTPase-activating proteins</i>
Rho-GDIs	<i>Rho GDP dissociation inhibitors</i>
Rho-GEFs	<i>Rho guanine nucleotide exchange factors</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPTKs	Rezeptor-Proteintyrosinkinasen
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde

Sar	<i>secretion-associated, Ras-related protein</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	<i>Src homology</i>
Shc	Adapterprotein
Src	<i>sarcoma tyrosine kinase</i>
Syk	<i>spleen tyrosin kinase</i>
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
Tec	Tyrosinkinase
Tiam	<i>T-lymphoma invasion- and metastasis-inducing protein</i>
T_m	<i>melting temperature</i>
Trp	Tryptophan
Tween	Polyoxyethylensorbitan-monolaurat
Tyr	Tyrosin
U	<i>unit</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
Val	Valin
Vav	ein Guaninnukleotidaustauschfaktor
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VT	Volumenteil
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
Wnt	Signaltransduktionsweg
XmnI	ein Restriktionsenzym
ZAP-70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>
ZF	Zink-Finger(-Region)
μ l	Mikroliter

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Einführung

Jede Form von Leben, angefangen von der Mikrobe bis hin zum komplexen Organismus *Homo sapiens*, unterliegt einem steten Wechselspiel mit seiner Umwelt. Um dieser Gegebenheit gerecht zu werden, bedarf es einer permanenten Anpassung eines Lebewesens, sowohl als Ganzes als auch seiner kleinsten Einheiten, den Zellen. Zur Gewährleistung der zellulären Flexibilität muss sowohl ein Informationsaustausch unter den Zellen als auch eine übergeordnete Regulierung und Koordination stattfinden. Hierfür stehen dem Körper zwei grundlegende Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen die physikalische Reizleitung in Form von Aktionspotentialen und Ladungsunterschieden an Zellmembranen und zum anderen die chemische Übermittlung von Signalen. Für letztere haben sich im Laufe der Evolution eine ganze Reihe an Botenstoffen wie Hormone und Zytokine entwickelt, die spezifisch an ihre jeweiligen Rezeptoren binden und so eine Signalkaskade in der Zelle auslösen.

1.2. Transmembranrezeptoren

Wie der Name bereits sagt, befinden sich diese Art von Rezeptoren auf der Zellmembran und setzen nach ihrer Aktivierung eine Signalkaskade ins Innere der Zelle in Gang. Diese Art von Rezeptoren bildet jedoch keine einheitliche Gruppe, sondern man muss drei Typen unterscheiden. Eine Gruppe stellen die Liganden-gesteuerten Ionenkanäle dar, die für eine sehr schnelle Übertragung von Informationen sorgen, wie es z.B. zwischen Gehirn und Skelettmuskulatur der Fall sein muss. Daneben gibt es die Proteintyrosinkinasen, die sich wiederum in zwei Untergruppen aufteilen lassen und heute zu Tage eine große Rolle in der Tumorforschung spielen. Und nicht zuletzt die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), die die größte Gruppe der Transmembranrezeptoren bilden. Sie sind derzeit vor allem aus pharmakologischer Sicht im Fokus der Wissenschaft.

1.2.1. Ligandengesteuerte Ionenkanäle

Diese ionotropen Transmembranrezeptoren findet man typischerweise an neuromuskulären Endplatten, anhand derer man exemplarisch ihre Funktionsweise erklären kann. Nikotinische Acetylcholinrezeptoren sind Kationen-selektive Ionenkanäle, die aus fünf Untereinheiten bestehen, die zusammen eine Pore bilden. Zusammen bilden die Untereinheiten zwei orthosterische Bindungsstellen für den entsprechenden Liganden (Wells et al. 2008). Durch die Bindung von ACh kommt es zu einer Konformationsänderung und folglich zu einer Öffnung des Rezeptors, was zu einem Einstrom von Kationen führt. Allerdings sind die Rezeptoren nicht Ionen-selektiv. Wegen der unterschiedlichen Ionenverteilung im Körper kommt es vor allem zu einem Einstrom von Ca^{2+} und Na^{+} in die Muskelzelle, was deren Depolarisation zur Folge hat. Nachdem sich der Ligand vom Rezeptor gelöst hat, schließt sich dieser wieder und die Zelle wird durch aktive Transportvorgänge wieder repolarisiert (Burgis 2008). Weitere Beispiele für Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, wie man sie typischerweise im ZNS findet, sind ionotrope GABA-Rezeptoren (GABA_A - und GABA_C -Rezeptoren) (Sieghart 1995) oder der Serotonin-Rezeptor 5-HT_3 (Hoyer et al. 1994).

1.2.2. Proteintyrosinkinasen

Es gibt zwei Arten von Tyrosinkinasen, zum einen die membrangebundenen Tyrosinkinasen, die eine Rezeptorfunktion aufweisen, die Rezeptor-Proteintyrosinkinasen (RPTKs), und zum anderen die intrazellulären Tyrosinkinasen, auch Nichtrezeptor-Proteintyrosinkinasen (NRPTKs) genannt. Proteintyrosinkinasen entfalten ihre physiologische Funktion, indem sie ihre Zielmoleküle phosphorylieren. Diese Phosphorylierung kann sowohl hemmender als auch aktivierender Natur sein (Müller-Tidow et al. 2007, Schlessinger 2000). Es gibt insgesamt mindestens 58 RPTKs und 32 NRPTKs, die wiederum in Subklassen unterteilt werden (Robinson et al. 2000). Die Aktivierung von RPTKs durch ihre Liganden hat häufig eine Homo- oder Heterodimerisierung zur Folge. Typische Liganden für diese Art von Rezeptoren sind Wachstumsfaktoren, EPO, Insulin, EGF, FGF, VEGF und PDGF. Die durch den Prozess der Ligandenbindung dimerisierten Rezeptoren phosphorylieren sich nun gegenseitig (Autophosphorylierung) an Tyrosinresten des intrazellulären Anteils des Rezeptors. An diese phosphorylierten Stellen können sich nun Adapter- oder Signalproteine anlagern. Zu

diesen Signalproteinen gehören Tec-, Src- oder Syk-Kinasen sowie Isoformen der Phospholipase C- γ . Weitere Beispiele sind Ras-GTPase-aktivierende Proteine, Rho-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren oder Phosphatidylinosit-3-Kinasen (PI3K) (Schlessinger 2000, Robinson et al. 2000). Aus der Familie der Adapterproteine wären Grb2, Crk, Shc und Nck zu nennen, die sich mit Hilfe ihrer SH2-, SH3-, oder ihrer PTB-Domänen an den phosphorylierten, zytoplasmatischen Teil des Rezeptors anlagern (Schlessinger et al. 2000, Rhee 2001). NRPTKs haben dagegen keine Rezeptorfunktion, sondern kommen im Zytoplasma vor und binden von dort an ihre jeweiligen Rezeptoren. Zu diesen Rezeptoren gehören Zytokinrezeptoren, Rezeptoren von Lymphozyten wie die T- und B-Zell-Antigenrezeptoren (TCR und BCR) oder Integrinrezeptoren. Vertreter der Familie der NRPTK sind Csk-, Src-, Syk-, Tec-, Jak-, Fak-, Abl-, Frk- und Ack-Tyrosinkinasen (Tsygankov 2003). Durch diese Anlagerung werden sie selber aktiviert und phosphorylieren ihre Zielmoleküle. Zu den Effektoren der NRPTK gehört u.a. Phospholipase C- γ -Isoformen, PI3K und Rho-GEFs wie FRG, Vav1, Vav2 oder Tiam1 (Kurosaki et al. 2001, Cruz-Orcutt et al. 2009, Crespo et al. 1997, Teramoto et al. 1997, Miyamoto et al. 2003). RPTKs spielen heute zu Tage vor allem in der Tumorbilogie eine große Rolle. So hat man bei verschiedensten Tumoren onkogen aktivierte Tyrosinkinasen gefunden, die für das Tumorstadium essentiell sind und versucht nun infolgedessen diese gezielt zu hemmen. Als Beispiel wäre die Hemmung der Neoangiogenese von Tumoren zu nennen und die Rolle des VEGF (Winder et al. 2010). Oder das Medikament Imatinib, das unter anderem bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) seit Jahren sehr erfolgreich angewendet wird, bei der die entarteten Leukozyten sehr häufig das sogenannte Philadelphia-Chromosom aufweisen.

1.2.3. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Wie bereits bemerkt, stellen GPCRs die größte und heterogenste Gruppe unter den Transmembranrezeptoren dar. Darüber hinaus umfasst die Rezeptorfamilie etwa 1000 Mitglieder, die wiederum aufgrund von Gemeinsamkeiten in ihrer Nukleotidsequenz in drei Subfamilien, A, B und C unterteilt werden (Ritter et al. 2009). Auch pharmakologisch spielen sie eine wichtige Rolle, da etwa 30 % aller Medikamente ihre Wirkung über GPCRs entfalten (Hill 2006, Ritter et al. 2009). So ist es nicht verwunderlich, dass sie bereits heute in der Medizin die größte Gruppe an therapeutischen Zielmolekülen darstellen (Stallaert et al. 2012). Als Beispiele sind hier die Adrenorezeptoren, wie der β_2 -

Adrenozeptor zu nennen oder die Gruppe der Histaminrezeptoren, deren Beeinflussung eine immer größere Bedeutung gewinnt (Nishida et al. 2010, Burgis 2008). Als Beispiel dafür wären Asthmaerkrankungen zu nennen, die in westlich geprägten Gesellschaften stark zunehmen und deren Therapie unter anderem in der Gabe von β 2-Adrenozeptor-Agonisten und Histaminrezeptor-Antagonisten besteht. Darüber hinaus vermitteln diese Rezeptoren die Reize des Seh- und Geruchssinns oder Reize des autonomen Nervensystems, um nur ein paar wichtige, physiologische Bedeutungen zu nennen. Gerade in Bezug auf die Weiterleitung von Signalen des autonomen Nervensystems versucht man heute durch verschiedenste Medikamente Einfluss zu nehmen, wie beispielsweise den Beta-Adrenorezeptor-Antagonisten (Betablocker), die zu den am meist verordneten Medikamenten der heutigen Zeit gehören (Burgis 2008).

GPCRs gehören zur Superfamilie der heptahelikalen Transmembranproteine, sie werden dementsprechend auch Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren genannt. Das Polypeptid besteht aus sieben Segmenten mit helikaler Struktur, die die Zellmembran sieben Mal, in abwechselnder Richtung, durchstoßen. Daraus ergeben sich drei intra- und drei extrazelluläre Rezeptorschleifen (Palczewski et al. 2000). Der N-Terminus des Rezeptors befindet sich extrazellulär, wohingegen sich der C-Terminus auf der zytoplasmatischen Seite befindet (Gether et al. 1998). Die äußeren Schleifen bilden in der Regel die Bindungsstelle für ihre jeweiligen Liganden, indem sie eine ringförmige Tasche bilden. Die inneren Schleifen weisen Anlagerungsstellen für die heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden Proteine (G-Proteine) und andere Signal- bzw. Adaptermoleküle auf. Heterotrimere G-Proteine bestehen aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit, wobei die beiden zuletzt genannten Untereinheiten wiederum ein Dimer bilden, welches als $G\beta\gamma$ -Dimer bezeichnet wird. Die α -Untereinheit besitzt die Fähigkeit, GTP zu binden und es zu GDP zu hydrolysieren. Bindet nun ein Ligand an den GPCR, dann führt dies zur Freisetzung des an die α -Untereinheit gebundenen GDP. Die somit freigewordene Bindungsstelle auf der α -Untereinheit wird wieder mit GTP besetzt, mit der Folge, dass das heterotrimere G-Protein in seine Untereinheiten dissoziiert (Marinissen et al. 2001). Die einzelnen Untereinheiten können durch eine Reihe von Signalwegen Informationen in die Zelle weiterleiten und so zu einer zellulären Reaktion auf äußere Stimuli führen. Nun lassen sich aber die Effekte von GPCR nicht nur durch die Aktivierung von G-Proteinen erklären, sondern es gibt auch Beispiele für alternative, also G-Protein-unabhängige Signalwege (Rasmussen et al. 2011). Als Beispiel lassen sich die Frizzled-Rezeptoren anführen, die durch den Wnt-Signalweg den Abbau von β -Catenin

blockieren (Verkaar 2008). Zu erwähnen sei an dieser Stelle das „*extended ternary complex model*“, welches besagt, dass ein Teil der Rezeptoren auch ohne Liganden aktiv ist und G-Proteine aktivieren kann, also konstitutiv aktiv ist (Rasmussen et al. 2011). Rezeptoragonisten und sogenannte inverse Rezeptoragonisten verschieben also lediglich das Gleichgewicht von aktiven und inaktiven Rezeptoren in Richtung aktiviert bzw. inaktiviert (Gether et al. 1998).

1.2.4. Guaninnukleotid-bindende-Proteine

Alle G-Proteine verbindet die Eigenschaft, GTP bzw. GDP binden zu können. Grob unterscheidet man sie in heterotrimere und kleine G-Proteine (Nishida 2011, Takai et al. 2001, Cabrera et al. 2003). Heterotrimere G-Proteine sind Polypeptide, die aus drei Untereinheiten bestehen, einer α -, β - und γ -Untereinheit, die im inaktiven Zustand aus diesen drei Untereinheiten zusammen mit GDP ein Trimer bilden. Kommt es zu einer Aktivierung des Rezeptors, wird GDP gegen GTP ausgetauscht und das Polypeptid zerfällt in seine Untereinheiten, wobei die $G\alpha$ -Untereinheit als Monomer und die β - und γ -Untereinheit als Dimer ($G\beta\gamma$ -Dimer) im weiteren Signaltransduktionsprozess fungieren. Beide, sowohl die $G\alpha$ -Untereinheit als auch das $G\beta\gamma$ -Dimer spielen bei der weiteren Signaltransduktion eine wichtige Rolle, jedoch induzieren die beiden Botenstoffe verschiedene Signalwege. So scheint zum Beispiel das $G\beta\gamma$ -Dimer bei der Wiederherstellung der Barrierefunktion von Endothelzellen nach einer Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle zu spielen (Knezevic et al. 2009). Darüber hinaus scheint dieses Dimer auch *inward rectifier*-Kanäle (K_{ir}), zu öffnen (Osawa et al. 2009). K_{ir} -Kanäle sind Kaliumkanäle, die z.B. am Herzen vorkommen. Besondere Bedeutung kommt jedoch der $G\alpha$ -Untereinheit zu, nicht nur weil sie die GTPase-Funktion innehat, sondern weil es auch mehr als 20 verschiedene Isoformen gibt, die ganz unterschiedliche Funktionen wahrnehmen (Mizuno et al. 2009). Dennoch darf man diese einzelnen Subfamilien und die von ihnen aktivierten Signalwege nicht als völlig separat voneinander betrachten. Zahlreiche Beispiele zeigen, dass es verschiedene Schnittstellen und gemeinsame Endstrecken gibt (Gu et al. 2002).

Neben den heterotrimeren G-Proteinen stellt auch die Superfamilie der kleinen G-Proteine ein wichtiges Forschungsgebiet dar. Zu dieser Superfamilie gehören mehr als 100 Mitglieder, die wiederum in fünf Subfamilien unterteilt werden, die Ras-, Rho-, Rab-,

Sar1/Arf- und Ran-Familie (Takai et al. 2001). Entsprechend ihrer Vielzahl, haben kleine G-Proteine auch unterschiedliche biologische Funktionen inne. So ist bekannt, dass Proteine der Ras-Familie an der Regulation der Genexpression beteiligt sind, wohingegen Mitglieder der Rho-Familie zusätzlich eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Zytoskeletts spielen (Takai et al. 2007). Da kleine G-Proteine auch in dieser Arbeit von großer Bedeutung sind, werden sie in Kapitel 1.4. genauer beschrieben.

1.3. Inositphospholipid-spezifische Phospholipase- C-Enzyme

1.3.1. Allgemeine Einführung

PLC-Enzyme spielen bei vielen und größtenteils sehr unterschiedlichen Prozessen in unserem Körper eine wichtige Rolle. Ihre immense Bedeutung für unseren Organismus zeigt sich bereits daran, dass sie durch eine ganze Bandbreite von Transmembranrezeptoren aktiviert werden können. Zu ihren Transmembranrezeptoren gehören hauptsächlich G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wie α_1 -Adrenozeptoren, H_1 -Histamin-Rezeptoren und $5HT_2$ -Rezeptoren, aber auch Tyrosinkinase-Rezeptoren wie der PDGF-Rezeptor (Rebecchi et al. 2000). Eine der wichtigsten Aufgaben von PLC-Enzymen besteht in der enzymatischen Spaltung des Membranphospholipids Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu D-myoinosit-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und 1,2-Diacyl-sn-glycerin (DAG). IP_3 und DAG werden als *second messenger* bezeichnet, was bedeutet, dass sie das Primärsignal des Rezeptors in die Zelle fortleiten (Harden et al. 2006). IP_3 sorgt für eine rasche Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem endoplasmatischen bzw. sarkoplasmatischen Retikulum glatter Muskelzellen, was eine Kontraktion selbiger nach sich zieht. Dies erfolgt über Ionenkanäle, die durch IP_3 -reguliert werden (Putney 2009). DAG hingegen aktiviert Proteinkinase C-Enzyme und hat zudem eine negativ-regulatorische Wirkung auf Rac-Signalwege (Wang et al. 2006). Proteinkinase C ist ein Ca^{2+} -abhängiges Enzym, das eine zentrale Funktion in der Zellteilung und Proliferation einnimmt, ebenso wird eine tragende Rolle bei der Signaltransduktion von Lymphozyten vermutet. Zum anderen spielt es aber auch, wie neuere Studien zeigen, eine gewichtige Rolle bei der Entstehung von Spätkomplikationen im Rahmen eines Diabetes mellitus. Dabei hat sich gezeigt, dass Proteinkinase C-Enzyme bezüglich der Mikroangiopathie und der extrazellulären

Matrixsynthese stark an deren Pathogenese beteiligt sind, was wiederum für zahlreiche Komplikationen wie die diabetische Nephropathie und die Retinopathie sowie Durchblutungsstörungen verantwortlich ist (Geraldes et al. 2010).

1.3.2. Einteilung und Struktur der Phospholipase- C-Isoenzyme

PLC-Enzyme sind lösliche Enzyme mit mehreren Domänen. Nach bisherigem Wissenstand umfasst diese Familie sechs Isoenzymgruppen, β (PLC β_{1-4}), γ (PLC γ_{1-2}), δ (PLC $\delta_{1, 3-4}$), ϵ (PLC ϵ), ζ (PLC ζ) und η (PLC η_{1-2}) (Rebecchi et al. 2000, Katan 2005, Harden et al. 2006). Insgesamt sind bis heute 13 Mitglieder dieser Enzymfamilie bekannt. Bezüglich ihrer Struktur ist die etwa 100 Aminosäuren lange PH-Domäne am N-Terminus der PLC-Enzyme von großer Bedeutung. Sie ermöglicht die Bindung von Inositphosphaten und ermöglicht dadurch die Membranverankerung. Jedoch sind die Aminosäuresequenzen der PH-Domänen in den einzelnen Untergruppen teilweise abweichend. Eine Erklärung hierfür dürfte vermutlich in der unterschiedlichen Regulierung der einzelnen Enzyme liegen (Rebecchi et al. 2000). Eine Ausnahme bildet PLC ζ , welche keine PH-Domäne besitzt. Die Sequenzunterschiede in den PH-Domänen haben auch Auswirkungen auf die Bindungspartner der jeweiligen PLC-Enzyme. So binden an die PH-Domäne von PLC β_2 die $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteinen, was sich regulatorisch auf die Enzymaktivität auswirkt (Harden et al. 2006). Eine weitere, Isotyp-spezifische Aktivierung von PLC β_2 , wird durch die Bindung an Rac- und Cdc42-GTPasen vermittelt. In diesem Fall interagiert beispielsweise die PH-Domäne mit den *switch I*- und *switch II*-Regionen von Rac1 (Jezyk et al. 2006). Ferner interagiert die PH-Domäne der PLC γ_1 mit Phosphatidylinosit-3,4,5-trisphosphat (PIP $_3$), was beispielsweise für die PI3K-abhängige Translokation und Aktivierung von PLC γ_1 verantwortlich sein könnte (Rebecchi et al 2000, Rhee 2001, Harden et al 2006). Die PH-Domäne der PLC δ hat indes für IP $_3$ eine hohe Affinität, ebenso wie für PIP $_2$ (Rebecchi et al. 2000). Strukturanalysen haben gezeigt, dass im Anschluss an die PH-Domäne eine *EF-hand*-Domäne folgt, die sich aus 4 *EF-hand*-Motiven zusammensetzt. Auch hier gibt es wieder eine Ausnahme, bei PLC ϵ besteht sie nur aus 2 *EF-hand*-Motiven. Über die Funktion der *EF-hand*- Domänen ist bisher nur wenig bekannt. In Versuchen mit PLC ζ -Varianten, die Deletionen in dieser Region aufwiesen, hat sich eine deutliche Einschränkung der Ca $^{2+}$ -Bindungsfähigkeit des Enzyms gezeigt (Kouchi et al. 2005). Der *EF-hand*-Domäne folgen die X- und Y-Subdomänen, die allen Mitgliedern der Enzymfamilie gemein sind. Der X- und Y-Domäne kommt die

entscheidende Funktion des Proteins zu, da sie, aufgebaut aus alternierenden α -Helices und β -Faltblättern das aktive Zentrum des Enzyms darstellt und somit die katalytische Funktion besitzt (Rebecchi et al. 2000). Damit die katalytische Funktion, die das Herzstück jedes Enzyms bildet und somit die biologische Aufgabe des Proteins charakterisiert, gewährleistet ist, ist die Aminosäuresequenz dieser Domänen hoch konserviert. In diesem Zusammenhang sei auch Ca^{2+} zu nennen, welches als essentieller Kofaktor für die katalytische Funktion von PLC-Enzymen fungiert. Ca^{2+} -Ionen binden an spezifische Aminosäurereste der X- und Y-Domäne und sind sowohl für die katalytische Funktion als auch für die Substraterkennung des Enzyms wichtig. Dieser Zusammenhang wurde nicht zuletzt durch Versuche mit der $\text{PLC}\gamma$ ermittelt (Rhee 2001). Da die Subfamilie der $\text{PLC}\gamma$ in dieser Arbeit einen entscheidenden Anteil hat, wird hier näher auf die Struktur dieser Enzyme eingegangen. Die beiden PLC-Isoenzyme weisen als Besonderheit zwei PH-Domänen auf, eine N-terminal und eine zwischen den beiden katalytischen Subdomänen X und Y gelegene. Die zweite PH-Domäne wird darüber hinaus durch zwei SH2 und eine SH3-Domäne unterbrochen (Rhee 2001). Allgemein kann man sagen, dass SH2-Domänen an phosphorylierte Tyrosinreste binden, wohingegen SH3-Domänen Prolin-reiche Sequenzen erkennen und mit diesen interagieren (Rhee et al. 1997). Nähere Untersuchungen mit der $\text{PLC}\gamma_1$ zu dieser auffallenden Molekularstruktur mit den zwei PH-Domänen haben gezeigt, dass die C-terminale Hälfte der zweigeteilten PH-Domäne an einen N-terminalen Teil einer PH-ähnlichen Domäne von TRPC3 binden kann. TRPC3 ist ein Ca^{2+} -Ionenkanal; die Abkürzung steht für *transient receptor potential channel 3*. Die Interaktion dieser Domänen bildet eine intermolekulare PH-Domäne, die es dem Proteinkomplex erlaubt, an PIP_2 zu binden. Dadurch kann die $\text{PLC}\gamma_1$ durch die Aktivierung eines Agonisten den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle regulieren (van Rossum et al. 2005). TFII-I (*transcription factor II-I*) inhibiert den durch diesen Mechanismus induzierten Kalziumioneneinstrom, indem er mit TRPC3 um die Bindungsstelle der zweigeteilten PH-Domäne der $\text{PLC}\gamma_1$ konkurriert und die Aktivität von TRPC3 dadurch hemmt (Caraveo et al. 2006). Im Hinblick auf die $\text{PLC}\gamma_2$ haben Untersuchungen gezeigt, dass die kleine GTPase Rac2 direkt an die C-terminale Hälfte der zweigeteilten PH-Domäne des Enzyms bindet und das Enzym durch diese Interaktion aktiviert (Bunney et al. 2009, Walliser et al. 2008). Die letzte und somit am C-terminalen Ende des Enzyms lokalisierte Domäne ist die C2 (*calcium-dependent lipid-binding*)-Domäne. Die C2-Domäne ist ebenso wie die X- und Y-Domäne hoch konserviert und wiederum aus alternierenden α -Helices und β -Faltblättern aufgebaut (Suh et al. 2008). Bei $\text{PLC}\delta_1$ weist

die C2-Domäne drei bis vier Bindungsstellen für Ca^{2+} -Ionen auf. Darüber hinaus konnten Untersuchungen mit der PLC β Interaktionen zwischen der α -Untereinheit von G-Proteinen und der C2-Region nachweisen (van Rossum et al. 2005). Die C2-Region ermöglicht zudem der PLC γ_2 eine Kalziumionen-abhängige Translokation an die Zellmembran, wodurch eine Vervielfachung des Ca^{2+} -Signals ermöglicht wird (Nishida et al. 2003). Nach heutigem Stand der Forschung, kommt der C2-Region somit eine regulatorische Funktion zu. Die PLC β stellt eine Ausnahme hinsichtlich des carboxyterminalen Bereichs des Enzyms dar, da sie nach der C2-Domäne eine zusätzliche, etwa 400 Aminosäuren lange Region aufweist. Untersuchungen haben gezeigt, dass dieser Region mehrere Aufgaben zukommen, wie die Lokalisation des Enzyms im Zellkern, die Bindung an Zellmembranen, sowie die Aktivierung durch Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine (Rebecchi et al. 2000). Eine weitere Ausnahme in der Molekularstruktur von PLC-Enzymen stellt die PLC η dar, da sie am C-terminalen Ende, nach der C2-Domäne, eine lange Serin- und Prolin-reiche Sequenz besitzt (Hwang et al. 2005). Eine weitere Besonderheit weist die PLC ϵ auf, an deren N-terminalen Ende sich eine Ras-GEF-ähnliche CDC25-Domäne befindet. Auch C-terminal weicht sie von den anderen PLC-Enzymen ab, da sie hier zwei RA (*Ras-associating*)-Domänen besitzt (Katan 2005).

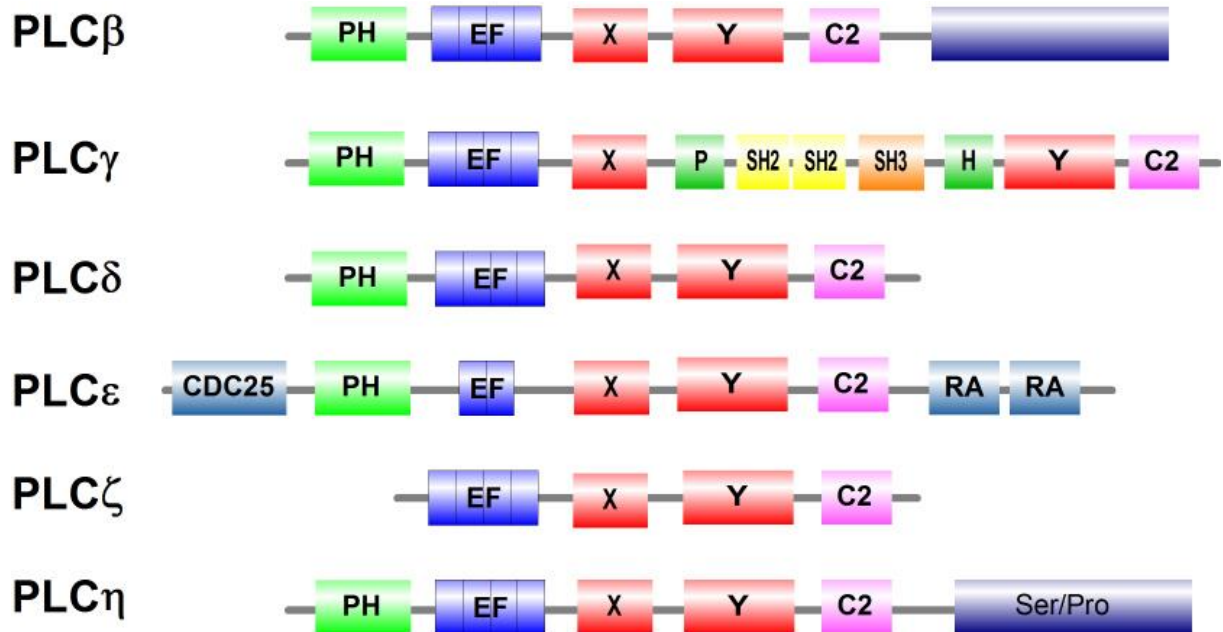


Abbildung 1: Schematische Darstellung der einzelnen Domänen der verschiedenen Phospholipase C (PLC)-Isoenzyme. Dargestellt ist die Abfolge der verschiedenen Domänen der PLC-Enzyme (PH: Pleckstrinhomologie-Domäne; EF: EF-hand-Domäne; X: katalytische Subdomäne X; Y: katalytische Subdomäne Y; SH2: Src-Homologie-Domäne 2; SH3: Src-Homologie-Domäne 3; C2: C2-Domäne; CDC25: CDC25-Homologie-Domäne, RA: Ras associating-Domäne; Ser/Pro: Serin-/Prolin-reiche Domäne) (Katan 2005).

1.3.3. Regulation von Phospholipase- C- γ -Isoenzymen

PLC-Enzyme können durch eine ganze Reihe von Transmembranrezeptoren aktiviert werden, was deren Bedeutung widerspiegelt. Nicht zuletzt, können sie aber auch durch viele andere Mechanismen in der Zelle reguliert werden. Die wichtigsten und häufigsten Rezeptoren, die zu einer Aktivierung von PLC γ -Isoenzymen führen, sind Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie PDGFR, EGFR, FGFR und NGFR, also die Gruppe der RPTKs (Rhee 2001, Choi et al. 2004). Die durch die Ligandenbindung ausgelöste Dimerisierung des Tyrosinkinase-Rezeptors ermöglicht es den PLC γ -Isoenzymen zusammen mit der anschließenden Autophosphorylierung des Rezeptors mittels ihrer SH2-Domänen an den Rezeptor zu binden, ebenso wie PI3-Kinasen, die ebenfalls mittels ihrer SH2-Domänen an den autophosphorylierten Rezeptor binden können (Rebecchi et al. 2000). Damit die PLC-Enzyme aktiviert werden, müssen sie sowohl an den Rezeptor binden, als auch von diesem phosphoryliert werden. Die Bindung an den Rezeptor ist insbesondere für

die PLC γ_1 auch insofern wichtig, da sie erst durch die Bindung an den Rezeptor in die Nähe ihres Substrates PIP $_2$ gelangt (Rhee 2001). PLC γ -Isoenzyme nehmen somit eine wichtige Rolle in der Signalübertragung mitogener Stimuli ein und spielen ebenso eine Rolle bei der Zelldifferenzierung, aber auch bei der Apoptose. Für die Bindung an RPTKs haben PLC γ -Enzyme SH2-Domänen, die u.a. eine Adapterfunktion aufweisen. Die Affinität der SH2-Domäne der PLC γ_1 zu den Autophosphorylierungsstellen der unterschiedlichen RPTKs hängt auch von der intrazellulären Ca $^{2+}$ -Ionenkonzentration und deren initialen Anstieg bei der Rezeptoraktivierung ab (Obermeier et al. 1996). Nach der Bindung von PLC-Enzymen an eine RPTK kommt es auch zu einer Phosphorylierung der PLC-Enzyme. Bei der PLC γ_1 konnte man in diesem Zusammenhang die Seitenketten der Aminosäuren Y771, Y783 und Y1254 als mögliche Phosphorylierungsstellen nachweisen (Rebecchi et al. 2000). Die Tyrosinreste Y771 und Y783 befinden sich im X/Y-Linker zwischen den beiden katalytischen Subdomänen der PLC γ_1 und sind darüber hinaus hoch konserviert (Rebecchi et al. 2000). Die Phosphorylierung von Y1254 ist jedoch optional und deren Funktion noch nicht völlig geklärt. Zudem weist PLC γ_2 diese Phosphorylierungsstelle nicht auf. Interessanterweise hat man anhand von Mutationsexperimenten herausgefunden, dass die Phosphorylierung von nur jeweils einer Aminosäure zu unterschiedlichen Effekten in Fibroblasten führt (Rebecchi et al. 2000). Zusätzlich haben mehrere Studien gezeigt, dass für die Stimulation der Lipaseaktivität der Zellen lediglich die Phosphorylierung von Y783 notwendig ist (Suh et al. 2008). Y771 scheint hier sogar eine inhibitorische Funktion bezüglich der Enzymaktivität zuzukommen. Dies könnte unter anderem dazu führen, dass die Aktivierung von PTRKs sowohl aktivierend als auch hemmend auf verschiedene Zellfunktionen z.B. auf den Zellzyklus wirken kann. Darüber hinaus gibt es noch weitere Moleküle, die als positive oder negative Modulatoren Einfluss auf die PLC γ -Aktivität nehmen. Zu den negativen Modulatoren gehören ABP und Proteine, die am Auf- und Abbau des Aktinzytoskeletts beteiligt sind, wie Vinculin, α -Actinin und Gelsolin. Diese Moleküle können PIP $_2$ binden und konkurrieren somit mit den PLC γ -Isoformen um ihr Substrat (Rebecchi et al. 2000, Janmey 1994). Im Gegensatz dazu zählen PIP $_2$ und PIP $_3$ zu den positiven Modulatoren. PIP $_3$ fixiert in diesem Zusammenhang die PLC γ_1 an die Zellmembran, indem es direkt an die PH- und SH2-Domäne des Proteins bindet. Aufgrund dieser Translokation an die Zellmembran wird die enzymatische PIP $_2$ -Spaltung erheblich erhöht (Rhee 2001). Dies ist sogar der Fall, wenn die Phosphorylierung durch den Rezeptor fehlt, was somit auf einen alternativen Aktivierungsweg hinweist (Rebecchi et al. 2000). Eine weitere Form der PLC γ -

Aktivierung erfolgt unter anderem in B-Zellen. Hier spielen vor allem NRPTKs eine wichtige Rolle. Eines der Schlüsselenzyme dieser Signalwege ist PLC γ_2 . Die Aktivierung des BCR durch Antigene führt unter anderem zu einer Rekrutierung von *Src-related kinases* wie Lyn, Fyn und Blk. Ebenso werden Syk/ZAP-70 und Btk/Tec Tyrosinkinasen aktiviert (Kurosaki 2011). Erfolgt eine Antigenerkennung durch den Rezeptor, so kommt es zur Aktivierung von Lyn (Kurosaki 2011). Das aktivierte Lyn phosphoryliert Tyrosinreste in der ITAM-Sequenz des BCR, wodurch es anschließend zu einer Rekrutierung und Phosphorylierung von Syk kommt. Infolgedessen kommt es zur Rekrutierung und Phosphorylierung des Adapterproteins BLNK (Fu et al. 1998), welches wiederum für die Translokation der PLC γ_2 an die Membran wichtig ist (Ishiai et al. 1999, Kurosaki 2011). Eine weitere Konsequenz der Aktivierung des BCR ist die Aktivierung von PI3K, welche wiederum PIP₃ bilden. PIP₃ bindet nun an die PH-Domäne von Btk, einem Mitglied der Tec-Familie, wodurch Btk an die Membran transloziert und aktiviert wird. Aktiviertes Btk kann die PLC γ_2 an spezifischen Tyrosinresten phosphorylieren und die PLC γ_2 damit aktivieren (Rhee 2001, Kurosaki 2009). In T-Zellen erfolgt die Aktivierung der PLC γ_1 in ähnlicher Weise (Rebecchi et al. 2000, Song et al. 2011). Der Aktivierung des TCR folgt eine Tyrosinkinase-Kaskade, an der auch Lck, Blk und Fyn, ebenso wie der Korezeptor LAT und ZAP-70-Kinasen beteiligt sind. ZAP-70-Kinasen können unter anderem PLC γ_1 aktivieren (Song et al. 2011). Eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von NRPTKs spielt zudem Vav, das später noch genauer beschrieben wird. Eine weitere Gruppe von Transmembranrezeptoren, die Einfluss auf die Aktivität von PLC γ -Isoformen haben muss hier auch noch Erwähnung finden, die G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Diese Rezeptoren beeinflussen die Aktivität von PLC-Isoformen durch die sogenannte *trans*-Aktivierung, bei der GPCRs mit NRPTKs interagieren. Typische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die eine PLC γ_1 -Aktivierung induzieren sind die Angiotensin II- und Bradykinin-Rezeptoren (Suh et al. 2008). Für die Regulation der PLC γ_2 sind die Immunglobulin-Rezeptoren charakteristisch (hier vor allem IgE- und IgG-Rezeptoren), ebenso Adhäsions-Rezeptoren auf B-Zellen, Thrombozyten, Mastzellen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Suh et al. 2008).

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die PLC γ_2 im Gegensatz zur PLC γ_1 im zellfreien System und in intakten Zellen Isoenzym-spezifisch durch Rac-GTPasen (Rac1, Rac2 und Rac3), jedoch nicht durch Cdc42 und RhoA aktiviert wird (Piechulek et al. 2005). Unsere Arbeitsgruppe untersuchte gemeinsam mit einer Arbeitsgruppe aus

London die Interaktion zwischen PLC γ_2 und Rac2, mit dem Ergebnis, dass Rac2 mit der carboxylterminalen Hälfte der zweigeteilten PH-Domäne der PLC γ_2 interagiert (Bunney et al. 2009, Walliser et al. 2008). Im Rahmen dieser Interaktion kommt es zu einer Translokation der PLC γ_2 an die Zellmembran in die Nähe ihres Substrates PIP $_2$.

1.3.4. Expression und Funktionen von PLC γ_1

PLC γ_1 wird im menschlichen Körper ubiquitär in allen Geweben exprimiert (Suh et al. 2008). Eine besonders ausgeprägte Expression findet man in embryonalen Geweben, vor allem bei der Entwicklung des ZNS. Die Aktivierung der PLC γ_1 erfolgt in diesen Geweben klassischerweise durch Wachstumsfaktor-Rezeptoren, jedoch wird bis heute die tatsächliche Bedeutung dieses Isoenzyms bei der Zellproliferation kontrovers diskutiert. So hat man in Versuchen mit Knock-out-Mäusen, die keine PLC γ_1 Aktivität in Fibroblasten aufweisen herausgefunden, dass das Enzym hier für eine Wachstumsfaktor-stimulierte Mitose nicht nötig ist. Andererseits konnte man bei PLC γ_1 -defizienten fötalen Mäusen ein intrauterines Absterben beobachten (Mohammadi et al. 1992). Darüber hinaus konnte schon vor längerer Zeit nachgewiesen werden, dass PLC γ_1 an der Entwicklung der Nieren beteiligt ist (Shirane et al. 2001). Die Relevanz des Enzyms für die Zelldifferenzierung und der Regulation von Überlebensprogrammen der Zelle gilt jedoch als besser etabliert. Dies ist nicht zuletzt durch die starke Verflechtung der PLC γ_1 -Aktivität mit der Regulation des Aktinzytoskeletts der Fall (Smith et al. 1989, Li et al. 2009). Im besonderen Maße trifft diese Verflechtung auf Nervenzellen im ZNS zu, deren Differenzierung stark von PLC γ_1 beeinflusst zu werden scheint. Hieran haben auch die RPTKs Nyk und die der Trk-Familie einen gewichtigen Anteil, da diese anscheinend das Wachstum von Dendriten beeinflussen (Nguyen et al. 2007, Sato et al. 2011, Obermeier et al. 1994). Auch bei der Entstehung von Neoplasien konnte eine Beteiligung der PLC γ_1 beobachtet werden. So konnte man in Geweben aus Dickdarmpolypen von Patienten, die an familiärer adenomatöser Polyposis leiden, eine erhöhte PLC γ_1 -Konzentration nachweisen (Rebecchi et al. 2000, Park et al. 1994). Allerdings ist bisher völlig unklar, in welcher Art und Weise die PLC γ_1 hieran beteiligt ist. Darüber hinaus konnte man bei der Entstehung von Brustkrebs eine stark erhöhte PLC γ_1 -Expression nachweisen (Noh et al. 1998). Dies zeigt noch einmal, wie wenig die physiologische wie auch pathologische Bedeutung von PLC γ_1 für unseren Körper bisher verstanden ist.

1.3.5. Expression und Funktionen von PLC γ_2

Es ist bekannt, dass PLC γ_2 ebenfalls in vielen Geweben des Körpers exprimiert wird, wenn auch nicht ubiquitär wie PLC γ_1 . Hier weisen vor allem das hämatopoetische System, insbesondere Lymphknoten und Lymphfollikel eine sehr hohe Dichte dieses Isoenzyms auf (Hikida et al. 2009). Man nimmt an, dass eine der wichtigsten Aufgaben der PLC γ_2 in der zielgerichteten und koordinierten Immunantwort, wie sie von B-Zellen ausgeübt wird, zu liegen scheint. Werden diese hoch spezialisierten Zellen durch äußere oder innere Einflüsse gestört, kann das fatale Folgen für den Organismus haben. Ein Beispiel für eine endogene Störung der B-Zell-Funktion ist die XLA (X-chromosomale Agammaglobulinämie). Bei der XLA liegt eine verminderte Aktivierung von PLC γ_2 in B-Zellen vor, wodurch es zu einer Immundefizienz aufgrund einer Agammaglobulinämie kommen kann. Ursache für die verminderte Aktivierung der PLC γ_2 ist eine Mutation von Btk (Satterthwaite et al. 1998). Ebenso zeigten PLC γ_2 -Knockout-Mäuse Defekte in der Funktion von B-Zellen, Thrombozyten, Mastzellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Wang et al. 2000). Im Rahmen des ENU (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea)-Mutagenese-Projektes in München wurden zwei Mutationen in Mäusen entdeckt, Ali5 und Ali14, welche zu einer Hyperaktivität der PLC γ_2 führen (Yu et al. 2005, Abe et al. 2011). In diesem Zusammenhang wurde der Ca²⁺-Einstrom in kultivierten WEHI-231 B-Zellen gemessen, wobei diese mit verschiedenen PLC γ_2 -Konstrukten transfiziert wurden, jeweils mit einer wildtypischen PLC γ_2 , einer PLC γ_2 mit einer Ali5- bzw. Ali14-Mutation und ein PLC γ_2 -Konstrukt, welches beide Ali-Mutationen aufwies. Ergebnis war, dass die Zellen mit der Ali14-Mutation der PLC γ_2 den höchsten Ca²⁺-Einstrom zeigten. Bei der Ali14-Mutation, die sich in der zweigeteilten PH-Region der PLC γ_2 befindet, kommt es zu einem Austausch der Aminosäure Tyr-495 gegen Cystein. Als Folge dieser Mutation kann PLC γ_2 durch eine Reihe von Signalwegen leichter aktiviert werden, beispielsweise durch EGF *in vitro* (Everett et al. 2009). Durch den bei der Ali14-Mutation beschriebenen erhöhten Ca²⁺-Einstrom kommt es zu Funktionsstörungen der B-Zellen, was die Produktion von Autoantikörpern nach sich ziehen kann. So zeigten Mäuse mit den Mutationen Ali5 und Ali14 in den Studien von Yu et al. (2005) und Abe et al. (2011) eine rheumatoide Entzündungsreaktion infolge der B-Zell-Dysfunktion. Weiterhin zeigten Mäuse mit einer Ali14-Mutation unter anderem ein anormal hohes T- zu B-Zell-Verhältnis infolge einer stark erhöhten T-Zell-Zahl, eine Hochregulierung der Synthese von IgM und IgG1, Veränderungen im Körperbau, sowie eine Reduktion der Menge an Cholesterol und

Triglyceriden im peripheren Blut (Abe et al. 2011). Das abnorme T- zu B-Zell-Verhältnis, sowie die Hochregulierung der Synthese von IgM und IgG1 konnte man in gleicher Weise auch bei Mäusen mit einer Ali5-Mutation finden (Yu et al. 2005). In beiden Fällen nimmt man jedoch an, dass die erhöhte T-Zell-Population durch sekundäre Ursachen zustande kommt, nicht zuletzt dadurch, dass in T-Zellen die PLC γ_1 vorherrschend ist und nicht die PLC γ_2 (Abe et al. 2011). Dass es bei einer Hyperaktivität von PLC γ_2 , infolge einer Mutation, zu einer verstärkten Aktivierung von Thrombozyten und dadurch zu vermehrten Thrombosen kommen kann, konnte auch in einer anderen Studie mit Mäusen gezeigt werden (Elvers et al. 2010).

Auch beim Menschen konnte man bereits Krankheiten und eine Störung der PLC γ_2 -Funktion miteinander in Verbindung bringen. In diesem Zusammenhang wurde erst kürzlich zum ersten Mal eine Mutation von PLC γ_2 beim Menschen entdeckt, die einen erheblichen Krankheitswert in sich birgt. Dabei hat man Mitglieder von drei unterschiedlichen Familien, die am sogenannten familiären kälteinduzierten autoinflammatorischen Syndrom (FCAS) litten, untersucht und drei verschiedene Deletionen in der autoinhibitorischen Region von PLC γ_2 gefunden (Ombrello et al. 2012). Folge dieser Mutation ist eine konstitutiv aktive Phospholipaseaktivität von PLC γ_2 . Auffallend war zudem, dass bei allen PLC γ_2 -exprimierenden Zellen die zelluläre Signalübertragung bei 37°C abnahm, wohingegen sie bei Temperaturen darunter erhöht war (Ombrello et al. 2012). Als Manifestation der Erkrankung war allen erkrankten Familienmitgliedern gemein, dass sie an Kälteurtikaria litten. Weitere variable Manifestationen waren unter anderem granulomatöser Hautausschlag, eine Autoimmunthyreoiditis, der Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANAs) und sinopulmonale Infekte. Darüber hinaus waren die Mengen an IgA und IgM im Serum erniedrigt, ebenso wie die Anzahl an zirkulierenden NK-Zellen und Memory-B-Zellen (Ombrello et al. 2012). Neuere Studien konnten zudem zeigen, dass die PLC γ_2 bei der Ausbildung und Persistenz von Memory-B-Zellen eine wichtige Rolle spielt (Hikida et al. 2009).

1.4. Rho-GTPasen

1.4.1. Struktur und Regulation

Rho-GTPasen sind monomere G-Proteine, denen die Eigenschaft zur Bindung von GTP zu Eigen ist, welches sie anschließend zu GDP hydrolysieren. Bislang wurden im humanen Genom 23 Gene gefunden, die Rho-GTPasen kodieren. Rho-GTPasen gehören zur Superfamilie der Ras-Proteine. Ras leitet sich von *rat sarcoma* ab, da das Protein erstmals in neoplastischen Zellen von Ratten entdeckt wurde. Bisher umfasst die Ras-Superfamilie folgende Proteinsubfamilien, Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf und Ran (Harden et al. 2006, Takai et al. 2001). Darüber hinaus lassen sich Rho-GTPasen, ausgehend von Homologien ihrer Aminosäuresequenzen, in sechs weitere Subfamilien unterteilen. Diese sind: die Rho-Proteine (RhoA, RhoB und RhoC), die Rac-Proteine (Rac1, Rac2, Rac3, RhoG/AhrG), die Cdc42-Proteine (Cdc42, TC10, TCL, Wrch1 und Chp), die Rnd-Proteine (Rnd1, Rnd2 und Rnd3/RhoE), die RhoBTB- Proteine (RhoBTB1, RhoBTB2 und RhoBTB3), die Miro-Proteine (Miro1 und Miro2), RhoD/F (RhoD und Rif) und RhoH/TTF (Bustelo et al. 2007). Strukturanalysen von Rac2, welches auch in dieser Arbeit verwendet wurde, haben gezeigt, dass zwei Regionen dieses Proteins für die Interaktion mit anderen Molekülen entscheidend sind, die sogenannten *switch I*- und *switch II*-Regionen (Scheffzek et al. 2000). Nach der Bindung von GTP kommt es zur Interaktion der beiden Regionen (die durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden) und zu einer Konformationsänderung des Moleküls. Weiterhin wird dieser Molekülkomplex durch Mg^{2+} -Ionen stabilisiert, die an einen Serin-/Threonin-Rest der *switch I*-Region sowie an einen Aspartatrest der *switch II*-Region binden. In Strukturanalysen konnte gezeigt werden, dass die *switch I*-Region von Rac2 die Aminosäuren 30 bis 40 umfasst und sich die *switch II*-Region von Rac2 von der Aminosäure 57 bis zur Aminosäure 71 erstreckt (Scheffzek et al. 2000). Eine weitere Region von Rac-Molekülen, die an der GTP-Bindung beteiligt ist, ist die P-loop (*phosphate-binding loop*)-Region. Sie bindet die β -Phosphatgruppe von GTP (Zhang et al. 2000). Wichtige Effektorenzyme für Rac2 sind die $PLC\gamma_2$ und die $PLC\beta_2$. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Rac2 spezifisch $PLC\gamma_2$ aktiviert, nicht jedoch das Isoenzym $PLC\gamma_1$ (Bunney et al. 2009, Walliser et al. 2008). $PLC\beta_1$ und $PLC\beta_3$ können ebenfalls durch aktivierte Rho-GTPasen stimuliert werden, jedoch nicht in dem Maße wie die $PLC\beta_2$. In diesem Zusammenhang konnte beispielsweise in einer *in vitro*

Studie gezeigt werden, dass Rac1 und Rac2 einen stärkeren aktivierenden Effekt auf die PLC β_2 zeigen als Cdc42 (Illenberger et al. 2003).

An die *switch*-Regionen von Rac binden nicht nur Effektoren, sondern auch Regulatoren. Im Allgemeinen stehen dem Organismus drei verschiedene Möglichkeiten zur Regulierung von Rho-GTPasen zur Verfügung (Abb. 2). Zum einen die Rho-GEF-Proteine, welche den Austausch von GDP gegen GTP bewirken und Rho-GTPasen somit in ihre aktive Konformation überführen. Beispiele für Rho-GEFs sind Tiam1, Vav1 und P-Rex1, wobei bis heute etwa 69 verschiedene Rho-GEFs identifiziert werden konnten (Aittaleb et al. 2010, Wennerberg et al. 2004). Die Gruppe der Rho-GEFs wird in Kapitel 1.5. näher beschrieben. Als Gegenspieler zu den Rho-GEFs fungieren die Rho-GAP-Proteine, die die intrinsische GTPase-Aktivität von Rho-GTPasen steigern und infolgedessen die Bildung von GDP durch Abspaltung einer Phosphatgruppe bewirken. Dieser Mechanismus kann aber durch Mutationen von Rac aufgehoben werden, wie es bei der Rac2-Mutante Rac2^{G12V} der Fall ist. Bei dieser Rac2-Mutante ist die intrinsische und durch Rho-GAPs induzierte Hydrolysefähigkeit aufgehoben (Scheffzek et al. 1997, Bishop et al. 2000). Als dritte Möglichkeit sind die Rho-GDI-Proteine zu nennen. Auch sie haben einen inhibitorischen Einfluss auf Rho-GTPasen, da sie die GDP-Freisetzung verhindern und somit das Protein in seiner inaktiven Konfiguration fixieren (Scheffzek et al. 1997, van Aelst et al. 1997). Neben dieser Funktion sind sie durch eine hydrophobe Tasche in der Lage, den Isoprenylrest der Rho-GTPasen zu inkorporieren, mit der Folge, dass die Rho-GTPase nicht mehr in der Lage ist, sich mittels des Isoprenylrestes in die Plasmamembran einzulagern und hier seine Aktivität zu entfalten. Dadurch transloziert die Rho-GTPase in einem stabilisierten und inaktivierten Zustand zurück ins Zytosol. Zudem ermöglicht die Komplexierung von Rho-GDI-Proteinen mit Rho-GTPasen eine Translokation der Rho-GTPase zwischen verschiedenen Membranen (Buchsbaum et al. 2007).

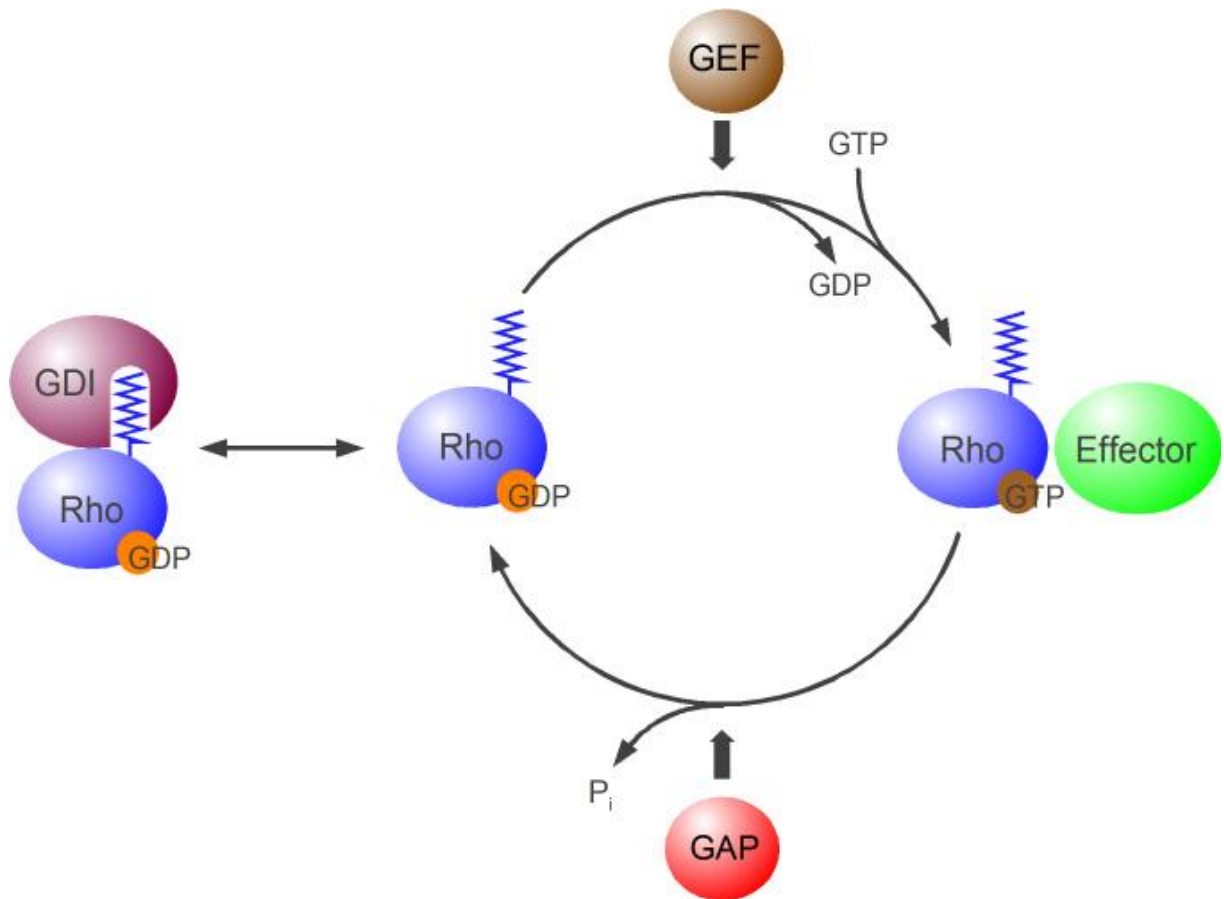


Abbildung 2: Der funktionelle Zyklus von Rho-GTPasen. Rho-GTPasen (*Rho*) wirken als molekulare Schalter und wechseln zwischen einem inaktiven, GDP-gebundenem (*GDP*) Zustand und einem aktiven, GTP-gebundenem (*GTP*) Zustand, in dem sie dazu in der Lage sind, mit ihren Effektoren (*Effector*) zu interagieren. In diesem Kreislauf werden die Rho-GTPasen von Rho-GEFs (*GEF*) aktiviert bzw. von Rho-GAPs (*GAP*) und Rho-GDIs (*GDI*) inaktiviert (P_i : anorganisches Phosphat, Rho-GEF: *guanine nucleotide exchange factor for Rho/Rac/Cdc42-like GTPases*, Rho-GAP: *Rho-GTPase-activating proteins*, Rho-GDI: *Rho GDP dissociation inhibitors*).

1.4.2. Biologische Funktionen von Rho-GTPasen

Anhand der großen Anzahl von Rho-GTPasen lässt sich schon erkennen, dass sie eine Fülle von biologischen Aufgaben innehaben. Hierzu zählt die Regulation einer Vielzahl von Enzymen des Zytoskeletts, welches unter anderem für die Morphologie und Motilität einer Zelle ausschlaggebend ist. Daher war die Entdeckung, dass Rho-GTPasen entscheidende Aufgaben in der Regulation des Zytoskeletts erfüllen, von großer Bedeutung. Hierbei erstreckt sich ihr Wirkungsbereich sowohl auf die Aktinfilamente wie auch auf Mikrotubuli (Zhou et al. 2010, Chesarone et al. 2010, Etienne-Manneville et al.

2002, Jaffe et al. 2005, Tybulewicz et al. 2009). So haben Untersuchungen zu Mechanismen der Aktin-Polymerisation gezeigt, wie diese zum Beispiel durch Rac- und Cdc42-Proteine beeinflusst wird. Rac und Cdc42 aktivieren den sogenannten Arp2/3-Komplex, welcher für die Initiierung der Filamentbildung wichtig ist. Diese Aktivierung geschieht dabei aber nicht direkt, sondern über Proteine der WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*)-Familie (Padrick et al. 2010). Darüber hinaus sind Rho-GTPasen nicht nur bei der Initiation der Filamentbildung wichtig, sondern auch generell bei der Regulation der Polymerisation. In diesem Zusammenhang ist Rho zu nennen, welches an Formin mDia bindet und so dessen Konformation verändert (Chesarone et al. 2010). Formin mDia kann nun an bereits bestehende Aktinfilamente binden, was zu einer Anlagerung weiterer Aktinfilamente führt. Ist dieses System beispielsweise durch eine Minderexpression von RhoB gestört, kann dies zur Ausbildung eines Myelodysplastischen Syndroms (MDS) beitragen (DeWard et al. 2009). Rho-GTPasen regulieren auch die Verankerung von Mikrotubuli, welche ein Minus- und ein Plusende besitzen, an der Zellmembran. Am Minusende sind Mikrotubuli an ihren Ursprungsort gebunden, dem *microtubule organizing center*, welches meist das Zentrosom ist. Mit dem Plusende sind sie an der Zellmembran verankert, wofür jedoch Adapterproteine nötig sind. Diese werden wiederum zum Teil durch Rho-GTPasen reguliert. Auch hier sind wieder Rac und Cdc42 zu nennen, für welche IQGAP ein Effektor darstellt. IQGAP wird durch Rho-GTPasen aktiviert und bindet an CLIP-170, welches seinerseits an das Plusende von Mikrotubuli binden kann und so die Interaktion mit der Zellmembran vermittelt (Chesarone et al. 2010, Szczepanowska 2009). Auch im Hinblick auf pathologische Prozesse konnten bisher einige Aspekte über die Mitwirkung von Rho-GTPasen nachvollzogen werden. So findet man in maligne entarteten Zellen nur selten direkte Mutationen von Rac1, Rac2 oder Rac3, jedoch oft Veränderungen in der Proteinexpression. Besonders Rac1 ist hier hervorzuheben, welches in vielen Tumoren überexprimiert wird, was zu einer verminderten Apoptose und somit zur Immortalisierung von Tumorzellen beiträgt (Vega et al. 2008). Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch bei Rac3 nachgewiesen. Dieses Protein konnte unter anderem bei Lymphomen mit Zellen, welche das Philadelphia-Chromosom (Bcr-Abl-Fusionsprotein) aufwiesen, nachgewiesen werden. Ebenso zeigen etwa 15 % der malignen Tumoren aktivierende Mutationen in Ras-Genen (Vega et al. 2008). Rho-GTPasen sind nicht nur für die Regulation der Zellmorphologie und der Motilität, sondern auch für die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix wichtig (Zhou et al. 2010, Chesarone et al. 2010, Vega et al. 2008, Etienne-Manneville et al. 2002).

Wird dieses filigrane System gestört, können entartete Zellen die Fähigkeit zur Metastasierung erlangen, was den pathologischen Aspekt der gestörten Regulation von Rho-GTPasen noch einmal unterstreicht (Vega et al. 2008).

Die Bedeutung von Rac2, welches im Gegensatz zu Rac1 nicht ubiquitär, sondern ausschließlich im hämatopoetischen System exprimiert wird, wurde in mehreren Studien untersucht. Wie wichtig Rac2 für das hämatopoetische System ist, konnte eindrücklich in verschiedenen Studien mit Knock-out-Mäusen gezeigt werden. So wiesen diese Mäuse beispielsweise eine Störung der Differenzierung von T-Helferzellen, vom Subtyp T_H1 auf. Die Ursache hierfür liegt in einer verminderten Interferon- γ -Produktion, welche in diesem Fall p38- und NF- κ B-abhängig ist (Li et al. 2000). Ebenso hat eine Rac2-Defizienz Auswirkungen auf die Zusammensetzung der B-Zell-Population. Hier findet man eine verminderte Anzahl an peripheren B-Zellen, IgM- und IgA-sezernierenden Plasmazellen sowie peritonealen B1-Zellen (Croker et al. 2002).

1.5. Rho-Guaninnukleotidaustauschfaktoren

1.5.1. Allgemeine Einführung

Das erste Rho-GEF-Protein, Dbl, wurde in einem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom entdeckt (Rossman et al. 2005). Daher auch die Namensgebung von Dbl, was für *diffuse B-cell-lymphoma* steht. Bisher wurden etwa 70 weitere Vertreter dieser Proteinfamilie entdeckt, die Sequenzhomologien mit Dbl aufweisen. Weitere Mitglieder dieser Proteinfamilie sind Vav1, Vav2, P-Rex1, Asef und Tiam1 (Aittaleb et al. 2010). Ihnen allen ist eine hochkonservierte DH-Domäne gemein, welche auch das katalytische Zentrum dieser Enzyme darstellt. Manche der Rho-GEFs sind hoch spezifisch und erkennen nur ein Substrat, während andere mehrere Rho-GTPasen als Substrat haben. So aktiviert z.B. Tiam1 nur Rac-GTPasen (Rac1, Rac2, Rac3) und Asef nur Cdc42. Ein breiteres Spektrum weist hingegen Vav1 auf, das sowohl Rac1, Rac2, RhoG, RhoA und Cdc42 als Substrat erkennen kann (Rossman et al. 2005, Gotthardt et al. 2007, Schmidt et al. 2002).

1.5.2. Vav-Proteine

Der Name Vav leitet sich aus dem hebräischen Alphabet ab und ist dort der sechste Buchstabe, als Anspielung darauf, dass Vav das sechste Onkogen war, welches man im Labor der Erstbeschreiber entdeckt hat. Vav-Proteine sind zytoplasmatische Rho-GEFs, von denen es drei Isoformen gibt, Vav1, Vav2 und Vav3. Die Proteine haben eine molekulare Masse von etwa 95 kDa. Vav1 wurde erstmals bei der Suche nach bis dato noch unbekannten Onkogenen in 3T3-Fibroblasten entdeckt. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expression von Vav1 auf das hämatopoetische System beschränkt ist, während Vav2 und Vav3 auch in anderen Geweben vorkommen (Movilla et al. 1999, Katzav et al. 1989). So konnte man hohe Vav2-Spiegel in der Leber, der Milz, in den Hoden und der Plazenta nachweisen (Schuebel et al. 1996). Eine hohe Dichte an Vav3 wurde in peripheren Lymphozyten, in der Milz und im Gehirn gefunden, ebenso wie im Thymus, im Herzen, in den Nieren, in der Lunge und in der Leber, hier jedoch in geringerer Konzentration (Movilla et al. 1999). Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich nicht nur in ihren Expressionsmustern, sondern auch in ihrer Substratspezifität. So hat Vav3 eine hohe Affinität für RhoA, RhoG und eine etwas niedrigere für Rac1, während es bei Cdc42 keine Aktivität zeigt. Vav1 hingegen zeigt ein größeres Spektrum, welches unter anderem Rac1, Rac2, RhoG, RhoA und Cdc42 umfasst (Crespo et al. 1997, Movilla et al. 1999, Chrencik et al. 2008, Tybulewicz 2005, Schuebel et al. 1998). Wenn auch die Substrate der einzelnen Vav-Proteine unterschiedlich sein mögen, darf man aber nicht vergessen, dass sich die einzelnen Signalwege dennoch überlappen und an einem gemeinsamen Effektor enden können (Movilla et al. 1999). Allen Isoformen ist gemein, dass sie wichtige Funktionen in der Kontrolle der Zellmorphologie und der Zellmotilität innehaben. Insbesondere bei der Regulation des Zytoskeletts, der Ausbildung von Stressfasern und Pseudopodien, sowie der Phagozytose und der Zellteilung spielen sie eine wichtige Rolle (Bonney-Bérard et al. 1996, Bertagnolo et al. 2011, Bertagnolo et al. 2012). Eine weitere wichtige Bedeutung von Vav-Proteinen liegt zum einen in der Steuerung der Zellreifung und zum anderen in der Justierung der Zytokinsynthese (Bonney-Bérard et al. 1996). So spielt Vav1 eine entscheidende Rolle bei der Reifung und Funktion von T-Zellen (Tybulewicz 2005). Wie wichtig Vav1 hierbei ist, haben Studien mit Knock-out-Mäusen ergeben. Ein komplettes Fehlen von Vav1 ist für den Embryo nicht letal, führt jedoch zu einem ausgeprägten Mangel an doppelt negativen ($CD4^-CD8^-$), doppelt positiven ($CD4^+CD8^+$), einfach positiven Thymozyten sowie

ausgereiften, peripheren T-Zellen. Darüber hinaus kommt es ebenso zu einem schweren B-Zell-Mangel und einem völligen Fehlen von peritonealen CD5⁺-B-Zellen (Bonnefoy-Bérard et al. 1996, Sanchez-Aguilera et al. 2011). Hinzu kommt, dass sowohl bei B- als auch bei T-Zellen die Antigen-vermittelte Proliferation schwer gestört war. Somit konnte gezeigt werden, dass Vav1 unter anderem eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von T-Zell-Rezeptoren spielt. Bindet ein T-Zell-Rezeptor sein spezifisches Antigen, dann kommt es zu einer Aktivierung von Kinasen der Src-Familie, welche wiederum ITAMs in CD3- und TCR ζ -Proteinen phosphorylieren und infolgedessen Bindungsstellen für Kinasen der Syk/ZAP-70-Familie schaffen. Darüber hinaus kommt es zu einer Rekrutierung von Adapter-Proteinen wie LAT, GADS und SLP-76 sowie Enzymen wie PI3Ks, Tec-Kinasen und PLC γ_1 (Miletic et al. 2009). Dies führt letztlich zur Bildung von IP₃ und DAG, die einen Kalziumeinstrom und die Aktivierung von MAPKs induzieren. Ebenso führt die Aktivierung des TCR zu einer Modifizierung des Aktinzytoskeletts. Hierbei spielt neben ZAP-70, LAT, SLP-76, Nck, Grb2 und WASP, auch Vav1 eine wichtige Rolle. Vav1 kann in diesem Fall direkt an ZAP-70, TCR ζ und phosphoryliertes SLP-76 binden und vermutlich auch wie LAT als Linker-Protein fungieren (Miletic et al. 2009). Erstaunlicherweise zeigen Vav-1-defiziente T-Zellen zwar schwere Defekte der TCR-vermittelten Signaltransduktion, jedoch nur geringe oder überhaupt keine Beeinträchtigungen in der TCR-vermittelten Beeinflussung des Zytoskeletts (Miletic et al. 2009). Welche genaue Rolle Vav1 bei der TCR-vermittelten Genexpression spielt, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Es gibt aber Hinweise darauf, dass Vav1 maßgeblich an der Proteinbiosynthese von IL-2 beteiligt ist, da Vav1-defiziente Mäuse nur eine spärliche, wenn nicht sogar überhaupt keine IL-2-Synthese zeigen (Billadeau et al. 2000). Wenn man bedenkt, dass IL-2 eines der wichtigsten Mediatoren von T-Helfer-Zellen darstellt, da es vor allem autokrin wirkt und ihre Aktivierung sowie Proliferation steigert, bedeutet eine Störung in der IL-2-Synthese einen entscheidenden Einschnitt in das Immunsystem (Liao et al. 2011). Die starke Suppression des Immunsystems durch ein vermindertes IL-2-Angebot macht man sich bei Immunsuppressiva zunutze, beispielsweise bei Tacrolimus oder Ciclosporin (Burgis et al. 2008). Vav1 spielt jedoch nicht nur bei der Signaltransduktion von TCRs sondern auch bei BCRs eine Rolle. Ein funktionstüchtiger BCR besteht aus dem Rezeptor selbst und einem Ig α (CD79a)/Ig β (CD79b)-Heterodimer (Kurosaki et al. 2009, Kurosaki 2011). Die Abkürzungen Ig stehen hierbei für Immunglobulin und CD für *cluster of differentiation*. Kommt es nun zu einer Aktivierung des BCR, dann wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, bei der die ITAM -Region des

Igα/Igβ-Heterodimers, an ihren Tyrosinresten phosphoryliert wird. Über weitere Signalübertragungsschritte, an denen Lyn, Syk und Btk beteiligt sind, kommt es unter anderem zur Aktivierung von PLCγ₂ und PI3Ks (Kurosaki et al. 2009, Kurosaki 2011). PLCγ₂ und PI3Ks vermitteln die beiden Hauptsignaltransduktionewege bei der BCR-Aktivierung. BLNK, das nach seiner Phosphorylierung durch Syk an die PLCγ₂ binden kann, ist ein wichtiges Adapterprotein für die weitere Signaltransduktion durch die PLCγ₂. Die PLCγ₂ wird nach der Interaktion mit BLNK selbst durch Syk und Btk phosphoryliert und dadurch aktiviert. Die aktivierte PLCγ₂ ist nun in der Lage, an ihr Substrat PIP₂ zu binden und es kommt zur enzymatischen Produktion von IP₃ und DAG. Sowohl bei der PLCγ₂- als auch bei der PI3K-vermittelten Signaltransduktion stellt Vav ein regulatorisches Element dar. So sind Proteine der Vav-Familie für den durch die BCR-Aktivierung ausgelösten Ca²⁺-Einstrom in die Zelle unabdingbar (Kurosaki 2011). Ebenso konnte in einer weiteren Studie eine enge Beziehung zwischen Vav3 und PLCγ₂ bei der BCR-Signaltransduktion in DT40 B-Zellen nachgewiesen werden, sowie der synergistische Effekt, der aus dieser Beziehung hervorgeht. In dieser Studie lag der Schluss nahe, dass sich Vav und PLCγ₂ gegenseitig in ihrer Rekrutierung an Mikrosignalosome positiv beeinflussen und gemeinsam in synergistischer Weise das *spreading* von B-Zellen und die BCR-vermittelte Signaltransduktion regulieren (Weber et al. 2008). Auch in unserer Arbeit konnten wir eine deutliche Steigerung der PLCγ₂-Aktivität in Anwesenheit von Vav1 beobachten.

Die Aktivität von Vav1-Proteinen hat nicht nur in physiologischen Prozessen eine tragende Rolle inne, sondern auch bei einigen pathologischen Veränderungen. Die pathogenetische Bedeutung von Vav1 vor allem für maligne Erkrankungen wird dadurch deutlich, wenn man sich vor Augen hält, dass das Proteine als GEF von Rho-GTPasen wirkt, welche direkt an der Regulation der Zellteilung und -proliferation beteiligt sind. So ist es nicht verwunderlich, dass eine funktionssteigernde Mutation des Protoonkogens Vav1 zu einer malignen Transformation von Zellen führen kann (Katzav et al. 2007). Trotz des onkogenen Potentials von Vav1, wurde bisher keine onkogene Variante von Vav1 in menschlichen Tumorzellen gefunden. Stattdessen fand man aber eine ektopische Überexpression von wildtypischen Vav1 in zahlreichen menschlichen Malignomen, beispielsweise in Neuroblastomen sowie in Pankreas- und Bronchialkarzinomen (Lazer et al. 2011, Hornstein et al. 2003, Fernandez-Zapico et al. 2005). Erstaunlicherweise konnte aber auch gezeigt werden, dass ein Verlust von Vav1 und RasGRF2 die Entwicklung von

hoch aggressiven T-Zelllymphomen in Mäusen fördert (Sergio et al. 2009). Im Gegensatz hierzu findet man in etwa 30% der Lymphome eine zweifach erhöhte Vav1-Expression. Vor allem bei der CLL (chronisch lymphatische Leukämie), bei diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen und beim multiplen Myelom konnte eine verstärkte Vav1-Aktivität nachgewiesen werden (Sergio et al. 2009, Lazer et al. 2011). Eine Vav1-Expression konnte man jedoch nicht nur in Neoplasien des hämatopoetischen Systems nachweisen, sondern auch in soliden Tumoren. So zeigte eine Untersuchung von 42 Neuroblastomen, dass mehr als zwei Drittel der Tumore Vav1 exprimierten (Lazer et al. 2011, Hornstein et al. 2003). Neben diesem Tumor konnte man eine pathophysiologische Vav1-Expression auch in Mammakarzinomen, Ovarialkarzinom und Melanomen der Uvea finden (Lazer et al. 2011).

1.5.3. Struktur und Regulation von Vav1

Das GEF-Protein Vav1 setzt sich aus mehreren Domänen zusammen (siehe Abb. 3). Von N-terminal beginnend konnte man folgende Domänen bestimmen: CH (1-116), AC (132-176), DH (185-375), PH (398-508), CRD (516-565), PR (607-610) und SH3-SH2-SH3 (612-844) (Chrencik et al. 2008). Die einzelnen Abkürzungen stehen für: *calponin homology domain* (CH), *acidic region* (AC), *Dbl homology domain* (DH), *pleckstrin homology domain* (PH), *cysteine-rich domain* (CR), *proline-rich region* (PR) und *Src-homology 2 bzw. 3* (SH2 bzw. SH3). Generell muss gesagt werden, dass Regionen wie die DH-, PH- und Zinkfinger (ZF) -Regionen multifunktionell sind und infolgedessen in unterschiedlichen Zellarten unterschiedliche Funktionen innehaben (Chrencik et al. 2008).



Abbildung 3: Schematische Darstellung der einzelnen Domänen von Vav1. Dargestellt sind die einzelnen Domänen des Rho-Guaninnukleotidaustauschfaktors Vav1 (CH: *calponin-homology*-Domäne; AC: *acidic* Domäne; DH: *Dbl homology*-Domäne; PH: *pleckstrin homology*-Domäne; CR: Cysteinreiche-Domäne, PR: Prolinreiche-Domäne, ZF: Zinkfinger-Domäne, SH3: *scr homology*-Domäne 3; SH2: *scr homology*-Domäne2 (nach Chrencik et al. 2008 und Bustelo 2001)

Die CH-Domäne kann man bei vielen Proteinen finden, welche an Aktin binden oder regulatorische Funktionen bezüglich des Zytoskeletts besitzen. Der Name leitet sich von Calponin ab, welches selbst ein Aktin-bindendes Protein ist (Gimona et al. 2002). In Jurkat T-Zellen sistierte die NF-AT-vermittelte Genexpression bei einer Deletion in dieser Domäne. Dies zeigte, dass diese Region vermutlich auch einen Einfluss auf Effektorproteine von Vav1 ausübt (Billadeau et al. 2000). Ebenso zeigte sich in CH-Domäne-negativen T-Zellen eine signifikante Verminderung des TCR-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms (Billadeau et al. 2000). Die genaue Rolle der CH-Domäne bei Vav1 ist bisher noch nicht vollständig geklärt, jedoch vermutet man, dass sie die Bindung an Aktin ermöglicht und insgesamt für die Lokalisation am Aktinzytoskelett sorgt (Billadeau et al. 2000). Ebenso scheint sie für die Signaltransduktion bei TCR-Aktivierung wichtig zu sein und den damit vermittelten Ca^{2+} -Einstrom. Eine weitere wichtige regulatorische Funktion der CH-Domäne ergibt sich durch eine Interaktion mit der ZF-Region, was zu einer Herunterregulierung der basalen Vav-Aktivität führt. Die Bedeutung dieser Domäne zeigt sich unter anderem dadurch, dass eine Deletion der ersten 66 Aminosäuren der CH-Domäne bereits zu onkogenem Vav1 führt (Abe et al. 1999). Darüber hinaus stellt die CH-Domäne auch eine Interaktionsstelle für Rho-GDIs dar, sowie für den Transkriptionsfaktor Enx1 (Zugaza et al. 2002). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CH-Domäne sowohl regulatorische als auch Effektoreigenschaften hat. Als weiteres strukturelles Merkmal weist Vav1 eine AC-Domäne auf. Mutationen, insbesondere Deletionen dieser Domäne können zu einer onkogenen Transformation des Moleküls führen, wie es beispielsweise die Arbeit von Abe et al. (1999) gezeigt hat. Die genaue Funktion dieser Domäne ist aber noch nicht geklärt. Jedoch hat sie zusammen mit der DH-Domäne eine autoinhibitorische Funktion auf Vav-Proteine. In NMR-Studien konnte nachgewiesen werden, dass die AC-Region an Stellen der DH-Region bindet und dementsprechend zu einer „*closed conformation*“ des Enzyms führt, es also inaktiviert, sodass eine Bindung an seine Substratmoleküle nicht mehr möglich ist (Zugaza et al. 2002). Dieser Umstand wurde unter anderem auch in dieser Arbeit ausgenutzt und durch eine Deletion der Aminosäuren 1-188 (welche diese beiden Regionen umfassen) onkogenes Vav (Vav1^{AN}) hergestellt. Die DH-Domäne stellt das Kernstück der GEF-Aktivität dar, da sich hier das aktive Zentrum des Proteins befindet. Sie wird aus insgesamt elf α -Helix-Strukturen gebildet. Die Eigenschaften dieser Struktur werden auch in dieser Arbeit beleuchtet. Die DH-Domäne ist hoch konserviert und findet sich in vielen weiteren Rho-GEFs (Billadeau et al. 2000, Chrencik et al. 2008, Bustelo 2000, Bustelo 2001, Zugaza et al. 2002,). In diesem

Zusammenhang kann auch die CR-Domäne angeführt werden, die einen regulatorischen Einfluss auf die DH-Domäne zeigt und die Substratbindung zu beeinflussen scheint (Chrencik et al. 2008). Darüber hinaus haben weitere Analysen ergeben, dass diese intramolekulare Interaktion möglicherweise für das breite Substratspektrum von Vav1 mitverantwortlich ist. Die CR-Domäne besteht aus zwei β -Faltblatt-Strukturen und einer C-terminalen α -Helix (Chrencik et al. 2008). Eine ähnliche Funktion scheint auch die PH-Domäne zu haben, die sich an die C-terminale α -Helix der DH-Domäne bindet. Sie selbst besteht aus sieben antiparallel verlaufenden β -Faltblatt-Strukturen sowie einer C-terminalen α -Helix. Zusammen mit der DH- und der CR-Domäne bildet sie bei der Aktivierung von Rac1 einen DH-PH-CRD/Rac1-Komplex (Chrencik et al. 2008). Die PH- und die CR-Domäne scheinen hier die DH-Domäne zu stabilisieren, welche mit der *switch II*-Region von Rac1 interagiert und dem Protein ermöglicht, seine Rho-GEF-Funktion wahrzunehmen. Dabei ist insbesondere die CR3-Region der DH-Domäne für die Interaktion mit der *switch II*-Region von Rac1 verantwortlich. Ebenso interagiert die *switch I*-Region von Rac1 mit der CR1- und CR2-Region der DH-Domäne (Chrencik et al. 2008). Diese drei Bindungsstellen der DH-Domäne sind unter den Rho-GEFs hoch konserviert und man nimmt an, dass sie die Freisetzung von GDP und damit die Bindung von GTP katalysieren. Das große Spektrum an Substratmolekülen von Vav1, welches unter anderem Rac1, RhoA, RhoG und Cdc42 beinhaltet, scheint von der CR-Domäne auszugehen, die als solche eher uncharakteristisch für Rho-GEFs ist. Die SH-Domänen haben keine katalytische Funktion und sind häufig bei zytoplasmatischen Signalproteinen zu beobachten, insbesondere bei Proteinen der Signaltransduktion von RPTKs. Die Präsenz dieser Proteinregionen führt zur Annahme, dass Vav1 nicht nur eine Rho-GEF-Funktion hat, sondern auch als Adapterprotein fungieren kann, da die SH-Domänen Bindungsstellen für andere Signalmoleküle darstellen, wie es z.B. für die SH2-Region charakteristisch ist. SH2-Domänen, welche etwa 100 Aminosäuren lang sind, erkennen Proteine oder Peptide mit phosphorylierten Tyrosinresten und stellen Bindungsstellen für diese dar. SH2-Domänen nehmen also nach bisherigem Wissen vor allem eine Funktion als Bindeglied in verschiedenen Signalwegen ein (Koch et al. 1991). So wurden auch für die SH2-Domäne von Vav1 einige potentielle Bindungspartner identifiziert, wie SLP-76, ZAP-70 und Syk (Tybulewicz 2005). Die SH3-Domäne von Vav1 ist etwa 60 Aminosäuren lang und erkennt vor allem Prolin-reiche Regionen. Ebenso wie SH2 vermittelt auch die SH3-Domäne Protein-Protein-Interaktionen und spielt bei vielen Signaltransduktionswegen eine Rolle. Die N-terminale SH3-Domäne bindet beispielweise an das Adapterprotein Grb2,

was wiederum eine Interaktion mit den beiden, an der Membran verankerten, Molekülen LAT und CD28 ermöglicht und demgemäß Vav1 eine Translokation an die Zellmembran erlaubt (Tybulewicz 2005). Weiterhin bindet die C-terminale SH3-Domäne von Vav1 eine Vielzahl von Proteinen, so bildet die SH3-Domäne Komplexe mit dem zytoskeletalen Regulatorprotein *Zyxin*, mit RNA-bindenden Proteinen (z.B. hnRNP-K, hnRNP-C und p44) und Enzymen, welche die Ubiquitinierung von Proteinen regulieren wie Cbl-b (Zugaza et al. 2002). SH-Domänen fungieren aber nicht nur bei intermolekularen Reaktionen als Adapterstellen, sondern auch bei intramolekularen Prozessen und sorgen so für die Stabilität von Proteinen oder anderen zellulären Molekülen. Zudem können Proteine mit enzymatischer Aktivität über SH-Domänen aktiviert oder inaktiviert werden, z.B. durch Phosphorylierung und entsprechende Konformationsänderung des Moleküls (Koch et al. 1991). An dieser Stelle muss auch die ZF-Region von Vav1 erwähnt werden, welche sich C-terminal zwischen der PH- und der ersten SH3-Domäne befindet (Bustelo 2001). ZF-Regionen findet man vor allem bei Transkriptionsfaktoren und sie scheint für alle biologischen Funktionen von Vav1 essentiell zu sein. Bisher konnten zwei wichtige Funktionen dieser Region dargestellt werden. Zum einen hat die Zinkfinger-Region eine regulatorische Funktion, indem sie durch eine Interaktion mit der CH-Domäne eine Herunterregulation der basalen Vav-Aktivität bewirkt (Bustelo 2001, Zugaza et al. 2002). Zum anderen vermittelt sie die Bindung von Substratmolekülen und die Induktion von untergeordneten Signalwegen. So konnten Studien mit Vav3 zeigen, dass die ZF-Region für die optimale Bindung an Substratmoleküle vonnöten ist (Bustelo 2001, Zugaza et al. 2002). Ein weiterer wichtiger Regulationsmechanismus von Vav-Proteinen stellt die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung dar. So führt eine Phosphorylierung von Tyr¹⁷⁴ in der AC-Region zu einer *open conformation* also zu einer Aktivierung des Enzyms, da es in dieser Konformation in der Lage ist, an seine Substratmoleküle zu binden (Zugaza et al. 2002).

1.6. Ziele der Arbeit

Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass Rac2 spezifisch das Isoenzym PLC γ_2 aktiviert, nicht aber seine Isoform PLC γ_1 . Die Aktivität der PLC γ_1 kann weder durch konstitutiv aktives Rac1, Rac2 und Rac3 noch durch Cdc42 und RhoA stimuliert werden. Überraschenderweise konnten wir aber zeigen, dass Vav1, welches als Rho-

Guaninnukleotidaustauschfaktor für Rac1, Rac2, RhoG, Cdc42 und RhoA fungiert, die Aktivität der PLC γ_1 in COS-7-Zellen wie auch in HEK293-Zellen stimuliert. Da aus der Literatur schon länger bekannt ist, dass Vav1 in T-Zellen die Aktivität der PLC γ_1 reguliert und wichtige Funktionen in T-Zellrezeptor-Signalwegen ausübt, war ein wesentliches Ziel dieser Arbeit, die molekularen Mechanismen der Vav1-vermittelten Stimulation der PLC γ_1 aufzuklären. Zu diesem Zweck wurden vier verschiedene Mutanten von onkogenem Vav1 $^{\Delta N}$ hergestellt. Die Mutationen lagen zum einen in der DH-Region, von der bekannt ist, dass sie das katalytische Zentrum des Austauschfaktors ist. Dies sollte die Frage beantworten, ob die intrinsische GEF-Aktivität von Vav1 für die Aktivierung der PLC γ_1 verantwortlich ist. Zum anderen wurde eine C-terminal trunkierte Mutante von Vav1 $^{\Delta N}$ hergestellt, in der die beiden SH3-Domänen und die SH2-Domäne entfernt wurden. Es ist bekannt, dass diese Domänen für zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sind und die Funktion von Vav1 als Adaptermolekül in T-Zellrezeptorsignalwegen regulieren. Mit Hilfe dieser trunkierten Mutante sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob eine Adapterfunktion von Vav1 an der Aktivierung der PLC γ_1 in intakten Zellen beteiligt ist. Alle generierten Vav1-Mutanten sollten zusammen mit PLC γ_1 oder PLC γ_2 in COS-7-Zellen und in HEK293-Zellen exprimiert werden und ihr Effekt auf die Aktivität der beiden PLC γ -Isoenzyme analysiert werden. Da bekannt ist, dass aktives Rac2 die PLC γ_2 stimulieren kann und Rac2 durch Vav1 aktiviert wird, sollten onkogenes Vav1 $^{\Delta N}$ und die Vav1-Mutanten gemeinsam mit PLC γ_2 und Rac2 in Zellen exprimiert werden, um Rückschlüsse auf die Funktionalität der Mutanten ziehen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und biochemische Reagenzien

Acrylamid 4K-Lösung (Mix 37,5:1)	AppliChem, Darmstadt
Agar Agar, Serva <i>high gel-strength</i>	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumformiat	Fluka, Neu-Ulm
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Bactotrypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis, Heidelberg
DMEM-Medium (# 41965-039)	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe
dNTP-Mix (100 mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Dowex Harz (1x8, 100-200 <i>mesh</i> , Cl ⁻ -Form)	Sigma, Deisenhofen
ECL™ Western Blotting Detektionsreagenz	GE Healthcare, München
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Dinatriumsalz	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(β-aminoethyl)-N,N,N'N' -tetraessigsäure (EGTA), freie Säure	Sigma, Deisenhofen
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Genetic Analysis Buffer	Abi, Darmstadt
D(+)-Glucose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	Serva Electrophoresis, Heidelberg

N-2-Hydroxyethylpiperazin-	
N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Deisenhofen
HMW-Marker	Sigma, Deisenhofen
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Kristallviolett	Sigma, Deisenhofen
Lipofectamine TM 2000, Transfektionsreagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Marker III (Lambda DNA/EcoRI + Hind III Marker)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Magermilchpulver (für Mikrobiologie)	Fluka, Neu-Ulm
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver (<i>blotting grade</i>)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumformiat	Fluka, Neu-Ulm
Natriumtetraborat (Decahydrat)	Sigma, Deisenhofen
OptiMEM I-Medium	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Pyronin Y	Sigma, Deisenhofen
RTU 60 Entwickler/Fixierer	Adefo, Dietzenbach
Szintillationsflüssigkeit Quicksafe A [®]	Zinsser Analytic, Frankfurt
Template Suppression Reagent	Abi, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Thimerosal	Sigma, Deisenhofen
Tinte	Pelikan, Hannover
Triethanolamin (TEA)	Sigma, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA (1 x) (# L11-004)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Trypsininhibitor aus Sojabohnen (STI)	Fluka, Neu-Ulm
Tween [®] 20	Sigma, Deisenhofen

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

2.1.1. Radioaktiv markierte Chemikalien

D-*myo*-[2-³H(N)]-Inosit mit PT6-271 Stabilisator

GE Healthcare, Freiburg

2.1.2. Enzyme, Kits und molekularbiologische Materialien

Alkalische Phosphatase

Roche, Mannheim

Big Dye Terminator Ready Reaction Mix

PE Biosystems, Wertigheim

DNA-Marker III

MBI-Fermentas, St. Leon-Rot

HMW-Marker

Sigma, Deisenhofen

Nucleobond[®] AX-PC 100 Kit

Macherey-Nagel, Düren

Nucleospin[®]-Plasmid Kit

Macherey-Nagel, Düren

QIAquick[®]-Gelextraktionskit

Qiagen, Hilden

QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit

Stratagene, Heidelberg

PfuUltra-Polymerase

Stratagene, Heidelberg

Restriktionsenzyme

MBI-Fermentas, St. Leon-Rot

T4-DNA-Ligase

New England Biolabs, Frankfurt

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

AGFA Cronex 5, Medical X-Ray Film

AGFA, Mortsels, Belgien

Einfriergefäße CryoPure Tube, 1,8 ml

Sarstedt, Nümbrecht

Gel-Blotting-Papier

Whatman, Dassel

Kanülen 0,45 x 25 mm (26 *gauge*)

Braun, Melsungen

Nitrocelluloserundfilter (32 mm)

Advanced Microdevices, Ambala,
Indien

Protran[®] Nitrocellulosemembran (0,45 µm)

Whatman, Dassel

Reagiergefäße (1,5 ml, 39 x 10,8 mm, farblos)

Sarstedt, Nümbrecht

Skalpell

Aescula, Tuttlingen

Spritzen (1 ml, 10ml, 20 ml)

Becton Dickinson, Heidelberg

Spritzenfilter Millex[®]-GS (0,22 µm)

Millipore Corporation Bedford, USA

Spritzenfilter Millex[®]-HA (0,45 µm)

Millipore Corporation Bedford, USA

Szintillationsröhrchen (20 ml)

Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim

Zellkulturschalen (Ø 100 mm)	TPP, Trasadingen, Schweiz
12-Loch-Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhren (mit konischem Boden, 15 ml und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.4. Pro- und eukaryotische Zellstämme

<i>Escherichia coli</i> DH5α	Clontech / ITC Biotechnology, Heidelberg
COS-7 (<i>African green monkey kidney cells-7</i> ; ATCC: CLR-1651)	American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA. Freundlicherweise von der Abteilung Virologie, Universität Ulm zur Verfügung gestellt.
HEK (<i>human embryonic kidney</i>)-293-Zellen ATCC: CRL-1573	American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA.

2.1.5. Oligonukleotide

2.1.5.1. Oligonukleotide für in vitro DNA-Mutagenese

2.1.5.1.1. Vav1^{ΔN/Q331A}

BP009

5'-GACCTGCTGATGGTGCCTATGGCCCGAGTTCTCAAATATCACCTC-3'

BP010

5'-GAGGTGATATTTGAGAACTCGGGCCATAGGCACCATCAGCAGGTC-3'

2.1.5.1.2. Vav1^{ΔN/D376A}

BP005

5'-ACGAGGTCAAGCGAGCCAACGAGACACTGCG-3'

BP006

5'-CGCAGTGTCTCGTTGGCTCGCTTGACCTCGT-3'

2.1.5.1.3. Vav1^{ΔN/E378A}

BP007

5'-AGGTCAAGCGAGACAACGCCACACTGCGACAGATCAC-3'

BP008

5'-GTGATCTGTCTGCAGTGTGGCGTTGTCTCGCTTGACCT-3'

2.1.5.1.4. Vav1^{ΔN/T617}

BP003

5'-ATGAAGCTGGAGGAATGTTCTGCCAGAGCCAACAACGGGAGGTTC-3'

BP004

5'- GAACCTCCCGTTGTTGGCTCTGGCAGAACATTCCTCCAGCTTCAT-3'

2.1.5.2. Sequenzierungsprimer

T7 Promotor [Sequenzierung von 5'-Enden von pcDNA3.1-*inserts*]

5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA-3'

BGH reverse Primer² [Sequenzierung von 3'-Enden von pcDNA3.1-*inserts*]

5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'

Delta-Primer [Sequenzierung von HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) und der Mutanten Q331A, D376A, E378A und T617]

5'-GAG AGC CAA CAA CGG GAG-3'

Vav-Primer [Sequenzierung von HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) und der Mutanten Q331A, D376A, E378A und T617]

5'-TCT GGG GAG GGT CCC TCC-3'

MK001 [Sequenzierung von HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) und der Mutanten Q331A, D376A, E378A und T617)]

5'-CCA TTG GAC CCT TTC TAC-3'

MK002 [Sequenzierung von HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) und der Mutanten Q331A, D376A, E378A und T617]

5'-TCC TAT GAC CTC AAG GAC-3'

MK003 [Sequenzierung von HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) und der Mutanten Q331A, D376A, E378A und T617]

5'-TCC TCA AAG GAG AAC ATC-3'

MK004 [Sequenzierung von HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) und der Mutanten Q331A, D376A, E378A und T617]

5'-CCA TTG GAC CCT TTC TAC-3'

2.1.6. Vorhandene Plasmide

HA-pcDNA3.1(+)	M. Meister, Ulm
pcDNA3.1(+)	Invitrogen, Karlsruhe
HA-Vav1 ^{ΔN} -pcDNA3.1(+)	
(N-terminal trunkiertes Vav1; AS 1-188)	M. Meister, Ulm
Rac2-pcDNA3.1(+) (<i>accession number</i> CAG30441.1)	C. Walliser, Ulm
hPLCγ ₂ -myc-pcDNA3.1(+) (<i>accession number</i> NP_002652)	C. Walliser, Ulm
hPLCγ ₁ -myc-pcDNA3.1(+) (<i>accession number</i> ABB84466)	C. Walliser, Ulm

2.1.7. Antikörper

2.1.7.1. Primäre Antikörper

Anti-HA (monoklonales Maus-IgG aus der Hybridomazelllinie 12CA5)	Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm
Myc-Tag (# 2276, 9B11) (monoklonales Maus-IgG)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

2.1.7.2. Sekundäre Antikörper

Anti-Maus-IgG

Sigma, Deisenhofen

2.1.7.3. Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

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

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

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

2.1.8. Geräte

ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer

Perkin-Elmer, Weiterstadt

Brutschrank Kelvitron® T

Heraeus Instruments, Fellbach

Certomat HK (Temperaturregeleinheit)

Braun, Melsungen

Certomat R (Schüttlereinheit)

Braun, Melsungen

Flüssigszintillationszähler LSC 2200 CA

Canberra Packard, Dreieich

Gelelektrophoresekkammer (DNA)

MBT, Giessen

Gelelektrophoresekkammer (SDS-PAGE)

Hoefer-Amersham Pharmacia, Freiburg

Hamilton Microliter-Spritze, 100 µl

Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Schweiz

Heizrührer MR 3001

Heidolph, Kehlheim

Immunoblot-Transferkammer	Renner GmbH, Darmstadt
Inkubator CB 210	Binder, Tuttlingen
J2-HS Zentrifuge	Beckman Instruments, München
Kleinschüttler Reax 2000	Heidolph, Kehlheim
Kleinschüttler Reax control	Heidolph, Kehlheim
Magnetrührer IkaCombimag RET	Janke & Kunkel, Staufen
Megafuge 1.0	Heraeus Christ, Osterode
Mikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg
Milli-Q ^{UF} PLUS	Millipore, Eschborn
Minifuge GL	Heraeus Christ, Osterode
Minifuge T	Heraeus Sepatech, Osterode
Netzgerät EPS 600 (SDS-PAGE)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Netzgerät EPS 301 (DNA)	Amersham Pharmacia, Freiburg
pH-Meter 765 calimatic	Knick Meßgeräte, Berlin
Photometer Gene Quant <i>pro</i>	Amersham Biosciences, Freiburg
PTC 200 Peltier Thermal Cycler (PCR)	MJ Research, Oldendorf
Rundschüttler Unimax 2010	Heidolph, Kehlheim
Schüttler Titramax 100	Heidolph, Kehlheim
SHARP JX-330 Scanner	Sharp Electronics GmbH, Hamburg
Sicherheitswerkbank HERA Safe	Heraeus Instruments, Fellbach
Sicherheitswerkbank Uniflow UVUB 1200	Uni Equip, Martinsried
Speedvac (Concentrator 5301)	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator IL 200M	Bachofer, Reutlingen
Videodokumentationsystem CF8/1 DX	Kappa Meßtechnik GmbH, Gleichen

2.1.9. Elektronische Datenverarbeitung

Chromas	Version 2.22, Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Australien
GraphPad Prism TM , Version 5	GraphPad Software Inc., San Diego, USA

Micrografx Designer [®] 9	Micrografx Inc., München
Micrografx Picture Publisher [®] 9	Micrografx Inc., München
Microsoft Word [™]	Microsoft Corp., Washington, USA
OMIGA [™] 2.0	Oxford Molecular Ltd., Oxford, Großbritannien
Sharp [™] -Scanner Scan JX/WIN V4.0	Krystek EDV, Hamburg

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Herstellung von Luria-Bertani (LB)- Medium

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

LB-Medium:	1,0 % (m/V)	Bactotrypton
	0,5 % (m/V)	Hefeextrakt
	1,0 % (m/V)	NaCl in ddH ₂ O
LB-Agar:	1,5 % (m/V)	Agar in LB-Medium

2.2.1.2. Antibiotika zur Selektion transformierter Bakterien

Aus dem Natriumsalz von Ampicillin wurde durch Auflösen in ddH₂O eine Stocklösung mit einer Konzentration von 50 mg/ml hergestellt. Diese wurde durch Filtration (Nitrozellulosefilter, Porengröße 0,22 µm) sterilisiert und bei –20 °C gelagert. Im Medium wurde diese Lösung auf eine Konzentration von 50 µg/ml verdünnt.

2.2.1.3. Herstellung kompetenter Zellen

Mittels einer Impföse wurden die in einer Einfrierlösung gelagerten Bakterien auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze wurden sechs Einzelkolonien von der Agarplatte gepickt und zur Vermehrung in 25 ml flüssiges LB-Medium überführt. Die Inkubation dieser Vorkultur erfolgte bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 200 Umdrehungen pro Minute (UpM). Nach 6 bis 8 h wurden mit 2 ml, 4 ml und 10 ml der Vorkultur je 250 ml SOB-Medium angeimpft und über Nacht bei 200 UpM und 20 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die OD₆₀₀ aller drei Kulturen beobachtet. Die Kultur, die als erstes eine OD₆₀₀ von 0,55 erreichte, wurde für 10 min in ein eiskaltes Wasserbad überführt. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (2500 x g, 10 min, 4 °C) und in 80 ml eiskalten Inoue-Puffer aufgenommen. Die Bakterien wurden erneut zentrifugiert (2500 x g, 10 min, 4°C) und das Pellet in 20 ml eiskaltem Inoue-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1,5 ml DMSO und Inkubation für 10 min auf Eis wurden die kompetenten, zur Aufnahme von fremder DNA bereiten Zellen in 50 µl Aliquots portioniert, in flüssigem Stickstoff (N₂) schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Einfriermedium:	3,6 mM	K ₂ HPO ₄
	1,3 mM	KH ₂ PO ₄
	2 mM	NaCitrat
	1 mM	MgSO ₄
	1,4 % (m/V)	Glycerin
	in ddH ₂ O	
SOB-Medium:	2 % (m/V)	Bactotrypton
	0,5 % (m/V)	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄
	in ddH ₂ O, pH 7,0	

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

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

2.2.1.4. Transformation kompetenter Zellen

Zunächst wurden die bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagerten kompetenten DH5 α Zellen auf Eis angetaut. Danach wurde das gewünschte Plasmid (10 ng in einem Volumen von $\leq 2\text{ }\mu\text{l}$), der PCR-Ansatz (2 μl) oder die Ligationsreaktion (2 μl) zu 50 μl der Bakteriensuspension gegeben und die beiden Komponenten vorsichtig durchmischt. Nach der 30-minütigen Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock für 90 s im $42\text{ }^\circ\text{C}$ warmen Wasserbad. Die Zellen wurden dann für 2 min auf Eis abgekühlt, bevor 500 μl vorgewärmtes LB-Medium hinzugegeben wurde. Danach wurden die Zellen 1 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ auf einem Schüttler (220 Upm) inkubiert, sodass Antibiotikaresistenzgene exprimiert wurden. Zur Selektion wurden 400 μl der transformierten Zellen auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und die Platten für mindestens 12 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

2.2.1.5. Selektion transformierter Bakterien

Die Suspension der transformierten Bakterien wurde auf LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ im Brutschrank kultiviert. Bei erfolgreicher Aufnahme und Amplifikation der Plasmide besaßen die Bakterien eine für den verwendeten Vektor charakteristische Resistenz gegenüber einem Antibiotikum. Sequenzen der verwendeten pcDNA3.1(+)-Vektoren kodieren für eine Ampicillin-Resistenz. Daher konnten nur plasmidtragende Bakterien auf den LB^{Amp^+} -Platten überleben und optisch sichtbare Einzelkolonien bilden. Diese wurde mittels einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und je nach benötigter Menge an DNA in 34 ml (Minipräparation) oder 50 ml (Midipräparation) LB^{Amp^+} -Medium überführt. Hier erfolgte

die weitere Kultur der Zellen wiederum über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. Präparation von Plasmid-DNA

Um die rekombinanten Plasmide für das weitere Vorgehen zu präparieren, mussten diese zunächst aus den transformierten Zellen aufgereinigt werden. Für eine analytische Präparation (Minipräparation) wurde der NucleoSpin®-Plasmid-Kit, für einen präparativen Ansatz (Midipräparation) der NucleoBond® PC100-Kit, beide von der Fa. Macherey-Nagel, verwendet. Dazu wurde zunächst 3 ml (analytischer Ansatz) bzw. 50 ml (präparativer Ansatz) steriles LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, mit einer Kolonie der transformierten Bakterien beimpft und die Suspension über Nacht bei 37 °C und 200 Upm auf einem Schüttler inkubiert. Der weitere Arbeitsablauf wurde dann entsprechend den Protokollen der jeweiligen Kits durchgeführt. Die DNA wurde anschließend in ddH₂O eluiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren absorbieren UV-Licht mit einem Absorptionsmaximum bei 260 nm. Diese Eigenschaft wird sich bei der photometrischen Messung der DNA-Konzentration zu Eigen gemacht. Mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes $A = \varepsilon \times d \times c$, mit A, Absorption, ε , molarer Extinktionkoeffizient, d, Schichtdicke, c, Konzentration, kann die Konzentration der DNA in Abhängigkeit des bei 260 nm absorbierten Lichts berechnet werden. Der molare Extinktionkoeffizient für dsDNA bei 260 nm liegt bei $\sim 50 (\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$. Zusätzlich kann anhand des Verhältnisses der OD₂₆₀ (DNA) zur OD₂₈₀ (Proteine) die Reinheit der DNA bestimmt werden. Für reine DNA liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung der DNA durch Proteine hin.

2.2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von Fragmentgrößen und zur Präparation von Fragmenten aus Plasmid-DNA erfolgte deren Auftrennung nach Molekülgröße durch Elektrophorese in 1 %igem Agarosegel. Nach dem Auflösen von 0,4 g Agarose in 40 ml 1 x TAE-Puffer, Aufkochen

und Abkühlen der Lösung auf *ca.* 60 °C wurde die Lösung in einen Gelschlitten gegossen, um dort zu polymerisieren. Analytische Ansätze, die 1 µg DNA in 15 µl Lösung enthielten, und präparative Ansätze mit 10 µg DNA in 50 µl Lösung wurden mit DNA-Probenpuffer im Verhältnis 1/5 (V/V) versehen und in die Taschen des Gels geladen. Die DNA-Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V für *ca.* 60 min in 1 x TAE-Puffer durchgeführt. Danach wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung mit einer finalen Konzentration von 1 µg/ml gebadet und das überschüssige Ethidiumbromid anschließend durch Waschen mit Wasser entfernt. Die Auswertung fand unter Beleuchtung mit UV-Licht ($\lambda = 312$ nm) auf dem Transilluminator statt, wobei das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid rot-orange emittierte ($\lambda = 560$ nm). Bei Bedarf wurde das erhaltene Bild videodokumentiert und gedruckt.

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

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

Kristallviolettlösung	10 mg/ml	in H ₂ O
6 x Ladepuffer	30 % (V/V)	Glycerin
	300 µg/ml	Kristallviolett

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

Marker III: λ -DNA/EcoRI/HindIII (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in 1 x DNA-Probenpuffer

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

2.2.2.4. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

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

2.2.2.5. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

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

	Präparative Restriktion	Analytische Restriktion
Plasmid DNA	5 μg	0,5-1 μg
10 x Restriktionspuffer	5 μl	1,5 μl
Restriktionsenzym je	25 U	5 U
Mit ddH ₂ O <i>ad</i>	50 μl	15 μl

Gemäß Herstellerangaben erfolgte die Inkubation bei präparativer Restriktion für 1,5 h bei 37 °C, bei analytischer Restriktion für 1 h bei 37 °C. Anschließend wurden die DNA-

Proben mit DNA-Probenpuffer versetzt und mit dem Marker III durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Spaltprodukte konnten danach mittels UV-Beleuchtung ausgewertet werden.

2.2.2.6. Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Um rekombinante Plasmide zu erhalten, die anschließend in Zellen eingeschleust werden können, müssen das DNA-Fragment (*insert*) und der geeignete linearisierte Vektor ligiert werden. Hierfür wird T4-DNA-Ligase verwendet, die die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen dem 5'-Phosphat-Ende und dem 3'-Hydroxyl-Ende doppelsträngiger DNA katalysiert. Das molare Verhältnis von Vektor zu *insert* betrug 1:15.

Ligationsansatz:	ca. 20 ng	linearisierter Vektor
	x ng	DNA-Fragment
	1,5 µl	10 x T4-DNA-Ligase-Puffer
	1,5 µl	T4-DNA-Ligase
	ad 15 µl	mit ddH ₂ O

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

2.2.2.7. Einfügung von Mutationen in eine DNA-Sequenz

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

Mutagenese-PCR-Ansatz:	ca. 100 ng	Matrizen-DNA
	5 µl	10 x PfuUltra-Puffer
	1,25 µl	<i>primer</i> (100 ng/µl)
	1,25 µl	<i>primer</i> (100 ng/µl)
	1 µl	dNTP-Mix (10mM)
	3 µl	Quik-Solution
	1 µl	<i>PfuUltra</i> -Polymerase (2,5 U/µl)
	ad 50 µl	mit ddH ₂ O

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

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

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Start	95 °C	1 min	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C	50 s	18 Zyklen
Anlagerung der <i>primer</i>	60 °C	50 s	
Elongation	68 °C	1 min/kb	
Elongation	68 °C	8 min	1 Zyklus
Lagerung	4°C	unbegrenzt	

Nach der PCR wurde die methylierte, nicht-mutierte DNA durch das Enzym DpnI (10 U/µl) für 1 h bei 37 °C gespalten. Die anschließende Vermehrung der mutierten DNA und die Bildung ihrer *supercoiled* Form erfolgten in entsprechenden kompetenten Bakterien. Dazu wurden 2,0 µl des Ansatzes für die Transformation in kompetente Bakterien-Zellen verwendet. Mittels Mini-Präparation wurde die rekombinante DNA isoliert und mittels Sequenzierung der Erfolg der Mutagenese überprüft. Die Elongationszeit zur Herstellung der DNA von HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1.(+) betrug etwa 8 min.

2.2.2.8. Auswahl der *primer* für die Mutagenese-PCR

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

Formel 1: Ermittlung der Schmelztemperatur nach Angaben des QuikChange site-directed mutagenesis Kit.

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

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

2.2.2.9. Sequenzierung von DNA

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

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

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

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

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Start	96 °C	2,5 min	1 Zyklus
Denaturierung	96 °C	1 min	25 Zyklen
Anlagerung der <i>primer</i>	51 °C	1 min	
Elongation	60 °C	4 min	
Elongation	60 °C	5 min	1 Zyklus
Lagerung	4 °C	Unbegrenzt	

Nach Beendigung der PCR wurden 90 µl ddH₂O zugegeben, die DNA für 10 min bei 4 °C mit 2,5 Volumen 100 %igem Ethanol gefällt und bei 15800 x *g* für 20 min bei RT (Raumtemperatur) zentrifugiert. Das DNA-Pellet des Sequenzieransatzes wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA-Pellets wurden in 11 µl Template Suppression Reagent gelöst, für 2 min bei 90 °C denaturiert, kurz auf Eis inkubiert und in den Probenwechsler des Sequenzanalyse-Geräts gestellt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch Kapillar-Gelelektrophorese mit 1 x Genetic Analysis Buffer für 36 min bei 50 °C und 15 kV. Die Sequenzierungen wurden freundlicherweise von Frau S. Gierschik durchgeführt.

2.2.3. Eukaryotische Zellen

2.2.3.1. HEK293-Zellen

2.2.3.1.1. Zellkultur von HEK293-Zellen

HEK (*human embryonic kidney*)-293-Zellen wurden in Zellkulturschalen (Ø 100 mm) in 10 ml DMEM-Medium der Firma Invitrogen (Gibco) kultiviert. Dem DMEM-Medium waren folgende Komponenten steril zugesetzt worden: 10 % (V/V) FCS (*fetal calf serum*), 2 mM Glutamin, eine Lösung aus 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat und 25 mM HEPES, pH 7,2. Nach drei bis vier Tagen wurden die noch nicht vollständig konfluenten Zellen in neue Kulturschalen umgesetzt. Hierzu wurde das

Medium entfernt und die Zellen vom Boden der Kulturschalen mittels einer Glaspipette abgespült. Die Zellen wurden in eine 15 ml Zentrifugenröhre überführt, zentrifugiert (300 x g, 5 min, RT) und anschließend in DMEM-Medium 1:10 bzw. 1:6 verdünnt. Es wurden ca. 2×10^6 bzw. $3,3 \times 10^6$ Zellen pro Zellkulturschale ausgesät. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.2.3.1.2. Bestimmung der Zellzahl

Um Zellen mit einer bestimmten Dichte in einer Zellkulturschale zu kultivieren, mussten die Zellen gezählt werden. Zunächst wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 5 ml steril filtriertem PBS-Puffer gewaschen. Danach wurden die adhärenenten Zellen für 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ mit 2 ml Trypsin/EDTA (0,5 g Trypsin (1:250)/l; 0,2 g EDTA/l in PBS) vom Boden der Schale abgelöst. Zur Verdünnung des Trypsins wurden danach 7 ml DMEM-Medium zugegeben. Die Zellen wurden mittels einer Glaspipette abgespült und die Suspension in eine 50 ml Zentrifugenröhre überführt, bei 300 g für 5 Minuten bei 20°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml DMEM-Medium resuspendiert. Davon wurde ein Aliquot 1:10 (V/V) mit Trypanblaulösung [0,5 % (m/V) in 0,85 %iger (m/V) NaCl-Lösung] verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Das Volumen des Zählbereiches betrug 0,1 µl, weshalb die erhaltene Zellzahl mit 10⁴ und zusätzlich mit dem Verdünnungsfaktor 10 multipliziert werden musste, um die Zellzahl je ml Suspension berechnen zu können.

PBS-Puffer, pH 7,4: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄

2.2.3.1.3. Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Für eine transiente Transfektion von HEK293-Zellen wurden die Zellen zunächst 48 h vor der Transfektion in 1 ml Medium in eine 12-Loch-Zellkulturschalen ausgesät. Die Zelldichte betrug dabei $0,15 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung. Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium mit 1 ml frischem Medium ersetzt. Für die Transfektion wurden dann pro Ansatz 1750 ng DNA in 100 µl Serum-reduziertem Opti-MEM® I-Medium (Invitrogen) verdünnt. Um die Menge an DNA konstant zu halten, wurde gegebenenfalls mit dem entsprechenden leeren Vektor auf die erforderliche DNA-Menge abgeglichen. Pro Ansatz wurden dann 2 µl LipofectamineTM 2000 (Invitrogen) pro µg DNA in 100 µl Serum-reduziertem Opti-MEM® I-Medium verdünnt. Nach 5-minütiger Inkubation des

Gemisches wurden die DNA-Medium- und Lipofectamine™ 2000-Medium-Lösungen miteinander vereint und 20 min bei RT inkubiert. Nach vorsichtigem Zutropfen von 200 µl der vereinigten Lösungen zu den Zellen wurden diese für 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.3.2. COS-7-Zellen

2.2.3.2.1. Zellkultur von COS-7-Zellen

Bei der COS-7-Zelllinie handelt es sich um eine etablierte Fibroblasten-Zelllinie, die aus Nierengewebe von Grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) gewonnen wurde. Das Wort selber ist ein Akronym, das sich aus CV-1 (waren ursprünglich CV-1-Zellen) und SV40 (die Zellen beinhalten zusätzlich SV40-DNA) zusammensetzt (Gluzmann 1981). Die COS-7-Zellen wurden als adhärenente Kultur in Kulturschalen (Ø 100 mm) in 10 ml Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), welches mit 10 % (V/V) fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt worden war, bei 37 °C, 10 % CO₂, kultiviert. Bevor die Zellen Konfluenz erreichten (alle drei bis vier Tage) wurden sie passagiert. Dazu wurde das Medium zunächst abgesaugt und die Zellen einmal mit 5 ml PBS (pH 7,4) gewaschen. Um die adhärenenten Zellen von der Kulturschale abzulösen, wurden sie für 10 min mit 2 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Verdünnung des Trypsins wurden danach 7 ml Medium zugegeben. Die noch anhaftenden Zellen wurden mittels einer Glaspipette abgespült und die Suspension in eine 15 ml Zentrifugenröhre überführt, bei 300 x g für 5 min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in Medium 1:10 bzw. 1:12 verdünnt.

PBS-Puffer, pH 7,4: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄.

2.2.3.2.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl von COS-7-Zellen erfolgte analog zu der Bestimmung der Zellzahl von HEK-293-Zellen mit folgenden Unterschieden: Die Zellen wurden 10 Minuten mit Trypsin/EDTA bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert. Ein Aliquot der Zellen wurde 1:4 mit einer Trypanblaulösung verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

2.2.3.2.3. Transiente Transfektion von COS-7-Zellen

Für eine transiente Transfektion von COS-7-Zellen wurden die Zellen zunächst 24 h vor der Transfektion in 1 ml Medium in eine 12-Loch-Zellkulturschalen ausgesät. Die Zelldichte betrug dabei $0,13 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung. Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium mit 1 ml frischem Medium ersetzt. Für die Transfektion wurden pro Ansatz 1750 ng DNA in 100 µl Serum-reduziertem Opti-MEM® I-Medium verdünnt. Um die Menge an DNA konstant zu halten, wurde gegebenenfalls mit dem entsprechenden leeren Vektor auf die erforderliche DNA-Menge abgeglichen. Pro Ansatz wurden dann 2 µl Lipofectamine™ 2000 pro µg DNA in 100 µl Serum-reduziertem Opti-MEM® I-Medium verdünnt. Nach 5-minütiger Inkubation des Gemisches wurden die DNA-Medium- und Lipofectamine™ 2000-Medium-Lösungen miteinander vereint und 20 min bei RT inkubiert. Nach vorsichtigem Zutropfen von 200 µl der vereinigten Lösungen zu den Zellen wurden diese für 24 h bei 37 °C, 10 % CO₂ inkubiert.

2.2.3.3. Herstellung von Ganzzelllysaten zur Kontrolle der Expression von Proteinen in COS-7- und HEK293-Zellen

Zur Kontrolle der Expression von PLCγ₁, PLCγ₂, Vav1^{ΔN}, Vav1^{ΔN/Q331A}, Vav1^{ΔN/D376A}, Vav1^{ΔN/E378A} und Vav1^{ΔN/T617} wurden COS-7- bzw. HEK293-Zellen lysiert und die darin enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Hierzu wurden die Zellen in 12-Loch-Zellkulturschalen zunächst mit 400 µl PBS gewaschen und anschließend in 200 µl (COS-7-Zellen) bzw. in 300 µl (HEK293-Zellen) einfach konzentriertem (+)-Probenpuffer auf einem Schüttler (Titramax 100, Heidolph) bei 1200 Upm für 30 min inkubiert. Das Zelllysate wurde anschließend in Reagiergefäße (1,5 ml) überführt, zur Denaturierung der Proteine für 5 min bei 95 °C inkubiert und wie unten beschrieben analysiert.

2.2.4. SDS-PAGE

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

größerer Proteine wie PLC- und Vav-Proteine 10 % (m/V) Monomer. Die genaue Zusammensetzung zeigt folgende Tabelle:

Tab. 4: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel. Gezeigt sind jeweils die für die Herstellung der Gele verwendeten Reagenzien.

	10 % (m/V) Trenngel	12,5 % (m/V) Trenngel	6 % (m/V) Sammelgel
Monomerlösung	10 ml	12,5 ml	2 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml	7,5 ml	---
Sammelgelpuffer	---	---	2,5 ml
bidestilliertes Wasser	12 ml	9,5 ml	5,3 ml
10 % (m/V) Natriumdodecyl- sulfat	0,3 ml	0,3 ml	100 µl
10 % (m/V) Ammoniumper- sulfat	150 µl	150 µl	50 µl
N,N,N',N'- Tetramethyl- ethyldiamin	10 µl	10 µl	5 µl

Die Trenngellösung wurde bis *ca.* 4 cm unterhalb der Oberkante der Kammer eingefüllt und mit ddH₂O überschichtet. Nach dem Ende der Polymerisation wurde das Wasser abgossen, ein Kamm mit der erforderlichen Anzahl an Taschen zwischen die Platten eingebracht und das Sammelgel oberhalb des Trenngeles aufgebracht. Nach Polymerisation des Sammelgels war das System einsatzbereit.

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

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

Zur Herstellung des Trenngelpuffers wurden 90,75 g Trisbase in 400 ml ddH₂O gelöst und der pH-Wert mit *ca.* 16 ml konz. HCl auf pH 8,8 eingestellt. Die Lösung wurde mit ddH₂O auf 500 ml aufgefüllt und durch einen 0,45-µm-Filter filtriert.

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

Zur Herstellung des Sammelgelpuffers wurden 12 g Trisbase in 160 ml ddH₂O gelöst und der pH-Wert mit *ca.* 9 ml konz. HCl auf pH 6,8 eingestellt. Die Lösung wurde mit ddH₂O auf 200 ml aufgefüllt und durch einen 0,45-µm-Filter filtriert. Geeignete Mengen Protein (*ca.* 80-100 µg pro Geltasche), sowie die Markerproteinlösung, wurden mit ddH₂O auf ein Volumen von 50 µl verdünnt. Nach Zugabe von 50 µl von 2-fach konzentriertem (+)-Probenpuffer wurden die Proben für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Vor dem Einbringen der Proben mittels einer 100 µl-Hamilton-Spritze wurden die Taschen mit 1 x Tankpuffer gespült. Freie Taschen wurden mit 100 µl eines 1:1 Gemisches aus 2-fach konzentriertem (-)-Probenpuffer und ddH₂O versehen. Der Lauf erfolgte in 1 x Tankpuffer bei einer Stromstärke von 45 mA für *ca.* 3-4 h, bis die farblich markierte Front den Unterrand des Gels erreicht hatte.

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

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

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

2.2.5. Immunblotting von Proteinen (*Western blotting*)

2.2.5.1. Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran

Zur immunchemischen Analyse der mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden die Proteine im elektrischen Feld auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (*Western blotting*). Hierfür wurden das Gel und ein Stück Nitrozellulosemembran passender Größe mit Transferpuffer getränkt. Zunächst wurde das Gel auf ein Gel-Blotting-Papier gelegt. Die Nitrozellulosemembran wurde luftblasenfrei auf das Gel aufgebracht und auf der Membran ein zweites Gel-Blotting-Papier platziert. Nun wurden die Membran und die Blotting-Papiere zwischen zwei Schaumstoffschwämmen und zwei Plastikhalterungen in die mit Transferpuffer gefüllte Immunblot-Transfer-Kammer eingehängt. Die Kammer wurde an ein Netzgerät mit einer konstanten Stromstärke von 125 mA bei einer Leistung von 2 W angeschlossen. Der Proteintransfer erfolgte im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Das Gel war der Kathode, die Membran der Anode zugewandt, so dass die negativ geladenen Proteine aus dem Gel zur Membran wanderten. Die Dauer des Proteintransfers war abhängig von der Größe des nachzuweisenden Proteins. Für Phospholipasen (ca. 150 kDa) und Vav1^{AN}-Proteine (ca. 80 kDa) war der Proteintransfer nach 15 Stunden abgeschlossen. Nach dem Transfer wurde die Spur auf der Nitrozellulosemembran, die den Marker enthielt, abgetrennt, in ddH₂O gewaschen und die transferierten Markerproteine mit blauer Tinte (3,3 % (V/V) Tinte in 0,3 % (V/V) Tween-Lösung) gefärbt und anschließend markiert. Die Proteine auf der Nitrozellulosemembran wurden immunchemisch analysiert.

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

2.2.5.2. Immunchemische Analyse transferierter Proteine

Zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran wurde diese nach dem Proteintransfer eine Stunde lang in PBS/Tween mit 5 % (m/V) Magermilchpulver vorbehandelt. Inkubationen der Membran in Flüssigkeiten wurden auf dem Rundschtüttler vollzogen. Die Bindung des ersten, für das jeweilige Protein spezifischen, Antikörpers erfolgte für zwei Stunden bei RT unter ständigem Schütteln. Hierfür wurde die Antikörperlösung geeignet in PBS/Tween verdünnt und mit 0,05 % (m/V) des Konservierungsmittels Thimerosal versetzt. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen der Membran in PBS/Tween für je sieben Minuten. Die Bindung des zweiten, gegen den ersten Antikörper gerichteten Antikörpers (Peroxidase-Anti-Maus-IgG) erfolgte in einer mit PBS/Tween 1:1000 verdünnten Lösung bei RT für 45 min. Es folgten wieder drei Waschschrte für je fünf Minuten in PBS/Tween und einer in ddH₂O. Mittels ECL-*Western-Blot*-Detektionsreagenz erfolgte die Identifikation der Banden der jeweiligen Proteine. Hierfür wurde die Membran einer 1:1-Mischung der Lösungen für eine Minute ausgesetzt. Die so behandelte Membran wurde ohne Zeitverzug mit Frischhaltefolie auf einer Glasplatte fixiert und durch direktes Auflegen wurde in dunkler Umgebung ein Röntgenfilm belichtet. Die Belichtungsdauer variierte zwischen 10 s und 20 min. Nachfolgend wurde der Film entwickelt und die Position der Banden der Markerproteine übertragen.

PBS-Puffer:	80 mM	Na ₂ HPO ₄
	20 mM	NaH ₂ PO ₄
	100 mM	NaCl
	pH 7,5 mit NaOH	
PBS/Tween:	PBS-Puffer mit 0,05 % (V/V) Tween	

2.2.6. Bestimmung der Phospholipase C Aktivität in COS-7- und HEK293-Zellen

Durch Stimulation der PLC-Isoenzyme werden infolge hydrolytischer Spaltung des Substrats PIP₂ die beiden *second messenger* IP₃ und DAG gebildet. IP₃ wird anschließend mittels Phosphatasen zu IP₂, IP und weiter zu Inosit hydrolysiert. Die durch Aktivierung

der PLC-Isoenzyme generierten Inositphosphate wurden mittels Anionenaustauschchromatographie analysiert. Zunächst wurden $0,13 \times 10^6$ COS-7-Zellen, die in Kultur die Passagen 20 bis 31 durchlaufen hatten, in 12-Loch-Zellkulturschalen ausgesät, für 24 h bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert und am folgenden Tag mit den entsprechenden Plasmid-DNA-Konstrukten transfiziert (siehe 2.2.3.2.1., 2.2.3.2.2. und 2.2.3.2.3.). Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die COS-7-Zellen radioaktiv markiert (siehe 2.2.6.1.) und am folgenden Tag die gebildeten Inositphosphate mittels Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt und ihre Menge im Szintillationszähler ermittelt. Für die Bestimmung der Phospholipase C-Aktivität von HEK293-Zellen wurden zunächst $0,15 \times 10^6$ HEK293-Zellen, die in Kultur die Passagen 3 bis 20 durchlaufen hatten, in 12-Loch-Zellkulturschalen ausgesät, für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und mit den entsprechenden Plasmid-DNA-Konstrukten transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die HEK293-Zellen radioaktiv markiert und am folgenden Tag die gebildeten Inositphosphate mittels Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt und ihre Menge im Szintillationszähler ermittelt.

2.2.6.1. Radioaktive Markierung

Die radioaktive Markierung der COS-7-Zellen und HEK293-Zellen wurde in Anlehnung an eine Arbeit von Offermanns und Simon (1995) durchgeführt. Hierzu wurde D-*myo*-[2-³H(N)]-Inosit verwendet. Das ³H-markierte Inosit wird in den Zellen zur Synthese von [³H]PIP₂ verwendet, welches wiederum durch PLC-Isoenzyme zu ³H-markierten Inositphosphaten hydrolysiert wird. Die jeweiligen Zellen wurden mit 500 µl PBS-Puffer gewaschen und für 20 Stunden bei 37 °C und 10 % CO₂ bei COS-7-Zellen bzw. 5 % CO₂ bei HEK293-Zellen in 400 µl DMEM-Medium inkubiert, das D-*myo*-[2-³H(N)]-Inosit mit einer Konzentration von 2,5 µCi/ml und 10 mM LiCl enthält. Eine 24-stündige Inkubation mit LiCl wurde in einer Arbeit von Zhang und Neer (2001) beschrieben. Lithiumchlorid hemmt in den Zellen die Enzyme Inositpolyphosphat-1-phosphatase und Inositmonophosphatase, die den Abbau von IP₂ über IP zu Inosit katalysieren. Die dadurch akkumulierten Inositphosphate wurden mittels Säulenchromatographie analysiert.

2.2.6.2. Säulenchromatographie und Messung der Inositphosphate

COS-7-Zellen und HEK293-Zellen wurden mit 400 µl PBS gewaschen und zur Extraktion der Inositphosphate mit 200 µl eiskalter 10 mM Ameisensäure für 30 Minuten auf Eis in den Zellkulturschalen inkubiert. Danach wurde der Überstand in Reagiergefäße (1,5 ml) überführt, zur Neutralisation der Ameisensäure 300 µl einer 10 mM Ammoniumhydroxid-Lösung zugegeben und die Proben durchmischt. Zur Abtrennung von noch vorhandenen Zellresten wurden die Proben bei $15\,000 \times g$ für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf das Dowex-Harz der Chromatographiesäulen aufgetragen, das zuvor mit 3 ml ddH₂O gewaschen worden war. Die weiteren Schritte der Säulenchromatographie wurden in Anlehnung an eine Arbeit von Wu et al.(1992) durchgeführt. Zur Elution von Inosit und Glycerolphosphoinosit wurde das Dowex-Material einmal mit 3 ml ddH₂O und anschließend zweimal mit je 3,5 ml 5 mM Natriumtetraborat, 60 mM Natriumformiat gewaschen. Die Inositphosphate IP, IP₂ und IP₃, die durch elektrostatische Anziehungskräfte an das positiv geladene Harz gebunden waren, wurden mittels dreimaliger Zugabe von je 1 ml 1 M Ammoniumformiat/0,1 M Ameisensäure in Szintillationsröhrchen eluiert. Das Eluat wurde mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit (Zinsser Analytic) gemischt und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler gemessen.

2.2.6.3. Regeneration des Dowex-Harzes

Um das Dowex-Harz zu regenerieren, wurden 8 ml 2 M Ammoniumformiat, 0,1 M Ameisensäure und anschließend 10 ml ddH₂O zur Neutralisation auf die Säulen gegeben. Zur Lagerung wurden die Säulen mit 3 ml ddH₂O befüllt und verschlossen.

2.2.6.4. Präparation der Matrix

Um eine Bindung von Inositphosphaten an die Säulenmatrix zu ermöglichen, wurde diese von der Chlorid-Form in die Formiat-Form überführt. Dazu wurden 50 ml Dowex-1 (Cl⁻-Form) für eine Stunde bei RT in 200 ml 1 N NaOH inkubiert, wobei die basische Lösung mit einem Glasstab alle 5 min gerührt wurde. Nach der Sedimentation der rötlich-orangen Matrix wurde der Überstand dekantiert und erneut 200 ml 1 N NaOH zugegeben. Nach Rühren und Sedimentation wurde der Überstand erneut dekantiert und die Matrix mit 200 ml 1 M Ameisensäure versetzt und gerührt, wobei die Farbe des Harzes in hell-gelb umschlug. Nach der Sedimentation wurde der Überstand dekantiert und das Harz zweimal

mit ddH₂O gewaschen. Die präparierte Matrix wurde anschließend in 50 ml ddH₂O aufgenommen und entweder direkt zur Befüllung der Säulen verwendet oder bei 4 °C gelagert.

2.3. Darstellung der Ergebnisse

Alle in dieser Arbeit dargestellten Experimente wurden mindestens dreifach durchgeführt. Die Ergebnisse von repräsentativen Experimenten sind in Form der Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen gezeigt. Aufgrund der geringen Anzahl an Messproben wurde keine statistische Auswertung der Ergebnisse durchgeführt, sondern jeweils eine Dreifachbestimmung mit Berechnung des Mittelwertes $\pm$ Standardabweichung.

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung von Vektoren zur Expression der Fremdproteine Vav1^{ΔN}, Vav1^{ΔN/Q331A}, Vav1^{ΔN/D376A}, Vav1^{ΔN/E378A} und Vav1^{ΔN/T617} in eukaryotischen Zellen

Um Fremdproteine in eukaryotischen Zellen exprimieren zu können, musste cDNA, welche für die zu exprimierenden Proteine kodiert, in geeignete Expressionsvektoren ligiert werden. In dieser Arbeit wurde für die Expression von Vav1-Proteinen sowohl in COS-7-Zellen als auch in HEK293-Zellen der Vektor HA-pcDNA3.1(+) verwendet. Der in Abb. 4 dargestellte HA-Tag diente zum Expressionsnachweis der Vav1-Proteine mittels eines gegen den Tag gerichteten Antikörpers (Abbildung 14, 17, 20 und 23). Als *insert* wurde humanes HA-Vav1^{ΔN}, das in diesem Kapitel noch näher beschrieben wird, verwendet.

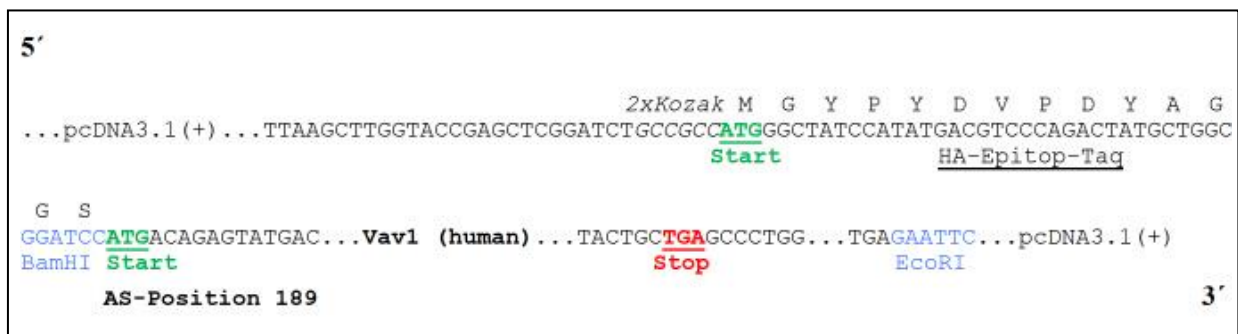


Abb. 4: Das Plasmid HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+). Zu sehen sind von 5' nach 3' jeweils die beiden Schnittstellen für die Endonukleasen BamHI (BamHI) und EcoRI (EcoRI) sowie das Startkodon (Start) des Plasmids HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+). Kurz nach dem Startkodon wurde der HA-Tag (HA-Epitop-Tag) eingefügt. Das Startkodon (Start) von Vav1^{ΔN} befindet sich an Position 189 der Aminosäuresequenz von Vav1. Darüber hinaus ist in der Abbildung das Stopkodon (Stop) am 3'-Ende der Nukleinsäuresequenz zu sehen.

Die Protein- und Nukleinsäuresequenz der natürlich vorkommenden, wildtypischen Form von Vav1 werden in der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information*

(NCBI) mit der jeweiligen *accession-number* NP_005419 und NM_005428 geführt. Für die Expression der PLC γ_1 und PLC γ_2 in COS-7- und HEK293-Zellen wurde als Expressionsvektor myc-pcDNA3.1(+) verwendet.

Seit längerem ist bekannt, dass die PLC γ_2 im Gegensatz zur PLC γ_1 spezifisch durch die konstitutiv aktiven Rac-Varianten Rac1^{G12V}, Rac2^{G12V} und Rac3^{G12V} aktiviert wird. Die Rac-vermittelte Aktivierung ist also Isoenzym-spezifisch. Unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch zeigen, dass Vav1, ein Guaninnukleotidaustauschfaktor für RhoA, Rac1, Rac2 und Cdc42, in COS-7-Zellen und in HEK293-Zellen nicht nur die Aktivität der PLC γ_2 , sondern auch die der PLC γ_1 stimuliert. Die PLC γ_1 kann aber weder durch die konstitutiv aktiven Varianten von Rac1, Rac2, Rac3, noch durch die aktiven Varianten von Cdc42 und RhoA aktiviert werden. Es stellte sich daher die Frage, ob dieser stimulierende Effekt auf PLC γ_1 der GEF-Aktivität von Vav1 zuzuschreiben ist, oder eine Adapterfunktion des Vav1-Proteins hierfür verantwortlich ist. Um dieser Frage nachzugehen, zogen wir unter anderem auch eine Arbeit von Jill E. Chrencik et al.(2008) heran, welche sich mit der Regulation des Vav1-Moleküls und dessen Wechselwirkung mit Rac1 befasst. In der 2008 veröffentlichten Arbeit wurden sowohl intramolekulare Wechselwirkungen der DH- mit der cysteinreichen Domäne (CRD) untersucht, als auch Interaktionen der DH-Domäne von Vav1 mit der *switch I*- und der *switch II*- Region von Rac1. Im Einzelnen konnte dabei unter anderem gezeigt werden, dass die Aminosäure Aspartat(Asp)-376, welche in der elften α -Helix der DH-Region lokalisiert ist, mit den Aminosäuren Threonin (Thr)-539 der CRD und Lysin (Lys)-404 der PH-Domäne interagiert. Diese Wechselwirkung hat einen stabilisierenden Effekt auf die DH-Domäne, wenn diese mit der *switch II*-Region von Rac1 in Verbindung tritt. Zudem haben weitere Analysen ergeben, dass die besagte Wechselwirkung zwischen der CRD und der DH-Region für eine optimale GEF-Aktivität und für das breite Substratspektrum von Vav1 mit verantwortlich ist. Ein Austausch von Asp-376 durch Alanin führt folglich zu einem vollständigen Verlust der GEF-Aktivität von Vav1 gegenüber Rac1. Weiterhin wurde in der Arbeit die Interaktion der DH-Region von Vav1 mit den Rac1-Regionen *switch I* und *switch II* näher untersucht. Dabei konnten mehrere Aminosäuren der DH-Region identifiziert werden, die direkt (unter anderem über Wasserstoffbrückenbindungen) mit den beiden *switch*-Regionen interagieren. Zu diesen Aminosäuren gehören Glutamin (Gln)-331 und Glutamat (Glu)-378. Gln-331 der DH-Domäne interagiert hierbei mit der *switch I*-Region von Rac1, wohingegen Glu-378 mit *switch II* in Wechselwirkung tritt. Werden beide Aminosäuren durch Alanin ausgetauscht,

dann führt dies, wie in der Arbeit von Chrencik et al. (2008) beschrieben, zu einer Hemmung der Vav1-vermittelten Aktivierung von Rac1.

In Anlehnung an die Arbeit (Chrencik et al. 2008) wurden von uns die Mutanten Vav1^{ΔN/Q331A}, Vav1^{ΔN/D376A} und Vav1^{ΔN/E378A} hergestellt, um zu klären, ob die Aktivierung von PLC γ durch Vav1 auf dessen GEF-Aktivität beruht oder einer GEF-unabhängigen Adapterfunktion von Vav1 zuzuschreiben ist. Für die Herstellung der drei DNA-Konstrukte wurde eine gerichtete Mutagenese durchgeführt. Hierfür wurden jeweils die Mutagenese-Primer BP009 und BP010 für Vav1^{ΔN/Q331A}, BP005 und BP006 für Vav1^{ΔN/D376A} und BP007 und BP008 für Vav1^{ΔN/E378A} verwendet. Zur Kontrolle der PCR wurden die Mutageneseprodukte elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt. Um zu überprüfen, ob die jeweiligen Plasmide das gewünschte Insert enthielten, wurde eine Restriktionsanalyse mittels der Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI durchgeführt. Diejenigen DNA-Präparationen, die Vav1^{ΔN}-DNA oder die jeweilige DNA der Mutanten enthielten, konnten daraufhin mittels vollständiger Sequenzierung auf ihre Nukleotidabfolge untersucht werden, um festzustellen, ob die Mutagenese zur gewünschten Mutation geführt hatte. Zum Ausschluss unerwünschter Mutationen durch die PCR im Vektor pcDNA3.1(+), wurde die für die jeweilige Vav1-Mutante kodierende cDNA mittels EcoRI und BamHI aus dem Vektor ausgeschnitten und mit einem neuen linearisierten pcDNA3.1(+)-Plasmid ligiert. Abbildung 5 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der Vektoren Vav1^{ΔN/Q331A}-pcDNA3.1(+), Vav1^{ΔN/D376A}-pcDNA3.1(+) und Vav1^{ΔN/E378A}-pcDNA3.1(+), welche zuvor mit EcoRI und BamHI geschnitten worden waren. Man sieht in Abbildung 5 jeweils bei etwa 5400 bp die Banden des linearisierten Vektors, sowie bei etwa 2000 bp die Banden des jeweiligen cDNA-Inserts. Anschließend wurde die aufgetrennte cDNA der Vav1-Mutanten gereinigt und jeweils mit einem linearisierten pcDNA3.1(+)-Vektor ligiert. Die erfolgreichen Ligationen wurden mittels Restriktionsanalyse und Teilsequenzierungen überprüft.

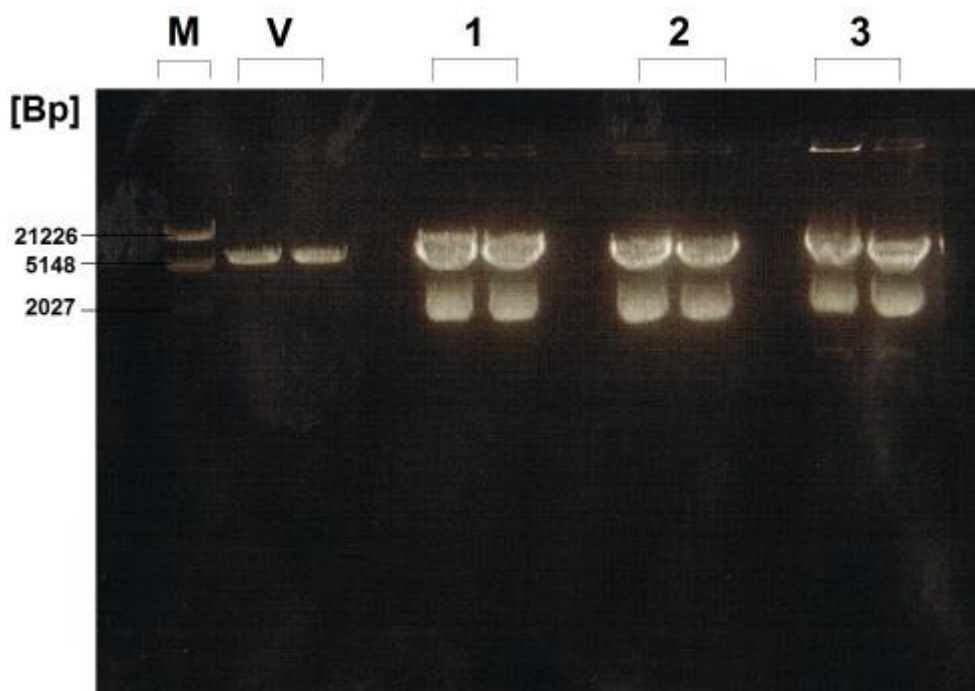


Abbildung 5: Elektrophoretische Auftrennung der Produkte der Restriktion durch die Endonukleasen *EcoRI* und *BamHI*. Jeweils 1µg der Plasmid-DNA $Vav1^{\Delta N/Q331A}$ -pcDNA3.1(+) (1), $Vav1^{\Delta N/D376A}$ -pcDNA3.1(+) (2), $Vav1^{\Delta N/E378A}$ -pcDNA3.1(+) (3) und 1µg des Vektors pcDNA3.1(+) (V) wurden mit jeweils 5 U der Restriktionsendonukleasen inkubiert. Die Restriktionsprodukte wurden anschließend durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. [Bp]: Basenpaare; M: Größenstandard; V: linearisierter Vektor pcDNA3.1(+), Spur 1: geschnittenes Plasmid $Vav1^{\Delta N/Q331A}$, Spur 2: geschnittenes Plasmid $Vav1^{\Delta N/D376A}$, Spur 3: geschnittenes Plasmid $Vav1^{\Delta N/E378A}$.

In der DH-Domäne von $Vav1^{\Delta N}$ befindet sich an Stelle 331 die Aminosäure Glutamin (Q). Des Weiteren weist die Aminosäuresequenz von $Vav1^{\Delta N}$ ein Aspartat an Stelle 376 und ein Glutamat an Stelle 378 auf. Diese drei Aminosäuren, von denen bekannt ist, dass sie sowohl bei der intramolekularen Regulation der Aktivität von Vav1 als auch bei der Interaktion dieses GEFs mit Rac eine wichtige Rolle spielen, wurden jeweils durch ein Alanin ersetzt. Alanin wurde ausgewählt, da es nur eine Methylgruppe als Seitenrest besitzt und daher weniger reaktions- und bindungsfreudig ist als die zuvor erwähnten Aminosäuren.

Vav1 ^{ΔN}	GACCTGCTGATGGTGCCTATG <u>CAG</u> CGAGTTCTCAAATATCACCTC
Vav1 ^{ΔN/Q331A}	GACCTGCTGATGGTGCCTATG <u>GCC</u> CGAGTTCTCAAATATCACCTC
AS-Sequenz	D L L M V P M <u>A</u> R V L K Y H L

Abbildung 6: Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von Vav1^{ΔN} und Vav1^{ΔN/Q331A}, sowie der Aminosäuresequenz der Mutante Vav1^{ΔN/Q331A} (AS-Sequenz). Um die Mutation zu erzeugen, wurde ein primer-Paar konstruiert, dessen Sequenz ein Nukleotid-Triplett enthielt, das anstelle des wildtypischen Glutamins (CAG) an Position 331 für Alanin (GCC) kodiert und zur komplementären Bindung an die ursprüngliche Vav1-DNA fähig war. Die Primer wurden nach der humanen Vav1-cDNA-Sequenz, die in der Datenbank (NM_005428) des NCBI enthalten ist, entwickelt.

Um Rückschlüsse darüber zu bekommen, ob die Aktivierung von PLC γ_1 durch Vav1 eventuell auf einer Adapterfunktion von Vav1 beruht, wurde von uns eine zusätzliche vierte Mutante entworfen. Auch hierfür wurde wiederum eine gerichtete Mutagenese zur Herstellung des DNA-Konstruktes durchgeführt und die Produkte daraufhin elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde mittels einer Restriktionsanalyse mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI kontrolliert, ob das Plasmid das gewünschte Insert enthielt. Die Mutagenese-Primer BP003 und BP004 für die Mutante Vav1^{ΔN/T617} wurden dabei so gewählt, dass an Stelle 617 ein Stop-Kodon in die DNA eingebaut und das Protein somit an Position 617 trunziert wurde. Dadurch wurden die beiden SH3-Domänen und die SH2-Domäne von Vav1 entfernt, welche als Interaktionsstellen für Adapter-Proteine bekannt sind. Nach der Mutagenese wurde auch hier die DNA-Präparation vollständig sequenziert und das Insert anschließend mit einem neuen pcDNA3.1(+)-Vektor ligiert, um Mutationen des Vektors während der Mutagenese ausschließen zu können. Als Template für die C-terminal trunzierte Mutante und für die drei anderen Mutagenese-Reaktionen wurde in dieser Arbeit das Plasmid HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) verwendet. Die Mutante Vav1^{ΔN} ist N-terminal trunziert, wodurch die Aminosäuren 1-188 entfernt wurden und daher Vav1^{ΔN} erst in Position 189 mit dem dort ursprünglich vorhandenen Methionin beginnt. Folge der N-terminalen Deletion ist ein konstitutiv aktives Vav1. Solche N-terminal trunzierten Vav-Mutanten wurden unter anderem in der Arbeit von Abe et al. (1999) beschrieben, in welcher man die Eigenschaften von drei Vav-Mutanten mit einer Deletion der jeweils ersten 65, 127, 168 und 186 Aminosäuren untersuchte. Ein Ergebnis dieser Studie war, dass Vav-Mutanten mit

einer N-terminalen Deletion von 168 (Δ N-168-Vav) oder 186 (Δ N-186-Vav) Aminosäuren eine wesentlich höhere onkogene Aktivität in NIH 3T3-Zellen zeigten, als solche Mutanten, die nur eine Deletion der ersten 65 Aminosäuren aufwiesen. Ebenso konnte man eine positive Korrelation zwischen dem onkogenen Potential von transformiertem Vav und der Aktivität von c-Jun, Elk-1 und NF- κ B, sowie einer erhöhten Transkription von Cyclin D1 nachweisen. Eine Ursache hierfür könnte darin liegen, dass Δ N-186-Vav ein erhöhtes Membranbindungspotential aufweist (Abe et al. 1999). Zusammenfassend kann man sagen, dass Δ N-186-Vav eine höhere konstitutive Aktivität besitzt als Δ N-65-Vav. Eine hohe konstitutive Aktivität von Vav1 war auch in dieser Arbeit wichtig, weshalb wir Vav1 ^{Δ N188} verwendeten.

Um eine ausreichende Validität der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die einzelnen Mutanten von Vav1 ^{Δ N} sowohl in COS-7- als auch in HEK293-Zellen exprimiert und der Einfluss der Mutanten auf die Aktivität der beiden PLC γ -Isoenzyme PLC γ_1 und PLC γ_2 in Ab- oder Anwesenheit der Rho-GTPase Rac2 untersucht. Die PLC γ_2 fungierte hierbei als Positiv-Kontrolle, da bekannt ist, dass die Aktivität dieses Enzyms durch Vav1-aktiviertes Rac2 stimuliert werden kann. Somit eignet sich diese Konstellation gut, um die GEF-Aktivität der einzelnen Mutanten beurteilen zu können.

3.2. Einfluss von Vav1 ^{Δ N} auf die Aktivität der Phospholipase C- γ_1 und Phospholipase C- γ_2 in COS-7-Zellen

Im folgenden Experiment wurde zunächst der Effekt der aktiven Variante von Vav1 ^{Δ N} auf die Aktivität der beiden Enzyme PLC γ_1 und PLC γ_2 untersucht. Die beiden nachfolgend gezeigten Versuche setzten sich mit der Frage auseinander, ob dieser Effekt eine Abhängigkeit zur Menge der exogen in die COS-7-Zellen eingebrachten PLC γ -kodierenden DNA aufweist. Hierfür wurden zunächst eine Menge von 1 μ g der PLC γ_1 -kodierenden DNA und nachfolgend eine DNA-Menge von 0,3 μ g in die Zellen eingebracht und die Zellen jeweils mit Vav1 ^{Δ N}-DNA kotransfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, welche mit 1 μ g PLC γ_2 -DNA und Vav1 ^{Δ N}-DNA kotransfiziert wurden.

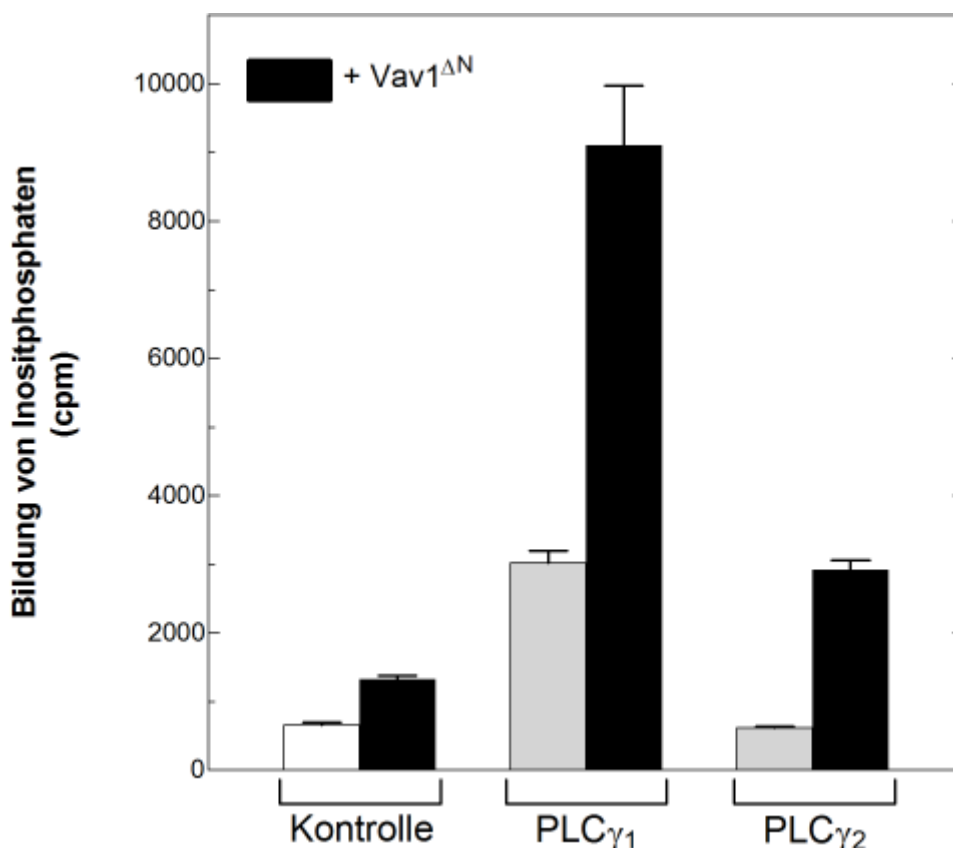


Abbildung 7: Aktivierung von PLC_{γ1} und PLC_{γ2} durch konstitutiv aktives Vav1^{ΔN} in COS-7-Zellen.

COS-7-Zellen wurden wie in der Abbildung angegeben mit jeweils 1,75 µg pcDNA3.1(+) (Kontrolle), 1 µg der Vektoren hPLC_{γ1}-myc-pcDNA3.1(+) (PLC_{γ1}), hPLC_{γ2}-myc-pcDNA3.1(+) (PLC_{γ2}) und jeweils mit 0,5 µg HA- Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) (Vav1^{ΔN}) kotransfiziert. Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1,75 µg konstant gehalten. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 Stunden in DMEM-Medium mit 2,5 µCi/ml D-myo-[2-³H(N)]-Inosit und 10 mM LiCl inkubiert und anschließend die Inositphosphatbildung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen ± Standardabweichungen.

Abbildung 7 zeigt die Aktivität von PLC_{γ1} und PLC_{γ2} in COS-7-Zellen, welche jeweils mit 1 µg hPLC_{γ1}-myc-pcDNA3.1(+) bzw. 1 µg hPLC_{γ2}-myc-pcDNA3.1(+) transfiziert worden waren. Bereits in Abwesenheit von Vav1^{ΔN} war bei der alleinigen Expression von PLC_{γ1} im Vergleich zur Kontrolle eine Zunahme der Bildung von Inositphosphaten zu beobachten. Die PLC_{γ1} zeigte somit eine erhöhte basale Aktivität in den COS-7-Zellen. Dieser Effekt konnte bei alleiniger Expression von exogener PLC_{γ2} jedoch nicht beobachtet werden. Die Koexpression von Vav1^{ΔN} und PLC_{γ1} führte zu einer deutlichen Steigerung der Bildung von Inositphosphaten. Diese betrug im Vergleich zur alleinigen Expression von PLC_{γ1} das etwa 3-fache. Auch bei Koexpression von Vav1^{ΔN} und PLC_{γ2} kam es zu einer Steigerung der Inositphosphatbildung um ca. das 4,8-fache im Vergleich

zur alleinigen Expression von $\text{PLC}\gamma_2$, wenngleich in diesem Versuch die Gesamtmenge an gebildetem Inositphosphat bei der Koexpression von $\text{Vav1}^{\Delta\text{N}}$ und $\text{PLC}\gamma_1$ deutlich höher war als die bei der Koexpression von $\text{Vav1}^{\Delta\text{N}}$ und $\text{PLC}\gamma_2$.

Im nächsten Experiment wurde die zur Transfektion verwendete Menge an $\text{PLC}\gamma_1$ -DNA variiert, um zu testen, inwieweit die DNA-Menge auf den Vav1 -vermittelten stimulatorischen Effekt einen Einfluss hat.

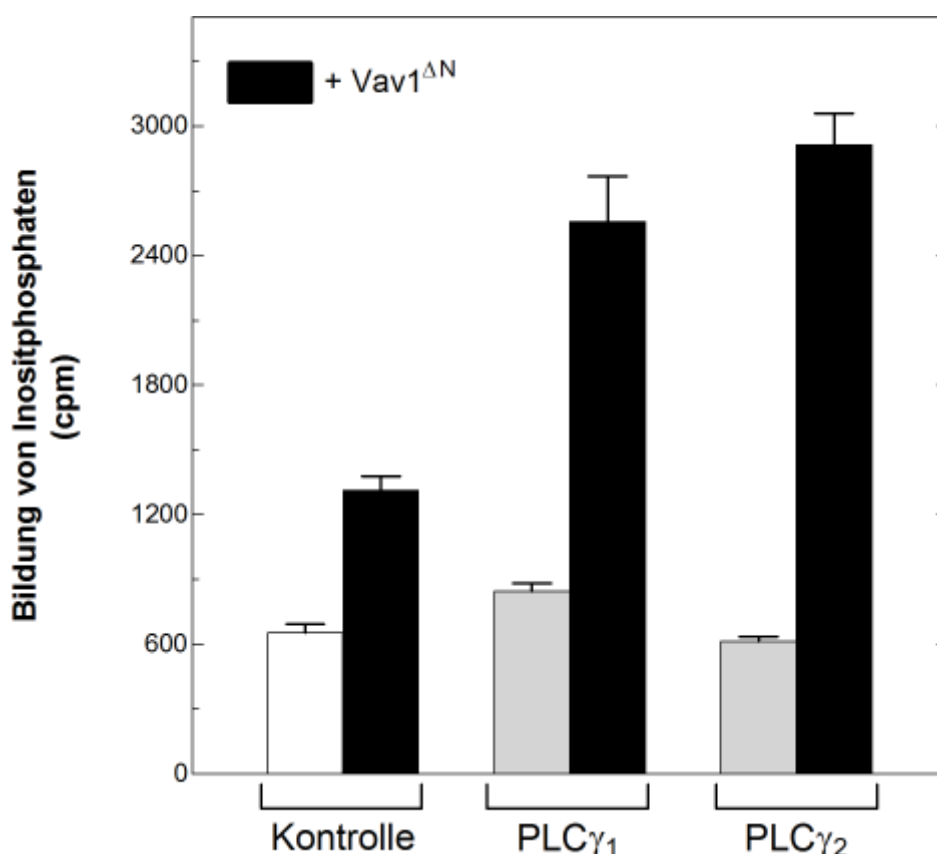


Abbildung 8: Aktivierung von $\text{PLC}\gamma_1$ und $\text{PLC}\gamma_2$ durch konstitutiv aktives $\text{Vav1}^{\Delta\text{N}}$ in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen wurden wie in der Abbildung angegeben mit jeweils 1,75 μg pcDNA3.1(+) (Kontrolle), 0,3 μg des Vektors h $\text{PLC}\gamma_1$ -myc-pcDNA3.1(+) ($\text{PLC}\gamma_1$), 1,0 μg des Vektors h $\text{PLC}\gamma_2$ -myc-pcDNA3.1(+) ($\text{PLC}\gamma_2$) und jeweils mit 0,5 μg HA- $\text{Vav1}^{\Delta\text{N}}$ -pcDNA3.1(+) ($\text{Vav1}^{\Delta\text{N}}$) kotransfiziert. Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1,75 μg konstant gehalten. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 Stunden in DMEM-Medium mit 2,5 $\mu\text{Ci/ml}$ D-*myo*-[2- ^3H (N)]-Inosit und 10 mM LiCl inkubiert und anschließend die Inositphosphatbildung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen $\pm$ Standardabweichungen.

Abbildung 8 zeigt den Einfluss von Vav1 auf die Aktivität der PLC γ_1 , deren Menge an transfizierter DNA im Vergleich zum Versuch aus Abbildung 7 nur noch 0,3 μ g betrug. Der zuvor beobachtete Anstieg der Inositphosphatbildung bei alleiniger Expression von exogener PLC γ_1 konnte bei diesem Versuch kaum beobachtet werden, da die Menge an Inositphosphaten nur geringfügig höher war als bei der Messung der Kontrollzellen, welche nur mit pcDNA3.1(+) transfiziert worden waren. Die Expression von konstitutiv aktivem Vav1^{ΔN} führte jedoch zu einer Zunahme der Inositphosphatbildung um das etwa 2-fache im Vergleich zur Kontrolle (pcDNA3.1(+)), was bedeutet, dass in den Zellen endogen vorhandene PLC-Enzyme, vermutlich ubiquitär exprimierte PLC γ_1 durch Vav1^{ΔN} aktiviert werden. Die Koexpression von PLC γ_1 und Vav1^{ΔN} führte zu einer ca. 3-fachen Steigerung der Inositphosphatmenge gegenüber der alleinigen Expression der PLC γ_1 . Ebenso konnte bei der Koexpression von PLC γ_2 und Vav1^{ΔN} eine etwa 4,8-fache Steigerung der Inositphosphatbildung gemessen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass der stimulatorische Effekt von Vav1^{ΔN} auf die PLC γ_1 weitestgehend unabhängig von der eingebrachten Menge an PLC γ_1 ist, zumindest bei den in diesem Experiment verwendeten Mengen an PLC γ_1 -DNA.

3.3. Einfluss von Rac2 auf die Vav1^{ΔN}-vermittelte Stimulation von PLC γ_2 und PLC γ_1 in Abhängigkeit von der Menge an Rac2

Es ist bekannt, dass Rac2 durch den Guaninnukleotidaustauschfaktor Vav1 aktiviert wird und folglich in der aktiven GTP-gebundenen Konformation zahlreiche Effektoren regulieren kann. In den nun folgenden Experimenten wurde der Einfluss von wildtypischen Rac2 auf die Vav1-vermittelte Stimulation der PLC-Enzyme PLC γ_1 und PLC γ_2 in COS-7- und HEK293-Zellen untersucht. Hierbei wurden verschiedene Rac2-DNA-Mengen verwendet. Hohe Rac2-DNA-Mengen von 300 ng und 1000 ng führen aufgrund toxischer Effekte unter anderem in Gegenwart von aktivem Vav1^{ΔN} zu einem Abrunden und Ablösen der Zellen von der Kulturschale. Daher wurden in den Versuchen verschiedene, niedrigere DNA-Mengen getestet, um die optimale Menge an exogen exprimiertem Rac2 bestimmen zu können.

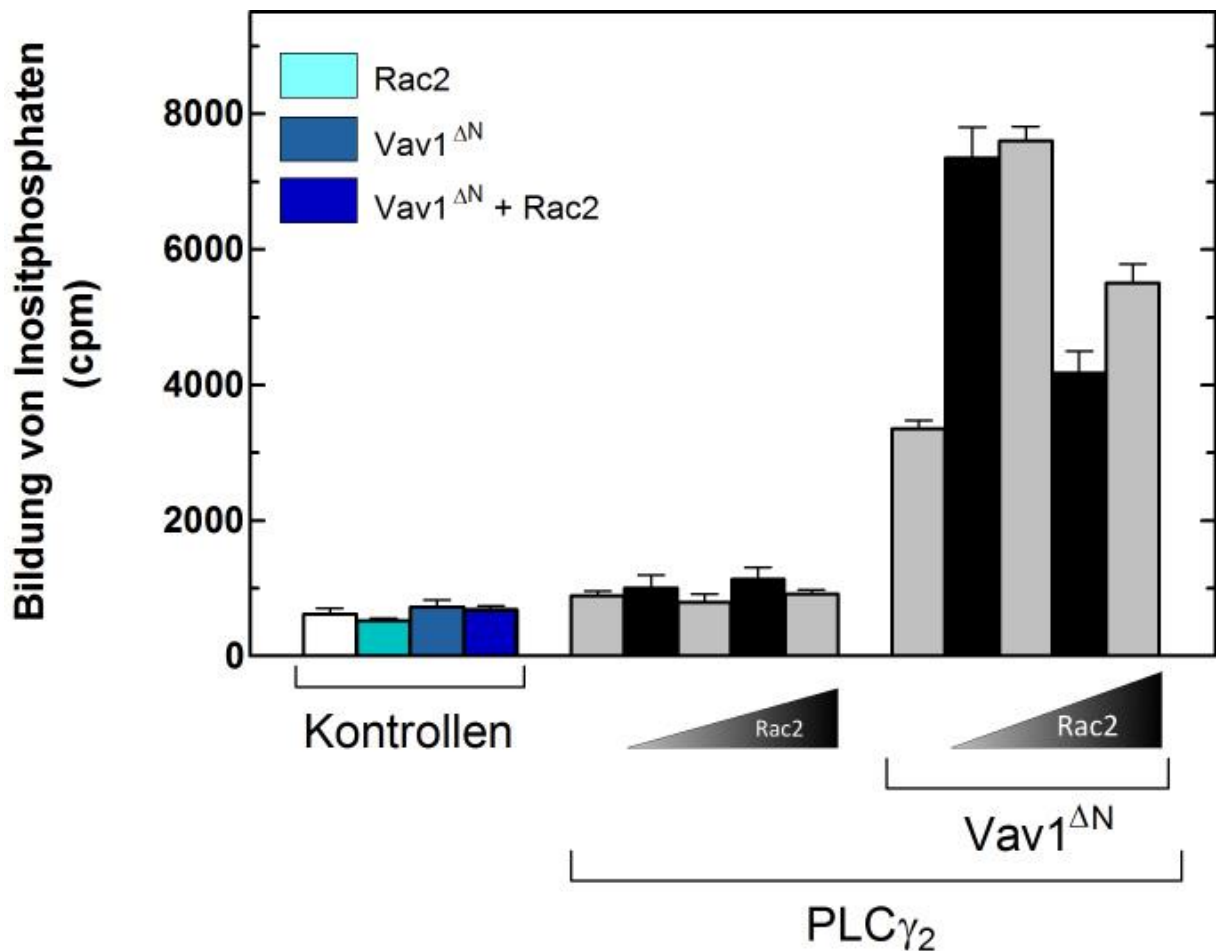


Abbildung 9: Einfluss verschiedener Rac2-Mengen auf die Aktivität von PLC γ_2 in An- und Abwesenheit von Vav1^{ΔN} in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen wurden wie in der Abbildung dargestellt jeweils mit den Vektoren pcDNA3.1(+) (Kontrolle), 1 μ g hPLC γ_2 -myc-pcDNA3.1(+) (PLC γ_2), 0,5 μ g HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) (Vav1^{ΔN}), sowie in aufsteigender Konzentration mit 0, 10, 30, 100 und 300 ng Rac2-pcDNA3.1(+) (Rac2) kotransfiziert. Als weitere Kontrolle wurden wie in der Abbildung ersichtlich COS-7-Zellen mit 0,5 μ g der Vektoren HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) (Vav1^{ΔN}) und 300 ng des Vektors Rac2-pcDNA3.1(+) (Rac2) kotransfiziert. Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1,8 μ g konstant gehalten. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 Stunden in DMEM-Medium mit 2,5 μ Ci/ml D-myo-[2-³H(N)]-Inosit und 10 mM LiCl inkubiert und anschließend die Inositphosphatbildung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen $\pm$ Standardabweichungen.

Abbildung 9 zeigt den Einfluss verschiedener Rac2-Mengen auf die Aktivität der PLC γ_2 in An- und Abwesenheit von konstitutiv aktivem Vav1^{ΔN} in COS-7-Zellen. Eine Koexpression von PLC γ_2 mit verschiedenen Mengen an Rac2 (10-300 ng DNA) führte zu keiner bedeutsamen Zunahme der Inositphosphatbildung gegenüber den nur mit PLC γ_2 -DNA transfizierten Kontrollzellen. Bei Koexpression von PLC γ_2 und Vav1^{ΔN} hingegen

kam es zu einer deutlichen Steigerung der Inositphosphatmenge. Hier wurde eine etwa 3,8-fache Steigerung der Inositphosphatbildung gemessen. Die Bildung von Inositphosphaten wurde durch Zugabe von Rac2 zusätzlich erhöht, und zwar bei 10 ng Rac2-pcDNA3.1(+) um das circa 2,2-fache und bei 30 ng um etwa das 2,3-fache im Vergleich zur Expression von PLC γ_2 und Vav1 $^{\Delta N}$. Bei der Transfektion der Zellen mit höheren Mengen als 100 ng Rac2-DNA nahm die zusätzliche Steigerung der Inositphosphatbildung jedoch wieder ab. Die Ergebnisse zeigen somit, dass Rac2 durch das GEF Vav1 aktiviert wird und folglich in seiner aktiven GTP-gebundenen Form die Aktivität der PLC γ_2 stimulieren kann. Hierbei wurde die maximale Aktivierung bereits bei einer Rac2-DNA-Menge von 10 ng erreicht.

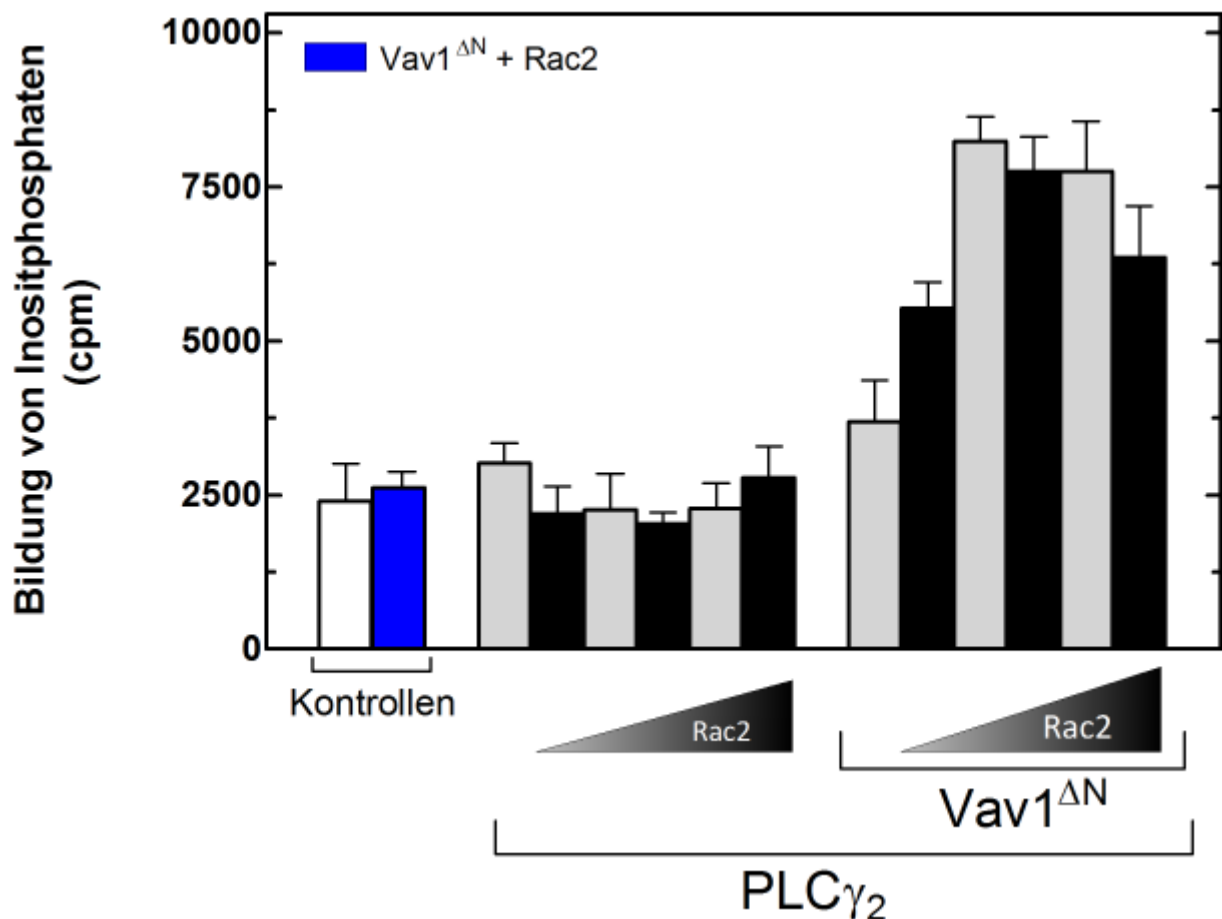


Abbildung 10: Einfluss verschiedener Rac2-Mengen auf die Aktivität von PLC γ_2 in An- und Abwesenheit von Vav1^{ΔN} in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden wie in der Abbildung dargestellt jeweils mit den Vektoren pcDNA3.1(+) (Kontrolle), 1 μ g hPLC γ_2 -myc-pcDNA3.1(+) (PLC γ_2), 0,5 μ g HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) (Vav1^{ΔN}), sowie in aufsteigenden Mengen mit 0, 3, 10, 30, 100 und 300 ng Rac2-pcDNA3.1(+) (Rac2) kotransfiziert. Als weitere Kontrolle wurden wie in der Abbildung ersichtlich HEK293-Zellen mit 0,5 μ g der Vektoren HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) (Vav1^{ΔN}) und 300 ng des Vektors Rac2-pcDNA3.1(+) (Rac2) kotransfiziert. Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1,8 μ g konstant gehalten. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 Stunden in DMEM-Medium mit 2,5 μ Ci/ml D-myo-[2-³H(N)]-Inosit und 10 mM LiCl inkubiert und anschließend die Inositphosphatbildung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen $\pm$ Standardabweichungen.

Im Folgenden wurde ein ähnlicher Versuch in HEK293-Zellen durchgeführt, um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte nur zelltypspezifisch beobachtet werden kann. Letzterer Versuch erlaubte eine ähnliche Interpretation bezüglich der optimalen Rac2-DNA-Menge (Abbildung 10). Wiederum konnte eine gemeinsame Expression von PLC γ_2 und wildtypischem Rac2 keine signifikante Steigerung der Inositphosphatbildung gegenüber der alleinigen Expression der PLC γ_2 zeigen. Allerdings ist die basale Aktivität

von endogenen PLC-Enzymen in HEK293-Zellen wesentlich höher als in COS-7-Zellen (Abbildung 9). Erneut zeigte sich eine zusätzliche Steigerung der Inositphosphatbildung bei einer gemeinsamen Expression von PLC γ_2 , Vav1^{ΔN} und Rac2 bei einer Rac2-DNA-Menge von 10 ng bzw. 30 ng. Bei 10 ng Rac2-DNA ergab sich eine Erhöhung der Inositphosphatbildung um *ca.* das 2,2-fache, bei 30 ng Rac2 um das 2,1-fache gegenüber den Kontrollzellen, welche mit PLC γ_2 -DNA und Vav1^{ΔN}-DNA kotransfiziert wurden. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Messungen in Abbildung 9, so sieht man in HEK293-Zellen eine deutlich geringere Stimulation der PLC γ_2 durch Vav1. Wurde aber zusätzlich Rac2 exprimiert, stieg die Stimulation der PLC γ_2 noch einmal deutlich an. Da sich bereits beim letzten Versuch (Abbildung 9) eine deutliche Steigerung der Phospholipaseaktivität bei einer Transfektion mit nur 10 ng Rac2-pcDNA3.1(+) zeigte, wurde in diesem Versuch auch 3 ng DNA eingesetzt. Wie allerdings in Abbildung 10 zu erkennen ist, findet sich die deutlichste Zunahme der Inositphosphatbildung bei einer Menge von 10 bzw. 30 ng Rac2-pcDNA3.1(+). DNA-Mengen von unter 10 ng sind dementsprechend offensichtlich nicht ausreichend für eine maximale Stimulation PLC γ_2 . Somit kann man den letzten beiden Versuchen entnehmen, dass die für den hier untersuchten Effekt optimale Menge an Rac2-pcDNA3.1(+) bei etwa 10-30 ng liegt. Diese DNA-Menge wurde auch in allen weiteren Versuchen verwendet.

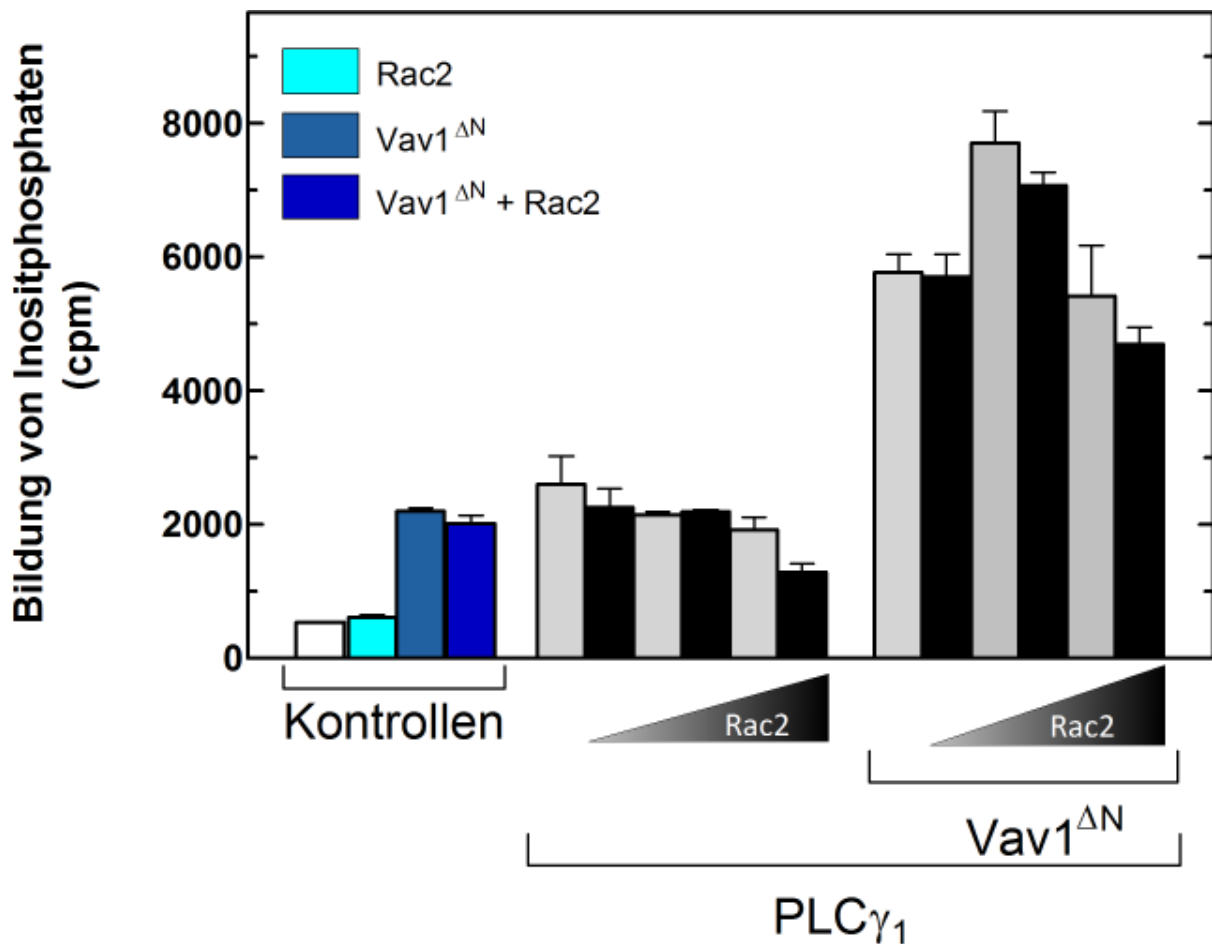


Abbildung 11: Einfluss verschiedener Rac2-Mengen auf die Aktivität von PLC γ_1 in An- und Abwesenheit von Vav1^{ΔN} in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden wie in der Abbildung dargestellt jeweils mit den Vektoren pcDNA3.1(+) (Kontrolle), 1 μ g hPLC γ_1 -myc-pcDNA3.1(+) (PLC γ_1), 0,5 μ g HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) (Vav1^{ΔN}), sowie in aufsteigender Konzentration mit 0, 3, 10, 30, 100 und 300 ng Rac2-pcDNA3.1(+) (Rac2) kotransfiziert. Als weitere Kontrolle wurden wie in der Abbildung ersichtlich HEK293-Zellen mit 0,5 μ g der Vektoren HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) (Vav1^{ΔN}) und 300 ng des Vektors Rac2-pcDNA3.1(+) (Rac2) kotransfiziert. Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1,8 μ g konstant gehalten. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 Stunden in DMEM-Medium mit 2,5 μ Ci/ml D-myo-[2-³H(N)]-Inosit und 10 mM LiCl inkubiert und anschließend die Inositolphosphatbildung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen $\pm$ Standardabweichungen.

Es ist bekannt, dass konstitutiv aktives Rac2 die PLC γ_2 Isoenzym-spezifisch stimuliert, jedoch das andere Isoenzym, die PLC γ_1 , nicht stimulieren kann. In Gegenwart des Austauschfaktors Vav1 wird wildtypisches Rac2 aktiviert und kann folglich die Aktivität der PLC γ_2 stimulieren (Abbildung 9 und 10). Im folgenden Experiment wurde der Einfluss von Rac2 auf die Aktivität der PLC γ_1 in intakten Zellen in Ab- oder Anwesenheit von

Vav1 untersucht. Dabei wurden wie zuvor DNA-Mengen zwischen 3 ng und 300 ng verwendet. Das Experiment zeigte, dass die Aktivität der PLC γ_1 durch Rac2 nicht stimuliert wurde (Abbildung 11). Dagegen bewirkte die gemeinsame Expression der PLC γ_1 und Vav1 eine deutliche Zunahme der Inositphosphatbildung um *ca.* das 2,3-fache gegenüber der alleinigen Expression der PLC γ_1 . Rac2 führte dagegen bei geringeren Rac2-DNA-Mengen von 10 ng und 30 ng nur zu einer geringfügigen weiteren Zunahme der Vav1-vermittelten Stimulation der PLC γ_1 . Bei höheren Rac2-DNA-Mengen (100, 300 ng) war eine Zunahme der Stimulation nicht zu erkennen. Dieser Versuch bestätigt somit frühere Ergebnisse, die zeigten, dass die PLC γ_1 im Unterschied zur PLC γ_2 nicht oder nur sehr geringfügig durch aktives Rac2 stimuliert wird.

3.4. Einfluss von Vav1 Δ^N und der Mutanten Vav1 $\Delta^N/Q331A$, Vav1 $\Delta^N/D376A$, Vav1 $\Delta^N/E378A$ und Vav1 $\Delta^N/T617$ auf die Aktivität der Isoenzyme PLC γ_1 und PLC γ_2 bei An- und Abwesenheit von Rac2 in COS-7-Zellen

Es stellte sich die Frage, welche molekularen Mechanismen der beobachteten Vav1-vermittelten Aktivierung der PLC γ_1 zugrunde liegen. Eine Möglichkeit wäre, dass Vav1 als Austauschfaktor für eine endogen in den untersuchten Zellen vorhandenen Rho-GTPase fungiert und dadurch eine Stimulation der Aktivität der PLC γ_1 bewirkt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Mutanten von Vav1 verwendet, welche in der Literatur als GEF-defizient beschrieben worden waren, Vav1 $\Delta^N/Q331A$, Vav1 $\Delta^N/D376A$ und Vav1 $\Delta^N/E378A$. Eine andere Möglichkeit wäre, dass Vav1 als Adapterprotein GEF-unabhängige Funktionen ausübt, wie bereits in der Literatur für den T-Zell-Rezeptor-Signalweg beschrieben worden war (Miletic et al. 2009). Für diese Adapterfunktion von Vav1 sind die Domänen SH2 und SH3 notwendig, welche in der Vav1-Mutante Vav1 $\Delta^N/T617$ entfernt wurden. Der Effekt aller dieser Mutanten wurde im folgenden Experiment auf die Aktivität der PLC γ_1 in Ab- oder Anwesenheit von Rac2 in COS-7-Zellen untersucht. Die eingesetzte Menge an Rac2-pcDNA3.1(+) richtete sich nach der zuvor ermittelten Menge und betrug somit 30 ng Rac2-DNA, da sie uns am geeignetsten erschien und in Versuchen mit PLC γ_2 auch die besten Ergebnisse zeigte.

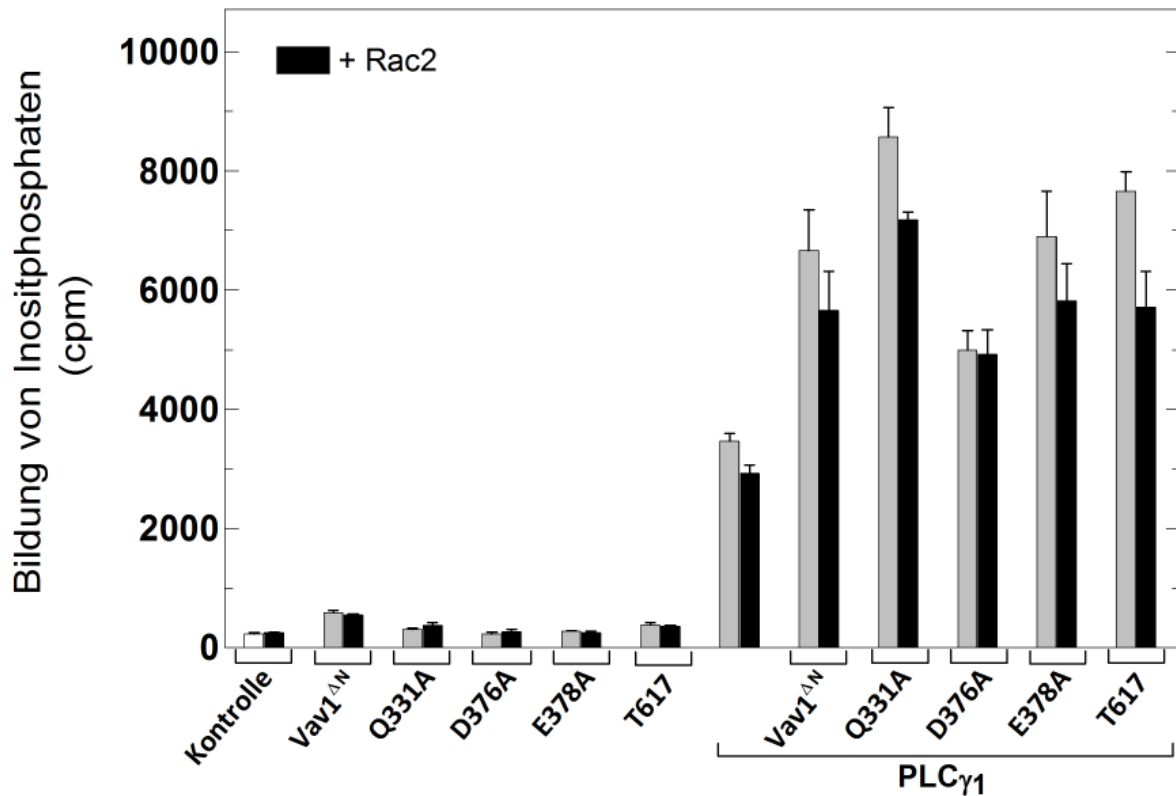


Abbildung 12: Einfluss der verschiedenen Vav1^{ΔN}-Mutanten Vav1^{ΔN/Q331A}, Vav1^{ΔN/D376A}, Vav1^{ΔN/E378A} und Vav1^{ΔN/T617} auf die Aktivität der PLC γ_1 bei An- und Abwesenheit von Rac2 in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen wurden wie in der Abbildung angegeben mit jeweils 1,53 μ g des Vektors pcDNA3.1(+) (Kontrolle), 1 μ g des Vektors hPLC γ_1 -myc-pcDNA3.1(+) (PLC γ_1), 0,5 μ g der Vektoren HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) (Vav1^{ΔN}), HA-Vav1^{ΔN/Q331A}-pcDNA3.1(+) (Q331A), HA-Vav1^{ΔN/D376A}-pcDNA3.1(+) (D376A), HA-Vav1^{ΔN/E378A}-pcDNA3.1(+) (E378A), HA-Vav1^{ΔN/T617}-pcDNA3.1(+) (T617) und mit jeweils 30 ng Rac2-pcDNA3.1(+) (Rac2) kotransfiziert. Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1,53 μ g konstant gehalten. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 Stunden in DMEM-Medium mit 2,5 μ Ci/ml D-myo-[2-³H(N)]-Inosit und 10 mM LiCl inkubiert und anschließend die Inositphosphatbildung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen $\pm$ Standardabweichungen.

Bereits im vorangegangenen Kapitel konnte man einen deutlichen stimulatorischen Effekt des konstitutiv aktiven GEF-Proteins Vav1^{ΔN} auf die PLC γ_1 sehen. Auch dieser Versuch bestätigte unsere vorherigen Beobachtungen und zeigte eine Steigerung der Inositphosphatbildung bei Koexpression von Vav1^{ΔN} und PLC γ_1 um das ungefähr 1,9-fache gegenüber der alleinigen Expression der PLC γ_1 (Abbildung 12). Überraschenderweise zeigte die Mutante Vav1^{ΔN/Q331A} (Q331A) einen noch deutlicheren Effekt auf die Aktivität der PLC γ_1 mit einer nahezu 2,5-fachen Steigerung der Inositphosphatbildung gegenüber den Zellen mit alleiniger Expression der PLC γ_1 . Auch

die beiden ebenfalls in der DH-Domäne punktmutierten Mutanten Vav1^{ΔN/D376A} (D376A) und Vav1^{ΔN/E378A} (E378A) führten zu einer Stimulation der PLCγ₁ bei Koexpression in COS-7-Zellen. D376A bewirkte eine etwa 1,4-fache und E378A eine circa 2-fache Steigerung der Inositphosphatbildung im Vergleich zur alleinigen Expression von PLCγ₁. Hier zeigte bereits, wenn auch noch nicht so deutlich wie in den nachfolgenden Versuchen heraus, dass die Mutante D376A, bei welcher die Interaktion der CRD mit der DH-Domäne beeinträchtigt ist, einen schwächeren Vav1-Effekt aufweist als die übrigen Mutanten. Denn auch die trunkierte Mutante Vav1^{ΔN/T617} weist vergleichbar zu Vav1^{ΔN} eine Steigerung der Inositphosphatbildung bei Koexpression mit PLCγ₁ um das circa 2,2-fache auf, verglichen mit der alleinigen Expression der PLCγ₁. Zu erwähnen sei an dieser Stelle, dass bereits die alleinige Expression von exogener PLCγ₁ eine Steigerung der Inositphosphatbildung um das etwa 14-fache im Vergleich zu den Kontrollzellen, welche nur mit pcDNA3.1(+) transfiziert wurden, bewirkte, was der basalen Aktivität der PLCγ₁ entspricht. Die Stimulation der PLCγ₁ durch Vav1^{ΔN} und die Mutanten wurde kaum durch Rac2 beeinflusst. Es war meist nur eine leichte Abnahme der PLC-Aktivität zu beobachten. Die PLCγ₁ wird also nicht durch aktives Rac2 zusätzlich stimuliert. Die Ergebnisse des Experiments zeigen also, dass die Mutationen in der DH-Domäne von Vav1, Q331A und E378A, welche an der Interaktion mit den *switch*-Regionen von Rac beteiligt sind, die Vav1-vermittelte Stimulation der PLCγ₁ in COS-7-Zellen nicht beeinträchtigen. Ein Austausch von D376 in der DH-Domäne, welche an der Interaktion mit der Cysteinreichen Domäne und der PH-Domäne beteiligt ist, gegen Alanin führte zu einer geringeren Vav1-vermittelten Stimulation der PLCγ₁. Das Entfernen der SH3- und SH2-Domänen in der trunkierten Mutante T617 hatte keinen Einfluss auf die Stimulation der PLCγ₁ durch Vav1 in COS-7-Zellen.

Um die Expression der rekombinanten Proteine in COS-7-Zellen zu überprüfen, wurden Kontrollzellen mit denselben Mengen an Plasmid-DNA transfiziert und die in den Zelllysaten enthaltenen Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurden PLCγ₁ mit einem Anti-myc-Antikörper und Vav1^{ΔN} sowie die jeweiligen Mutanten mit einem Anti-HA-Antikörper immunchemisch semiquantitativ nachgewiesen. Die Abbildungen 13 und 14 zeigen die Expression der rekombinanten Proteine.

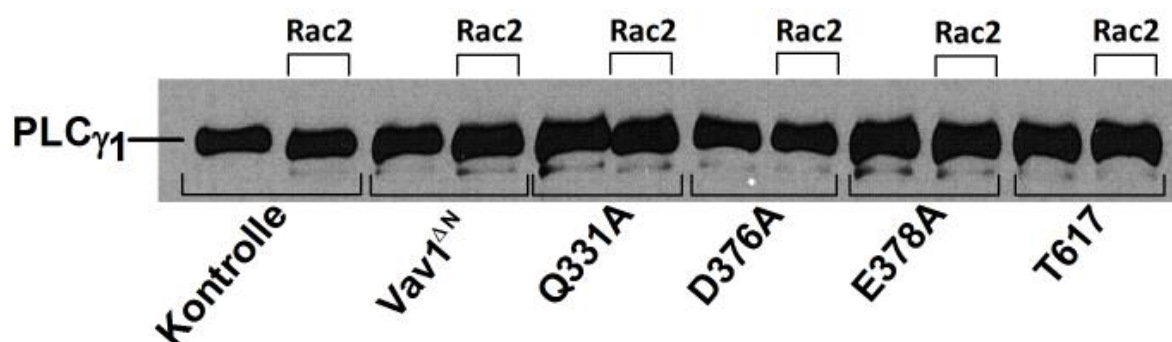


Abbildung 13: Expression von PLC γ_1 in transfizierten COS-7-Zellen. COS-7-Zellen wurden wie gekennzeichnet mit jeweils 1 μ g des Vektors hPLC γ_1 -myc-pcDNA3.1(+) (PLC γ_1), sowie jeweils 0,5 μ g der Vektoren HA-Vav1 ΔN -pcDNA3.1(+) (Vav1 ΔN), HA-Vav1 $\Delta N/Q331A$ -pcDNA3.1(+) (Q331A), HA-Vav1 $\Delta N/D376A$ -pcDNA3.1(+) (D376A), HA-Vav1 $\Delta N/E378A$ -pcDNA3.1(+) (E378A), HA-Vav1 $\Delta N/T617$ -pcDNA3.1(+) (T617) und 30 ng des Vektors Rac2-pcDNA3.1(+) (Rac2) kotransfiziert. Die Expression von PLC γ_1 alleine und mit Rac2 diente als Kontrolle (Kontrolle). Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1,53 μ g konstant gehalten. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 h in Kulturmedium mit 10 mM LiCl inkubiert und anschließend homogenisiert. Fünfundzwanzig μ l des Homogenats wurden in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der immunchemische Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte mittels eines Anti-myc-Antikörpers.

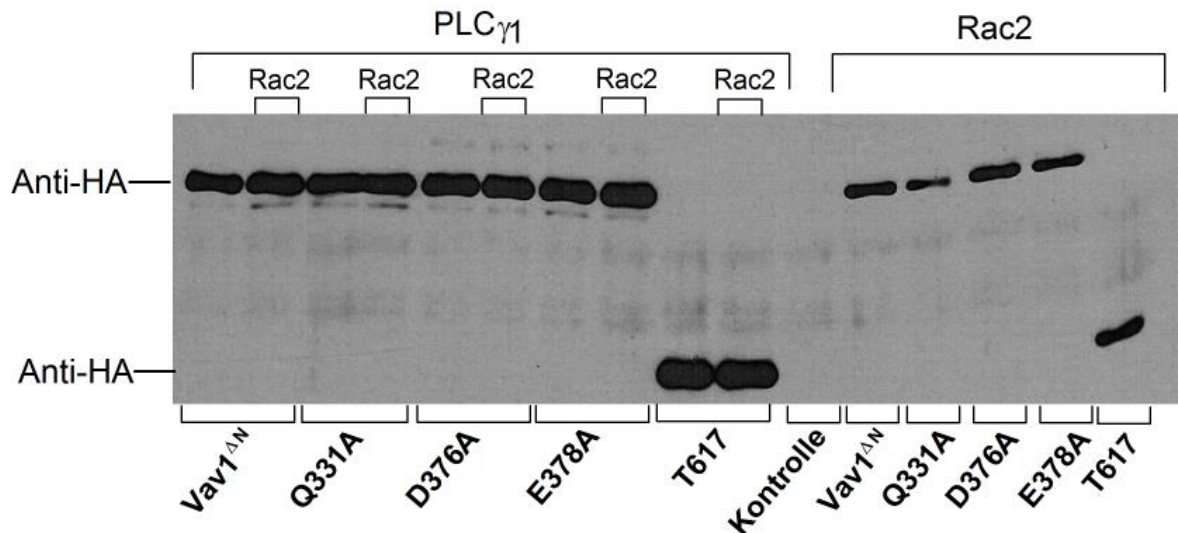


Abbildung 14: Expression von Vav1^{ΔN}, Vav1^{ΔN/Q331A}, Vav1^{ΔN/D376A}, Vav1^{ΔN/E378A} und Vav1^{ΔN/T617} in transfizierten COS-7-Zellen. COS-7-Zellen wurden wie gekennzeichnet mit jeweils 1 µg des Vektors hPLCγ₁-myc-pcDNA3.1(+) (PLCγ₁), sowie jeweils 0,5 µg der Vektoren HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) (Vav1^{ΔN}), HA-Vav1^{ΔN/Q331A}-pcDNA3.1(+) (Q331A), HA-Vav1^{ΔN/D376A}-pcDNA3.1(+) (D376A), HA-Vav1^{ΔN/E378A}-pcDNA3.1(+) (E378A), HA-Vav1^{ΔN/T617}-pcDNA3.1(+) (T617), 30 ng des Vektors Rac2-pcDNA3.1(+) (Rac2) und mit 1,53 µg pcDNA3.1(+) (Kontrolle) kotransfiziert. Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1,53 µg konstant gehalten. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 h in Kulturmedium mit 10 mM LiCl inkubiert und anschließend homogenisiert. Fünfundzwanzig µl des Homogenats wurden in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der immunchemische Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte mittels eines Anti-HA-Antikörpers.

Wie in den Abbildungen 13 und 14 zu erkennen ist, wurden sowohl PLCγ₁ als auch Vav1^{ΔN}, Vav1^{ΔN/Q331A}, Vav1^{ΔN/D376A}, Vav1^{ΔN/E378A} und Vav1^{ΔN/T617} exprimiert. Die Expression von PLCγ₁ war in allen Spuren weitgehend ähnlich, wohingegen bei den Vav1-Mutanten die Expression von Vav1^{ΔN/T617} bei gemeinsamer Koexpression mit PLCγ₁ und Rac2 stärker ausgeprägt war. Die Auswirkungen dieser verstärkten Expression müssen in die Interpretation der Ergebnisse mit einfließen. Alle übrigen Mutanten wurden bei gemeinsamer Expression mit PLCγ₁ und Rac2 in etwa gleichmäßig exprimiert. Somit beruhen die beobachteten stimulatorischen Effekte der Vav1-Mutanten auf die Aktivität der PLCγ₁ nicht auf Expressionsunterschieden. Dem gegenüber war die alleinige Expression der Vav1-Proteine deutlich schwächer.

Im nächsten Versuch wurden die Effekte der Vav1-Mutanten in Ab- oder Anwesenheit von Rac2 auf die Aktivität des anderen Isoenzym, PLC γ_2 , untersucht. Da Rac2 spezifisch die PLC γ_2 stimuliert und die eingefügten Mutationen im jeweiligen Vav1-Protein auf Grundlage der Interaktion mit Rac1 ausgewählt wurden, zeigten sich die zu erwartenden Eigenschaften der jeweiligen Vav1 Δ^N -Mutanten in diesem Versuch deutlicher, wie in Abbildung 15 zu sehen ist.

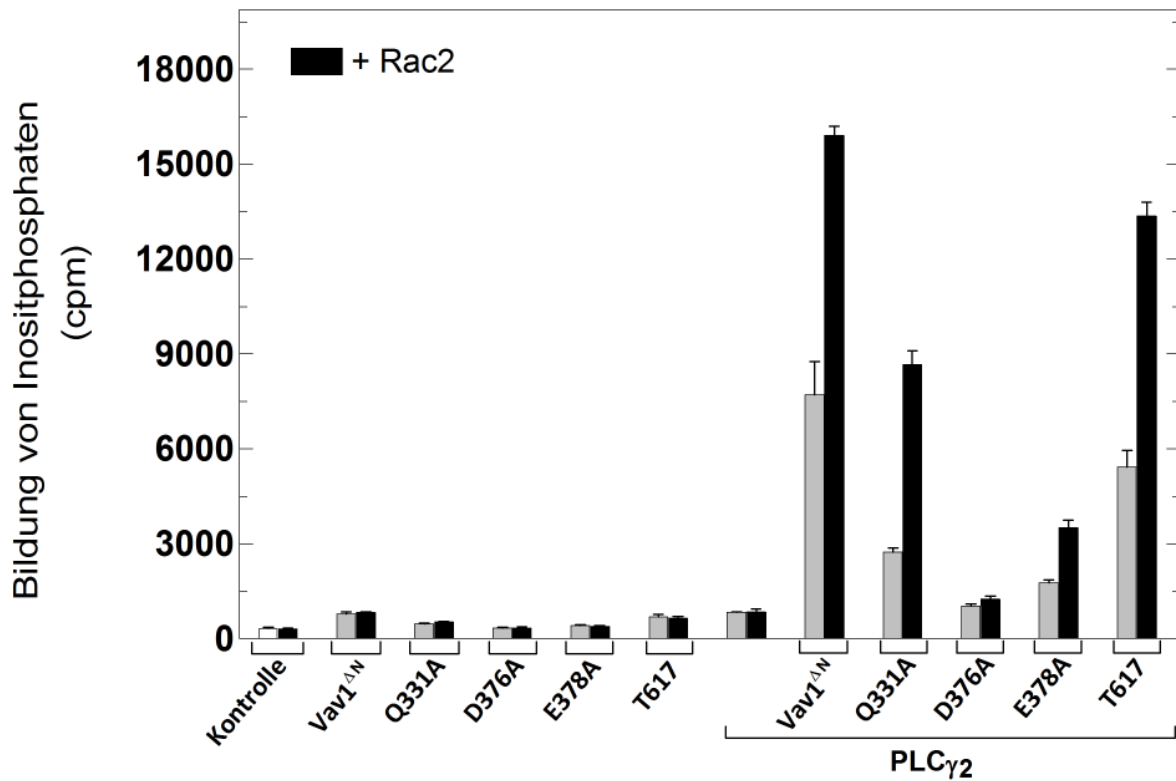


Abbildung 15: Einfluss der verschiedenen Vav1 Δ^N -Mutanten Vav1 Δ^N /Q331A, Vav1 Δ^N /D376A, Vav1 Δ^N /E378A und Vav1 Δ^N /T617 auf die Aktivität der PLC γ_2 bei An- und Abwesenheit von Rac2 in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen wurden wie in der Abbildung angegeben mit jeweils 1,53 μ g des Vektors pcDNA3.1(+) (Kontrolle), 1 μ g des Vektors hPLC γ_2 -myc-pcDNA3.1(+) (PLC γ_2), 0,5 μ g der Vektoren HA-Vav1 Δ^N -pcDNA3.1(+) (Vav1 Δ^N), HA-Vav1 Δ^N /Q331A-pcDNA3.1(+) (Q331A), HA-Vav1 Δ^N /D376A-pcDNA3.1(+) (D376A), HA-Vav1 Δ^N /E378A-pcDNA3.1(+) (E378A), HA-Vav1 Δ^N /T617-pcDNA3.1(+) (T617) und mit jeweils 30 ng Rac2-pcDNA3.1(+) (Rac2) kotransfiziert. Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1,53 μ g konstant gehalten. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 Stunden in DMEM-Medium mit 2,5 μ Ci/ml D-myo-[2- 3 H(N)]-Inosit und 10 mM LiCl inkubiert und anschließend die Inositphosphatbildung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen $\pm$ Standardabweichungen.

Auch bei diesem Versuch führte eine Koexpression von Vav1^{ΔN} und PLCγ₂ zu einer Steigerung der Inositphosphatbildung um das etwa 9,3-fache im Vergleich zur alleinigen Expression von exogener PLCγ₂ (Abbildung 15). Anders als bei PLCγ₁ führte hier eine zusätzliche Koexpression von Rac2 mit den anderen bereits genannten Proteinen zu einer weiteren, deutlichen Anhebung der Inositphosphatbildung. Diese betrug bei gemeinsamer Expression aller drei exogenen Moleküle das nahezu 2,1-fache im Vergleich zu den mit hPLCγ₂-myc-pcDNA3.1(+) und HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) transfizierten Zellen. Im Vergleich dazu war bei den beiden Mutanten Vav1^{ΔN/Q331A} und Vav1^{ΔN/E378A}, welche in ihrer Interaktion mit den entsprechenden *switch*-Domänen von Rac1 beeinträchtigt sind, eine signifikante Reduktion ihrer Stimulierung der PLCγ₂ zu beobachten. Bei der jeweiligen Koexpression mit PLCγ₂ zeigte sich bei Vav1^{ΔN/Q331A} eine Steigerung der Inositphosphatbildung nur noch um lediglich das ca. 3,3-fache und bei Vav1^{ΔN/E378A} um das etwa 2,1-fache im Vergleich zu den Zellen, die nur mit hPLCγ₂-myc-pcDNA3.1(+) transfiziert worden waren. Eine zusätzliche Expression von exogenem Rac2 mit PLCγ₂ und den Vav1-Mutanten zeigte jedoch einen deutlicheren Effekt. So steigerte sich die Inositphosphatbildung bei einer gemeinsamen Expression von Vav1^{ΔN/Q331A}, PLCγ₂ und Rac2 um ca. das 3,2-fache im Vergleich zur Koexpression von Vav1^{ΔN/Q331A} und PLCγ₂. Bei Expression von Vav1^{ΔN/E378A} zusammen mit der PLCγ₂ und Rac2 ergab sich ebenfalls eine Anhebung der Inositphosphatbildung, diese betrug das etwa Doppelte im Vergleich zu Zellen mit einer Koexpression von exogenem Vav1^{ΔN/E378A} und PLCγ₂. Die schwächste Aktivität zeigte die Vav1-Mutante Vav1^{ΔN/D376A}. Hier konnte nur eine schwache ca. 1,2-fache Stimulation der Aktivität der PLCγ₂ gemessen werden. In Anwesenheit von Rac2 wurde keine zusätzliche Stimulation der PLCγ₂ beobachtet. Die C-terminal trunkierte Vav1-Mutante Vav1^{ΔN/T617} bewirkte bei einer gemeinsamen Expression mit der PLCγ₂ eine Zunahme der Inositphosphatbildung um das ungefähr 6,5-fache und in Anwesenheit von exogenem Rac2 eine zusätzliche Stimulation der PLCγ₂ um das annähernd 2,5-fache im Vergleich zu den Zellen welche Vav1^{ΔN/T617} zusammen mit PLCγ₂ exprimierten. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass für die Stimulation der PLCγ₂-Aktivität durch Vav1 die Interaktion des Guaninnukleotidaustauschfaktors mit endogenen Rho-GTPasen und die katalytische Aktivität des Austauschers eine bedeutende Rolle spielen. Ist wie bei der Vav1-Mutante D376A die Interaktion der DH-Domäne mit der Cysteinreichen Domäne CRD und folglich die GEF-Aktivität gestört, wird die PLCγ₂ nicht mehr durch Vav1 stimuliert. Die verschiedenen Vav1-Mutanten zeigten jedoch Unterschiede im Hinblick auf ihre Aktivität. Mutationen in der DH-Domäne (Q331A, E378A) bewirkten

eine reduzierte GEF-Aktivität gegenüber endogenen Rac-GTPasen und folglich eine reduzierte Stimulation der PLC γ_2 . Die Vav1-Mutanten waren jedoch in der Lage, Rac2 zu aktivieren und bewirkten folglich ähnlich wie wildtypisches Vav1 eine zusätzliche Stimulation der PLC γ_2 . Die C-terminalen SH3 und SH2-Domänen scheinen im Hinblick auf die Stimulation der PLC γ_2 keine bedeutende Rolle zu spielen. Die trunkierte Mutante bewirkte eine ähnliche Aktivierung von Rac2 wie wildtypisches Vav1 und eine ähnliche Stimulation der PLC γ_2 .

Zur Beurteilung der Expression der rekombinanten Proteine wurden auch bei diesem Versuch Kontrollzellen mit denselben Mengen an Plasmid-DNA transfiziert und die in den Zelllysaten enthaltenen Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Expression der jeweiligen rekombinanten Proteine ist in den Abbildungen 16 und 17 zu sehen.

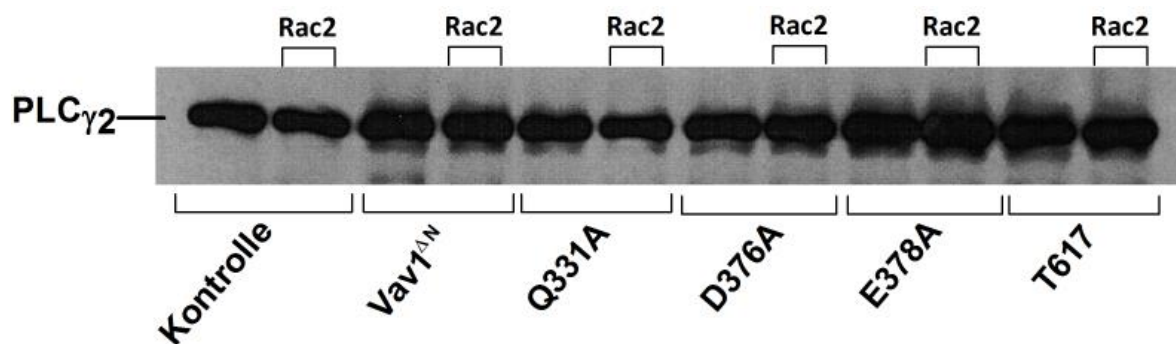


Abbildung 16: Expression von PLC γ_2 in transfizierten COS-7-Zellen. COS-7-Zellen wurden wie gekennzeichnet mit jeweils 1 μ g des Vektors hPLC γ_2 -myc-pcDNA3.1(+) (PLC γ_2), sowie jeweils 0,5 μ g der Vektoren HA-Vav1 ΔN -pcDNA3.1(+) (Vav1 ΔN), HA-Vav1 $\Delta N/Q331A$ -pcDNA3.1(+) (Q331A), HA-Vav1 $\Delta N/D376A$ -pcDNA3.1(+) (D376A), HA-Vav1 $\Delta N/E378A$ -pcDNA3.1(+) (E378A), HA-Vav1 $\Delta N/T617$ -pcDNA3.1(+) (T617) und 30 ng des Vektors Rac2-pcDNA3.1(+) (Rac2) kotransfiziert. Die Expression von PLC γ_2 alleine und mit Rac2 diente als Kontrolle (Kontrolle). Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1,53 μ g konstant gehalten. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 h in Kulturmedium mit 10 mM LiCl inkubiert und anschließend homogenisiert. Fünfundzwanzig μ l des Homogenats wurden in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der immunchemische Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte mittels eines Anti-myc-Antikörpers.

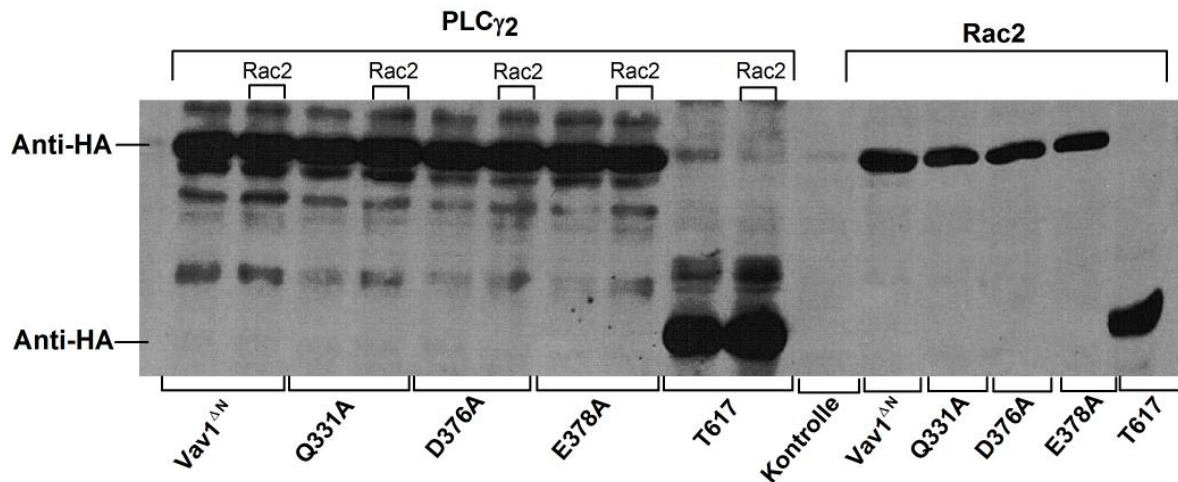


Abbildung 17: Expression von Vav1^{ΔN}, Vav1^{ΔN/Q331A}, Vav1^{ΔN/D376A}, Vav1^{ΔN/E378A} und Vav1^{ΔN/T617} in transfizierten COS-7-Zellen. COS-7-Zellen wurden wie gekennzeichnet mit jeweils 1 µg des Vektors hPLCγ₂-myc-pcDNA3.1(+) (PLCγ₂), sowie jeweils 0,5 µg der Vektoren HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) (Vav1^{ΔN}), HA-Vav1^{ΔN/Q331A}-pcDNA3.1(+) (Q331A), HA-Vav1^{ΔN/D376A}-pcDNA3.1(+) (D376A), HA-Vav1^{ΔN/E378A}-pcDNA3.1(+) (E378A), HA-Vav1^{ΔN/T617}-pcDNA3.1(+) (T617), 30 ng des Vektors Rac2-pcDNA3.1(+) (Rac2) und mit 1,53 µg pcDNA3.1(+) (Kontrolle) kotransfiziert. Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1,53 µg konstant gehalten. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 h in Kulturmedium mit 10 mM LiCl inkubiert und anschließend homogenisiert. Fünfundzwanzig µl des Homogenats wurden in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der immunchemische Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte mittels eines Anti-HA-Antikörpers.

Wie in Abbildung 16 und 17 zu erkennen ist, wurden die rekombinanten Proteine PLCγ₂ sowie Vav1^{ΔN} und die Mutanten Vav1^{ΔN/Q331A}, Vav1^{ΔN/D376A}, Vav1^{ΔN/E378A} und Vav1^{ΔN/T617} in den jeweiligen COS-7-Zellen exprimiert. Die Expression der PLCγ₂ war in allen Proben ähnlich. Die Mutanten von Vav1, Vav1^{ΔN/Q331A}, Vav1^{ΔN/D376A}, Vav1^{ΔN/E378A} wurden ebenfalls ähnlich exprimiert und ihr Expressionsmuster gab somit keinen Grund anzunehmen, dass die unterschiedlichen Eigenschaften der Proteine hinsichtlich der Stimulation der PLCγ₂ in An- und Abwesenheit von Rac2, auf unterschiedlicher Expression beruhen. Allerdings ist noch zu klären, inwieweit die stärkere Expression von T617 für die funktionellen Eigenschaften dieser Mutante verantwortlich ist.

3.5. Einfluss von Vav1^{ΔN} und der Mutanten Vav1^{ΔN/Q331A}, Vav1^{ΔN/D376A}, Vav1^{ΔN/E378A} und Vav1^{ΔN/T617} auf die Aktivität der Isoenzyme PLCγ₁ und PLCγ₂ bei An- und Abwesenheit von Rac2 in HEK293-Zellen

Um zu prüfen, ob die Mutanten von Vav1 in einer anderen Zelllinie ähnliche funktionelle Eigenschaften besitzen und um somit zelltypspezifische Effekte auszuschließen, wurden die nachfolgenden Experimente in der Säugetierzelllinie HEK293 durchgeführt. HEK293-Zellen waren auch in den Versuchen von Jill E. Chrencik et al. (2008) verwendet worden. Ein sehr markanter Unterschied zwischen HEK293-Zellen und COS-7-Zellen im Rahmen unserer Versuche war, dass HEK293-Zellen eine deutlich höhere basale PLC-Aktivität zeigten (Kontrolle, Abbildung 18). Die basale Aktivität endogener PLC-Enzyme wurde deutlich durch Vav1^{ΔN}, aber auch durch die Vav1-Mutanten Q331A, E378A und T617 stimuliert. So ergab die Expression von exogenem Vav1^{ΔN} einen Anstieg der Inositphosphatbildung um ungefähr das 2,7-fache im Vergleich zu den Zellen, die nur mit pcDNA3.1(+) transfiziert worden waren. Auch bei der Expression von Q331A und E378A zeigte sich dieser Trend, was ebenfalls zu einer Anhebung der Inositphosphatbildung um etwa das 2,5-fache bei Q331A und ungefähr das 1,8-fache bei E378A führte. Die Vav1-Mutante D376A, bei welcher die Interaktionen zwischen der DH- und der CR-Domäne sowie der PH-Domäne gestört sind, zeigte die schwächste katalytische GEF-Aktivität und bewirkte nur eine geringfügige Stimulation endogener PLC-Enzyme um das etwa 1,4-fache (Abbildung 18). Dem gegenüber zeigte die C-terminal trunkierte Mutante T617 keinen Unterschied zu Vav1^{ΔN} und bewirkte eine ungefähr 2,7-fache Erhöhung der Inositphosphatbildung gegenüber den Zellen, die nur mit pcDNA3.1(+) transfiziert worden waren.

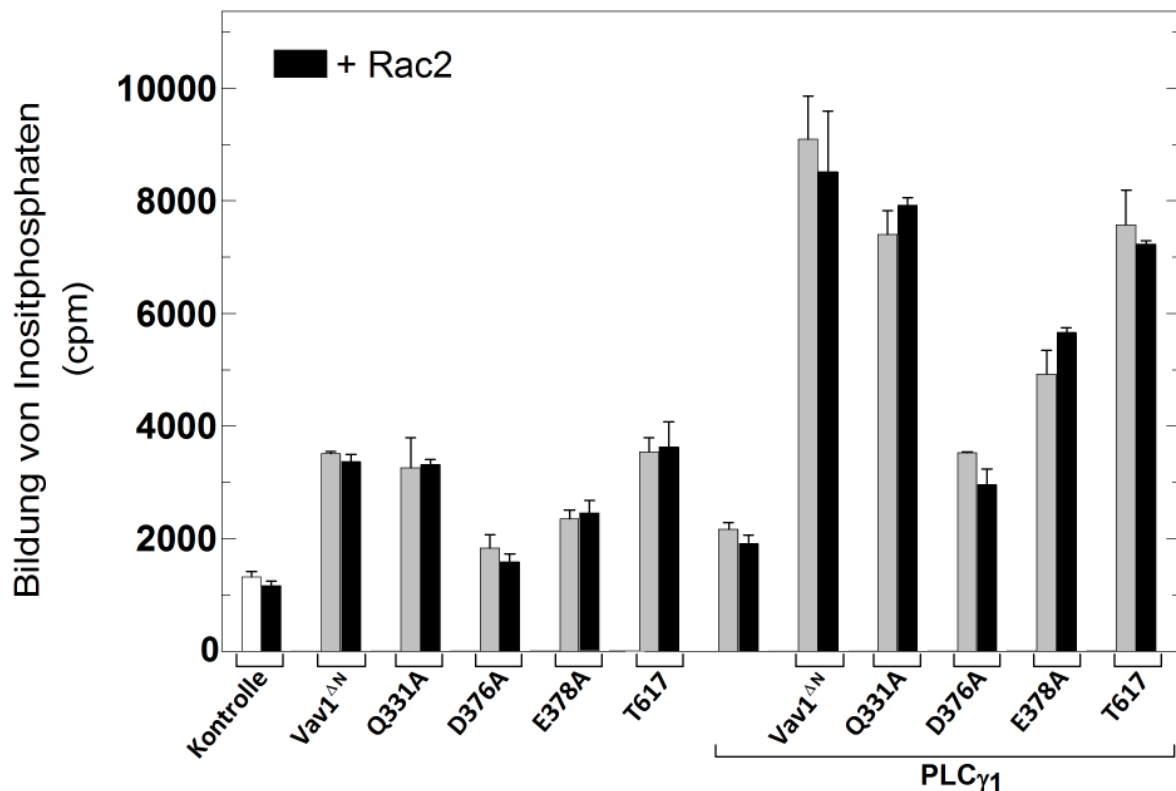


Abbildung 18: Einfluss der verschiedenen Vav1^{ΔN}-Mutanten Vav1^{ΔN/Q331A}, Vav1^{ΔN/D376A}, Vav1^{ΔN/E378A} und Vav1^{ΔN/T617} auf die Aktivität der PLC_{γ1} bei An- und Abwesenheit von Rac2 in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden wie in der Abbildung angegeben mit jeweils 1,53 µg des Vektors pcDNA3.1(+) (Kontrolle), 1 µg des Vektors hPLC_{γ1}-myc-pcDNA3.1(+) (PLC_{γ1}), 0,5 µg der Vektoren HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) (Vav1^{ΔN}), HA-Vav1^{ΔN/Q331A}-pcDNA3.1(+) (Q331A), HA-Vav1^{ΔN/D376A}-pcDNA3.1(+) (D376A), HA-Vav1^{ΔN/E378A}-pcDNA3.1(+) (E378A), HA-Vav1^{ΔN/T617}-pcDNA3.1(+) (T617) und mit jeweils 30 ng Rac2-pcDNA3.1(+) (Rac2) kotransfiziert. Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1,53 µg konstant gehalten. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 Stunden in DMEM-Medium mit 2,5 µCi/ml D-myo-[2-³H(N)]-Inosit und 10 mM LiCl inkubiert und anschließend die Inositphosphatbildung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen ± Standardabweichungen.

Für die Koexpression von PLC_{γ1} und Vav1^{ΔN} ergab sich eine Erhöhung der Inositphosphatbildung um das etwa 4,1-fache im Vergleich zu Zellen mit Expression von exogener PLC_{γ1}. Die Koexpression von Q331A und PLC_{γ1} bewirkte eine circa 3,4-fache Stimulation der Bildung von Inositphosphaten. Für die Mutante D376A konnte man nur eine schwache Zunahme der Bildung von Inositphosphaten bei gemeinsamer Expression mit PLC_{γ1}, im Vergleich zu den Zellen mit alleiniger Expression von PLC_{γ1}, beobachten. Die Vav1-Mutante E378A zeigte ebenfalls im Vergleich zu den anderen Mutanten eine reduzierte Aktivität und bewirkte eine ca. 2,3-fache Zunahme der Bildung von

Inositphosphaten. Im Hinblick auf die Koexpression von T617 und PLC γ_1 hingegen ergab sich im Vergleich zur alleinigen Expression von PLC γ_1 eine Steigerung der Inositphosphatbildung um *ca.* das 3,5-fache. Die GTPase Rac2 konnte die Aktivität der PLC γ_1 nicht zusätzlich stimulieren, weder in Anwesenheit von wildtypischem Vav1 noch in Anwesenheit der Mutanten von Vav1. Die Ergebnisse des Experimentes mit HEK293-Zellen (Abbildung 18) zeigten somit Unterschiede zu denjenigen des Experimentes mit COS-7-Zellen (Abbildung 12). Die Vav1-Mutante D376A in besonderem Maße aber auch die Mutante E378A zeigten in HEK293-Zellen eine schwächere Aktivität und somit eine geringere Stimulation der PLC γ_1 . In COS-7-Zellen zeigte nur die Mutante D376A eine geringere Aktivität. In beiden Zelllinien dagegen stimulierten die Vav1-Mutante Q331A und die C-terminal trunkierte Mutante T617 die Aktivität der PLC γ_1 vergleichbar zu Vav1^{AN}.

Zur Überprüfung der Expression der jeweiligen rekombinanten Proteine, wurden bei diesem Versuch Kontrollzellen mit denselben Mengen an Plasmid-DNA transfiziert und die in den Zelllysaten enthaltenen Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Expression der jeweiligen rekombinanten Proteine ist in Abbildung 19 und 20 zu sehen.

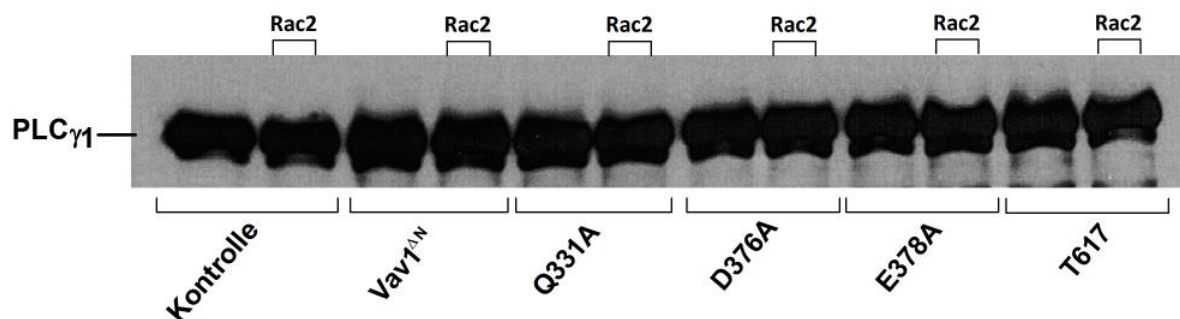


Abbildung 19: Expression von PLC γ_1 in transfizierten HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden wie gekennzeichnet mit jeweils 1 μ g des Vektors hPLC γ_1 -myc-pcDNA3.1(+) (PLC γ_1), sowie jeweils 0,5 μ g der Vektoren HA-Vav1^{AN}-pcDNA3.1(+) (Vav1^{AN}), HA-Vav1^{AN/Q331A}-pcDNA3.1(+) (Q331A), HA-Vav1^{AN/D376A}-pcDNA3.1(+) (D376A), HA-Vav1^{AN/E378A}-pcDNA3.1(+) (E378A), HA-Vav1^{AN/T617}-pcDNA3.1(+) (T617) und 30 ng des Vektors Rac2-pcDNA3.1(+) (Rac2) kotransfiziert. Die Expression von PLC γ_1 alleine und mit Rac2 diente als Kontrolle (Kontrolle). Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1,53 μ g konstant gehalten. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 h in Kulturmedium mit 10 mM LiCl inkubiert und anschließend homogenisiert. Fünfundzwanzig μ l des Homogenats wurden in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der immunchemische Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte mittels eines Anti-myc-Antikörpers.

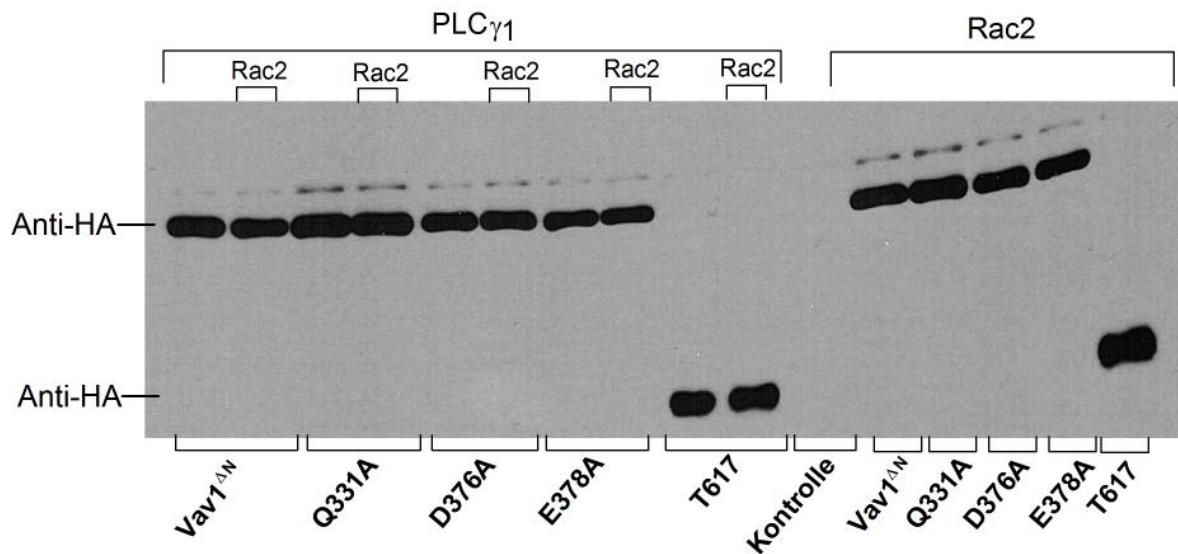


Abbildung 20: Expression von Vav1^{ΔN}, Vav1^{ΔN/Q331A}, Vav1^{ΔN/D376A}, Vav1^{ΔN/E378A} und Vav1^{ΔN/T617} in transfizierten HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden wie gekennzeichnet mit jeweils 1 µg des Vektors hPLCγ₁-myc-pcDNA3.1(+) (PLCγ₁), sowie jeweils 0,5 µg der Vektoren HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) (Vav1^{ΔN}), HA-Vav1^{ΔN/Q331A}-pcDNA3.1(+) (Q331A), HA-Vav1^{ΔN/D376A}-pcDNA3.1(+) (D376A), HA-Vav1^{ΔN/E378A}-pcDNA3.1(+) (E378A), HA-Vav1^{ΔN/T617}-pcDNA3.1(+) (T617), 30 ng des Vektors Rac2-pcDNA3.1(+) (Rac2) und mit 1,53 µg pcDNA3.1(+) (Kontrolle) kotransfiziert. Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1,53 µg konstant gehalten. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 h in Kulturmedium mit 10 mM LiCl inkubiert und anschließend homogenisiert. Fünfundzwanzig µl des Homogenats wurden in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der immunchemische Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte mittels eines Anti-HA-Antikörpers

Wie man in Abbildung 19 erkennen kann, wurden die jeweiligen rekombinanten PLCγ₁-Proteine gleichmäßig exprimiert. Dies trifft auch für die jeweiligen Vav1^{ΔN}-Proteine zu, wie man aus Abbildung 20 entnehmen kann, auch wenn hier teilweise kleinere Expressionsunterschiede zu sehen waren. Insgesamt sind damit auch bei diesem Versuch Expressionsunterschiede als Ursache der jeweiligen Effekte der einzelnen Mutanten Q331A, D376A, E378A und T617 auf die Aktivität der PLCγ₁ in An- und Abwesenheit von Rac2 unwahrscheinlich.

In einem weiteren Experiment wurden die Effekte der verschiedenen Vav1-Mutanten auf die Aktivität der PLCγ₂ in Ab- und Anwesenheit von Rac2 in HEK293-Zellen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 zu sehen.

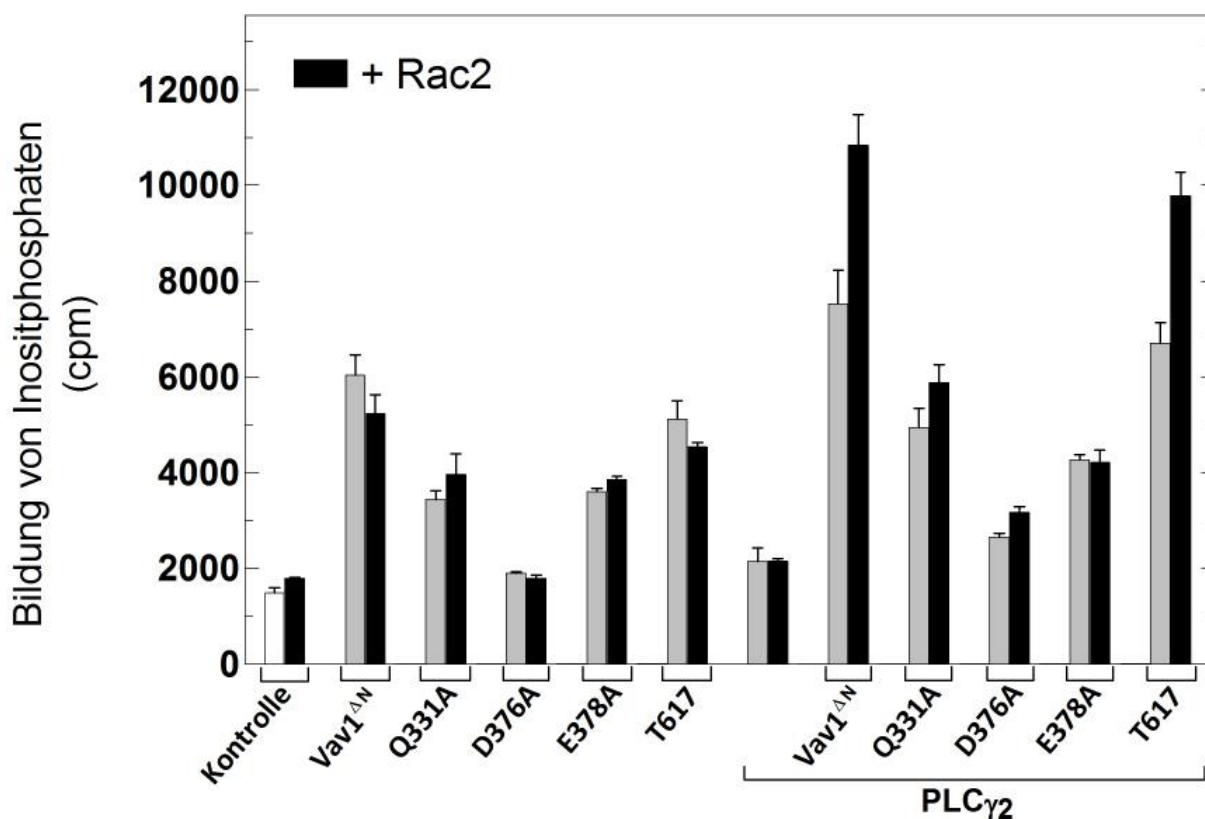


Abbildung 21: Einfluss der verschiedenen Vav1^{ΔN}-Mutanten Vav1^{ΔN/Q331A}, Vav1^{ΔN/D376A}, Vav1^{ΔN/E378A} und Vav1^{ΔN/T617} auf die Aktivität der PLC γ_2 bei An- und Abwesenheit von Rac2 in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden wie in der Abbildung angegeben mit jeweils 1,53 μ g des Vektors pcDNA3.1(+) (Kontrolle), 1 μ g des Vektors hPLC γ_2 -myc-pcDNA3.1(+) (PLC γ_2), 0,5 μ g der Vektoren HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) (Vav1^{ΔN}), HA-Vav1^{ΔN/Q331A}-pcDNA3.1(+) (Q331A), HA-Vav1^{ΔN/D376A}-pcDNA3.1(+) (D376A), HA-Vav1^{ΔN/E378A}-pcDNA3.1(+) (E378A), HA-Vav1^{ΔN/T617}-pcDNA3.1(+) (T617) und mit jeweils 30 ng Rac2-pcDNA3.1(+) (Rac2) kotransfiziert. Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1,53 μ g konstant gehalten. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 Stunden in DMEM-Medium mit 2,5 μ Ci/ml D-myo-[2-³H(N)]-Inosit und 10 mM LiCl inkubiert und anschließend die Inositphosphatbildung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen $\pm$ Standardabweichungen.

Wie in den Versuchen mit PLC γ_1 konnte man auch hier wieder eine erhöhte basale Inositphosphatbildungsrate messen, welche auf die endogene Aktivität von in den Zellen vorhandenen PLC-Enzymen zurückzuführen ist. Diese endogene PLC-Aktivität wird durch Vav1^{ΔN} und die Vav1-Mutanten unterschiedlich stark stimuliert. So konnte man bei der Expression von exogenem Vav1^{ΔN} eine Erhöhung der Inositphosphatbildung um das etwa 4-fache im Vergleich zu den Zellen sehen, die nur mit pcDNA3.1(+) transfiziert worden waren. Auch bei der Expression von exogenem Q331A und E378A war dieser Effekt zu

sehen. Hier stieg die Inositphosphatbildung bei Q331A um das etwa 2,3-fache und bei E378A um ungefähr das 2,4-fache. Die Mutante D376A war dagegen nicht aktiv und bewirkte keine Zunahme der Bildung von Inositphosphaten. Bei Expression von T617 zeigte sich eine Steigerung der Inositphosphatbildung um *ca.* das 3,4-fache. Rac2 führte in Gegenwart von Vav1^{ΔN} oder der Mutanten von Vav1 zu keiner weiteren Stimulation, was bedeutet, dass das durch Vav1 aktivierte Rac2 endogene PLC-Enzyme nicht zu stimulieren vermag. Da in HEK293-Zellen endogene PLC-Enzyme stark durch Vav1 stimuliert werden, ist in diesem Experiment die zusätzliche Stimulation der heterolog exprimierten PLCγ₂ durch Vav1 kaum zu erkennen. Die Rac2-vermittelte Stimulation der PLCγ₂ ist dagegen zu sehen. Rac2 wurde durch Vav1^{ΔN} aktiviert und stimulierte die Aktivität der PLCγ₂. Bei zusätzlicher Expression von Rac2 stieg der Wert auf das etwa 1,4-fache gegenüber Kontrollzellen, welche PLCγ₂ und Vav1^{ΔN} exprimierten. Berücksichtigt man die basale Inositphosphatbildung bei der jeweiligen Expression von Q331A bzw. E378A, dann zeigte sich im Rahmen der Koexpression mit PLCγ₂ keine wesentliche Erhöhung der Inositphosphatbildung. Auch wurde Rac2 durch die Vav1-Mutanten Q331A und E378A nicht aktiviert und bewirkte keine Stimulation der PLCγ₂-Aktivität. Die Mutante D376A zeigte einen vollständigen Verlust der Aktivität. Sie konnte weder die Aktivität endogener PLC-Enzyme stimulieren noch die Aktivität der PLCγ₂. Die Vav1-Mutante T617 zeigte in HEK293-Zellen ähnliche Effekte wie Vav1^{ΔN}. Sie führte zu einer ähnlichen Stimulation der Aktivität endogener PLC-Enzyme. Eine zusätzliche Stimulation der PLCγ₂ war nach Abzug der basalen Aktivität nur sehr geringfügig zu erkennen. Vergleichbar zu Vav1^{ΔN} bewirkte die T617-Mutante eine Aktivierung von Rac2, was zu einem zusätzlichen Anstieg der Inositphosphatbildung um das *ca.* 1,5-fache führte. Auch hier zeigten die Ergebnisse des Experimentes deutliche Unterschiede zu denjenigen des Experiments in COS-7-Zellen (Abbildung 15). In COS-7-Zellen konnte eine deutliche Stimulation der PLCγ₂ durch Vav1 gemessen werden, wohingegen in HEK293-Zellen aufgrund der starken Stimulation endogener PLC-Enzyme kaum eine zusätzliche Stimulation der PLCγ₂ durch Vav1 sichtbar war. Auch zeigten die Mutanten von Vav1 Unterschiede hinsichtlich der Aktivierung von Rac2. Während in COS-7-Zellen die Mutanten Q331A und E378A Rac2 aktivieren konnten und folglich zu einer zusätzlichen Stimulation der exogenen PLCγ₂ führten, konnten sie in HEK293-Zellen im Unterschied zu Vav1^{ΔN} Rac2 nicht ausreichend aktivieren. Die Mutante D376A zeigte dagegen in beiden Zelllinien einen Verlust ihrer Aktivität.

Ebenso wie in den vorherigen Versuchen, wurden Kontrollzellen mit denselben Mengen an Plasmid-DNA transfiziert und die in den Zelllysaten enthaltenen Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt, um etwaige Expressionsunterschiede der jeweiligen rekombinanten Proteine zu detektieren. Die Expression der jeweiligen rekombinanten Proteine ist in Abbildung 22 und 23 zu sehen.

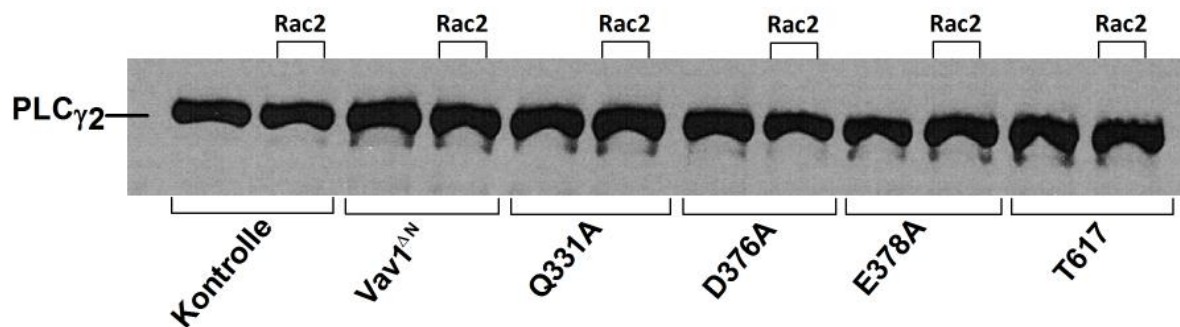


Abbildung 22: Expression von PLC γ_2 in transfizierten HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden wie gekennzeichnet mit jeweils 1 μ g des Vektors hPLC γ_2 -myc-pcDNA3.1(+) (PLC γ_2), sowie jeweils 0,5 μ g der Vektoren HA-Vav1 ΔN -pcDNA3.1(+) (Vav1 ΔN), HA-Vav1 $\Delta N/Q331A$ -pcDNA3.1(+) (Q331A), HA-Vav1 $\Delta N/D376A$ -pcDNA3.1(+) (D376A), HA-Vav1 $\Delta N/E378A$ -pcDNA3.1(+) (E378A), HA-Vav1 $\Delta N/T617$ -pcDNA3.1(+) (T617) und 30 ng des Vektors Rac2-pcDNA3.1(+) (Rac2) kotransfiziert. Die Expression von PLC γ_2 alleine und mit Rac2 diente als Kontrolle (Kontrolle). Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1,53 μ g konstant gehalten. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 h in Kulturmedium mit 10 mM LiCl inkubiert und anschließend homogenisiert. Fünfundzwanzig μ l des Homogenats wurden in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der immunchemische Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte mittels eines Anti-myc-Antikörpers.

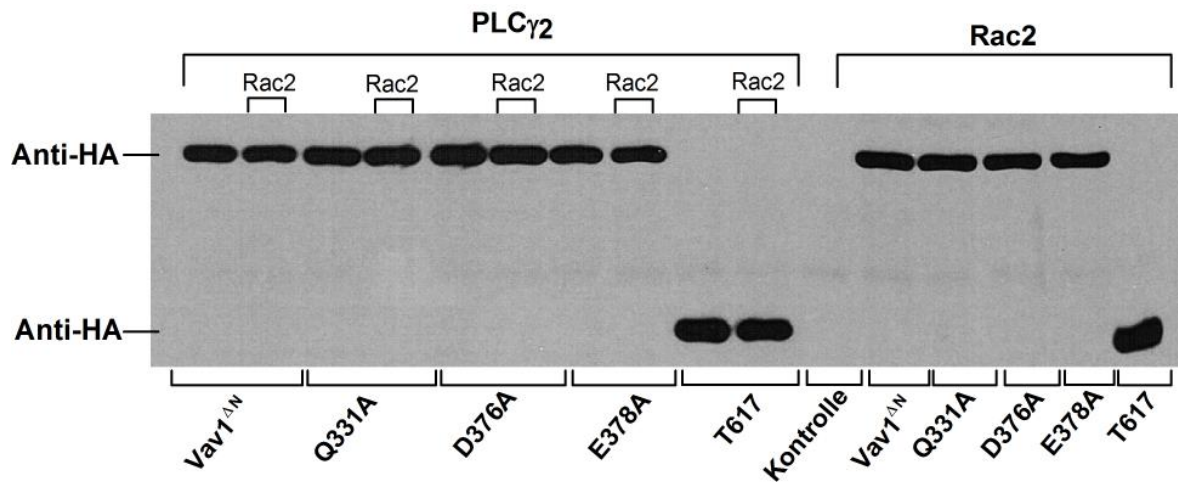


Abbildung 23: Expression von Vav1^{ΔN}, Vav1^{ΔN/Q331A}, Vav1^{ΔN/D376A}, Vav1^{ΔN/E378A} und Vav1^{ΔN/T617} in transfizierten HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden wie gekennzeichnet mit jeweils 1 µg des Vektors hPLCγ₂-myc-pcDNA3.1(+) (PLCγ₂), sowie jeweils 0,5 µg der Vektoren HA-Vav1^{ΔN}-pcDNA3.1(+) (Vav1^{ΔN}), HA-Vav1^{ΔN/Q331A}-pcDNA3.1(+) (Q331A), HA-Vav1^{ΔN/D376A}-pcDNA3.1(+) (D376A), HA-Vav1^{ΔN/E378A}-pcDNA3.1(+) (E378A), HA-Vav1^{ΔN/T617}-pcDNA3.1(+) (T617), 30 ng des Vektors Rac2-pcDNA3.1(+) (Rac2) und mit 1,53 µg pcDNA3.1(+) (Kontrolle) kotransfiziert. Die Gesamtmenge der zur Transfektion verwendeten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von pcDNA3.1(+) bei 1,53 µg konstant gehalten. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 20 h in Kulturmedium mit 10 mM LiCl inkubiert und anschließend homogenisiert. Fünfundzwanzig µl des Homogenats wurden in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der immunchemische Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte mittels eines Anti-HA-Antikörpers.

Wie bereits in den vorherigen Versuchen mit HEK293-Zellen zu sehen war, wiesen auch diese Zellen keine gravierenden Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen rekombinanten Proteinen auf. In Abbildung 22 ist gezeigt, dass die PLCγ₂ in den jeweiligen HEK293-Zellen nahezu gleichmäßig exprimiert wird. Ebenso verhielt es sich mit der Expression der jeweiligen Vav1^{ΔN}-Mutanten mit der Ausnahme, dass auch in diesem Versuch die Mutante T617 etwas stärker exprimiert wurde.

4. Diskussion

Das menschliche Immunsystem sieht sich ständig einer Vielzahl von unterschiedlichen Krankheitserregern gegenüber, deren Abwehr essentiell für das Überleben ist. Eine Schlüsselposition in der Immunabwehr des Menschen nehmen T-Zellen ein, die unter anderem für die Koordination und Regulation des Immunsystems sorgen. In diesem Zusammenhang ist auch die besondere Bedeutung von PLC-Enzymen zu nennen, die unter anderem bei der molekularen Regulierung von T-Zellen zum Tragen kommt. So ist seit längerem bekannt, dass die Stimulation von T-Zell-Rezeptoren zu einer Aktivierung von PLC-Enzymen führt, welche wiederum an der Hydrolyse von PIP_2 beteiligt sind (Tybulewicz 2005, Miletic et al. 2009). PIP_2 kann durch alle bisher bekannten PLC-Enzyme gespalten werden und spielt eine wichtige Rolle beim Ca^{2+} -Ionen-Einstrom in T-Zellen, was wiederum eine Vielzahl von Effekten in der Zelle hervorruft. Die einzelnen Funktionen und vor allem auch die Aktivierung von PLC-Enzymen ist Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten, wie auch in unserer Arbeitsgruppe, deren zentrales Thema unter anderem die Erforschung der Interaktion von Rho-GTPasen mit PLC-Enzymen sowie der Einfluss von GEF-Proteinen ist. Einige, erst kürzlich veröffentlichten Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass Rac2 spezifisch $\text{PLC}\gamma_2$ aktiviert, was durch eine direkte Interaktion der beiden Enzyme vermittelt wird (Bunney et al. 2009, Walliser et al. 2008, Piechulek et al. 2005). Die andere $\text{PLC}\gamma$ -Isoform, $\text{PLC}\gamma_1$, kann dagegen durch konstitutiv aktive Rac-GTPasen nicht aktiviert werden (Piechulek et al. 2005). Interessanterweise konnte in früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe, wie auch in dieser Arbeit, gezeigt werden, dass der Rho-Guaninnukleotidaustauschfaktor Vav1 die Aktivität der $\text{PLC}\gamma_1$ stimulieren kann. Vav1 fungiert als GEF für Rac1, RhoG, Cdc42 und RhoA (Rossman et al. 2005). Die Aktivität der $\text{PLC}\gamma_1$ kann aber in intakten Zellen weder durch aktive Rac-GTPasen noch durch Cdc42 und RhoA stimuliert werden (Piechulek et al. 2005). In der Literatur ist die Verknüpfung von Vav1- und $\text{PLC}\gamma_1$ -Signalwegen wohl bekannt. Die physiologische Bedeutung von $\text{PLC}\gamma_1$ sowie deren Aktivierung durch Vav1 wurde in den vergangenen Jahren durch Herstellung und Erforschung Vav1-defizienter Mäuse intensiv untersucht. Die molekularen Mechanismen der Vav1-vermittelten Aktivierung der $\text{PLC}\gamma_1$ sind jedoch noch wenig verstanden. Vav1/Vav2/Vav3-defiziente T-Zellen zeigten einen vollständigen Verlust einer Ca^{2+} -Ionenantwort nach Stimulation des T-Zellrezeptors (Fujikawa et al.

2003). Es konnte gezeigt werden, dass Vav1-defiziente $CD4^+$ T-Zellen und $CD4^+CD8^+$ Thymozyten eine wesentlich geringere Aktivierung der $PLC\gamma_1$ aufwiesen, da sowohl die Bildung von IP_3 als auch die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern wesentlich reduziert war (Reynolds et al. 2002, Costello et al. 1999). Des Weiteren war auch die Phosphorylierung der $PLC\gamma_1$ beeinträchtigt (Reynolds et al. 2002). Die Autoren schlugen zwei unterschiedliche Mechanismen vor, wie Vav1 die Aktivität der $PLC\gamma_1$ in T-Zellen nach Aktivierung des T-Zellrezeptors regulieren könnte. Der eine Signalweg führt zur Aktivierung der PI3-Kinase, vermutlich durch die GEF-vermittelte Aktivierung von Rac1, zur Phosphorylierung von Tyrosinkinasen der Tec-Familie (Itk, Tec) und somit zur Phosphorylierung und Aktivierung der $PLC\gamma_1$. In dem anderen unabhängigen Signalweg hingegen vermittelt Vav1 die Phosphorylierung des Adapterproteins LAT (*linker for activation of T cells*) und die Komplexbildung zwischen LAT, $PLC\gamma_1$ und den Adaptermolekülen Gads und SLP-76 unabhängig von einer Aktivierung der PI3-Kinase (Reynolds et al. 2002, Reynolds et al. 2004, Tybulewicz et al. 2003). Es ist jedoch noch unklar, wie Vav1 diese beiden Signalwege in T-Zellen reguliert. Es wird vermutet, dass Rac1 durch die GEF-Aktivität von Vav1 aktiviert wird und folglich die PI3-Kinase aktiviert (Reynolds et al. 2002, Reynolds et al. 2004). Im Gegensatz dazu nimmt man auch an, dass Vav1 die Komplexbildung zwischen LAT, SLP-76 und $PLC\gamma_1$ allosterisch reguliert. Ein Anhaltspunkt dafür ist, dass Vav1 mittels seiner SH2-Domäne an eine phosphorylierte Tyrosinseitenkette von SLP-76 binden kann, was wiederum den gesamten SLP-76- $PLC\gamma_1$ -Komplex stabilisieren könnte (Tybulewicz 2005). Des Weiteren wurden auch Funktionen von Vav1 bei der Regulation von T-Zellsignalwegen und bei der Regulation der Ca^{2+} -Mobilisierung beschrieben, die von der intrinsischen Rho-GEF-Aktivität des Proteins unabhängig sind (Miletic et al. 2009).

Die entscheidende Fragestellung dieser Arbeit war folglich, auf welchen molekularen Mechanismen die Vav1-vermittelte Aktivierung der $PLC\gamma_1$ beruht. Es stellte sich hierbei die Frage, ob Vav1 mittels seiner intrinsischen GEF-Aktivität durch die Aktivierung von Rho-GTPasen die Aktivität der $PLC\gamma_1$ reguliert und/oder Vav1 bei der Aktivierung der $PLC\gamma_1$ seine Funktion als Adapterprotein, unabhängig von der GEF-Aktivität, ausübt. Hierfür wurden verschiedene Mutanten von der onkogenen Variante Vav1^{AN} hergestellt, von denen gezeigt worden war, dass sie in ihrer GEF-Aktivität oder in ihrer Funktion als Adapterprotein beeinträchtigt sind. Vav1^{AN} wurde in dieser Arbeit verwendet, weil es durch eine Deletion der autoinhibitorischen CH- und AC-Domänen konstitutiv aktiv ist

und somit keiner exogen vermittelten Stimulation mehr bedarf (Abe et al. 1999). Die einzelnen Mutanten wurden auf Basis der Kristallstruktur des humanen Vav1/Rac1-Komplexes gewählt (Chrencik et al. 2008). Die Arbeitsgruppe um Jill E. Chrencik konnte verschiedene Interaktionsstellen von Vav1 mit Rac1 sowie intramolekulare Wechselwirkungen aufzeigen, die für die GEF-Aktivität von Vav1 von entscheidender Bedeutung sind (Chrencik et al. 2008). Zwei der Aminosäuren der DH-Domäne, die mit den *switch*-Regionen von Rac1 interagieren, sind Glutamin (Gln)-331 und Glutamat (Glu)-378, wobei Gln-331 mit *switch I* und Glu-378 mit *switch II* interagiert. In dieser Arbeit wurden diese beiden Aminosäuren in onkogenem Vav1 folglich durch Alanin ausgetauscht. Des Weiteren war gezeigt worden, dass die intramolekulare Interaktion zwischen der DH-Domäne von Vav1 mit der PH- und der Cystein-reichen Domäne (CRD) für die effiziente Interaktion des GEFs mit der *switch II*-Region von Rac und für das breite Substratspektrum des GEFs essentiell ist. Folglich führte der Austausch der Aminosäure Aspartat (Asp)-376 in der DH-Domäne, welche mit Threonin (Thr)-539 in der CRD und mit Lysin (Lys)-404 in der PH-Domäne interagiert, gegen Alanin zu einer GEF-defizienten Mutante (Chrencik et al. 2008). Diese Mutante von Vav1 wurde in dieser Arbeit ebenfalls hergestellt und ihr Einfluss auf die Aktivität der PLC γ_1 untersucht. Wie Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, wurde PLC γ_1 sowohl in COS-7- wie auch in HEK293-Zellen beträchtlich durch die onkogene Vav1-Variante Vav1^{AN} stimuliert (siehe Abbildungen 7, 8, 11, 12, 18). Überraschenderweise wiesen die beiden Mutanten Q331A und E378A in COS-7-Zellen keinen Unterschied zu wildtypischem Vav1^{AN} hinsichtlich der Stimulation der PLC γ_1 auf. Die Mutante D376A zeigte in COS-7-Zellen ebenfalls eine Stimulation der PLC γ_1 , die jedoch im Vergleich zu Vav1^{AN} und den anderen Vav1-Mutanten schwächer war. In HEK293-Zellen dagegen zeigte die D376A-Mutante nur eine sehr geringe Aktivität. Auch der Austausch von E378 gegen Alanin in der DH-Domäne führte in HEK293-Zellen zu einer Vav1-Mutante mit geringerer Aktivität. Die Mutante Q331A stimulierte dagegen PLC γ_1 ähnlich wie Vav1^{AN}. Die Vav1-Mutanten zeigten somit in verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Aktivitäten. Die Mutante D376A war hierbei am wenigsten aktiv. Die Unterschiede zwischen den Zelllinien könnten darauf zurückzuführen sein, dass COS-7- und HEK293-Zellen unterschiedliche Mengen an endogenen Rho-GTPasen besitzen und sich somit Unterschiede in der Aktivität der verschiedenen Vav1-Mutanten ergeben. In *pull-down*-Experimenten von Chrencik et al. (2008) wurde der Effekt der verschiedenen exogen exprimierten Vav1-Mutanten auf die Aktivierung von endogenem Rac1 in HEK293-Zellen gemessen. Während die Vav1^{M351T}-Variante DH-PH-CRD (AS 190-575)

zu einer deutlichen Aktivierung von Rac1 führte, konnte kein aktives Rac1 in Gegenwart der Vav1-Mutanten Q331A, D376A und E378A im *pull-down*-Versuch detektiert werden (Chrencik et al. 2008). In unseren Experimenten stimulierten jedoch die Vav1^{ΔN}-Mutanten Q331A und E378A die Aktivität der PLCγ₁, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß in COS-7- und HEK293-Zellen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die beiden Mutanten, welche in der Interaktion mit der *switch I*-Region (Q331A) bzw. mit der *switch II*-Region (E378A) von Rac1 beeinträchtigt sind, noch eine geringe GEF-Aktivität besitzen und diese restliche Aktivität für eine Stimulation der PLCγ₁ ausreichend ist. Die Mutante D376A dagegen ist aufgrund der fehlenden Interaktion zwischen DH-, PH- und CRD-Regionen sehr stark in der GEF-Aktivität beeinträchtigt und kann somit die PLCγ₁ nicht mehr in HEK293-Zellen oder nur noch sehr schwach in COS-7-Zellen aktivieren. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Chrencik et al. (2008), die ebenfalls eine fehlende GEF-Aktivität der Vav1-Mutante D376A zeigten. Als weiterer Punkt ist aufzuführen, dass Chrencik et al. (2008) die Effekte der verschiedenen Vav1-Mutanten nur auf die Aktivität von Rac1 untersucht haben und nicht auf die Aktivität anderer Rho-GTPasen wie z.B. RhoA oder Cdc42, die ebenfalls Substrate für Vav1 sind. Wir vermuten in diesem Zusammenhang, dass die PLCγ₁ nicht durch Rac1 aktiviert wird, da wir schon früher zeigen konnten, dass konstitutiv aktives Rac1^{G12V} selektiv zwar die Aktivität der PLCγ₂, nicht aber die des anderen Isoenzym, PLCγ₁, aktiviert (Piechulek et al. 2005). Zur Überprüfung der GEF-Aktivität der einzelnen Vav1^{ΔN} Mutanten und zum Vergleich der Ergebnisse, wurden in dieser Arbeit die Effekte der verschiedenen Vav1-Mutanten auch auf die Aktivität der PLCγ₂ untersucht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PLCγ₂ durch Vav1^{ΔN} stimuliert wird. Dies erfolgt vermutlich durch Aktivierung von endogenem Rac1, da Rac1 ubiquitär exprimiert wird und wir zeigen konnten, dass die PLCγ₂ spezifisch durch Rac-GTPasen wie Rac1 aktiviert wird (Piechulek et al. 2005). Der Befund, dass die Aktivität der PLCγ₂ durch Vav1 stimuliert wird, ist daher so interessant, weil sowohl PLCγ₂ als auch Vav1, Vav2 und Vav3 in B-Zellen exprimiert werden und in B-Zellrezeptor-vermittelten Signalwegen eine wichtige Rolle spielen. Denn es konnte gezeigt werden, dass Vav1-defiziente, Vav1/Vav2-defiziente und in besonderem Maße Vav1/Vav2/Vav3-defiziente B-Zellen Defekte in der Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺ zeigen, vor allem bei Stimulation des B-Zellrezeptors in Anwesenheit niedriger Konzentrationen von Anti-IgM (Fujikawa et al. 2003, Tedford et al. 2001). Dies deutet darauf hin, dass Vav-Proteine die Aktivität der PLCγ₂ beeinflussen, wobei die molekularen Mechanismen noch nicht genau verstanden sind. Vav3-defiziente DT40 B-Zellen zeigten

sowohl Defekte in der Aktivierung der PLC γ_2 wie auch eine verminderte Aktivierung von Rac1 nach Stimulation des B-Zellrezeptors (Inabe et al. 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass Vav3 und PLC γ_2 in DT40 B-Zellen gemeinsam zu Microsignalosomen rekrutiert werden und in synergistischer Weise das *spreading* von B-Zellen als Reaktion auf membrangebundene Antigene regulieren (Weber et al. 2008). In dieser Arbeit zeigt sich deutlich, dass die kleine GTPase Rac2 durch Vav1 $^{\Delta N}$ sowohl in COS-7-Zellen als auch in HEK293-Zellen aktiviert wird und folglich die Aktivität der PLC γ_2 stimulieren kann (siehe Abbildungen 9, 10, 15, 21). Die PLC γ_1 kann dagegen nicht durch aktiviertes Rac2 stimuliert werden (siehe Abbildungen 11, 12, 18). Dies korreliert mit unseren früheren Befunden, die zeigten, dass die PLC γ_2 Isoenzym-spezifisch durch konstitutiv aktives Rac2 stimuliert wird (Piechulek et al. 2005). Dem gegenüber zeigten alle drei Vav1 $^{\Delta N}$ -Mutanten Q331A, D376A und E378A Defekte in der Aktivierung von endogenen Rac-GTPasen und folglich eine stark verminderte Stimulation der Aktivität der PLC γ_2 in COS-7-Zellen, wobei die Mutante D376A keine GEF-Aktivität mehr zeigte und folglich die PLC γ_2 nicht mehr stimulieren konnte (siehe Abbildung 15, 21). Die anderen Mutanten zeigten noch eine Restaktivität, die jedoch im Vergleich zu onkogenem Vav1 $^{\Delta N}$ wesentlich geringer war. Interessanterweise konnte die Vav1-Mutante Q331A exogen exprimiertes Rac2 ähnlich wie wildtypisches Vav1 $^{\Delta N}$ aktivieren und führte folglich zu einer deutlichen Stimulation der PLC γ_2 . Die Mutante E378A bewirkte eine schwächere Stimulation von Rac2, während die Mutante D376A nicht mehr in der Lage war, Rac2 zu aktivieren. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Mutante Q331A mit der *switch I*-Region von Rac zwar in geringerem Ausmaß interagieren kann, was sich in einer geringeren Rho-GEF-Aktivität für endogenes Rac1 auswirkt, aber dennoch in COS-7-Zellen überexprimiertes Rac2 ausreichend aktivieren kann. Die Mutante D376A dagegen, die eine defekte Interaktion zwischen DH-, PH und CRD-Regionen aufweist, was für die Funktion der DH-Domäne essentiell ist, zeigte einen vollständigen Verlust der GEF-Aktivität und konnte somit selbst überexprimiertes Rac2 nicht aktivieren (siehe Abbildung 15, 21).

Überraschenderweise gab es Unterschiede in HEK293-Zellen. Eine Aktivierung der PLC γ_2 durch onkogenes Vav1 $^{\Delta N}$ und die Mutanten war kaum zu erkennen, da in diesen Zellen endogene Enzyme, wahrscheinlich endogen vorhandene PLC γ_1 , bereits stark durch Vav1 stimuliert wurden (siehe Abbildung 10, 18, 21). Auch hier zeigte sich, dass die Mutante D376A, die vollständig Rho-GEF-defizient ist, die endogen vorhandenen Enzyme nicht stimulieren konnte. Wie in COS-7-Zellen konnte auch in HEK293-Zellen Rac2 durch

Vav1^{ΔN} aktiviert werden und die Aktivität der PLC γ_2 stimulieren. Der markanteste Unterschied zwischen COS-7-Zellen und HEK293-Zellen zeigte sich aber bei der Vav1^{ΔN}-Mutante Q331A, die in HEK293-Zellen Rac2 nicht aktivieren konnte und somit die Aktivität der PLC γ_2 nicht zusätzlich stimulierte. In beiden Fällen wurden die Zellen mit der gleichen Menge an Rac2-DNA transfiziert. Dennoch ist es aber möglich, dass es Unterschiede zwischen den Zelllinien bezüglich der Expressionsstärke von Rac2 gibt und somit in HEK293-Zellen durch die verminderte GEF-Aktivität von Q331A und E378A weniger Rac2-Moleküle aktiviert werden, die nicht ausreichen, um die PLC γ_2 zu stimulieren. Möglich wäre auch, dass die PLC γ_2 in HEK293-Zellen weniger sensitiv gegenüber Rac2 ist und somit durch wenige aktive Rac2-Moleküle in Gegenwart der Vav1-Mutanten Q331A und E378A nicht stimuliert werden kann. Auffallend ist, dass die Effekte der Vav1-Mutanten Q331A und E378A auf die Aktivität der beiden PLC γ -Isoenzyme vor allem in COS-7-Zellen sehr unterschiedlich sind. Im Vergleich zu Vav1^{ΔN} führten Q331A und E378A zu einer deutlich reduzierten Stimulation der PLC γ_2 , während ihre Effekte auf die Aktivität der PLC γ_1 nicht unterschiedlich waren. Möglicherweise werden PLC γ_1 und PLC γ_2 durch unterschiedliche Rho-GTPasen stimuliert, die durch die Vav1-Mutanten mit restlicher GEF-Aktivität wie Q331A und E378A in unterschiedlichem Ausmaß aktiviert werden können. PLC γ_2 wird durch konstitutiv aktives Rac1 aktiviert, jedoch nicht durch Cdc42 und RhoA (Piechulek et al. 2005). Daher wird die Stimulation dieses Isoenzyms durch Vav1 wahrscheinlich über die Aktivierung von endogenem Rac1 in intakten Zellen vermittelt. Im Gegensatz zur PLC γ_2 wird die PLC γ_1 weder durch Rac1 noch durch Cdc42 und RhoA stimuliert (Piechulek et al. 2005). Somit ist für die Stimulation der PLC γ_1 wahrscheinlich eine andere Rho-GTPase notwendig. Es ist aber offensichtlich, dass die GEF-Aktivität von onkogenem Vav1 für die Stimulation der Aktivität beider PLC γ -Isoformen entscheidend ist, da die vollständig GEF-defiziente Mutante D376A keine oder nur eine schwache Aktivität zeigte (siehe Abbildungen 15, 18, 21). Welche Rho-GTPase die Aktivierung der PLC γ_1 letzten Endes vermittelt, muss in zukünftigen Experimenten noch geklärt werden. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass PLC γ_1 weder durch Rac1, Rac2, Rac3 noch durch Cdc42 und RhoA aktiviert wird (Piechulek et al. 2005).

Hong-Geller und Cerione konnten mittels Immunpräzipitationsexperimenten zwar eine physikalische Interaktion zwischen Cdc42 und PLC γ_1 in Lysaten von RBL-2H3-Mastzellen bestimmen, jedoch keine Cdc42-vermittelte Stimulation der PLC γ_1 *in vitro*

feststellen (Hong-Geller et al. 2000). In einer anderen Arbeit wurde ebenfalls mittels Immunpräzipitation eine Interaktion zwischen der PLC γ_1 und Rac1 gezeigt, welche dazu führt, dass die PLC γ_1 selbst mittels der SH3-Domäne als Guaninnukleotidaustauschfaktor spezifisch für Rac1 fungiert und somit nach Stimulation des EGF-Rezeptors in COS-7-Zellen eine Aktivierung von Rac1 bewirkt (Li et al. 2009). Auch in intestinalen Epithelzellen wurde eine physikalische Interaktion zwischen Rac1 und PLC γ_1 nachgewiesen und gezeigt, dass Rac1 den Einstrom von Ca²⁺ in diesen Zellen und die Zellmigration in Abhängigkeit von der PLC γ_1 reguliert (Rao et al. 2008). Des Weiteren wurde eine Leukotrien D₄-abhängige Interaktion zwischen aktivem RhoA und PLC γ_1 in intestinalen Epithelzellen gefunden (Thodeti et al. 2002). Eine direkte Aktivierung der PLC γ_1 durch Rac1 und RhoA wurde jedoch in diesen Versuchen nicht gezeigt. Um zu klären, über welche Rho-GTPase(n) Vav1 die Aktivität der PLC γ_1 stimulieren kann, haben wir RhoG in Experimenten verwendet, da bekannt ist, dass Vav1 auch als Austauschfaktor für RhoG fungiert (Rossman et al. 2005). RhoG wurde zwar durch Vav1^{ΔN} aktiviert und bewirkte eine Stimulation der PLC γ_2 , führte jedoch wie Rac2 zu keiner Stimulation der PLC γ_1 (Ergebnisse nicht dargestellt).

Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Arbeit war, dass die Vav1-vermittelte Aktivierung der PLC γ_1 wie die der PLC γ_2 unabhängig von der Adapterfunktion des GEFs sowohl in COS-7- wie auch in HEK293-Zellen erfolgt, da die Vav1^{ΔN}-Mutante T617 (189-616), der beide SH3-Domänen und die SH2-Domäne fehlen, die beiden PLC γ -Isoenzyme ähnlich wie wildtypisches Vav1^{ΔN} stimulieren konnte (siehe Abbildungen 12, 15, 18, 21). In diesen Zellen spielt also die Adapterfunktion von Vav1^{ΔN} bei der Aktivierung der PLC γ_1 keine Rolle. Es ist bekannt, dass SH2- und SH3-Domänen von Vav1 an zahlreichen Interaktionen mit anderen Proteinen beteiligt sind. So vermittelt die SH2-Domäne z. B. die Interaktion zwischen Vav1 und SLP-76, ZAP-70 und Syk, die N-terminale SH3-Domäne die Interaktion zwischen Vav1 und Grb2 und die C-terminale SH3-Domäne die Interaktion zwischen Vav1 und z.B. Nef, Zyxin und Dynamin-2 (Tybulewicz 2005). Diese C-terminalen SH2- und SH3-Domänen sind für die transformierende Aktivität von wildtypischem Vav1 in NIH3T3-Zellen essentiell (Zugaza et al. 2002). In T-Zellen sind diese Domänen von Vav1 für zahlreiche Funktionen des GEFs notwendig. Sie sind zum Beispiel für die Vav1-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT und für die Aktivierung von JNK in Jurkat T-Zellen notwendig (Zugaza et al. 2002). Über diese Domänen werden die GEF-unabhängigen Adapterfunktionen von Vav1 in T-Zellen

vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass eine GEF-defiziente Mutante von wildtypischem Vav1, L278Q, die T-Zellrezeptor-vermittelte Freisetzung von Ca^{2+} in Vav1-defizienten T-Zellen wiederherstellen konnte, was zeigt, dass Vav1 auch Funktionen unabhängig von der intrinsischen GEF-Aktivität in T-Zellen ausübt (Miletic et al. 2009). Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, dass in COS-7-Zellen und in HEK293-Zellen die Vav1-vermittelte Stimulation der $\text{PLC}\gamma_1$ von der intrinsischen GEF-Aktivität abhängig ist und nicht von der Adapterfunktion von onkogenem Vav1^{ΔN}.

Man muss aber bedenken, dass die Entfernung der C-terminalen SH3-SH2-SH3-Region sich unterschiedlich auf die Funktionen von wildtypischem Vav1 und onkogenem Vav1^{ΔN} auswirken und diese Region unterschiedliche Funktionen in lymphatischen Zellen und nicht-lymphatischen Zellen erfüllen könnte. Dies wurde im Detail von Zugaza et al. (2002) mittels verschiedener Mutanten von Vav1 untersucht. In Fibroblasten dient die SH3-SH2-SH3-Region hauptsächlich der effizienten Lokalisation von Vav1 in der Plasmamembran, in T-Zellen ist sie jedoch für die effiziente Interaktion mit anderen Proteinen von T-Zellrezeptorsignalwegen verantwortlich, was z.B. bei der Aktivierung von N-FAT und JNK notwendig ist (Zugaza et al. 2002). In all unseren Versuchen wurde eine konstitutiv aktive onkogene Vav1^{ΔN} (Δ1-188)-Mutante verwendet, welcher die auto-regulatorischen N-terminalen CH- und AC-Regionen fehlen und die somit unabhängig von Tyrosinphosphorylierungen aktiv ist und transformierendes Potential besitzt (Abe et al. 1999). Für N-terminal trunkierte Vav1-Mutanten wurde gezeigt, dass sie vorwiegend in der Membranfraktion zu finden sind, wohingegen wildtypisches Vav1 und eine C-terminal deletierte Mutante (Δ617-845) vorwiegend in der zytosolischen Fraktion detektiert wurden (Abe et al. 1999). In unserem Fall wurde die C-terminale SH3-SH2-SH3-Region in der onkogenen Vav1-Variante Vav1^{ΔN} (Δ1-188) deletiert und somit die Vav1-Mutante T617 erzeugt, die noch die DH-Domäne, die PH-Domäne, die Cystein-reiche-Domäne CRD, die Prolin-reiche Domäne und die Zinkfinger-Domäne besitzt (siehe Einleitung, Abbildung 3). Wie erwähnt, zeigte die Vav1-Mutante T617 keinen Unterschied zu Vav1^{ΔN} hinsichtlich der Stimulation von $\text{PLC}\gamma_1$ und $\text{PLC}\gamma_2$ in COS-7- und HEK-293-Zellen. Da sich das Substrat von PLC-Enzymen, PIP_2 , in der Plasmamembran befindet, müssen $\text{PLC}\gamma_1$ und $\text{PLC}\gamma_2$ vom Zytosol an die Membran translozieren, um das Substrat spalten zu können. Wir konnten zeigen, dass aktives Rac2 die $\text{PLC}\gamma_2$ aktiviert, unter anderem durch Translokation des Enzyms vom Zytosol an die Plasmamembran (Piechulek et al. 2005). Wahrscheinlich befindet sich die von uns verwendete onkogene Vav1-Mutante T617 noch in ausreichender Menge in der Plasmamembran und kann somit die beiden $\text{PLC}\gamma$ -Isoenzyme stimulieren.

Bezüglich der SH-Domänen wurde in einer Studie außerdem beobachtet, dass die SH3-SH2-SH3-Region für die Interaktion von Vav1 mit dem EGF-Rezeptor wichtig ist, woraufhin Vav1 phosphoryliert und aktiviert wird (Zugaza et al. 2002). In unserem Fall war jedoch eine Aktivierung von Vav1 durch den EGF-Rezeptor nicht notwendig, da wir onkogenes, konstitutiv aktives Vav1 verwendeten. Somit ist also die Integrität der C-terminalen Region von Vav1^{ΔN} für die Stimulation der PLC γ_1 nicht notwendig, was aber wahrscheinlich zelltyp-spezifisch ist, da diese Region in T-Zellen für die verschiedenen Funktionen von Vav1 wichtig ist.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Vav1 nicht nur am N-Terminus in der *acidic*-Domäne phosphoryliert wird, sondern auch carboxyterminal an vier spezifischen Tyrosinresten (Lazer et al. 2010, Lazer et al. 2011). Es stellte sich heraus, dass alle vier, darunter die Tyrosinreste Tyr-826 und Tyr-841 für das transformierende Potential von Vav1 in pankreatischen Karzinomzellen notwendig sind. Unter den SH2-tragenden Proteinen, welche mit diesen beiden Tyrosinresten interagieren, wurde auch die PLC γ_1 identifiziert, welche mit Tyr-841 interagiert. Interessanterweise verloren Vav1-Mutanten, bei welchen die C-terminalen Tyrosine gegen Phenylalanin ausgetauscht wurden, ihre GEF-Aktivität gegenüber Rac und konnten somit Rac-GTPasen in Panc1-Zellen nicht mehr aktivieren (Lazer et al. 2010, Lazer et al. 2011). In unserem Fall blieb die GEF-Aktivität gegenüber endogenen Rac-GTPasen und Rac2 in der C-terminal tranktierten Vav1^{ΔN}-Mutante T617 jedoch erhalten, was sich daran zeigte, dass sich die Mutante hinsichtlich der Stimulation von PLC γ_1 und PLC γ_2 nicht von Vav1^{ΔN} unterschied. Für die Aktivierung der PLC γ_1 durch onkogenes Vav1 war in unseren Experimenten Tyr-841 nicht notwendig, da dieser Tyrosinrest in der C-terminal tranktierten Vav1^{ΔN}-Mutante fehlt. Die Unterschiede zu den Befunden von Lazer et al. könnten darin liegen, dass wir eine onkogene Variante von Vav1 und die davon abgeleitete C-terminal tranktierte Mutante T617 verwendeten, Lazer et al. aber ihre Tyrosinmutanten in wildtypischem Vav1 erzeugten und/oder dass unterschiedliche Zelllinien verwendet wurden, in unserem Fall COS-7- und HEK293-Zellen und in den Experimenten von Lazer et al. (2010) Panc1 Pankreaskarzinomzellen.

In mehreren Veröffentlichungen wurde die große GTPase Dynamin als Interaktionspartner von Vav1 und PLC γ_1 identifiziert. Dynamin, das zum Beispiel die Rezeptor-vermittelte Endozytose, das Recycling von synaptischen Vesikeln und den Vesikeltransport zum und

vom Golgi-Apparat reguliert, interagiert hierbei mittels seiner Prolin-reichen Region mit der C-terminalen SH3-Domäne von Vav1 und mit der SH3-Domäne der PLC γ_1 (Seedorf et al. 1994, Okamoto et al. 1997, Hinshaw 2000, Gomez et al. 2005). Interessanterweise interagiert Dynamin-2 mit Vav1 in T-Zellen und Dynamin-2-supprimierte T-Zellen zeigten eine verminderte Tyrosinphosphorylierung von PLC γ_1 an Tyr-783 und eine verminderte Ca⁺⁺-Mobilisierung (Gomez et al. 2005). Die molekularen Mechanismen der funktionellen Beeinflussung von Vav1 und PLC γ_1 durch Dynamin-2 sind jedoch noch unbekannt. In unserem Fall scheint jedoch Dynamin an der Vav1-vermittelten Aktivierung der PLC γ_1 nicht beteiligt zu sein, da die von uns verwendete C-terminale Deletionsmutante T617, die aufgrund der fehlenden SH3-Domäne nicht mit Dynamin interagieren kann, keine Defekte bei der Aktivierung der PLC γ_1 zeigte. Neben der Dynamin-vermittelten Aktivierung von PLC γ_1 durch Vav1 konnten wir eine auch eine von Kuhne et al. (2000) beschriebene Adapterfunktion von Vav1 als Ursache der PLC γ_1 -Aktivierung ausschließen. In der Arbeit von Kuhne et al. konnte eine GEF-unabhängige Funktion von Vav1 gezeigt werden, welche jedoch nicht oder nicht vorrangig von den Adapterdomänen SH2 bzw. SH3 ausgeht, sondern von der N-terminal gelegenen CH-Domäne (Kuhne et al. 2000). Da das in dieser Arbeit verwendete Vav1-Protein N-terminal bis Stelle 188 trunziert ist, fehlen diesem GEF-Protein sowie den daraus abgeleiteten Mutanten sowohl die CH-Domäne als auch die AC-Region. Damit lässt sich im Hinblick auf die Aktivierung von PLC γ_1 durch Vav1 diese, durch Kuhne et al. beschriebene, GEF-unabhängige Vav1-Funktion ausschließen.

Aus den oben beschriebenen Versuchen ergeben sich somit neue Fragen, auch zu den genauen mechanistischen Details der PLC γ_1 -Aktivierung durch Vav1. Diese sollten in zukünftigen Experimenten weiter erforscht werden. Die Klärung dieser Fragen hätte nicht nur akademischen Wert, sondern könnte sich auch in der Medizin als äußerst nützlich erweisen. Wie bereits eingangserwähnt, konnten mehrere Arbeiten, wie auch die Publikation von Tybulewicz (2005) die besondere Bedeutung von Vav1 bei der Aktivierung von T-Zellen aufzeigen, da das Protein unter anderem beim Einstrom von Ca⁺⁺-Ionen bei der Aktivierung von TCRs maßgeblich beteiligt ist. In einer Zeit, in der die Unterdrückung des Immunsystems immer mehr an Bedeutung gewinnt, sei es nach Organtransplantationen oder bei diversen Autoimmunerkrankungen, wäre eine selektive und gezielte Beeinflussung von T-Zellen ein wertvolles therapeutisches Hilfsmittel. Hierfür könnten sich beispielsweise Inhibitoren eignen, welche spezifische Funktionen von

Vav1 in T-Zell-Signalwegen gezielt hemmen und somit auch die T-Zellfunktion herunter regulieren, die Funktionen von Vav1 in B-Zellen aber unbeeinflusst lassen. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit findet sich in der Therapie maligner Krebserkrankungen. So konnte beispielsweise in der 2009 publizierte Arbeit von Lazer et al. eine ektopische Expression von Vav1, welches normalerweise nur auf das hämatopoetische System beschränkt ist, in Bronchialkarzinomen nachgewiesen werden. Dabei konnte in 26 von 59 Zellproben, welche sowohl von Adenokarzinomen als auch Plattenepithelzellkarzinomen und bronchoalveolären Karzinomen entnommen wurden, eine Expression von Vav1 nachgewiesen werden. Ebenso konnte beobachtet werden, dass eine starke Expression von Vav1 mit einer vermehrten Tumorgroße einherging. Interessanterweise führte eine durch siRNA vermittelte Ausschaltung von Vav1 zu einer Hemmung der Zellproliferation, sowohl bei kultivierten wie auch bei in Nacktmäuse verpflanzten Tumorzellen (Lazer et al. 2009). Darüber hinaus konnte in der besagten Arbeit gezeigt werden, dass Vav1 durch die beiden autokrin wirkenden Wachstumsfaktoren EGF und TGF α phosphoryliert und dadurch aktiviert wird. Im Umkehrschluss konnte gezeigt werden, dass nach Depletion von Vav1 in diesen Zellen die Rac-GTP-Aktivität reduziert war, wie auch die Expression von TGF α (Lazer et al. 2009). Aus diesen Ergebnissen kann man eine Rolle von Vav1 in der Tumorgenese und Malignitätssteigerung bei einem nicht geringen Anteil von Bronchialkarzinomen vermuten. Ebenso kann man anhand dieser Daten einen zielgerichteten Therapieansatz ins Auge fassen. Gelänge es zum Beispiel, Hemmstoffe von Vav1, die die Interaktion der CRD mit der DH-Domäne unterbinden, in Vav1-positive Tumorzellen zu bringen, könnte man so das Tumorstadium möglicherweise verlangsamen, vielleicht sogar die Überlebenszeit der Patienten verbessern. Bedenkt man zusätzlich, dass Vav1 physiologisch auf das hämatopoetische System beschränkt ist (Lazer et al. 2009), wäre ein solcher Therapieansatz wahrscheinlich nebenwirkungsärmer als bisher angewandte, nicht zielgerichtete Chemotherapeutika. So würden in diesem Fall unter anderem die Schleimhautepithelzellen des gastrointestinalen Traktes geschont werden wodurch eine Hauptnebenwirkung der letzteren Therapeutika wegfallen würde.

5. Zusammenfassung

Der Ras-homolog-gene-family (Rho)-Guaninnukleotidaustauschfaktor Vav1 (Vav ist der 6. Buchstabe im hebräischen Alphabet und steht für das 6. Onkogen), welcher vorwiegend in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, spielt zusammen mit Vav2 und Vav3 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Funktion von T- und B-Zellen. In diesem Zusammenhang reguliert Vav1 die T-Zellrezeptor-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C- γ_1 (PLC γ_1) und die B-Zellrezeptor-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C- γ_2 (PLC γ_2). Vav1 ist somit ein wichtiges Element von Phospholipase C- γ (PLC γ)-vermittelten Signalwegen in Immunzellen. Die molekularen Mechanismen der Stimulation von PLC γ_1 und PLC γ_2 durch Vav1 in T- bzw. in B-Zellen sind noch wenig verstanden. Vav1 aktiviert hauptsächlich die Ras-related-C3-botulinum-toxin-substrate (Rac)-GTPase Rac1, aber auch Ras-related-C3-botulinum-toxin-substrate 2 (Rac2), Cell division control protein 42 homolog (Cdc42), Ras-homolog-gene-family A (RhoA) und Ras-homolog-gene-family G (RhoG). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die PLC γ_2 Isoenzym-spezifisch durch die Rac-GTPasen Rac1, Rac2 und Ras-related-C3-botulinum-toxin-substrate 3 (Rac3), jedoch nicht durch Cdc42 und RhoA aktiviert wird. Somit konnte die PLC γ_2 als neuer Effektor von Rac-GTPasen identifiziert werden. Die PLC γ_1 dagegen wird weder durch Rac-GTPasen noch durch Cdc42 und RhoA aktiviert. Überraschenderweise wird jedoch die Aktivität der PLC γ_1 in African-green-monkey-kidney-cells (COS-7-Zellen) und in Human-embryonic-kidney-293-cells (HEK293-Zellen) durch Vav1 stimuliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Frage nachgegangen, welche molekularen Mechanismen der Vav1-vermittelten Stimulation der PLC γ_1 zugrunde liegen. Da Vav1 im Gegensatz zu anderen Rho-Guaninnukleotidaustauschfaktoren C-terminal eine Src-Homologie-Domäne 2 (SH2-Domäne) und zwei Src-Homologie-Domänen 3 (SH3-Domänen) besitzt und somit ein hoch-komplexes, modular aufgebautes Molekül darstellt, kann es, wie in T-Zellen gezeigt, physiologische Funktionen einerseits durch seine intrinsische Guanine-nucleotide-exchange-factor (GEF)-Aktivität ausüben, aber andererseits auch durch zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen GEF-unabhängig als Adapterprotein fungieren. Um zu klären, welche der Funktionen von Vav1 für die Aktivierung der PLC γ_1 in intakten Zellen entscheidend ist, wurden basierend auf der

publizierten Kristallstruktur des Vav1/Rac1-Komplexes in dieser Arbeit verschiedene Mutanten der onkogenen Vav1-Variante Vav1^{ΔN} (Δ1-188) hergestellt. Hierbei wurden drei Punktmutationen, Q331A, D376A und E378A in die DH-Domäne von Vav1^{ΔN} eingefügt, welche die Interaktionen von Vav1 mit der *switch I*-Region von Rac1 (Q331A) bzw. mit der *switch II*-Region von Rac1 (E378A) oder die intramolekulare Interaktion der Dbl-homology (DH)-Domäne mit der Pleckstrin-homology (PH)-Domäne und der cysteine-rich (CR)-Domäne (D376A) stören und somit zu einer defekten GEF-Aktivität führen. Des Weiteren wurde die C-terminale Deletionsmutante T617 (189-616) generiert, welcher die multifunktionelle SH3-SH2-SH3-Region fehlt. Diese Vav1-Mutanten wurden gemeinsam mit PLCγ₁ oder PLCγ₂ in COS-7- oder in HEK293-Zellen exprimiert und die Aktivität der beiden PLCγ-Enzyme gemessen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Vav1-Mutanten Q331A, D376A und E378A Zelltyp-spezifisch unterschiedliche GEF-Aktivitäten gegenüber endogenen Rho-GTPasen und gegenüber überexprimiertem Rac2 zeigten und somit beide PLCγ-Enzyme unterschiedlich stark aktivierten. Durch Vav1^{ΔN} aktiviertes Rac2 konnte nur die PLCγ₂ aktivieren, jedoch nicht die PLCγ₁, was mit früheren Befunden korreliert, die gezeigt hatten, dass nur PLCγ₂ spezifisch durch aktives Rac2 stimuliert wird. Die Vav1-Mutante D376A war am geringsten aktiv und konnte somit die Aktivität der PLCγ₁ und PLCγ₂ in Abhängigkeit vom Zelltyp nicht oder nur sehr schwach stimulieren. Dies deutet darauf hin, dass für die Stimulation der Aktivität der PLCγ₁ in diesen Zellen die intrinsische GEF-Aktivität von Vav1^{ΔN} entscheidend ist. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse, dass für die Stimulation der PLCγ₁ durch onkogenes Vav1^{ΔN} in COS-7- und HEK293-Zellen die Adapterfunktion von Vav1 keine wesentliche Rolle spielt, da sich die Aktivität der C-terminal tranktierten Mutante T617 kaum von derjenigen von wildtypischem Vav1^{ΔN} unterschied. Ob die PLCγ₁-Aktivierung durch Vav1 letzten Endes durch eine direkte Interaktion der beiden Moleküle zustande kommt und/oder ob womöglich eine bislang noch nicht ermittelte Rho-GTPase dazwischen geschaltet ist, müssen zukünftige Versuche klären. Da wildtypisches Vav1 beim Menschen in verschiedenen Krebsarten überexprimiert identifiziert ist, zum Beispiel in Pankreas- oder Bronchialkarzinomen, und somit ein potentiell therapeutisches Zielprotein darstellt, ist die Aufklärung von Vav1-vermittelten Signalwegen in Zellen, die einerseits abhängig von der intrinsischen GEF-Aktivität und andererseits unabhängig von der GEF-Aktivität reguliert werden, wichtig in Bezug auf die Entwicklung von Inhibitoren mit spezifischer, zielgerichteter Wirkung auf Mitglieder der Vav-Familie.

6. Literaturverzeichnis

1. Abe K, Fuchs H, Boersma A, Hans W, Yu P, Kalaydjiev S, Klaften M, Adler T, Calzada-Wack J, Mossbrugger I, Rathkolb B, Rozman J, Prehn C, Maraslioglu M, Kametani Y, Shimada S, Adamski J, Busch D H, Esposito I, Klingenspor M, Wolf E, Wurst W, Gailus-Durner V, Katan M, Marschall S, Soewarto D, Wagner S, de Angelis M H: *A novel N-ethyl-N-nitrosourea-induced mutation in phospholipase C γ 2 causes inflammatory arthritis, metabolic defects, and male infertility in vitro in a murine model.* Arthritis Rheum 63: 1301 - 1311 (2011)
2. Abe K, Whitehead I P, O'Bryan J P, Der C J: *Involvement of NH(2)-terminal sequences in the negative regulation of Vav signaling and transforming activity.* J Biol Chem 274: 30410 - 30418 (1999)
3. Aittaleb M, Boguth C A, Tesmer J J: *Structure and function of heterotrimeric G protein-regulated Rho guanine nucleotide exchange factors.* Mol Pharmacol 77: 111 - 125 (2010)
4. Bertagnolo V, Brugnoli F, Grassilli S, Nika E, Capitani S: *Vav1 in differentiation of tumoral promyelocytes.* Cell Signal 24: 612 - 620 (2012)
5. Bertagnolo V, Nika E, Brugnoli F, Bonora M, Grassilli S, Pinton P, Capitani S: *Vav1 is a crucial molecule in monocytic/macrophagic differentiation of myeloid leukemia-derived cells.* Cell Tissue Res 345: 163 - 175 (2011)
6. Billadeau D D, Mackie S M, Schoon R A, Leibson P J: *Specific subdomains of Vav differentially affect T cell and NK cell activation.* J Immunol 164: 3971 - 3981 (2000)
7. Birnbaumer L: *The discovery of signal transduction by G proteins: a personal account and an overview of the initial findings and contributions that led to our present understanding.* Biochim Biophys Acta 1768: 756 - 771 (2007)
8. Bishop A L, Hall A: *Rho GTPases and their effector proteins.* Biochem J 2: 241 - 255 (2000)
9. Bonnefoy-Bérard N, Munshi A, Yron I, Wu S, Collins T L, Deckert M, Shalom-Barak T, Giampa L, Herbert E, Hernandez J, Meller N, Couture C, Altman A: *Vav: function and regulation in hematopoietic cell signaling.* Stem Cells 14: 250 - 268 (1996)
10. Buchsbaum R J: *Rho activation at a glance.* J Cell Sci 120: 1149 - 1152 (2007)

11. Bueno C, Lemke C D, Criado G, Baroja M L, Ferguson S S, Rahman A K, Tsoukas C D, McCormick J K, Madrenas J: *Bacterial superantigens bypass Lck-dependent T cell receptor signaling by activating a G α 11-dependent, PLC- β -mediated pathway*. Immunity 125: 67 - 78 (2006)
12. Bunney T D, Opaleye O, Roe S M, Vatter P, Baxendale R W, Walliser C, Everett K L, Josephs M B, Christow C, Rodrigues-Lima F, Gierschik P, Pearl L H, Katan M: *Structural insights into formation of an active signaling complex between Rac and phospholipase C gamma 2*. Mol Cell 34: 223 - 233 (2009)
13. Burgis E: *Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pharmakologie*. Elsevier 4: 50 - 57, 253, 570 - 571 (2008)
14. Bustelo X R, Sauzeau V, Berenjeno I M: *GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo*. Bioessays 29: 356-370 (2007)
15. Bustelo X R: *Regulatory and signaling properties of the Vav family*. Mol Cell Biol 20: 1461 - 1477 (2000)
16. Bustelo X R: *Vav proteins, adaptors and cell signaling*. Oncogene 20: 6372 - 6381 (2001)
17. Cabrera-Vera T M, Vanhauwe J, Thomas T O, Medkova M, Preininger A, Mazzoni M R, Hamm H E: *Insights into G protein structure, function, and regulation*. Endocr Rev 24: 765 - 781 (2003)
18. Caraveo G, van Rossum D B, Patterson R L, Snyder S H, Desiderio S: *Action of TFII-I outside the nucleus as an inhibitor of agonist-induced calcium entry*. Science 314: 122 - 125 (2006)
19. Chesarone M A, DuPage A G, Goode B L: *Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons*. Nat Rev Mol Cell Biol 11: 62 - 74 (2010)
20. Choi J H, Park J B, Bae S S, Yun S, Kim H S, Hong W P, Kim I S, Kim J H, Han M Y, Ryu S H, Patterson R L, Snyder S H, Suh P G: *Phospholipase C- γ 1 is a guanine nucleotide exchange factor for dynamin-1 and enhances dynamin-1-dependent epidermal growth factor receptor endocytosis*. J of Cell Sci 117: 3785 - 3795 (2004)
21. Chrencik J E, Brooun A, Zhang H, Mathews I I, Hura G L, Foster S A, Perry J J, Streiff M, Ramage P, Widmer H, Bokoch G M, Tainer J A, Weckbecker G, Kuhn P: *Structural basis of guanine nucleotide exchange mediated by the T-cell essential Vav1*. J Mol Biol 380: 828 - 843 (2008)

22. Cockcroft S: *The latest phospholipase C, PLC β , is implicated in neuronal function.* Trends Biochem. Sci 31: 4 - 7 (2006)
23. Costello P S, Walters A E, Mee P J, Turner M, Reynolds L F, Prisco A, Sarner N, Zamoyska R, Tybulewicz V L: *The Rho-family GTP exchange factor Vav is a critical transducer of T cell receptor signals to the calcium, ERK, and NF- κ B pathways.* Proc Natl Acad Sci USA 96: 3035 - 3040 (1999)
24. Crespo P, Schuebel K E, Ostrom A A, Gutkind J S, Bustelo X R: *Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product.* Nature 385: 169 - 172 (1997)
25. Croker B A, Tarlinton D M, Cluse L A, Tuxen A J, Light A, Yang F C, Williams D A, Roberts A W: *The Rac2 guanosine triphosphatase regulates B lymphocyte antigen receptor responses and chemotaxis and is required for establishment of B-1a and marginal zone B lymphocytes.* J Immunol 168: 3376 - 3386 (2002)
26. Cruz-Orcutt N, Houtman J C: *PI3 kinase function is vital for the function but not formation of LAT-mediated signaling complexes.* Mol Immunol 46: 2274 - 2283 (2009)
27. DeWard A D, Leali K, West R A, Prendergast G C, Alberts A S: *Loss of RhoB expression enhances the myelodysplastic phenotype of mammalian diaphanous-related Formin mDia1 knockout mice.* PLoS One 4: 7102 - 7108 (2009)
28. Elvers M, Pozgaj R, Pleines I, May F, Kuijpers MJ, Heemskerk J M, Yu P, Nieswandt B: *Platelet hyperreactivity and a prothrombotic phenotype in mice with a gain-of-function mutation in phospholipase C γ 2.* J Thromb Haemost 8: 1353 - 1363 (2010)
29. Etienne-Manneville S, Hall A: *Rho GTPases in cell biology.* Nature 420: 629 - 635 (2002)
30. Everett K L, Bunney T D, Yoon Y, Rodrigues-Lima F, Harris R, Driscoll P C, Abe K, Fuchs H, de Angelis M H, Yu P, Cho W, Katan M: *Characterization of phospholipase C γ enzymes with gain-of-function mutations.* J Biol Chem 284: 23083 - 23093 (2009)
31. Farber D L: *Biochemical signaling pathways for memory T cell recall.* Semin Immunol 21: 84 - 91 (2009)
32. Fernandez-Zapico M E, Gonzalez-Paz N C, Weiss E, Savoy D N, Molina J R, Fonseca R, Smyrk T C, Chari S T, Urrutia R, Billadeau D D: *Ectopic expression of*

- Vav1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis. Cancer Cell* 7: 39 - 49 (2005)
33. Fu C, Turck C W, Kurosaki T, Chan A C: *BLNK: a central linker protein in B cell activation. Immunity* 9: 93 - 103 (1998)
 34. Fujikawa K, Miletic A V, Alt F W, Faccio R, Brown T, Hoog J, Fredericks J, Nishi S, Mildiner S, Moores S L, Brugge J, Rosen F S, Swat W: *Vav1/2/3-null mice define an essential role for Vav family proteins in lymphocyte development and activation, but a differential requirement in MAPK signaling in T and B cells. J Exp Med* 198: 1595 - 1608 (2003)
 35. Geraldes P, King G L: *Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. Circ Res* 106: 1319 - 1331 (2010)
 36. Gether U, Kobilka B K: *G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. J Biol Chem* 273: 17979 - 17982 (1998)
 37. Gimona M, Djinovic-Carugo K, Kranewitter W J, Winder S J: *Functional plasticity of CH domains. FEBS Lett* 513: 98 - 106 (2002)
 38. Gintzler A R, Chakrabarti S: *Chronic morphine-induced plasticity among signalling molecules. Novartis Found Symp* 261: 167 - 176 (2004)
 39. Gluzman Y : "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants". *Cell* 23: 175–182 (1981)
 40. Gomez T S, Hamann M J, McCarney S, Savoy D N, Lubking C M, Heldebrant M P, Labno C M, McKean D J, McNiven M A, Burkhardt J K, Billadeau D D: *Dynamin 2 regulates T cell activation by controlling actin polymerization at the immunological synapse. Nat Immunol* 6: 261 - 270 (2005)
 41. Gotthardt K, Ahmadian M R: *Asef is a Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor. Biol Chem* 388: 67 - 71 (2007)
 42. Gu J L, Müller S, Mancino V, Offermanns S, Simon M I: *Interaction of Gα₁₂ with Gα₁₃ and Gα_q signaling pathways. Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9352 - 9357 (2002)
 43. Harden T K, Sondek J. *Regulation of phospholipase C isozymes by Ras superfamily GTPases. Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 355 - 379 (2006)
 44. Hart M J, Jiang X, Kozasa T, Roscoe W, Singer W D, Gilman A G, Sternweis P C, Bollag G: *Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Gα₁₃. Science* 280: 2112 - 2114 (1998)

45. Hikida M, Casola S, Takahashi N, Kaji T, Takemori T, Rajewsky K, Kurosaki T: *PLC- γ 2 is essential for formation and maintenance of memory B cells*. J Exp Med 206: 681 - 689 (2009)
46. Hill S J: *G-protein-coupled receptors: past, present and future*. Br J Pharmacol 1: 27 - 37 (2006)
47. Hinshaw J E: *Dynamin and its role in membrane fission*. Annu Rev Cell Dev Biol 16: 483 - 519 (2000)
48. Hong-Geller E, Cerione R A: *Cdc42 and Rac stimulate exocytosis of secretory granules by activating the IP₃/calcium pathway in RBL-2H3 mast cells*. J Cell Biol 148: 481 - 494 (2000)
49. Hornstein I, Pikarsky E, Groysman M, Amir G, Peylan-Ramu N, Katzav S: *The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is expressed in a subset of human neuroblastomas*. J Pathol 199: 526 - 533 (2003)
50. Horton RM, Pease LR: *Recombination and mutagenesis of DNA sequences using PCR*. In: McPherson MJ : *Directed mutagenesis: A practical approach*. Oxford University Press England 18: 217 - 247 (1991)
51. Hoyer D, Clarke D E, Fozard J R, Hartig P R, Martin G R, Mylecharane E J, Saxena P R, Humphrey P P: *International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin)*. Pharmacol Rev 46: 157 - 203 (1994)
52. Hwang J I, Oh Y S, Shin K J, Kim H, Ryu S H, Suh P G: *Molecular cloning and characterization of a novel phospholipase C, PLC- η* . Biochem J 389: 181 - 186 (2005)
53. Illenberger D, Walliser C, Nurnberg B, Diaz Lorente M, Gierschik P: *Specificity and structural requirements of phospholipase C- β stimulation by Rho GTPases versus G protein $\beta\gamma$ dimers*. J Biol Chem 278: 3006 - 3014 (2003)
54. Inabe K, Ishiai M, Scharenberg A M, Freshney N, Downward J, Kurosaki T: *Vav3 modulates B cell receptor responses by regulating phosphoinositide 3-kinase activation*. J Exp Med 195: 189 - 200 (2002)
55. Ishiai M, Sugawara H, Kurosaki M, Kurosaki T: *Association of phospholipase C- γ 2 Src homology 2 domains with BLNK is critical for B cell antigen receptor signaling*. J Immunol 163: 1746 - 1749 (1999)
56. Jaffe A B, Hall A: *Rho GTPases: biochemistry and biology*. Annu Rev Cell Dev Biol 21: 247 - 269 (2005)

57. Janmey P A: *Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly*. Annu Rev Physiol 56: 169 - 191 (1994)
58. Jezyk M R, Snyder J T, Gershberg S, Worthylake D K, Harden T K, Sondek J: *Crystal structure of Rac1 bound to its effector phospholipase C- β 2*. Nat Struct Mol Biol 13: 1135 - 1140 (2006)
59. Jiang H, Wu D, Simon M I: *The transforming activity of activated Gal2*. FEBS Lett 330: 319 - 322 (1993)
60. Jin T G, Satoh T, Liao Y, Song C, Gao X, Kariya K, Hu C D, Kataoka T: *Role of the CDC25 homology domain of phospholipase C ϵ in amplification of Rap1-dependent signaling*. J Biol Chem 276: 30301 - 30307 (2001)
61. Katan M: *New insights into the families of PLC enzymes: looking back and going forward*. Biochem J 391: 7 - 9 (2005)
62. Katzav S, Martin-Zanca D, Barbacid M: *Vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells*. EMBO J 8: 2283 - 2290 (1989)
63. Katzav S: *Flesh and blood: the story of Vav1, a gene that signals in hematopoietic cells but can be transforming in human malignancies*. Cancer Lett 255: 241 - 254 (2007)
64. Knezevic N, Tauseef M, Thennes T, Mehta D: *The G protein subunit $\beta\gamma$ mediates reannealing of adherens junctions to reverse endothelial permeability increase by thrombin*. J Exp Med 206: 2761 - 2777 (2009)
65. Koch C A, Anderson D, Moran M F, Ellis C, Pawson T: *SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins*. Science 252: 668 - 674 (1991)
66. Kouchi Z, Shikano T, Nakamura Y, Shirakawa H, Fukami K, Miyazaki S: *The role of EF-hand domains and C2 domain in regulation of enzymatic activity of phospholipase C ζ* . J Biol Chem 280: 21015 - 21021 (2005)
67. Kuhne M, Ku G, Weiss A: *A guanine nucleotide exchange factor-independent function of Vav1 in transcriptional activation*. J Biol Chem 275: 2185 - 2190 (2000)
68. Kurosaki T, Hikida M: *Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes*. Immunol Rev 228: 132 - 148 (2009)

69. Kurosaki T, Okada T: *Regulation of phospholipase C- γ_2 and phosphoinositide 3-kinase pathways by adaptor proteins in B lymphocytes*. Int Rev Immunol 20: 697 - 711 (2001)
70. Kurosaki T: *Regulation of BCR signaling*. Mol Immunol 48: 1287 - 1291 (2011)
71. Laemmli U K: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227: 680 - 685 (1970)
72. Lazer G, Idelchuk Y, Schapira V, Pikarsky E, Katzav S: *The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is aberrantly expressed in lung cancer and plays a role in tumorigenesis*. J Pathol 219: 25 - 34 (2009)
73. Lazer G, Katzav S: *Guanine nucleotide exchange factors for RhoGTPases: good therapeutic targets for cancer therapy?* Cell Signal 23: 969 - 979 (2011)
74. Lazer G, Pe'er L, Farago M, Machida K, Mayer B J, Katzav S: *Tyrosine residues at the carboxyl terminus of Vav1 play an important role in regulation of its biological activity*. J Biol Chem 285: 23075 - 23085 (2010)
75. Li B, Yu H, Zheng W, Voll R, Na S, Roberts A W, Williams D A, Davis R J, Ghosh S, Flavell R A: *Role of the guanosine triphosphatase Rac2 in T helper 1 cell differentiation*. Science 288: 2219 - 2222 (2000)
76. Li S, Wang Q, Wang Y, Chen X, Wang Z: *PLC- $\gamma 1$ and Rac1 coregulate EGF-induced cytoskeleton remodeling and cell migration*. Mol Endocrinol 23: 901 - 913 (2009)
77. Liao W, Lin J X, Leonard W J: *IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation*. Curr Opin Immunol 23: 598 - 604 (2011)
78. Lin Q, Fuji R N, Yang W, Cerione R A: *RhoGDI is required for Cdc42-mediated cellular transformation*. Curr Biol 13: 1469 - 1479 (2003)
79. Marinissen M J, Gutkind J S: *G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms*. Trends Pharmacol Sci 22: 368 - 376 (2001)
80. Miletic A V, Graham D B, Sakata-Sogawa K, Hiroshima M, Hamann M J, Cemurski S, Kloeppel T, Billadeau D D, Kanagawa O, Tokunaga M, Swat W: *Vav links the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton and T cell activation independently of intrinsic guanine nucleotide exchange activity*. PLoS One 4: 6599 - 6602 (2009)

81. Miyamoto Y, Yamauchi J, Itoh H: *Src kinase regulates the activation of a novel FGD-1-related Cdc42 guanine nucleotide exchange factor in the signaling pathway from the endothelin A receptor to JNK*. J Biol Chem 278: 29890 - 29900 (2003)
82. Mizuno N, Itoh H: *Functions and Regulatory Mechanisms of Gq-Signaling Pathways*. Neurosignals 17: 42 - 54 (2009)
83. Mohammadi M, Dionne C A, Li W, Li N, Spivak T, Honegger A M, Jaye M, Schlessinger J: *Point mutation in FGF receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting mitogenesis*. Nature 358: 681 - 684 (1992)
84. Montminy M R, Gonzalez G A, Yamamoto K K: *Regulation of cAMP-inducible genes by CREB*. Trends Neurosci 13: 184 - 188 (1990)
85. Movilla N, Bustelo X R: *Biological and regulatory properties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins*. Mol Cell Biol 19:7870 - 7885 (1999)
86. Müller-Tidow C, Krug U, Brunnberg U, Berdel W E, Serve H: *Tyrosinkinase als Ziele neuer onkologischer Therapien: Aussichten und Probleme*. Dt Ärzteblatt 104: 1312 - 1319 (2007)
87. Nguyen Tle X, Ahn J Y: *Lipase inactive mutant of PLC- γ 1 regulates NGF-induced neurite outgrowth via enzymatic activity and regulation of cell cycle regulatory proteins*. J Biochem Mol Biol 40: 888 - 894 (2007)
88. Nishida M, Sugimoto K, Hara Y, Mori E, Morii T, Kurosaki T, Mori Y: *Amplification of receptor signalling by Ca^{2+} entry-mediated translocation and activation of PLC γ 2 in B lymphocytes*. EMBO J 22: 4677 - 4688 (2003)
89. Nishida M, Watanabe K, Nakaya M, Kurose H: *Mechanism of cardiac hypertrophy via diacylglycerol-sensitive TRPC channel*. Yakugaku Zasshi 130: 295 - 302 (2010)
90. Nishida M: *Roles of heterotrimeric GTP-binding proteins in the progression of heart failure*. J Pharmacol Sci 117: 1 - 5 (2011)
91. Noh D Y, Kang H S, Kim Y C, Youn Y K, Oh S K, Choe K J, Park I A, Ryu S H, Suh P G: *Expression of phospholipase C- γ 1 and its transcriptional regulators in breast cancer tissues*. Anticancer Res 18: 2643 - 2648 (1998)
92. Obermeier A, Bradshaw R A, Seedorf K, Choidas A, Schlessinger J, Ullrich A: *Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC gamma*. EMBO J 13: 1585 - 1590 (1994)
93. Obermeier A, Tinhofer I, Grunicke H H, Ullrich A: *Transforming potentials of epidermal growth factor and nerve growth factor receptors inversely correlate with*

- their phospholipase C gamma affinity and signal activation*. EMBO J 15: 73 - 82 (1996)
94. Offermanns S, Simon M I: *Gα₁₅ and Gα₁₆ couple a wide variety of receptors to phospholipase C*. J Biol Chem 270: 15175 - 15180 (1995)
 95. Okamoto P M, Herskovits J S, Vallee R B: *Role of the basic, proline-rich region of dynamin in Src homology 3 domain binding and endocytosis*. J Biol Chem 272: 11629 - 11635 (1997)
 96. Ombrello M J, Remmers E F, Sun G, Freeman A F, Datta S, Torabi-Parizi P, Subramanian N, Bunney T D, Baxendale R W, Martins M S, Romberg N, Komarow H, Aksentijevich I, Kim H S, Ho J, Cruse G, Jung M Y, Gilfillan A M, Metcalfe D D, Nelson C, O'Brien M, Wisch L, Stone K, Douek D C, Gandhi C, Wanderer A A, Lee H, Nelson S F, Shianna K V, Cirulli E T, Goldstein D B, Long E O, Moir S, Meffre E, Holland S M, Kastner D L, Katan M, Hoffman H M, Milner J D: *Cold urticaria, immunodeficiency, and autoimmunity related to PLCG2 deletions*. N Engl J Med 366: 330 - 338 (2012)
 97. Osawa M, Yokogawa M, Muramatsu T, Kimura T, Mase Y, Shimada I: *Evidence for the direct interaction of spermine with the inwardly rectifying potassium channel*. J Biol Chem 284: 26117 - 26126 (2009)
 98. Padrick S B, Rosen M K: *Physical mechanisms of signal integration by WASP family proteins*. Annu Rev Biochem 79: 707 - 735 (2010)
 99. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke C A, Motoshima H, Fox B A, Le Trong I, Teller D C, Okada T, Stenkamp R E, Yamamoto M, Miyano M: *Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor*. Science 289: 739 - 745 (2000)
 100. Park J G, Lee Y H, Kim S S, Park K J, Noh D Y, Ryu S H, Suh P G: *Overexpression of phospholipase C-γ1 in familial adenomatous polyposis*. Cancer Res 54: 2240 - 2244 (1994)
 101. Piechulek T, Rehlen T, Walliser C, Vatter P, Moepps B, Gierschik P: *Isozyme-specific stimulation of phospholipase C-γ₂ by Rac GTPases*. J Biol Chem 280: 38923 - 38931 (2005)
 102. Putney J W: *Capacitative calcium entry: from concept to molecules*. Immunol Rev 231: 10 - 22 (2009)
 103. Rao J N, Liu S V, Zou T, Liu L, Xiao L, Zhang X, Bellavance E, Yuan J X, Wang J Y: *Rac1 promotes intestinal epithelial restitution by increasing Ca²⁺ influx through*

- interaction with phospholipase C- γ 1 after wounding*. Am J Physiol Cell Physiol 295: 1499 - 1509 (2008)
104. Rasmussen S G, Choi H J, Fung J J, Pardon E, Casarosa P, Chae P S, Devree B T, Rosenbaum D M, Thian F S, Kobilka T S, Schnapp A, Konetzki I, Sunahara R K, Gellman S H, Pautsch A, Steyaert J, Weis W I, Kobilka B K: *Structure of a nanobody-stabilized active state of the β_2 adrenoceptor*. Nature 469: 175 - 180 (2011)
 105. Readinger J A, Mueller K L, Venegas A M, Horai R, Schwartzberg P L: *Tec kinases regulate T-lymphocyte development and function: new insights into the roles of Itk and Rlk/Txk*. Immunol Rev 228: 93 - 114 (2009)
 106. Rebecchi M J, Pentylala S N: *Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C*. Physiol Rev 80: 1291 - 1335 (2000)
 107. Reynolds L F, de Bettignies C, Norton T, Beeser A, Chernoff J, Tybulewicz V L: *Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of the Ras/ERK pathway via LAT, Sos, and RasGRP1*. J Biol Chem 279: 18239 - 18246 (2004)
 108. Reynolds L F, Smyth L A, Norton T, Freshney N, Downward T, Kioussis D, Tybulewicz V: *Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of Phospholipase C- γ 1 via Phosphoinositide3-Kinase-dependent and -independent pathways*. J Exp Med 195: 1103 - 1114 (2002)
 109. Rhee S G, Bae Y S: *Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes*. J Biol Chem 272: 15045 - 15048 (1997)
 110. Rhee S G: *Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C*. Annu Rev Biochem 70: 281 - 312 (2001)
 111. Ritter S L, Hall R A: *Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins*. Nat Rev Mol Cell Biol 10: 819 - 830 (2009)
 112. Robinson Dan R, Yi-Mi W, Su-Fang L: *The protein tyrosine kinase family of the human genome*. Oncogene 5548 - 5557 (2000)
 113. Rossman K L, Der C J, Sondek J: *GEF means go: turning on Rho GTPases with guanine nucleotide-exchange factors*. Nat Rev Mol Cell Biol 6: 167 - 180 (2005)
 114. Sanchez-Aguilera A, Lee Y J, Lo Celso C, Ferraro F, Brumme K, Mondal S, Kim C, Dorrance A, Luo H R, Scadden D T, Williams D A: *Guanine nucleotide exchange factor Vav1 regulates perivascular homing and bone marrow retention of hematopoietic stem and progenitor cells*. Proc Natl Acad Sci USA 108: 9607 - 9612 (2011)

115. Sato Y, Suzuki S, Kitabatake M, Hara T, Kojima M: *Generation of TrkA/TrkB chimeric receptor constructs reveals molecular mechanisms underlying BDNF-induced dendritic outgrowth in hippocampal neurons*. Cell Mol Neurobiol 31: 605 - 614 (2011)
116. Satterthwaite A B, Li Z, Witte O N: *Btk function in B cell development and response*. Semin Immunol 10: 309 - 316 (1998)
117. Scheffzek K, Ahmadian M R, Kabsch W, Wiesmüller L, Lautwein A, Schmitz F, Wittinghofer A: *The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants*. Science 277: 333 - 338 (1997)
118. Scheffzek K, Stephan I, Jensen O N, Illenberger D, Gierschik P: *The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI*. Nat Struct Biol 7: 122 - 126 (2000)
119. Schlessinger J: *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell 103: 211 - 225 (2000)
120. Schmidt A, Hall A: *Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch*. Genes Dev 16: 1587 - 1609 (2002)
121. Schuebel K E, Bustelo X R, Nielsen D A, Song B J, Barbacid M, Goldman D, Lee I J: *Isolation and characterization of murine Vav2, a member of the Vav family of proto-oncogenes*. Oncogene 13: 363 - 371 (1996)
122. Schuebel K E, Movilla N, Rosa J L, Bustelo X R: *Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2*. EMBO J 17: 6608 - 6621 (1998)
123. Seedorf K, Kostka G, Lammers R, Bashkin P, Daly R, Burgess W H, van der Bliek A M, Schlessinger J, Ullrich A: *Dynamin binds to SH3 domains of phospholipase C γ and GRB-2*. J Biol Chem 269: 16009 - 16014 (1994)
124. Sergio R, Eugenio S, Bustelo X R: *The use of knockout mice reveals a synergistic role of the Vav1 and Rasgrf2 gene deficiencies in lymphomagenesis and metastasis*. PLoS One 4: 8229 - 8240 (2009)
125. Shirane M, Sawa H, Kobayashi Y, Nakano T, Kitajima K, Shinkai Y, Nagashima K, Negishi I: *Deficiency of phospholipase C- γ 1 impairs renal development and hematopoiesis*. Development 128: 5173 - 5180 (2001)
126. Sieghart W: *Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes*. Pharmacol Rev 47: 181 - 234 (1995)

127. Smith M R, Ryu S H, Suh P G, Rhee S G, Kung H F: *S-phase induction and transformation of quiescent NIH 3T3 cells by microinjection of phospholipase C*. Proc Natl Acad Sci USA 86: 3659 - 3663 (1989)
128. Song K D, Hwang S, Yun C H: *T cell receptor signaling that regulates the development of intrathymic natural regulatory T cells*. Immune Netw 11: 336 - 341 (2011)
129. Stallaert W, Dorn J F, van der Westhuizen E, Audet M, Bouvier M: *Impedance responses reveal β_2 -Adrenergic receptor signaling pluridimensionality and allow classification of ligands with distinct signaling profiles*. PLoS One 7: 29420 - 29444 (2012)
130. Suh P G, Park J I, Manzoli L, Cocco L, Peak J C, Katan M, Fukami K, Kataoka T, Yun S, Ryu S H: *Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes*. BMB Rep 41: 415 - 434 (2008)
131. Suzuki N, Hajicek N, Kozasa T: *Regulation and physiological functions of G12/13-mediated signaling pathways*. Neurosignals 17: 55 - 70 (2009)
132. Szczepanowska J: *Involvement of Rac/Cdc42/PAK pathway in cytoskeletal rearrangements*. Acta Biochim Pol 56: 225 - 234 (2009)
133. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T: *Small GTP-binding proteins*. Physiol Rev 81: 153 - 208 (2001)
134. Tedford K, Nitschke L, Girkontaite I, Charlesworth A, Chan G, Sakik V, Barbacid M, Fischer K D: *Compensation between Vav-1 and Vav-2 in B cell development and antigen receptor signaling*. Nat Immunol 2: 548 - 555 (2001)
135. Teramoto H, Salem P, Robbins K C, Bustelo X R, Gutkind J S: *Tyrosine phosphorylation of the vav Proto-oncogene product links Fc ϵ RI to the Rac1-JNK Pathway*. J Biol Chem 272: 10751 - 10755 (1997)
136. Thodeti C K, Massoumi R, Bindslev L, Sjölander A: *Leukotriene D4 induces association of active RhoA with phospholipase C- γ 1 in intestinal epithelial cells*. Biochem J 365: 157 - 163 (2002)
137. Tsygankov A Y: *Non-receptor protein tyrosin kinases*. Front Biosci 8: 595 - 635 (2003)
138. Tybulewicz V L, Ardouin L, Prisco A, Reynolds L F: *Vav1: a key signal transducer downstream of the TCR*. Immunol Rev 192: 42 - 52 (2003)
139. Tybulewicz V L, Henderson R B: *Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes*. Nat Rev Immunol 9: 630 - 644 (2009)

140. Tybulewicz V: *Vav-family proteins in T-cell signalling*. Curr Opin Immunol 17: 267 - 274 (2005)
141. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C: *Rho GTPases and signaling networks*. Genes Dev 11: 2295 - 2322 (1997)
142. Van Rossum D B, Patterson R L, Sharma S, Barrow R K, Kornberg M, Gill D L, Snyder S H: *Phospholipase $C\gamma 1$ controls surface expression of TRPC3 through an intermolecular PH domain*. Nature 434: 99 - 104 (2005)
143. Vega F M, Ridley A J: *Rho GTPases in cancer cell biology*. FEBS Lett 582: 2093 - 2101 (2008)
144. Verkaar F, van Rosmalen J W, Blumenröhr M, van Koppen C J, Blankesteyn W M, Smits J F, Zaman G J: *G protein-independent cell-based assays for drug discovery on seven-transmembrane receptors*. Biotechnol Annu Rev 14: 253 - 274 (2008)
145. Walliser C, Retlich M, Harris R, Everett K L, Josephs M B, Vatter P, Esposito D, Driscoll P C, Katan M, Gierschik P, Bunney T D: *Rac regulates its effector phospholipase $C\gamma 2$ through interaction with a split pleckstrin homology domain*. J Biol Chem 283: 30351 - 30362 (2008)
146. Wang D, Feng J, Wen R, Marine J C, Sangster MY, Parganas E, Hoffmeyer A, Jackson C W, Cleveland J L, Murray P J, Ihle J N: *Phospholipase $C\gamma 2$ is essential in the functions of B cell and several Fc receptors*. Immunity 13: 25 - 35 (2000)
147. Wang H, Kazanietz M G: *The lipid second messenger diacylglycerol as a negative regulator of Rac signaling*. Biochem Soc Trans 34: 855 - 857 (2006)
148. Weber M, Treanor B, Depoil D, Shinohara H, Harwood N E, Hikida M, Kurosaki T, Batista F D: *Phospholipase $C\gamma 2$ and Vav cooperate within signaling microclusters to propagate B cell spreading in response to membrane-bound antigen*. J Exp Med 205: 853 - 868 (2008)
149. Wells G B: *Structural answers and persistent questions about how nicotinic receptors work*. Front Biosci 13: 5479 - 5510 (2008)
150. Wennerberg K, Der C J: *Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it)*. J Cell Sci 117: 1301 - 1312 (2004)
151. Westfield G H, Rasmussen S G, Su M, Dutta S, DeVree B T, Chung K Y, Calinski D, Velez-Ruiz G, Oleskie A N, Pardon E, Chae P S, Liu T, Li S, Woods V L Jr, Steyaert J, Kobilka B K, Sunahara R K, Skiniotis G: *Structural flexibility of the Gas α -helical domain in the $\beta 2$ -adrenoceptor Gs complex*. Proc Natl Acad Sci USA 108: 16086 - 16091 (2011)

152. Winder T, Lenz H J: *Vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor signaling pathways as therapeutic targets for colorectal cancer*. Gastroenterology 138: 2163 - 2176 (2010)
153. Wu D Q, Lee C H, Rhee S G, Simon M I: *Activation of phospholipase C by the α subunits of the G_q and G_{11} proteins in transfected Cos-7 cells*. J Biol Chem 267: 1811 - 1817 (1992)
154. Yu H, Leitenberg D, Li B, Flavell R A: *Deficiency of small GTPase Rac2 affects T cell activation*. J Exp Med 194: 915 - 926 (2001)
155. Yu P, Constien R, Dear N, Katan M, Hanke P, Bunney T D, Kunder S, Quintanilla-Martinez L, Huffstadt U, Schröder A, Jones N P, Peters T, Fuchs H, de Angelis M H, Nehls M, Grosse J, Wabnitz P, Meyer T P, Yasuda K, Schiemann M, Schneider-Fresenius C, Jagla W, Russ A, Popp A, Josephs M, Marquardt A, Laufs J, Schmittwolf C, Wagner H, Pfeffer K, Mudde G C: *Autoimmunity and inflammation due to a gain-of-function mutation in phospholipase $C\gamma 2$ that specifically increases external Ca^{2+} entry*. Immunity 22: 451 - 465 (2005)
156. Zhang B, Zhang Y, Wang Z, Zheng Y: *The role of Mg^{2+} cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins*. J Biol Chem 275: 25299 - 25307 (2000)
157. Zhang W, Neer E J: *Reassembly of phospholipase C- $\beta 2$ from separated domains: analysis of basal and G protein-stimulated activities*. J Biol Chem 276: 2503 - 2508 (2001)
158. Zhou J., Kim H Y., Wang J H., Davidson L A: *Macroscopic stiffening of embryonic tissues via microtubules, RhoGEF and the assembly of contractile bundles of actomyosin*. Development 137: 2785 - 2794 (2010)
159. Zugaza J L, López-Lago M A, Caloca M J, Dosil M, Movilla N, Bustelo X R: *Structural determinants for the biological activity of Vav proteins*. J Biol Chem 277: 45377 - 45392 (2002)

Danksagung

Für die Annahme als Doktorand, das Vertrauen, sowie für die stete Unterstützung, möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Peter Gierschik bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. Claudia Walliser bedanken. Mit ihrer herzlichen Art, ihrer beeindruckenden Sachkunde und ihrer unermüdlichen Geduld stand sie mir während der gesamten Arbeit hindurch mit Rat und Tat zur Seite. Liebe Claudia, vielen Dank für die gute Betreuung.

Frau Dr. Anja Bühler möchte ich für ihre Unterstützung bei der experimentellen Arbeit, sowie für die sehr angenehme und freundschaftlich geprägte Zeit im Labor herzlich danken.

Frau Angela Mansard und Herrn Norbert Zanker möchte ich sehr für Einarbeitung im Labor und die Unterstützung danken.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die sehr kollegiale und aufgeschlossene Art neuen Mitarbeitern gegenüber.

Ganz besonders möchte ich noch meiner Familie, speziell meinen Eltern Anton und Maria danken. Ohne ihre Unterstützung wäre ich nicht da, wo ich heute bin.

Lebenslauf

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.