

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Biochemische Analysen zur Funktion und Regulation von
Cytohesin-1 in humanen T-Zellen**

**von
Henning Dierks
aus
Rotenburg an der Fulda**

München 2002

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Waldemar Kolanus betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 25.02.2002



Henning Dierks

Dissertation eingereicht am: 25.02.2002

1. Gutachter: PD Dr. Waldemar Kolanus

2. Gutachter: Prof. Dr. Patrick Cramer

Mündlichen Prüfung am: 13.05.2002

**Um klar zu sehen, genügt ein Wechsel
der Blickrichtung**

ANTOINE DE SAINT-EXUPÉRY

Die vorliegenden Studien wurde im Zeitraum vom Mai 1997 bis Februar 2002 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Waldemar Kolanus am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Teile dieser Arbeit wurden bereits früher veröffentlicht:

Dierks H, Kolanus J, Kolanus W. (2001)

Actin cytoskeletal association of cytohesin-1 is regulated by specific phosphorylation of its carboxyl-terminal polybasic domain.

J Biol Chem **276**, 37472-37481

Weber KS, Weber C, Ostermann G, Dierks H, Nagel W, Kolanus W. (2001)

Cytohesin-1 is a dynamic regulator of distinct LFA-1 functions in leukocyte arrest and transmigration triggered by chemokines.

Curr Biol **11**, 1969-1974

Gawaz M, Besta F, Ylanne J, Knorr T, Dierks H, Böhm T, Kolanus W. (2001)

The NITY motif of the beta-chain cytoplasmic domain is involved in stimulated internalization of the beta3 integrin A isoform.

J Cell Sci **114**, 1101-1113

Geiger C, Nagel W, Böhm T, van Kooyk Y, Figdor CG, Kremmer E, Hogg N, Zeitlmann L, Dierks H, Weber KS, Kolanus W. (2000)

Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1.

EMBO J **19**, 2525-2536

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Immunsystem | 1 |
| 1.1.1 | Grundlagen der Immunantwort | 2 |
| 1.2 | Zelladhäsion | 3 |
| 1.2.1 | Zelladhäsionsabhängige Migration und Extravasation der Leukozyten | 3 |
| 1.3 | Integrine | 5 |
| 1.3.1 | Das β_2 -Integrin LFA-1 | 7 |
| 1.4 | Die Familie der Cytohesine | 9 |
| 1.4.1 | Funktion der Cytohesine | 10 |
| 2 | ZIELSETZUNG | 13 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 15 |
| 3.1 | Material | 15 |
| 3.1.1 | Geräte | 15 |
| 3.1.2 | Chemikalien | 17 |
| 3.1.3 | Radiochemikalien | 19 |
| 3.1.4 | Enzyme | 20 |
| 3.1.5 | Reaktionssystemsätze | 20 |
| 3.1.6 | Zellkultur-Medien und -Seren | 20 |
| 3.1.7 | Material für molekularbiologische Arbeiten | 21 |
| 3.1.8 | Puffer und Lösungen | 21 |
| 3.1.9 | Antikörper | 22 |
| 3.1.10 | Zelllinien | 23 |
| 3.1.11 | <i>Escherichia coli</i> Stämme | 24 |
| 3.1.12 | Virusstämme | 24 |
| 3.1.13 | DNA-Standard | 24 |
| 3.1.14 | Protein-Standard | 25 |
| 3.1.15 | Plasmide | 25 |
| 3.1.16 | Oligodesoxyribonukleotide | 26 |
| 3.2 | Methoden | 28 |
| 3.2.1 | Kultivierung und Stammhaltung der verwendeten Organismen | 28 |
| 3.2.2 | Eukaryotische Zellkultur | 29 |
| 3.2.3 | Molekularbiologische Methoden | 29 |
| 3.2.4 | Isolierung von Plasmid DNA | 32 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.2.5 | Transformationsverfahren bei <i>E. coli</i> | 34 |
| 3.2.6 | Transfektionsverfahren eukaryotischer Zellen | 36 |
| 3.2.7 | Herstellung rekombinanter Viren | 37 |
| 3.2.8 | Elektrophoreseverfahren | 40 |
| 3.2.9 | Proteinbiochemische Methoden | 41 |
| 3.2.10 | Proteinbiophysikalische Methoden | 46 |
| 3.2.11 | Proteinimmunologische Methoden | 46 |
| 3.2.12 | Biochemische und physiologische Funktionsanalysen | 50 |
| 4 | ERGEBNISSE | 55 |
| 4.1 | Cytohesin-1-induzierte Zelladhäsion | 55 |
| 4.1.1 | Phorbolster-induzierte Phosphorylierung von Cytohesin-1 in Zellen | 56 |
| 4.1.2 | Nachweis der Phosphorylierung durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese | 58 |
| 4.1.3 | Kartierung der phosphorylierten Aminosäurereste von Cytohesin-1 | 60 |
| 4.1.4 | Phosphorylierung und Membraninteraktion von Cytohesin-1 | 66 |
| 4.1.5 | Zytoskelettassoziation von Cytohesin-1 | 70 |
| 4.1.6 | Regulation der Zelladhäsion durch Cytohesin-1 | 75 |
| 4.1.7 | Membranassoziation versus Aktinzytoskelett-Lokalisierung | 78 |
| 4.2 | Cytohesin-1 ist ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für ARF1 | 80 |
| 4.2.1 | Die Cytohesin-1-Mutante E157K inhibiert die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion an ICAM-1 | 80 |
| 4.2.2 | Cytohesin-1 wird durch Phosphorylierung <i>in vitro</i> in seiner GEF-Aktivität reguliert | 83 |
| 5 | DISKUSSION | 85 |
| 5.1 | Cytohesin-1 wird in Jurkat-Zellen nach PMA-Stimulierung phosphoryliert | 85 |
| 5.2 | Serin 394 und Threonin 395 von Cytohesin-1 werden phosphoryliert | 86 |
| 5.3 | Plasmamembranassoziation von Cytohesin-1 | 86 |
| 5.4 | Phosphoryliertes Cytohesin-1 assoziiert mit dem Aktinzytoskelett | 88 |
| 5.5 | Funktionale Rolle der Zytoskelettassoziation von Cytohesin-1 | 89 |
| 5.6 | Die Phosphorylierung von Cytohesin-1 steigert dessen GEF-Aktivität | 90 |
| 5.7 | Modell der Cytohesin-1-regulierten Zelladhäsion | 92 |
| 6 | AUSBLICK | 96 |

| | | |
|----------|-----------------------------|------------|
| 7 | ZUSAMMENFASSUNG | 97 |
| 8 | LITERATURVERZEICHNIS | 98 |
| 9 | ABKÜRZUNGEN | 110 |
| | DANKSAGUNG | 113 |
| | LEBENS LAUF | 114 |

1 Einleitung

1.1 Immunsystem

Das Immunsystem sorgt für die Aufrechterhaltung der biologischen Integrität eines Individuums und sichert somit dessen Überleben. Das Immunsystem muß zwischen „selbst“ und „fremd“ unterscheiden können, wenn eine Immunreaktion gegen ein Antigen ausgelöst wird. Man differenziert zwischen unspezifischer (nichtadaptiver) Abwehrreaktion und spezifischer (adaptiver) Immunantwort. Viele wirbellose Tiere sind ausschließlich auf eine unspezifische Immunabwehr durch phagozytierende Zellen angewiesen. Eine adaptive Immunabwehr tritt in voller Ausprägung erst bei den Vertebraten auf. Ein immunologisches Gedächtnis fehlt in der Phylogenie bis zu den Reptilien und ist erst bei Säugern und Vögeln, also bei allen homoiothermen Tieren, vorhanden.

Die unspezifische Immunantwort gliedert sich in azelluläre und zelluläre Abwehrmechanismen. Auf der zellulären Seite finden sich Makrophagen bzw. Monozyten, Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Physikalische, chemische und biochemische Mechanismen sowie das Komplementsystem bilden die azelluläre Komponente. Diese angeborenen Mechanismen bedürfen keiner Anpassung des Immunsystems und gewährleisten somit eine schnelle Reaktion auf Pathogene.

Die adaptive Immunantwort wird von B- und T-Lymphozyten (B- und T-Zellen) sowie deren spezifischen Effektormolekülen durchgeführt. Diese Effektormoleküle sind Antikörper, die von den B-Zellen sezerniert werden und das Antigen spezifisch binden. Sie stellen den humoralen Anteil des spezifischen Immunsystems dar. Zytotoxische T-Zellen, die fremde bzw. entartete Zellen über direkten Zellkontakt mittels löslicher Zytotoxine (z.B. Granzyme, Perforine, Serinproteasen) spezifisch abtöten, gehören zum zellulären Anteil der adaptiven Immunantwort. Während Antikörper vor allem gegen lösliche Antigene, wie Proteine, bakterielle Toxine oder Medikamente sowie auch gegen Bakterien gerichtet sind, vernichten zytotoxische T-Lymphozyten ausschließlich Zellen, die fremde Antigene präsentieren, wie z.B. virusinfizierte und maligne transformierte Zellen und Zellen transplanterter Organe.

Die Zellen des Blutes stammen von den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks (im adulten Individuum) oder der Leber (Fetus) ab. Reifung und Differenzierung der verschiedenen Zelltypen findet im Falle der T-Lymphozyten (T = Thymus) im Thymus statt, während bei B-Lymphozyten (B = Bursa Fabricii) die Reifung in der Bursa Fabricii nur bei den Vögeln, bzw. im Knochenmark bei allen übrigen Vertebraten erfolgt.

1.1.1 Grundlagen der Immunantwort

Generell erfolgt die Antigenpräsentation auf Zelloberflächen durch MHC-Komplexe (major histocompatibility complex). Man unterscheidet MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle, wobei MHC-Klasse-II von Zellen des Immunsystems, wie z.B. Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert werden, während MHC-Klasse-I-Moleküle von allen Zelltypen außer den kernlosen Erythrozyten und Thrombozyten exprimiert werden.

Mit MHC-Klasse-I-Komplexen werden ausschließlich zelluläre Peptide präsentiert. Dazu gehören auch virale Proteine, die während einer Infektion von der Zelle synthetisiert werden. Peptide die im MHC-I-Komplex präsentiert werden, können durch CD8-positive T-Zellen, den zytotoxischen T-Zellen (T_C -Zellen), erkannt werden. Nach direktem Zellkontakt über den T-Zellrezeptor und akzessorischer Moleküle kann die gerichtete Lyse der Zielzelle erfolgen.

CD4-positive T-Helfer-Zellen (T_H -Zellen) erkennen dagegen Peptide die im MHC-II-Komplex präsentiert werden. Makrophagen oder dendritische Zellen, die ein Antigen aufnehmen, es in Phagolysosomen verdauen und in Bruchstücken an ihrer Oberfläche mit dem MHC-Klasse-II-Komplex präsentieren, werden zur antigenpräsentierenden Zelle (APC, antigen presenting cell). Diese antigenpräsentierende Zelle, z.B. ein Makrophage, wandert in die sekundären lymphatischen Organe (Lymphknoten und Milz) ein. Die T_H -Zellen erkennen mit ihrem spezifischen, klonalen Antigenrezeptor den Antigen-MHC-II-Komplex des Makrophagen, was zu ihrer Aktivierung führt und mit der Sezernierung löslicher Faktoren wie IL-2, γ -Interferon und IL-4 einhergeht. Über einen IL-2-Rezeptor auf der Oberfläche der T_H -Zelle kann eine Autostimulation erfolgen. Außerdem findet beim Zellkontakt mit der T_H -Zelle eine Aktivierung des Makrophagen selbst, über γ -Interferon statt. Dieser wird dadurch zur Phagozytose und IL-1-Sezernierung angeregt. IL-1 bindet an den IL-1-Rezeptor der T-Zellen und induziert deren Proliferation und Zytokinausschüttung. Diese sich selbst verstärkenden Mechanismen können durch die Aktion CD8-positiver Zellen kontrolliert und inhibiert werden.

Auch B-Zellen, die ein Antigen über membrangebundene Immunglobuline (IgM) binden, diesen Komplex dann internalisieren und verdaute Bruchstücke des Antigens schließlich mit MHC-II präsentieren, werden zu Antigen präsentierenden Zellen. Eine T_H -Zelle, die wie zuvor beschrieben aktiviert wurde, erkennt nun auf der B-Zelle die gleiche MHC-Klasse-II-Peptid-Kombination. Das führt zu Proliferation, Differenzierung und Umschalten der B-Zelle von IgM zu anderen Immunglobulin-Klassen (Switch). Neben diesem Prozeß, der eine T-Zell-B-Zell-Interaktion (T-B-Kooperation) erfordert, existieren noch T-unabhängige B-Zell-Antworten. Dies sind meistens eher kurzlebige, aber trotzdem effiziente IgM-Antworten

gegen repetitiv angeordnete Epitope auf viralen Kapsiden, auf Parasiten und auf Oberflächenantigenen von Bakterien, wie z.B. den Lipopolysacchariden (LPS).

1.2 Zelladhäsion

Vielzellige Organismen hängen von der Zellkommunikation und Zell-Zell-Kontakten ab. Die Integrität der Gewebe über Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion, Bildung von Geweben und Organen in der embryonalen Entwicklung, Wundheilung und inflammatorische Reaktionen, werden erst durch die biologische Adhäsion ermöglicht. Zu den wichtigsten Adhäsionsmolekülen gehören Integrine, Selektine, Cadherine sowie Proteine der Immunglobulinsuperfamilie zu denen unter anderem auch die T- und B-Zellrezeptoren zählen.

1.2.1 Zelladhäsionsabhängige Migration und Extravasation der Leukozyten

Im Immunsystem spielen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen eine entscheidende Rolle bei der Erkennung und Bekämpfung von Pathogenen. So wird die Fähigkeit der im Lymphsystem oder Blutstrom zirkulierenden Leukozyten zur Migration und Extravasation durch Adhäsionsmoleküle vermittelt. In diesem Prozeß sind Adhäsionsmoleküle, wie PECAM (CD31) und CD2, Selektine (CD62L, CD62P, CD62E) und Integrine, wie z.B. LFA-1 (CD11a/CD18) und MAC-1 (CR3; CD11b/CD18) und Proteine der Immunglobulinsuperfamilie, wie VCAMs (vascular cell adhesion molecules) und ICAMs (inter-cellular adhesion molecules), involviert.

Nach einer Infektion werden pathogene Mikroorganismen durch phagozytierende Makrophagen und Granulozyten des Immunsystems bekämpft. Im Rahmen dieser Immunantwort werden Faktoren, wie Zytokine und Chemokine, sezerniert. Durch Lyse von gram-negativen Bakterien kann es zusätzlich zur Freisetzung von Lipopolysacchariden (LPS) kommen. Diese inflammatorischen Reize können die Extravasation auslösen, den Prozeß bei dem Leukozyten aus den Blutgefäßen in das umliegende Gewebe migrieren. Bei der Extravasation sind zunächst die Selektine involviert. Diese können mit vaskulären Adressinen, wie CD34, GlyCAM-1 und MAdCAM-1 interagieren. Die lektinähnliche Domäne der Selektine bindet bei dieser Interaktion den Sialyl-Lewis^X-Glykoprotein-Anteil der Adressine. Einige Minuten nachdem die Zellen Leukotrien B₄, Komplement C5a oder Histamin ausgesetzt werden, wird im ersten Schritt der Extravasation P-Selektin (CD62P) aus intrazellulären Granula der Endothelzellen, den Weibel-Palade-Körpern, freigesetzt und an

die Oberfläche rekrutiert. Ein weiteres Selektin, das E-Selektin (CD62E), tritt erst einige Stunden später auf, nachdem die Zellen LPS oder TNF- α ausgesetzt werden. Die Interaktion mit P- oder E-Selektinen erlaubt es Monozyten und Neutrophilen reversibel an die Gefäßwände zu adhären, was im Blutstrom aufgrund der nur schwachen Adhäsion zu einem Rollen der Zellen auf dem Endothel führt. Eine stabile Zelladhäsion der Leukozyten wird erst durch Interaktion ihrer Integrine mit den spezifischen Liganden auf den Endothelien erreicht. Die Integrine LFA-1 und Mac-1 werden durch IL-8 und weitere Chemokine aktiviert, was eine starke Bindung an den Integrinliganden ICAM-1 ermöglicht. Die Expression von ICAM-1 durch Endothelzellen wird ebenfalls, wie auch die Produktion von E-Selektin, durch TNF- α induziert. Nachdem die Leukozyten fest an das Endothel adhären, können sie durch einen Diapedese genannten Prozeß in das gefäßumgebende Gewebe gelangen. Hierbei sind LFA-1 und Mac-1 sowie CD31 und Chemokine beteiligt. Der Leukozyt überwindet mit Hilfe des Adhäsionsapparates und proteolytischer Enzyme die Gefäßwand und Basalmembran und dringt so in das darunter liegende Gewebe ein. Der durch die inflammatorischen Stimuli ausgebildete Chemokingradient weist dem Leukozyten dann den Weg zum Entzündungsherd.

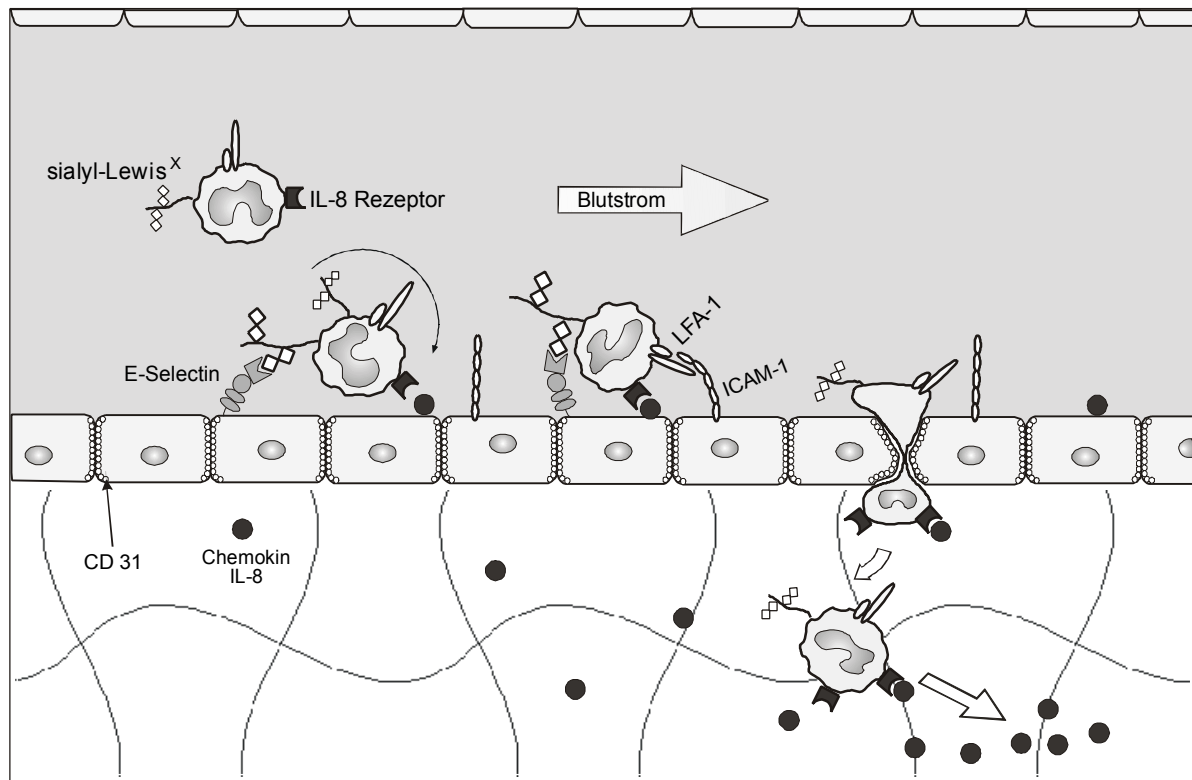


Abb. 1.2.1 Leukozyten-Extravasation

Von rechts nach links: Die Leukozyten binden über die Sialyl-Lewis^x Anteile ihrer Adressine an E-Selektin der Endothelzellen. Diese schwache Zelladhäsion ermöglicht ein Entlangrollen auf dem Gefäßendothel. Durch kostimulatorische Signale, wie die zusätzliche Bindung des Chemokins IL-8 an den IL-8-Rezeptor des Leukozyten, wird LFA-1 aktiviert. Dadurch wird eine starke Adhäsion an ICAM-1 ermöglicht und die Voraussetzung für die Migration durch den interzellulären Raum geschaffen. Nach der Diapedese, die über LFA-1 und CD31 vermittelt wird, streben die Leukozyten entlang des Chemokingradienten dem Inflammationsherd entgegen.

1.3 Integrine

Die Adhäsionsmoleküle der Integrinfamilie werden in fast allen Geweben des Organismus exprimiert und spielen eine entscheidende Rolle in der zuvor angesprochenen biologischen Zelladhäsion. Die Adhäsionsmolekülfamilie der Integrine besteht aus heterodimeren, nicht-kovalent assoziierten integralen Plasmamembranproteinen. Bisher sind 22 verschiedene Molekülkombinationen aus α - und β -Ketten gefunden worden (Stewart *et al.*, 1995; Kumar, 1998). Die α -Untereinheiten der Integrine liegen zwischen 120 kDa und 180 kDa, und die β -Untereinheiten weisen eine Masse von 90 - 110 kDa auf. Der größte Anteil beider Untereinheiten besteht aus dem extrazellulären Bereich, gefolgt von einer kurzen

Transmembrandomäne. Der zytoplasmatische Anteil der meisten Integrine ist relativ kurz und besteht bei den α -Untereinheiten aus 15 - 77 Aminosäuren und bei den β -Untereinheiten aus 46 - 60 Aminosäuren. Eine Ausnahme bildet hier die β_4 -Untereinheit, deren zytoplasmatischer Anteil mehr als 1000 Aminosäuren umfaßt. Derzeit sind 17 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt, deren Variabilität durch alternative Spleißvarianten erhöht wird (Fornaro und Languino, 1997; van der Flier und Sonnenberg, 2001). Die Liganden der Integrine sind Moleküle der extrazellulären Matrix, lösliche Moleküle (z.B. Faktoren des Komplementsystems und der Blutgerinnung) sowie Moleküle die auf Zelloberflächen exprimiert werden. Eine Übersicht der Integrine und ihrer Liganden ist in Tabelle 1.3 dargestellt.

Tabelle 1.3

| Integrin | weitere Bezeichnung | Liganden |
|-------------------|----------------------------|--|
| $\alpha_1\beta_1$ | VLA-1; CD49a/CD29 | Kollagen I, -IV, Laminin |
| $\alpha_2\beta_1$ | VLA-2; CD49b/CD29 | Kollagen I, -IV, Laminin |
| $\alpha_3\beta_1$ | VLA-3; CD49c/CD29 | Kollagen I, -IV, Laminin, Fibronectin, Epiligrin |
| $\alpha_4\beta_1$ | VLA-4; CD49d/CD29 | VCAM-1, Fibronectin |
| $\alpha_5\beta_1$ | VLA-5; CD49e/CD29 | Fibronectin |
| $\alpha_6\beta_1$ | VLA-6; CD49f/CD29 | Laminin |
| $\alpha_D\beta_2$ | CD11d/CD18 | ICAM-3, VCAM-1 |
| $\alpha_L\beta_2$ | LFA-1; CD11a/CD18 | ICAM-1,-2,-3,-4,-5 |
| $\alpha_M\beta_2$ | Mac-1; CR3; CD11b/CD18 | ICAM-1, Fibrinogen, iC3b, FaktorX |
| $\alpha_X\beta_2$ | p150,95; CD11c/CD18 | Fibrinogen, iC3b, CD23 |
| $\alpha_V\beta_3$ | CD51/CD61 | Vitronectin, Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen |
| $\alpha_6\beta_4$ | - | Laminin |
| $\alpha_9\beta_5$ | - | Vitronectin |
| $\alpha_V\beta_5$ | - | Fibronectin |
| $\alpha_9\beta_6$ | - | Fibronectin |
| $\alpha_4\beta_7$ | - | MAdCAM-1, Fibronectin, VCAM-1 |
| $\alpha_E\beta_7$ | - | E-Cadherin |

Tab. 1.3 Integrine und deren spezifische Liganden

VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), ICAM (inter-cellular adhesion molecule), iC3b (Komplement 3b inaktiviert), VLA (very late-activation antigen), LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1), MAdCAM (mucosal adressin cell adhesion molecule)

Unter physiologischen Bedingungen binden die Integrine im Grundzustand ihre Liganden nur schwach. Erst nach Aktivierung interagieren sie mit ihren spezifischen Liganden und üben ihre Effektorfunktion aus. Diese Aktivierung ist dynamisch und reversibel (Kolanus und Seed, 1997; Gahmberg, 1997; van Kooyk und Figdor, 2000).

1.3.1 Das β_2 -Integrin LFA-1

LFA-1 (CD11a/CD18; $\beta_2\alpha_L$; lymphocyte function-associated antigen 1) gehört zur Familie der β_2 -Integrine. β_2 - und β_7 -Integrine wurden bisher ausschließlich auf Leukozyten gefunden. Die β_2 -Integrine sind die dominierende Gruppe, mit derzeit vier Vertretern (Tab. 1.3). LFA-1 spielt eine entscheidende Rolle im adaptiven sowie nichtadaptiven Immunsystem und ist beteiligt an der vermittelten Zellyse durch zytotoxische T-Zellen, an der Aktivität von NK-Zellen, am „homing“ von T-Zellen zu den Lymphknoten, an der Aktivierung von naiven T-Zellen, an der Funktion von Memory-T-Zellen und an der Extravasation und Migration von Leukozyten (Arnaout, 1990; Springer, 1990). LFA-1, dessen spezifische Liganden und weitere Adhäsionsmoleküle ermöglichen den Kontakt von T-Zellen mit Antigen-präsentierenden Zellen. Dieser Zell-Zell-Kontakt ist notwendig für die Ausbildung der zuvor angesprochenen Interaktion über den T-Zellrezeptorkomplex mit dem MHC-Peptid-Komplex der Antigen-präsentierenden Zelle (Dustin und Springer, 1989). Die biologische Bedeutung der β_2 -Integrine ist durch das sogenannte LAD-Syndrom (leucocyte adhesion deficiency syndrom) dokumentiert. Patienten, die an dieser Erkrankung leiden, sind heftigen und rezidivierenden bakteriellen Infektionen ausgesetzt; sie versterben ohne spezifische Therapie (Knochenmark- Transplantation) meist in den ersten Lebensjahren. Die Krankheit beruht ursächlich auf Mutationen im extrazellulären Bereich der β_2 -Kette, was zum vollständigen Fehlen der β_2 -Integrine auf der Oberfläche von Leukozyten führen kann (Aranout *et al.*, 1990; Lopez Rodriguez *et al.*, 1993).

Die α -Kette (α_L) von LFA-1 besitzt in der N-terminalen Region sieben repetitive Sequenzeinheiten, die zwischen der zweiten und dritten repetitiven Sequenz durch eine I-Domäne (Insertions-Domäne) unterbrochen wird. Die repetitiven Sequenzen IV bis VII besitzen als Bindungsstellen für divalente Kationen ein EF-Hand-Motiv (Takada *et al.*, 1997; Mould 1996; Tuckwell *et al.*, 1992). Die I-Domäne birgt eine Mg^{2+}/Mn^{2+} -Bindungsstelle, die Metallionen-abhängige Adhäsionsstelle (MIDAS, metal-ion-dependent-adhesion-site) (Lee *et al.*, 1995) sowie eine Region, die IDAS (I-domain-allosteric-site) (Kamata *et al.*, 1995). Der zytoplasmatische, carboxyterminale Bereich von α_L trägt eine innerhalb der α -Untereinheiten

konservierte KXGFFKR-Sequenz, die unter anderem eine Bindungsstelle für Calreticulin darstellt (Williams *et al.*, 1994; O'Toole, 1997). Die β -Kette enthält im extrazellulären Bereich eine konservierte I-ähnliche Domäne, die Homologien zur I-Domäne der α -Untereinheiten aufweist und auch ein MIDAS-Motiv enthält (Lee *et al.*, 1995; Hogg *et al.*, 1999).

Die Liganden von LFA-1 sind die interzellulären Adhäsions-Moleküle, ICAM-1 bis ICAM-5 (inter-cellular adhesion molecule) (Larson und Springer, 1990; Gahmberg *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 2000). Der bedeutendste Ligand ist ICAM-1. Die Bindung von LFA-1 an den Liganden ICAM-1 wird hauptsächlich durch die Interaktion der beiden Ig-Domänen von ICAM-1 mit der I-Domäne von LFA-1 vermittelt (Knorr und Dustin, 1997). Erst nach Aktivierung des Integrins kommt es zu einer starken Bindung an den Liganden. Diese Bindung ist dynamisch reguliert (Kolanus und Seed, 1997; van Kooyk, *et al.*, 2000).

1.3.1.1 Regulierung der Integrinaktivität

Der Aktivierungszustand von LFA-1 wird durch Regulierung der Affinität sowie durch Modulation der Avidität beeinflusst. Die Erhöhung der Avidität wird durch eine Aggregation des Integrins auf der Zelloberfläche erreicht. Die Affinitätsänderung geht vermutlich mit einer Konformationsänderung des Integrins einher. Dies wird z.B. durch Experimente mit monoklonalen Antikörpern belegt. Die Bindung des anti-CD18 Antikörpers KIM185 an LFA-1 führt z.B. zur Aktivierung des Integrins (Andrew *et al.*, 1993), während der Antikörper mAB24 LFA-1 im Grundzustand nicht erkennt und erst nach dessen Aktivierung bindet (Dransfield und Hogg, 1989). Außerdem können Mg^{2+}/Mn^{2+} und Ca^{2+} über Bindung an das MIDAS-Motiv die Aktivität von LFA-1 modulieren (Mould 1996; Hogg *et al.*, 1999). Aviditätsänderungen werden vermutlich durch eine erhöhte laterale Mobilität der Integrine erreicht, die durch temporäre Entkopplung vom Zytoskelett ermöglicht wird. (Lub *et al.*, 1995; van Kooyk und Figdor, 2000). Die Affinität sowie Avidität wird durch komplexe zelluläre Mechanismen und Signale beeinflusst. Die Aktivierung bzw. ICAM-Bindung von LFA-1 läßt sich z.B. durch Quervernetzung des TCR (T-Cell Receptor)/CD3-Komplexes (Dustin und Springer, 1989) oder der Korezeptoren, wie CD2 (Kooyk *et al.*, 1989), CD7 und CD28 (Shimizu *et al.*, 1992), induzieren. Die Quervernetzung der Oberflächenrezeptoren führt zur Aktivierung von Tyrosinkinassen und stimuliert Phosphatidyl-Phospholipasen (B und C). Dadurch werden die „second messenger“ Diacylglycerol und Inositoltrisphosphat (IP3) freigesetzt. Diacylglycerol stimuliert die PKC-Aktivität und IP3 bewirkt die Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern. Durch die Behandlung von Leukozyten mit

Phorbolster (Diacylglycerol-Analog), Calcium-Ionophor, oder Zytokinen konnte *in vitro* gezeigt werden, daß eine Aktivierung von LFA-1 möglich ist (Kolanus und Seed, 1997). Auch Signale über monomere G-Proteine oder Aktivierung der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-Kinase) spielen eine Rolle bei der Integrinaktivierung (Zhang *et al.*, 1996; Klarlund *et al.*, 1997). Integrine sind Bestandteil von Fokalkontakten und interagieren mit Zytoskelett-assoziierten Proteinen, wie α -Aktinin, Filamin, Talin und Paxillin (Critchely *et al.*, 1999). Diese Fokalkontakte bestehen aus Multiproteinkomplexen, die neben den Integrinen auch Signalproteine enthalten. Der Ligandenbindung durch Integrine folgt häufig die Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK). Dies führt zur Aktivierung des RAS-MAP-Kinase-Signalweges (Schlaepfer *et al.*, 1989; Renshaw *et al.*, 1999). Bei der Aktivierung der Integrine spielen auch zelluläre Signale eine wichtige Rolle. In diesem Zusammenhang wurde das zytoplasmatische Protein Cytohesin-1 identifiziert (Kolanus *et al.*, 1996).

1.4 Die Familie der Cytohesine

Die Gruppe der Cytohesine stellt eine Proteinfamilie dar, deren Funktion seit Mitte der 90er Jahre Gegenstand der Forschung ist. Derzeit sind 4 Mitglieder identifiziert: Cytohesin-1 (B2-1), Cytohesin-2 (ARNO), Cytohesin-3 (ARNO3; GRP1) und Cytohesin-4. Diese Moleküle weisen eine molekulare Masse von ca. 47 kDa auf und sind durch das Vorhandensein von vier funktionellen Domänen gekennzeichnet. N-terminal befindet sich eine ca. 50 Aminosäuren lange „coiled-coil“ Domäne, gefolgt von der etwa 200 Aminosäuren langen Sec7-Domäne. Im carboxyterminalen Bereich befindet sich eine ca. 120 Aminosäuren umfassende Pleckstrin-Homologie (PH) -Domäne, an die sich eine kurze polybasische Region (c-Domäne) mit 15 bis 20 Aminosäuren anschließt (Abb. 1.4). Die Cytohesine weisen auf Aminosäureebene eine starke Homologie auf. Cytohesin-2 (ARNO, ARF-nucleotide-binding-site-opener) ist mit Cytohesin-1 zu 83% identisch, bei einer 92%igen Homologie (Liu und Pohajdak, 1992; Chardin *et al.*, 1996). Cytohesin-3 (ARNO3; GRP1, general-receptor of phosphoinositides) ist mit Cytohesin-1 zu 85% identisch, bei einer 91%igen Homologie (Klarlund *et al.*, 1997). Das jüngste Mitglied der Cytohesin-Familie ist Cytohesin-4. Es ist mit Cytohesin-1 zu 70% identisch bei 84%iger Homologie und damit das divergenteste Protein dieser Gruppe (Ogasawara *et al.*, 2000).

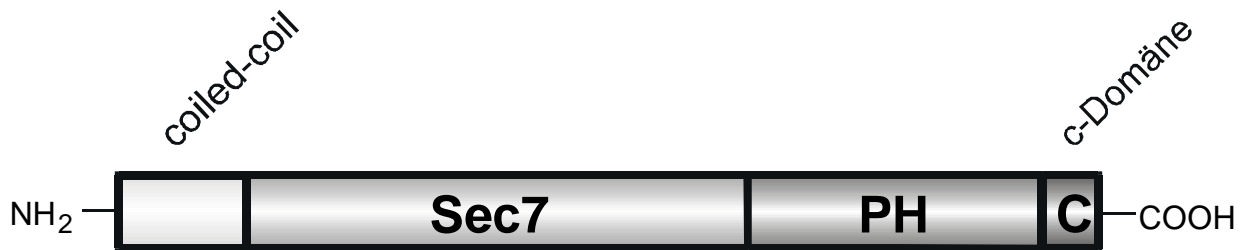


Abb. 1.4 Schematische Struktur der Cytohesine

Die Proteine enthalten aminoterminal eine „coiled-coil“ Domäne, gefolgt von einer zum Hefe Sec7-Protein homologen Domäne (Sec7). Carboxyterminal liegt die Pleckstrin-homologe Domäne (PH), gefolgt von einer polybasischen Region, der c-Domäne.

1.4.1 Funktion der Cytohesine

Die Cytohesine gehören zur Familie der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF, guanine nucleotide exchange factor). Für die katalytische Funktion als GEF ist die Sec7-Domäne verantwortlich. Erstmals wurde die GEF-Aktivität an dem Protein Gea1 (guanine-nucleotide-exchange on ARF1) aus *Sachoromyces cerevisiae* nachgewiesen. (Peyroche *et al.*, 1996). ARF-Proteine (ADP-ribosylation factors) sind monomere G-Proteine die eine eigene Gruppe innerhalb der Superfamilie der Ras-GTPasen bilden. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Regulation des Vesikeltransports in Säugerzellen (Kahn und Gilman, 1986; Balch 1992; Tsai *et al.*, 1997). ARF-Proteine liegen GDP-gebunden in ihrer inaktiven Form oder GTP-gebunden in ihrer aktiven Form vor. Die Hydrolyse des gebundenen GTP-Nukleotids wird durch die intrinsische GTPase-Funktion der ARF-Proteine katalysiert. Die GTP-Hydrolyse und damit die Inaktivierung der ARF-Proteine kann durch GAP-Moleküle (GTPase aktivierende Proteine) beschleunigt werden. Der Übergang vom inaktiven zum aktiven Zustand der ARF-Proteine wird durch GEF-Proteine beschleunigt, da sie die Dissoziation des ARF-gebundenen GDP-Nukleotids katalysieren. Die Domäne, die die GEF-Funktion bei Gea1 bereitstellt, ist homolog zu dem Sekretionsprotein Sec7 von *S. cerevisiae*. Daher leitet sich der Name für die Sec7-Domänen von Cytohesin ab, weil diese Domäne hier den Guanin-Nukleotid-Austausch an ARF katalysiert. Durch Sequenzvergleiche mit Sec7 und Gea1 konnte ARNO (Cytohesin-2) isoliert werden (Chardin *et al.*, 1996). Bei Cytohesin-2 und

Cytohesin-1 wurde die GEF-Aktivität durch GDP/GTP-Austausch an ARF1 und ARF6 nachgewiesen, wobei für die katalytische Aktivität die Sec7-Domäne hinreichend war (Chardin *et al.*, 1996; Meacci *et al.*, 1997; Frank *et al.*, 1998). Für Cytohesin-3 (ARNO3) und das mausanaloge GRP1 wurde ebenfalls die GEF-Aktivität gegenüber ARF1 und für Cytohesin 4 gegenüber ARF1 und ARF5 nachgewiesen (Klarlund *et al.*, 1998; Franco *et al.*, 1998, Ogasawara *et al.*, 2000). Die Struktur der Sec7-Domäne von Cytohesin-1 und Cytohesin-2 wurde inzwischen aufgeklärt. Die Sec7-Domänen bestehen aus zwei Untereinheiten, die von je 5 α -Helices gebildet werden. Durch Mutagenesen in Verbindung mit Proteinbindungsstudien konnte gezeigt werden, daß im C-terminalen Bereich der Sec7-Domäne ein hydrophober Graben enthalten ist, der für die Aktivität als Austauschfaktor und die Bindung von ARF1-Protein essentiell ist (Betz *et al.*, 1998; Cherfils *et al.*, 1998). Die Pleckstrin-Homologie (PH) -Domänen sind Module die außer in den Cytohesinen auch in Proteinen wie Btk, β ARK und Akt-Kinase, Regulatoren monomerer G-Proteine, wie SOS, Vav und Ras-GAP und weiterer membranassoziierter Proteine, wie den Phospholipasen-C γ und δ oder der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase vorkommen. PH-Domänen können im allgemeinen als universale Membranadapter betrachtet werden (Pawson, 1995; Shaw, 1996; Lemmon *et al.*, 1996; Hemmings 1997; Michiels *et al.*, 1997). Bei den Cytohesinen vermitteln die PH-Domänen die Membranrekrutierung der Proteine über Bindung an Phosphoinositide der Plasmamembranen (Klarlund *et al.*, 1997; Nagel *et al.*, 1998a). Die Funktionen der C-terminalen polybasischen c-Domänen der Cytohesine sind noch wenig erforscht. Jedoch deutet einiges daraufhin, daß zumindest bei Cytohesin-1 dieser Bereich die Membraninteraktion des Proteins stabilisiert (Nagel *et al.*, 1998b). Die Funktion der N-terminalen „coiled-coil“ Region ist ebenfalls noch nicht ausreichend geklärt. Womöglich ist diese Region aber für die temporäre Lokalisierung der Cytohesine im Golgikomplex verantwortlich (Lee und Pohajdak, 2000).

1.4.1.1 Cytohesin-1 ist ein spezifischer Interaktor von LFA-1

Cytohesin-1 wurde aus einer cDNA-Bibliothek isoliert und zunächst als B2-1 bezeichnet (Liu und Pohajdak, 1992). Durch Verwendung des „Yeast-Two-Hybrid-Systems“, auch als „Interaction-Trap“ bezeichnet, wurde Cytohesin-1 aus einer cDNA-Bibliothek von NK-Zellen isoliert und als Interaktionspartner der zytoplasmatischen Domäne von CD18 (β_2) identifiziert. Cytohesin-1 wird überwiegend in hämatopoetischen Zellen exprimiert und kommt abundant in NK-Zellen sowie in T-Zellen vor, während es in geringerem Maße auch

z.B. in myeloischen K562-Zellen und in nicht-hämatopoetischen Zelllinien vorkommt, wie z.B. in HeLa-Zellen (Kolanus *et al.*, 1996; Geiger *et al.*, 2000). Die Überexpression von Cytohesin-1 in peripheren Blutlymphozyten und Jurkat T-Zellen führt zur Aktivierung von LFA-1 (CD11a/CD18). LFA-1 bindet daraufhin seinen physiologischen Liganden ICAM-1, was zur Adhäsion der Zellen führt (Kolanus *et al.*, 1996). Cytohesin-1 interagiert spezifisch mit dem zytoplasmatischen Anteil der β_2 -Kette von LFA-1. Die membrannahen Aminosäuren W723, K724 und A725 von CD18 sind essentiell für die Bindung von Cytohesin-1 (Geiger *et al.*, 2000). Ebenfalls im zytoplasmatischen Bereich von CD18 wurden auch Interaktionsbereiche für α -Aktinin (bindet R733-D731 von CD18), Filamin (bindet K724 - W747 von CD18) und Rack1 (receptor for activated protein kinase C) identifiziert (Pavalko *et al.*, 1993; Sharma *et al.*, 1995; Lilienthal und Chang, 1998). Im Gegensatz zu Cytohesin-1, dessen Interaktion nach derzeitiger Kenntnis spezifisch nur mit CD18 (β_2) erfolgt, interagieren α -Aktinin, Filamin und Rack1 auch mit CD29 (β_1). Filamin interagiert zusätzlich mit β_7 und Rack1 auch noch mit β_5 (Otey *et al.*, 1990; Pfaff *et al.*, 1998; Lilienthal und Chang, 1998; Hemler, 1998).

2 Zielsetzung

Die Zellen des hämatopoetischen Systems sind in der Lage auf spezifische Weise mit Zellen anderer Gewebe und der extrazellulären Matrix zu interagieren. Zellkontakte werden durch Adhäsionsmoleküle gewährleistet. Dabei müssen Prozesse des Anheftens und des Ablösens der Zellen von ihren Interaktoren reguliert werden, um Zellmigration zu ermöglichen. Prozesse, wie die Leukozytenextravasation oder die Interaktionen von Lymphozyten mit antigenpräsentierenden Zellen sind daher von der Regulation der Adhäsion abhängig. Eine permanente Zelladhäsion wäre mit diesen Vorgängen unvereinbar. Der Adhäsionsmolekülfamilie der Integrine kommt in diesem Zusammenhang eine besondere Rolle zu. Integrine binden nicht konstitutiv an ihre Liganden, sondern werden zunächst aktiviert. Ein zytoplasmatisches Protein, Cytohesin-1, wurde als Regulator des Integrins LFA-1 identifiziert. Überexpression von Cytohesin-1 führt in Lymphozyten zur Aktivierung von LFA-1, das bindet dann seinen spezifischen Liganden ICAM-1 und vermittelt so die Zelladhäsion (Kolanus *et al.*, 1996). Diese Eigenschaft von Cytohesin-1 läßt es als geeignetes Instrument zur Analyse der Integrinregulation erscheinen. Aufgrund dieser Tatsachen wurde die Cytohesin-1-induzierte LFA-1-vermittelte Zelladhäsion näher untersucht. Analysen ergaben, daß Cytohesin-1 spezifisch mit hoher Affinität an Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP3) bindet. Als phosphoinositidbindende Domäne wurde die PH-Domäne identifiziert (Nagel *et al.*, 1998b). Cytohesin-1 kann durch diese Bindung an die Plasmamembran rekrutiert werden, was eine Interaktion mit dem integralen Membranprotein LFA-1 fördern könnte. Signale die zur Aktivierung der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase und somit zur vermehrten Synthese von PIP3 führen, begünstigen die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion (Nagel *et al.*, 1998a und 1998b).

Bisher sind Prozesse, die die Integrinaktivität auf zellulärer Ebene regulieren noch weitgehend unklar. Überexpressionsstudien von Cytohesin-1 zeigten jedoch, daß dieser zytoplasmatische Faktor die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion induzieren kann. In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion von Cytohesin-1 im Hinblick auf die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion durch molekularbiologische und biochemische Methoden *in vitro* und mit Hilfe zellbiologischer Experimente in hämatopoetischen Zelllinien untersucht werden. Es sollte weiterhin analysiert werden, ob Cytohesin-1 in seiner Funktion als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) eine entscheidende Rolle bei der Zelladhäsion spielt. Wie zuvor beschrieben, ist die Rekrutierung von Cytohesin-1 zur Plasmamembran in den Prozeß der LFA-1-Aktivierung involviert, deshalb sollte auch die Membran- bzw.

Zellkortexassoziation von Cytohesin-1 näher untersucht werden. Vorhergehende Untersuchungen deuteten daraufhin, daß Cytohesin-1 in Zellen phosphoryliert wird. Daher war auch diese Modifikation von Cytohesin-1 in der Zelle Gegenstand der funktionalen Analyse des Proteins. In der vorliegenden Arbeit sollte hauptsächlich die Rolle dieser Modifikation von Cytohesin-1 untersucht werden. Erkenntnisse zur Regulation von Cytohesin-1 sollten helfen, diejenigen Mechanismen weiter aufzuklären, die zur Induzierung der LFA-1-vermittelten Zelladhäsion führen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

| | |
|------------------------------|---|
| Agarosegeldokumentation | Eagle Eye II, Stratagene (Heidelberg) |
| Agarosegelkammern | Harnischmacher (München) |
| Autoklaven | MMM (München) |
| Bakterienschüttler | ISF-1-V, Adolf Kühner (Schweiz) |
| Bunsenbrenner | Roth (Karlsruhe) |
| Durchflußzytometer | Epics XL, Coulter (Miami, USA) |
| Elektroporationsapparatur | EasyJect Plus D2000, Eurogentec (Seraing, Belgien) |
| Entwicklermaschine | Hyperprocessor, Amersham (Braunschweig) |
| Fluoreszenz-Meßgerät | ZytoFluorII, PerSeptive Biosystems (Framingham, USA) |
| Heizblöcke | Thermomixer 5436, Eppendorf (Hamburg) |
| Heizrührgerät | Ikamag RCT, Bachhofer (Reutlingen) |
| Inkubatoren | Heraeus (Osterode) |
| konfokales Lasermikroskop | TCS-NT/Leitz DM IRB/E, Leica (Wetzlar) |
| Lichtmikroskop | IM35, Zeiss (Jena) |
| Magnetrührer | Ikamag Reo, Bachhofer (Reutlingen) |
| Kapillar-PCR-Gerät | FTS-I Thermal Sequencer, Corbett Research, (Sidney Australien) |
| pH-Meter | 761, Knick (Berlin) |
| Photometer Spektrophotometer | DU 640, Beckmann (München) |
| Phospho-Imager | Molekular Dynamics Storm 860 Pharmacia Biotech (Freiburg) |
| Pipetten | P2, P20, P200, P1000, Gilson (Middleton, USA) |

| | |
|------------------------------|---|
| Pipettierhilfe | Hirschmann (Eberstadt) |
| Protein-Minigel-Apparaturen | BioRad (München) |
| Protein-Transfer-Apparaturen | BioRad (München) |
| Radioaktivitätsmeßgerät | InstantImager, Packard (Canberra, Australien) |
| Reinstwasseranlage | MilliRo 30plus, Millipore (Eschborn) |
| Schüttelgerät | Reax2000, Heidolph (Kelheim) |
| Sonifikator | Sonifier GM300, Bandelin (Berlin); Sonifier B12-/B15, Branson (USA) |
| Spannungsgeräte | Modell 455, Consort (Turnhout, Belgien) |
| Sterilbank | BDK (Sonnenbühl) |
| Stickstofftank | XLC-230, MVE (New Prague, USA) |
| Szintillationsmeßgerät | Packard (Canberra, Australien) |
| Tischschüttler | 3020, GFL (Burgwedel) |
| Überkopfschüttler | Bachhofer (Reutlingen) |
| Ultraschallbad | Transsonic digital T480/H-2, Elma (Singen) |
| UV-Illuminatoren | (254 nm und 365 nm) Bachhofer (Reutlingen) |
| Waagen | AE163, Mettler-Toledo (Gießen); 1412, Sartorius (Göttingen) |
| Wasserbäder | 1086, GFL (Burgwedel) |
| Zentrifugen | Sorvall RC-5C plus, DuPont (Bad Homburg); J6-MC und L8-80M, Beckmann (München); 5417 und 5417R, Eppendorf (Hamburg) |
| Zentrifugenrotoren | Beckmann (München); DuPont (Bad Homburg) |

3.1.2 Chemikalien

| | |
|--|------------------------------|
| Acrylamid:Bisacrylamid (29:1), 30%ig | Roth (Karlsruhe) |
| Agar | Difco (Detroit, USA) |
| Agarose | Sigma (Taufkirchen) |
| Agarose (LMP-Agarose) | NuSieve®, Biozym (Oldendorf) |
| Ammoniumacetat | Merck (Darmstadt) |
| Ammoniumhydrogencarbonat | Merck (Darmstadt) |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Merck (Darmstadt) |
| Ammoniumsulfat | Merck (Darmstadt) |
| Ampicillin | Roth (Karlsruhe) |
| Aprotinin | Sigma (Taufkirchen) |
| ATP | Roche (Mannheim) |
| Benzamidin | Sigma (Taufkirchen) |
| Bisbenzimid H33342 Fluorochrom-Trihydrochlorid | Calbiochem (Bad Soden) |
| Borsäure | Merck (Darmstadt) |
| Bradford-Reagenzlösung | BioRad (München) |
| 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) | Biomol (Hamburg) |
| Bromphenolblau | Merck (Darmstadt) |
| n-Butanol | Roth (Karlsruhe) |
| Caesiumchlorid | Gibco (Eggenstein) |
| Calciumchlorid | Merck (Darmstadt) |
| Chloroquinphosphat | Sigma (Taufkirchen) |
| Coomassie-blau R-250 | Sigma (Taufkirchen) |
| Cytochalasin D | Sigma (Taufkirchen) |
| DEAE-Dextran | Sigma (Taufkirchen) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Roth (Karlsruhe) |
| Di-Natriumhydrogenphosphat | Merck (Darmstadt) |
| Dioleoyl-l- α -phosphatidyl-DL-glycerol | Sigma (Taufkirchen) |
| Dithiothreitol (DTT) | Merck (Darmstadt) |
| dNTP | Roche (Mannheim) |
| Essigsäure | Roth (Karlsruhe) |
| Ethanol (EtOH) | Roth (Karlsruhe) |
| Ethidiumbromid (EtBr) | Sigma (Taufkirchen) |

| | |
|---|------------------------------------|
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Merck (Darmstadt) |
| Ethylenglycol-bis[β -aminoethylether] -N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA) | Sigma (Taufkirchen) |
| Formaldehyd | Merck (Darmstadt) |
| Gelatine | Merck (Darmstadt) |
| Geneticin | Gibco (Eggenstein) |
| Gentamicinsulfat | Gibco (Eggenstein) |
| Glukose | Gibco (Eggenstein) |
| Glutathion (GSH) | Merck (Darmstadt) |
| GSH-Sepharose | Amersham, Pharmacia (Braunschweig) |
| Glyzerin | Roth (Karlsruhe) |
| Glycin | Roth (Karlsruhe) |
| Glykogen | Roche (Mannheim) |
| Hefe-Extrakt | Gibco (Eggenstein) |
| N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- ethansulfonsäure (HEPES) | Roth (Karlsruhe) |
| Hypoxanthin | Sigma (Taufkirchen) |
| Imidazol | Merck (Darmstadt) |
| Isopropanol | Roth (Karlsruhe) |
| Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) | Roche (Mannheim) |
| Kaliumacetat | Merck (Darmstadt) |
| Kaliumchlorid | Merck (Darmstadt) |
| Kalium-di-Hydrogenphosphat | Merck (Darmstadt) |
| Kaliumphosphat | Merck (Darmstadt) |
| Kanamycin | Sigma (Taufkirchen) |
| LB-Agar | Gibco (Eggenstein) |
| LB-Base | Gibco (Eggenstein) |
| Leupeptin | Sigma (Taufkirchen) |
| Lithiumchlorid | Sigma (Taufkirchen) |
| Magnesiumchlorid | Merck (Darmstadt) |
| Magnesiumsulfat | Merck (Darmstadt) |
| Manganchlorid | Merck (Darmstadt) |
| 2-Mercaptoethanol | Merck (Darmstadt) |
| Methanol | Roth (Karlsruhe) |

| | |
|--|---------------------------------------|
| Mounting-Medium | Vector Laboratories (Burlingame, USA) |
| Mycophenolsäure (MPA) | Sigma (Taufkirchen) |
| Natriumacetat | Merck (Darmstadt) |
| Natriumchlorid | Roth (Karlsruhe) |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Roth (Karlsruhe) |
| Natriumhydroxid | Roth (Karlsruhe) |
| Nickel-NTA-Agarose | Quiagen (Hilden) |
| Nitroblau Tetrazoliumchlorid (NBT) | Biomol (Hamburg) |
| Nocodazol | Sigma (Taufkirchen) |
| 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (PMA) | Sigma (Taufkirchen) |
| β -palmitoyl- γ -oleoyl-L- α -phosphatidylcholin | Sigma (Taufkirchen) |
| Paraformaldehyd | Merck (Darmstadt) |
| Phenol (TE-äquilibriert) | Roth (Karlsruhe) |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Serva (Heidelberg) |
| Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat | Matreya, inc. (USA) |
| Phosphatidyl-Serin | Sigma (Taufkirchen) |
| Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat (Tween20) | Roth (Karlsruhe) |
| Protein-A-Sepharose 6MB | Amersham (Braunschweig) |
| Puromycin | Biomol (Hamburg) |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Roth (Karlsruhe) |
| Saccharose | Merck (Darmstadt) |
| Salzsäure (37%) | Riedel-de-Haen (Seelze) |
| Scintillationsflüssigkeit Quicksafe A | Zinsser Analytic (Frankfurt) |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Sigma (Taufkirchen) |
| Tris-[hydroxymethyl]amino-methan (Tris) | Roth (Karlsruhe) |
| Triton-X-100 | ICN (Aurora, USA) |
| Trypsin/EDTA-Lösung | Gibco (Eggenstein) |
| Xanthin | Sigma (Taufkirchen) |

3.1.3 Radiochemikalien

| | |
|--------------------------------------|-------------------------|
| γ -[³⁵ S]-GTP | Amersham (Braunschweig) |
| 370 MBq/ml, 1 mCi/ml, >1000 Ci/mmol | |
| α -[³² P]-ATP | Amersham (Braunschweig) |
| 370 MBq/ml, 10 mCi/ml, >1000 Ci/mmol | |

3.1.4 Enzyme

| | |
|------------------------------------|--|
| Alkalische Phosphatase | Roche (Mannheim) |
| DNA-Polymerase I (Klenow Fragment) | Roche (Mannheim) |
| Lysozym | Sigma (Taufkirchen) |
| myrestoyliertes ARF1-Protein | Pierre Chardin (Valbonne, Frankreich) |
| Restriktionsendonukleasen | NEB (Schwalbach); Fermentas (Vilnius, Litauen); Roche (Mannheim) |
| PKC δ | Kolch W (Glasgow, UK) |
| RNase A | Sigma (Taufkirchen) |
| T4-DNA-Ligase | Fermentas (Vilnius, Litauen) |
| T4-DNA-Polymerase | NEB (Schwalbach) |
| T4-Polynukleotidkinase | NEB (Schwalbach) |
| Vent-DNA-Polymerase | NEB (Schwalbach) |

3.1.5 Reaktionssystemsätze

| | |
|----------------------|---|
| HRP-Detektionssystem | RPN 2106 ECL, Amersham (Braunschweig); Renaissance, NEN (Boston, USA) |
|----------------------|---|

3.1.6 Zellkultur-Medien und -Seren

| | |
|---|--------------------|
| Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) | Gibco (Eggenstein) |
| Fötale Kälber Serum (FCS) | Gibco (Eggenstein) |
| HBSS | Gibco (Eggenstein) |
| NuSerum | Gibco (Eggenstein) |
| RPMI 1640-Medium | Gibco (Eggenstein) |

3.1.7 Material für molekularbiologische Arbeiten

| | |
|---|---|
| Elektroporationsküvetten | Eurogentec (Seraing, Belgien) |
| Filterpapier (Whatman 3MM) | Schleicher&Schuell (Dassel) |
| Mikrotiterplatten (96-Well) | Nunc (Roskilde, Dänemark); Falcon (Heidelberg) |
| Nitrozellulosemembran (0,45 µm) | Schleicher&Schuell (Dassel) |
| Objektträger (Poly-L-Lysin beschichtet) | Sigma (Taufkirchen) |
| Pap-Pen Immunotech | (Marseille, Frankreich) |
| Röntgenfilme X-OMAT-AR | Kodak (Rochester, USA) |
| Ultrazentrifugationsröhrchen | Beckmann (München) |
| Zellkultur-Einweg-Plastikmaterialien | Nunc (Roskilde, Dänemark); Falcon (Heidelberg) |

3.1.8 Puffer und Lösungen

| | | | |
|----------|---|----------|--------------------------------------|
| 50x TAE: | 242 g Tris | 1x TE: | 10 mM Tris/HCl (pH 7,6) |
| | 57 ml 100% Essigsäure | | 1 mM EDTA (pH 8,0) |
| | 50 mM EDTA | | |
| | H ₂ O (bidest.) ad 1000 ml | | |
| 10x PBS: | 80 g NaCl | 10x TBS: | 121,1 g Tris |
| | 2 g KCl | | 87,66 g NaCl |
| | 14,4 g Na ₂ HPO ₄ | | H ₂ O (bidest.) ad 1000ml |
| | 2,4 g KH ₂ PO ₄ | | pH 7,5 |
| | H ₂ O (bidest.) ad 1000ml | | |
| | pH 7,4 | | |

3.1.9 Antikörper

Primäre Antikörper

| Antikörper | Verdünnung | Quelle |
|---|-------------|-------------------------------|
| Ratte-anti-Cytohesin-1 (7H2) | 1:10 (WB) | E. Kremmer (GSF, München) |
| Ratte-anti-Cytohesin-1 (2D7) | 1:10 (WB) | E. Kremmer (GSF, München) |
| Maus-anti-FLAG (M5) | 1:2000 (WB) | Sigma (Taufkirchen) |
| Maus-anti-Phosphotyrosin (4G10) | 1:2000 (WB) | UBI |
| Maus-anti-TCR (OKT3) | 2µg/ml | E. Kremmer (GSF, München) |
| Ziege-anti-Human-IgG (Fcγ-spezifisch) | 1:1000 (WB) | Dianova (Hamburg) |
| Kaninchen-anti-Human-IgG (F(ab) ² -Fragment) | 1:1000 (WB) | Rockland (Gilbertsville, USA) |

Sekundäre Antikörper

| Antikörper | Verdünnung | Quelle |
|---|-------------|-------------------------------|
| HRP-Ziege-anti-Maus | 1:2000 (WB) | Dianova (Hamburg) |
| HRP-Ziege-anti-Ratte | 1:1000 (WB) | Sigma (Taufkirchen) |
| HRP-Esel-anti-Ziege | 1:3000 (WB) | Dianova (Hamburg) |
| HRP-Ziege-anti-Kaninchen | 1:2000 (WB) | Dianova (Hamburg) |
| FITC-Ziege-anti-Human | 1:200 (IF) | Rockland (Gilbertsville, USA) |
| Texas-Red-Kaninchen-anti-actin (polyklonal) | 1:200 (IF) | Sigma (Taufkirchen) |

IF: Immunfluoreszenz; WB: Western-Blot

3.1.10 Zelllinien

| Bezeichnung | Eigenschaften | Applikation | Referenz |
|-------------|---|---|-----------------------------|
| CV-1 | fibroblastenähnliche Affen-nierenzellen („African green monkey“) | Amplifikation rekombinanter Vaccinia-Viren | Jensen <i>et al.</i> , 1964 |
| COS7 | COS7 fibroblastenähnliche CV-1-Zellen mit integriertem, replikationsdefektem SV40-Genom | transiente Expression von Proteinen durch DEAE-Dextran/Chloroquin-Transfektion bzw. durch Infektion mit rekombinan-ten Vaccinia-Viren | Gluzman, 1981 |
| J19 | Jurkat T-Zelllinie mit konstitutiv aktiviertem LFA-1 | Funktionale Studien nach transienter Transfektion bzw. Infektion mit rekombinanten Vaccinia-Viren | Weber K., nicht publiziert |
| Jurkat E6 | humane T-Zell-Linie aus Patienten mit akuter Leukämie | Funktionale Studien nach transienter Transfektion bzw. Infektion mit rekombinanten Vaccinia-Viren | Weiss <i>et al.</i> , 1984 |
| Jurkat LT | SV-40 LT-Antigen exprimierendes Jurkat E6-Derivat | Funktionale Studien nach transienter Transfektion bzw. Infektion mit rekombinanten Vaccinia-Viren | Clipstone N.A.,1992 |
| SKW3 | T-Lymphoma-Zelllinie | Zelladhäsionsanalysen | Weber <i>et al.</i> , 1997 |

3.1.11 *Escherichia coli* Stämme

| Stamm | Genotyp | Applikation | Referenz |
|-----------|--|--|---------------------------|
| BL21DE3 | <i>F</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>galλDE3</i> , <i>dcm</i> , <i>Cam^r</i> | Expression von Fusionsproteinen | Studier und Moffat, 1986 |
| MC1061 | <i>F</i> , <i>araD139</i> , (<i>ara-leu</i>)7696, <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , $\Delta(lac)_{X74}$, <i>rpsL</i> (<i>Str^r</i>), <i>hsdR2</i> ($r_K^- m_K^-$), <i>mcrA</i> , <i>mcrB</i> | Plasmidamplifikation | Casadaban and Cohen, 1980 |
| MC1061 p3 | wie MC1061, aber mit Helfer-Plasmid p3: <i>kan^r</i> , <i>bla(amp)-am</i> , <i>tet-am</i> | Amplifikation von CDM7/8-Vektoren | Casadaban and Cohen, 1980 |
| DH5α | <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> (<i>Nal^r</i>), <i>relA1</i> | Plasmidamplifikation, prokaryotische Proteinexpression | Hanahan, 1983 |

3.1.12 Virusstämme

| Bezeichnung | Applikation | Referenz |
|---------------------|---|------------------------------|
| Vaccinia (WR-Stamm) | Insertion rekombinanter DNA in das Vaccinia-Genom. Proteinexpression in Säugerzellen durch rekombinante Viren | Mackett <i>et al.</i> , 1982 |

3.1.13 DNA-Standard

| Bezeichnung | Fragmentlängen in Basen Paaren | Referenz |
|--|--|------------------------------|
| Lambda-DNA (<i>EcoRI/HindIII</i>) | 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125 | Fermentas, Vilnius (Litauen) |

3.1.14 Protein-Standard

| Protein (vorgefärbt) | Molekulargewicht | Referenz |
|--|------------------|---------------------|
| α_2 -Makroglobulin aus humanem Plasma | 180 kDa | Sigma (Taufkirchen) |
| β -Galaktosidase aus <i>E. coli</i> | 112 kDa | Sigma (Taufkirchen) |
| Fruktose-6-Phosphat-Kinase aus Kaninchenmuskel | 84 kDa | Sigma (Taufkirchen) |
| Pyruvat-Kinase aus Hühnermuskel | 64 kDa | Sigma (Taufkirchen) |
| Fumarase aus Schweineherz | 52 kDa | Sigma (Taufkirchen) |
| Laktose-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel | 35 kDa | Sigma (Taufkirchen) |
| Triosephosphat-Isomerase aus Kaninchenmuskel | 32 kDa | Sigma (Taufkirchen) |

3.1.15 Plasmide

| Bezeichnung | Resistenz | Applikation | Referenz |
|-------------|-----------|--|---------------------------|
| CDM7 | SupF; tet | eukaryotische Expression | Seed, 1987 |
| p5C7 | amp | Expression Proteinen mit cIg-Fusionsanteil | Kolanus, nicht publiziert |
| pGEX-2T | amp | prokaryotische Expression | Amersham |
| pT7Hxpflu | amp | Expression von Proteinen mit hexa-Histidinpeptid-Fusionsanteil | Kolanus, nicht publiziert |
| pLEN | amp | retrovirale Infektion, eukaryotische Expression | Adam, M.A. 1991 |
| pEGFP N1 | kan | prokaryotische Expression | Clontech |
| pN1 G418 | kan | prokaryotische Expression | Clontech |
| pTKg | amp | Vektor zur homologen Rekombination mit Vaccinia-Genom | Romeo und Seed, 1991 |

3.1.16 Oligodesoxyribonukleotide

| Bezeichnung | Sequenz (5' → 3') | Applikation |
|-----------------------|---|--|
| pN1-seq-f | CCG CTA GCG CTA CCG GAC TC | Sequenzierung von Klonierungen in pEGFP N1; pN1 G418 |
| pN1-seq-r | ATG TGG TAT GGC TGA TTA TGA TC | Sequenzierung von Klonierungen in pEGFP N1; pN1 G418 |
| cyh-f- <i>EcoRI</i> | GCGGCGGAATTCGCCACCATGGAGGAG GACGACAGC | Klonierung und PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-f- <i>HindIII</i> | GCGGCGAAGCTTGCCACCATGGAGGAG GACGACAGC | Klonierung und PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-f- <i>MluI</i> | GCGGCGACGCGTGCCACCATGGAGGAG GACGACAGC | Klonierung und PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-r- <i>NotI</i> | GGCGCGGCGGCCGCTCAGTGTCGCTTC GTGGAGGAG | Klonierung und PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-S151A-f | GGCACTACGGCAGTTCTTATGGGCCTTC CGGCTACCGGAG | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-S151A-r | CTCCGGGTAGCCGGAAGGCCCATAGGA ACTGCCGTAGTGCC | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-E157K-f | CTTCCGGCTACCCGGGAAGGCCAGAA GATCGACCGGAT | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-E157K-r | GTCGATCTTCTGGGCCTTCCCGGGTAGC CGGAAGCTCCAC | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-S238A-f | CTCCGGAATCTCTATGAGGCCATAAAA AATGAGCCCTTTAAAATCCCAGAAG | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-S238A-r | CTTCTGGGATTTTAAAGGGCTCATTTTT TATGGCCTCATAGAGATTCCGGAG | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-T277A-f | GGAGGTGGCAGGGTAAAGGCTTGGA AAGACGCTGGTTCATTCTG | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-T277A-r | CAGAATGAACCAGCGTCTTTTCCAAGC CTTTACCCTGCCACCTCC | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-T297A-f | CTTTACTACTTTGAGTATACCGTCGACA AGGAGCCCCGTGGAATC | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-T297A-r | GATTCCACGGGGCTCCTTGTCGACGGT AACTCAAAGTAGTAAAG | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-S311A-f | CCGTGGAATCATCCCTCTCGAGAATCT GGCTATCCGGGAAGTGGAGGAC | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-S311A-r | GTCCTCCACTTCCCGGATAGCCAGATTC TCGAGAGGGATGATTCCACGG | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |

| | | |
|------------------------------|--|---|
| cyh-S318A-f | CTGAGTATCCGGGAAGTGGAAGACGCC AAAAAACCAAACTGCTTTGAG | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-S318A-r | CTCAAAGCAGTTTGTTTTTTTGGCGTCTT CCTTCCCGGATACTCAG | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-S394A | GGCGCGGCGGCCGCTCAGTGTCGCTTC GTGGCGCTGACCTTCTTTTTCCG | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-T395A | GGCGCGGCGGCCGCTCAGTGTCGCTTG GCGCTGGAGACCTTATTTTTCCG | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh- S394A-T395G | GGCGCGGCGGCCGCTCAGTGTCGCTTG CCGGCGGAGACCTTCTTTTTCCG | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-S394D | GGCGCGGCGGCCGCTCAGTGTCGCTTC GTGTCGGAGACCTTCTTTTTCCG | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-T395E | GGCGCGGCGGCCGCTCAGTGTCGCTTC TCGGAGGAGACCTTCTTTTTCCG | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-S394D-T395E | GGCGCGGCGGCCGCTCAGTGTCGCTTC TCGTCGGAGACCTTCTTTTTCCG | PCR-Mutagenese von cytohesin-1 |
| cyh-PH-f- <i>MluI</i> | GCGGCGACGCGTGCCACCATGGATTCT TCAATCCAGACCGAG | Klonierung der PH- mit c-Domäne von cytohesin-1 |
| cyh-PH-r | GGCGCGGCGGCCGCTCACTTTCCAGG GACGACTAC | Klonierung der PH- Domäne von cyto- hesin-1 |
| cyh-PH-int | GATTCTTCAATCCAGACCGAG | Sequenzierung von cytohesin-1 |
| EGFP-f- <i>HindIII</i> | GCGGCGAAGCTTGCCACCATGGTGAGC AAGGGCGAGGAGC | Klonierung von EGFP als N-terminales Fusionsprotein |
| EGFP-r-3xGly- <i>MluI</i> | GCGGCGACGCGTACCTCCACCCTTGTA CAGCTCGTCCATGCCG | Klonierung von EGFP als N-terminales Fusionsprotein |
| EGFP-r- <i>NotI</i> | GCGGGCGCGGCCGCTCACTTGTACAGC TCGTCCATGCCG | Klonierung von EGFP |

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung und Stammhaltung der verwendeten Organismen

3.2.1.1 Kultivierung von Bakterien

Die Arbeiten mit Bakterien wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die eingesetzten Medien wurden bei 121°C autoklaviert und folgend mit entsprechenden Antibiotika in Form von sterilfiltrierten Lösungen versetzt. Die Anzucht der Bakterien auf LB-Agar in 10cm-Kunststoffpetrischalen erfolgte bei 37°C im Brutschrank. Die Anzucht in Flüssigmedien erfolgte bei Volumina bis zu 3 ml in Reagenzgläsern und bei Volumina über 3 ml in Erlenmeyerkolben, die maximal bis 50 % des Fassungsvermögens befüllt wurden, unter passiver Belüftung im Bakterienschüttler bei 37°C.

3.2.1.2 Anzucht von *E. coli* (MC1061, DH5 α und BL21)

E. coli-Stämme mit β -Lactamase-Kassette-tragenden Vektoren wurden zur Selektion in Medien mit 100 μ g/ml Ampicillin kultiviert. Wurden Vektoren mit Neomycin-phosphotransferase-Kassetten eingesetzt, wurden die Medien zur Selektion mit 30 μ g/ml Kanamycin versetzt.

3.2.1.3 Anzucht von *E. coli* (MC1061p3)

Der *E. coli*-Stamm, der das p3-Helfer-Plasmid trägt, wurde zur Amplifikation von CDM7-Vektoren verwendet. Zur Selektion wurde den Medien 12,5 μ g/ml Ampicillin und 7,5 μ g/ml Tetracyclin zugesetzt.

3.2.1.4 Glyzerinkulturen von *E. coli*

Die Bakterien-Stämme und Bakterienklone mit rekombinanten Plasmiden wurden zur längerfristigen Lagerung in Form von Glycerin-Dauerkulturen konserviert. Hierzu wurden 500 μ l einer Übernachtskultur mit 500 μ l 86%igem Glycerin versetzt und zur Lagerung in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß bei -80°C aufbewahrt.

3.2.2 Eukaryotische Zellkultur

3.2.2.1 Kultivierung adhärenter Zellen

Adhärenente Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10%(v/v) hitzeinaktiviertem FCS und 10 µg/ml Gentamicinsulfat in Plastik-Zellkultur-Schalen im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 96% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zur Ablösung der Zellen von ihrem Zellkultur-Kunststoff-Material wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 mg Trypsin/ml, 10 mM EDTA) inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden einmal mit frischem Medium gewaschen und zur weiteren Kultivierung in neue Kulturschalen überführt.

3.2.2.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10%(v/v) hitzeinaktiviertem FCS und 10 µg/ml Gentamicinsulfat in Plastik-Zellkultur-Flaschen im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 96% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.2.2.3 Dauerkulturen

Zur längerfristigen Lagerung wurden von den Zellen Dauerkulturen angelegt. Konfluente adhärenente Zellen einer 10cm-Kultur-Schale oder 2×10^7 Zellen einer Suspensionskultur wurden hierzu 5 Min. bei 1000x g abzentrifugiert und anschließend in 750 µl FCS resuspendiert und in ein steriles 2ml-Gefriergefäß überführt. Folgend wurden die Zellen mit 750 µl 70% FCS/ 30%DMSO (v/v) versetzt und bei -80°C eingefroren. Langfristige Lagerung der Proben erfolgte in flüssigem Stickstoff.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 Amplifizierung von DNA durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) führt zu exponentieller Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei an den komplementären Strängen hybridisierenden Oligodesoxyribonukleotiden (Saiki *et al.*, 1985; Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988).

PCR-Reaktionen wurden für analytische Experimente und Klonierungsexperimente sowie für die ortsspezifische Mutagenese angewandt.

Enzyme und Puffer wurden von New England Biolabs (Schwalbach) bezogen.

Zusammensetzung eines Standard PCR-Ansatzes:

| | | | |
|-------------------------|----|-----|------|
| 10x Reaktionspuffer | | 4 | μl |
| dNTP | je | 2,5 | mM |
| Primer | je | 200 | pM |
| Template DNA | | 200 | ng |
| Polymerase (Vent) | | 1 | Unit |
| Bidest H ₂ O | ad | 40 | μl |

Die Amplifizierung der DNA erfolgte in einer Kapillar-PCR-Maschine (Corbett Research) entsprechend der Programmierung für Strangtrennung (Denaturierung), Hybridisierung (Annealing) und Strangverlängerung (Extension). In der Regel wurden folgende Bedingungen gewählt:

| | | | |
|-----------------|----------------|---------|-------|
| | Denaturierung: | 4 Min. | 94 °C |
| (15 –25 Zyklen) | Annealing: | 30 Sek. | 55 °C |
| | Extension: | 1 Min. | 72 °C |
| | Denaturierung: | 30 Sek. | 91 °C |
| | Annealing: | 30 Sek. | 55 °C |
| | Extension: | 4 Min. | 72 °C |

3.2.3.2 Ortsspezifische Mutagenese durch überlappende PCR

Zur Generierung von Punktmutationen in rekombinanter DNA wurde ein abgewandeltes PCR-Verfahren nach (Ausubel *et al.*, 1987) angewandt. Bei diesem Verfahren wird eine Punktmutation in den betreffenden DNA-Abschnitt, bzw. das betreffende Gen eingeführt. Dies wird durch punktmutationstragende Primer (3.1.16) mittels einer PCR gewährleistet, wie unter 3.2.3.1 beschrieben. Zunächst wurden zwei entgegengesetzt orientierte Primer konstruiert, die jeweils in ihrer 5'-3' Orientierung zu den Enden des kodierenden Bereichs für das betreffende Gen wiesen. Die Länge der Primer lag in der Regel zwischen 25 und 30 bp, und sie trugen etwa in ihrer Mitte die spezifische Mutation. Diese Primer waren in einem Bereich von ca. 20 bp komplementär zueinander. Im ersten Schritt wurde der vordere Teil-Abschnitt der betreffenden DNA durch PCR amplifiziert. Dazu wurde der entsprechende vordere Primer mit dem entsprechenden Primer, der die Mutation trug, verwendet. Die Amplifizierung des hinteren DNA-Teil-Abschnitts erfolgte in analoger Weise. Die beiden so amplifizierten DNA-Teil-Abschnitte wiesen nun an den Enden, die mit Hilfe der Mutagenese-Primern generiert wurden, die entsprechende Punktmutation auf. Diese DNA-Abschnitte wurden nach dem unter 3.2.3.5 beschriebenen Verfahren präpariert und je 1 μl davon gemeinsam direkt als Template für die folgende PCR eingesetzt. Die zwei DNA-Teil-Abschnitte wurden in der folgenden PCR vereinigt. Hierzu wurden nur die beiden Primer

ohne Mutation eingesetzt, die schon zur Amplifizierung der beiden DNA-Teil-Abschnitte verwendet wurden. Durch die PCR wurde hier im ersten Zyklus die DNA elongiert, ausgehend von dem komplementären Bereich der DNA-Teil-Abschnitte. Der hieraus resultierende komplette punktmutierte DNA-Abschnitt, der nun die Sequenz der beiden Teil-Abschnitte in sich vereinigte, wurde in den folgenden Zyklen amplifiziert und konnte anschließend zur Klonierung in *E. coli* verwendet werden. Sämtliche Konstrukte wurden durch Doppelstrang-Sequenzierung überprüft.

3.2.3.3 Fällung von PCR Produkten

Das Volumen des PCR Ansatzes wurde durch Zugabe von H₂O auf 200 µl ergänzt und mit 200 µl phenolischer Lösung (Phenol in TE äquilibriert) versetzt. Durch Ausschütteln wurden die Proteine inaktiviert und aus der wäßrigen Phase entfernt. Nach Überführen der wäßrigen Phase in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß wurde durch Zugabe von 1 µl Glycogen (10 µg/µl) und 800 µl Ethanol die DNA bei 14000x g in der Zentrifuge präzipitiert. Die sedimentierte DNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend in 30 µl H₂O gelöst.

3.2.3.4 Restriktionen von DNA-Fragmenten

Die Fragmentierung von DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Angaben der Hersteller. (New England Biolabs und Boeringer Mannheim)

3.2.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Klonierung wurden ca. 500 ng DNA-Fragmente in einem niederschmelzenden 1%igem Agarosegel (LMP-Agarose) elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden durch inkorporiertes Ethidiumbromid unter UV-Licht ($\lambda = 365 \text{ nm}$) visualisiert und der entsprechende Gelbereich mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die isolierten Gelfragmente wurden anschließend bei 65 °C aufgeschmolzen und die so erhaltenen DNA direkt für die Ligation verwendet.

3.2.3.6 5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die freien 5'-Phosphatgruppen geschnittener Plasmidvektoren wurden durch alkalische Phosphatase (Boeringer Mannheim) entfernt, um Religation der Vektoren zu verhindern.

3.2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden nach dem beschriebenen Verfahren (3.2.3.5) isoliert und mit T4-DNA-Ligase (MBI) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl ligiert. Je nach Bedarf wurden 1-4 µl Vektor-DNA und 1-4 µl Insertionselement-DNA verwendet. Das Gesamtvolumen der vereinigten DNA-Lösungen sollten jedoch 5 µl nicht übersteigen. Hierbei wurde in der Regel ein dreifacher molarer Überschuß an Insertionselement-DNA gegenüber der Vektor-DNA verwendet. Die Ligation von DNA mit GC-reichen kohäsiven Enden erfolgte bei Raumtemperatur für 2 Stunden, während AT-reiche kohäsive DNA-Enden bei 16°C über Nacht ligiert wurden.

Ligationspuffer: 40 mM Tris/HCl
 10 mM MgCl₂
 5 mM DTT
 0,5 mM ATP
 pH 7,8

3.2.3.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration gereinigter dsDNA wurde photometrisch durch das Absorptionsvermögen der DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. $1 A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$

3.2.4 Isolierung von Plasmid DNA

3.2.4.1 Plasmid isolation „Miniprep“

Zur Analyse rekombinanter Plasmid-DNA wurden Plasmide nach modifiziertem Verfahren der von Birnboim und Doly beschriebenen Methode isoliert (Birnboim und Doly, 1979).

1,5 ml einer *E. coli* Übernacht-Kultur wurden 1 Min. bei 14000x g zentrifugiert. Anschließend wurde das resultierende Sediment in 200 µl Puffer-1 resuspendiert und folgend zur alkalischen Lyse der Zellen mit 300 µl Puffer-2 versetzt. Nach 5 minütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 200 µl Puffer-3. Der Ansatz wurde vorsichtig durchmischt und 5 Min. auf Eis inkubiert, gefolgt von einer 15 minütigen Zentrifugation bei 14000x g. Der wäßrige Überstand wurde in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl phenolischer Lösung (Phenol, in TE äquilibriert) ausgeschüttelt und anschließend 5 Min. bei 14000x g zentrifugiert um Proteine aus der wäßrigen Phase zu entfernen. Der resultierende Überstand wurde in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt, mit dem 0,8 fachen des

Volumens mit Isopropanol versetzt und bei 4 °C für 15 Min. bei 14000x g zentrifugiert, das Sediment zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend bei 42 °C getrocknet. Zum Lösen der DNA wurde die Probe nach dem Trocknen in 30 µl TE-Puffer mit 10 µg RNase A zur Degradation der RNA aufgenommen.

Puffer 1: 10 mM EDTA (pH 8,0)

Puffer 2: 0,2 M NaOH
1% (w/v) SDS

Puffer 3: 2,5 M KOAc
2,5 M HOAc
pH 4,7

3.2.4.2 Plasmidisolierung im Cäsiumchloridgradienten „Maxiprep“

Zur Gewinnung von Plasmiden in hoher Qualität und Quantität wurde ein abgewandeltes Verfahren von Ish-Horowitz und Burke verwendet (Ish-Horowitz und Burke, 1981). 1000 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden 20 Min. bei 4500x g zentrifugiert, die sedimentierten Bakterien in 40 ml Puffer-1 resuspendiert und zur Lyse mit 80 ml Puffer-2 versetzt. Nach 5 minütiger Inkubation wurde 40 ml Puffer-3 hinzugegeben, gut durchmischt und bei 4500x g für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Verbandmull in einen 500 ml Zentrifugenbecher filtriert, mit 0,7 Anteilen des Volumens mit Isopropanol versetzt und bei 4°C für 10 Min. bei 10000x g zentrifugiert, das resultierende Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 4 ml Puffer-1 aufgenommen. Dieser DNA-haltigen Lösung wurden 500 µl Ethidiumbromid (10mg/ml) und 5,5 g CsCl hinzugefügt. Dann wurden bei 50 °C gelöste und ungelöste Bestandteile durch 5 minütige Zentrifugation bei 5000x g entfernt. Der klare Überstand wurde in ein Ultrazentrifugationsgefäß überführt und bei 200.000x g für 5 Stunden zentrifugiert. Das Zentrifugengefäß wurde auf Höhe der von Ethidiumbromid dunkelrot gefärbten Plasmid-DNA-Bande mit einer Spritze durchstoßen, um die DNA-haltige Lösung abzusaugen. Das Ethidiumbromid wurde anschließend durch mehrmaliges Ausschütteln mit n-Butanol (gesättigt mit 1 M NaCl) entfernt. Zur Fällung der DNA wurden der Lösung ein Volumenäquivalent 1 M NH₄OAc und drei Volumenäquivalente Ethanol hinzugefügt, die DNA anschließend durch Zentrifugation für 10 Min. bei 7000x g sedimentiert, der resultierende Niederschlag mit 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und zum Lösen der Plasmid-DNA in 1 ml H₂O aufgenommen.

3.2.5 Transformationsverfahren bei *E. coli*

3.2.5.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterien

Das nachfolgend beschriebene Verfahren zur Herstellung kompetenter *E. coli* basiert auf dem Protokoll von Mike Scott (UCSF).

Die entsprechenden *E. coli*-Stämme wurden auf LB-Agarplatten vereinzelt und über Nacht bei 37°C inkubiert. 20 ml TYM (Trypton-Yeast-Medium) wurden im 250ml-Erlenmeyerkolben mit einer Bakterienkolonie inokuliert und bei 37°C und 200 Upm im Bakterien-schüttler inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0.5 - 0.8 wurden mit dieser Vorkultur 500 ml TYM in einen 3000ml-Erlenmeyerkolben inokuliert und im Bakterien-schüttler bei 37°C und 200 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 kultiviert. Folgend wurde die Kultur rasch auf 4°C gekühlt und für 10 Min. bei 3000x g abzentrifugiert, die sedimentierten Bakterien in 100 ml kaltem Tfb I (Transformation Buffer) vorsichtig resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml Tfb II aufgenommen, zu je 200µl in sterile 1,5ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte bei -80°C.

TYM: 2% (w/v) Bacto-Trypton
 0,5% /w/v) Hefe-Extrakt
 0,1 M NaCl
 10 mM MgSO₄

Tfb I: 30 mM KOAc
 100 mM KCl
 10 mM CaCl₂
 15% (v/v) Glyzerin
 50 mM MnCl₂

Tfb II: 10 mM HEPES (pH 7,0)
 75 mM CaCl₂
 10 mM KCl
 15% (v/v) Glyzerin)

3.2.5.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

100 μ l einer kompetenten *E. coli*-Suspension wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 μ l eines 50 μ l Ligationsansatzes (3.2.3.7) bzw. 5 ng einer Plasmid-DNA-Präparation vermischt und für 30 Min. auf Eis inkubiert, gefolgt von einer weiteren Inkubation für 3 Min. bei 41°C. Die Zellen wurden anschließend auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Selektion auf Transformanden enthielten die Agarplatten Antibiotika, entsprechend der plasmidkodierten Resistenzen.

3.2.5.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Die Zellen der entsprechenden *E. coli*-Stämme wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 unter aeroben Bedingungen bei 37°C in 400 ml LB-Medium angezogen und anschließend durch Zentrifugation bei 5000x g geerntet. Die sedimentierten Zellen wurde dreimal mit je 200 ml eiskaltem sterilem 10 %igem Glycerin gewaschen, um die Ionenstärke der Suspension herabzusetzen. Anschließend wurden die Zellen in 4 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert und zu je 40 μ l aliquotiert. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei –80°C.

3.2.5.4 Elektroporation von *E. coli*

Zu 40 μ l Zellen wurden je 10 μ l DNA in H₂O zugegeben. Die Transformation erfolgte in Elektroporationsküvetten mit einem Spaltabstand von 2 mm durch einen elektrischen Puls (2000 V, 800 Ω , 25 μ F, 16 bis 18 ms) (Gen-Pulser, BioRad). Anschließend wurden die Zellen zur phänotypischen Expression der Antibiotikaresistenzen für 1 Stunde bei 37°C in 1 ml LB unter Zusatz von 50 μ g Ampicillin bzw. 30 μ g Kanamycin inkubiert, abhängig vom verwendeten Vektor.

3.2.6 Transfektionsverfahren eukaryotischer Zellen

3.2.6.1 DEAE-Dextran/Chloroquin-Transfektion

Diese Transfektionsmethode wurde bei COS7-Zellen zur transienten Expression von Fusionsproteinen verwendet.

Die Transfektionsprozedur orientiert sich an dem Protokoll von Lopata *et al.* (1984). Zur Steigerung der Transfektionseffizienz wurden jedoch verschiedene Parameter modifiziert (Sussman und Milman, 1984).

Bei dieser Methode wird die Plasmid-DNA im Komplex mit DEAE-Dextran über einen bisher nicht vollständig geklärten Mechanismus aufgenommen. Chloroquin begünstigt diesen Prozeß vermutlich dadurch, daß es eine zu starke Ansäuerung der DNA-enthaltenden Endosomen verhindert.

COS7-Zellen einer dicht bewachsenen 10cm-Schale wurden am Vorabend trypsiniert und auf neue Schalen verteilt, so daß die Zellen zur Transfektion am nächsten Tag eine Konfluenz von etwa 80% aufwiesen. Zur Transfektion wurde 5 ml DMEM/10% NuSerum mit 5 µg Plasmid-DNA versetzt und folgend mit 200 µl einer 25-fach konzentrierten DEAE-Dextran/Chloroquin-Lösung vermischt. Dieser Ansatz wurde auf die zuvor mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. In der Regel waren nach ca. 3 – 5 stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ ca. 80% der Zellen abgerundet, aber noch nicht abgelöst. Das Medium wurde in diesem Stadium abgenommen, durch 5 ml PBS/10% (v/v) DMSO ersetzt und nach zweiminütiger Inkubation wieder abgenommen. Folgend wurden die Zellen wieder in 10 ml DMEM/10% FCS bei 37°C/5% CO₂ inkubiert. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung trypsiniert und 1:1 auf frische Platten überführt. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ konnten die Zellen zur Analyse der rekombinant expremierten Proteine eingesetzt werden.

25x DEAE-Dextran/Chloroquin: 10 mg/ml (w/v) DEAE-Dextran
 2,5 mM Chloroquinphosphat in PBS
 Sterilisation durch Filtration
 Lagerung in 1ml-Aliquots bei –20°C

3.2.6.2 Transfektion durch Calcium-Phosphat-Methode

Die Transfektion nach diesem Verfahren wurde bei adhärenenten Zellen angewandt. Zu 500 μ l 250 mM CaCl_2 wurden 10 μ g Plasmid-DNA gegeben. Diese Mischung wurde unter Schütteln sukzessive in 500 μ l 2x HEBS-Lösung getropft und nach fünf Minuten unter Schwenken auf 80% konfluente Zellen in 5 ml DMEM/10% FCS gegeben. Nach 12 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurde das Medium durch frisches DMEM/10% FCS ersetzt. Abschließend wurden die Zellen weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

2x HEBS-Lösung: 270 mM NaCl
 12 mM D^+ -Glukose
 100 mM KCl
 1,4 mM Na_2HPO_4
 40 mM HEPES
 pH 7,05 eingestellt mit 5 M NaOH
 Sterilisation durch Filtration
 Lagerung bei -20°C

3.2.6.3 Transfektion durch Elektroporation

Die Transfektion humaner und muriner Suspensionszellen erfolgte durch Elektroporation. Hierzu wurden $1,5 \times 10^7$ Zellen 5 Min. bei 1000x g abzentrifugiert und in 500 μ l RPMI/50% FCS aufgenommen, mit 10 –20 μ g Plasmid-DNA versetzt und für 30 Min. bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Elektroporation erfolgte in Elektroporationsküvetten mit 4 mm Spaltabstand. Die optimalen Parameter für Spannung und Kapazität wurde je nach Zelltyp und Küvettencharge neu bestimmt. Die Spannung für den elektrischen Puls variierte von 220 - 310 V, bei einer Kapazität von 900 - 1200 μ F. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 10 ml RPMI/10% FCS überführt und zur Expression 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

3.2.7 Herstellung rekombinanter Viren

3.2.7.1 Herstellung rekombinanter Vaccinia Viren

Das Vaccinia-Virus, ein Mitglied der Poxvirus-Familie, wird als virales System für die transiente Expression von Genen in Säugerzellen verwendet (Panicali und Paoletti, 1982; Mackett *et al.*, 1982). Der Vorteil des Vaccinia-Systems besteht im weiten Spektrum von

Wirtszellen und hoher Infektionsrate, gepaart mit einer hohen Expression der rekombinanten Gene. Von einer 10cm-Schale konfluenter CV-1-Zellen wurde das Medium abgenommen und durch 2,5 ml DMEM (ohne Zusätze) ersetzt. Die Zellen wurden mit 10^8 - 10^9 pfu des Vaccinia-Virus (Wildtyp) pro ml Medium infiziert und 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch 5 ml DMEM/10% FCS ersetzt und 10 µg pTKg-Plasmid-DNA zur Rekombination mit dem Vaccinia-Genom transfiziert, wie unter 3.2.6.2 beschrieben. Die so transfizierten und infizierten Zellen wurden geerntet und 5 Min. bei 1000x g zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 500 µl 10 mM Tris/HCl (pH 9,0) aufgenommen und durch wechselndes Einfrieren (in Trockeneis/Isopropanol) und Auftauen aufgebrochen. Diese Suspension wurde im Ultraschallbad (Transsonic Digital - Typ T480/H-2, Firma ELMA) bei maximaler Beschallungsstärke für 30 Sek. sonifiziert und anschließend bei 2500x g für 5 Min. zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und der virenhaltige Überstand bei -20°C gelagert. Die so präparierte Suspension enthielt sowohl Wildtypvirus als auch rekombinanten Vaccinia-Virus. Auf rekombinanten Vaccinia-Virus mußte daher selektiert werden (3.2.7.2).

3.2.7.2 Selektion rekombinanter Vaccinia-Viren

Die Selektion rekombinanter Vaccinia-Viren erfolgte mittels Mycophenolsäure (MPA). MPA hemmt die Guanylat (GMP) -Synthese der Zelle und somit folglich auch die Replikation von Virus (Wildtyp).

Zellen die mit rekombinanten Viren infizierten wurden koexprimieren das pTKg-vektorkodierte gpt Gen von *E. coli*, welches für die Guanin-Phosphoribosyltransferase (XGPRT) kodiert. In Gegenwart von Xanthin und Hypoxanthin kann die Inhibition der GMP-Biosynthese umgangen werden, da die XGPRT diese beiden Substrate zur GMP-Synthese verwenden kann (Falkner und Moss, 1988).

Zur Selektion wurden konfluente CV-1-Zellen auf 6cm-Schalen für 6 Stunden mit 3 ml Selektionsmedium vorinkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und durch 1,5 ml DMEM (ohne Zusätze) ersetzt, die Zellen mit der Suspension, die rekombinante Viren enthielt infiziert (3.2.7.1) und für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Folgend wurde das Medium durch 3 ml Selektionsmedium ersetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 36 – 48 Stunden wurden durch rekombinanten Virus lysierte Zellbereiche als Viren-Plaques sichtbar. Die infizierten Zellen am Rand der Plaques wurden unter sterilen Bedingungen abgenommen, in 200 µl 10 mM Tris (pH 9,5) lysiert und für eine erneute Selektionsrunde

verwendet. Nach drei bis vier Selektionsrunden lag der rekombinante Virus in aller Regel frei vom Wildtypvirus vor.

Selektionsmedium: 190 ml DMEM
2,5% (v/v) FCS
10 mg MPA
3 mg Hypoxanthin
100 mg Xanthin

3.2.7.3 Identifikation rekombinanter Vaccinia-Viren

Rekombinante Vaccinia-Viren wurden durch Immunofärbung von Viren-Plaques identifiziert. Viren-Plaques, die nach Infektion in einem dichten Zellrasen entstanden, wurden dazu mittels spezifischer Antikörper auf rekombinant exprimierte Proteine untersucht. Konfluente CV-1-Zellen, auf einer 6cm-Schale, wurden mit den zu testenden Vaccinia-Viren infiziert (3.2.7.1) und in DMEM/10% FCS Medium bei 37°C und 5% CO₂ bis zum Auftreten gut sichtbarer Viren-Plaques inkubiert. Die Zellen, die nach der Infektion mit rekombinanten Viren die entsprechenden Proteine überexprimierten, wurden mit PBS gewaschen und zur Detektion der Proteine mit spezifischen Antikörpern in 1 ml PBS inkubiert. Nach einstündiger Inkubation bei RT auf einem Kippschüttler wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und erneut mit 2 µg eines sekundären, mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörpers in 1 ml PBS für 1 Stunde inkubiert. Die Detektion des überexprimierten Proteins erfolgte durch Zugabe von 2,5 ml AP-Puffer, 8,25 µl BCIP (50 mg/ml) und 16,5 µl NBT (50 mg/ml). Zellen, die das gewünschte Protein exprimierten, färbten sich dabei nach etwa 10 – 20 Min. violett, aufgrund der Umsetzung des Farbstoffes durch die alkalische Phosphatase.

AP-Puffer: 100 mM Tris/HCl (pH 9,5)
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂

3.2.7.4 Amplifikation rekombinanter Vaccinia-Viren

Konfluente CV-1-Zellen, auf einer 15cm-Zellkulturschale, wurden mit 20 µl einer Suspension rekombinanter Vaccinia-Viren in 2,5 ml DMEM (ohne Zusätze) infiziert und 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch 10 ml

DMEM/10% FCS ersetzt. In der Regel waren nach 12 - 36 Stunden praktisch alle Zellen gleichmäßig infiziert. In diesem Stadium wurden die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und nach erneuter Zugabe von 5 ml PBS mit einem sterilen Plastikzellschaber von der Platte abgelöst. Nach 5 Min. Zentrifugation bei 1000x g wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment mit 500 µl 10 mM Tris/HCl (pH 9,0) versetzt, zur schnelleren Lyse eingefroren, wieder aufgetaut und im Ultraschallbad (Transsonic Digital – Typ T480/H-2, Firma ELMA) bei maximaler Beschallungsstärke für 30 Sek. sonifiziert. Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation für 5 Min. bei 3000x g entfernt. Die Lagerung der so gewonnenen Virensuspension erfolgte bei –20°C.

3.2.7.5 Protein-Expression mit Hilfe rekombinanter Vaccinia-Viren

Zur Expression von Proteinen, mit Hilfe des Vaccinia-Virus-Expressionssystems, wurden 3 x 10⁶ Suspensionszellen 5 Min. bei 1000x g zentrifugiert und in 400 µl RPMI (ohne Zusätze) resuspendiert. Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 (multiplicity of infection; 10 Viren pro Zelle) mit rekombinantem Vaccinia-Virus infiziert und 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf 6cm-Zellkulturschalen überführt, mit 5 ml RPMI/10% FCS versetzt und zur Expression 5 bis 8 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und nach dieser Phase für die Analysen eingesetzt.

3.2.8 Elektrophoreseverfahren

3.2.8.1 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA wurden 0,7 bis 1,2 %ige Agarosegele verwendet, mit 10 µg/ml Ethidiumbromid zur Detektion unter UV-Licht. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Die Elektrophorese erfolgte horizontal bei einer Spannung von 8 V/cm.

3.2.8.2 Elektrophorese von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte durch die diskontinuierliche, eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden 8%ige, 10%ige oder 12%ige Gele verwendet mit einem Acrylamid/Bisacrylamid-Verhältnis von 29 zu 1. Die Elektrophorese erfolgte vertikal bei einer Spannung von 15 V/cm. Die Proben wurden vor dem Auftrag in SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 Min. bei 95°C inkubiert.

| | |
|----------------------|--|
| 10x SDS-Laufpuffer: | 250 mM Tris 1,92 M Glycin 1% (w/v) SDS |
| 5x SDS-Probenpuffer: | 50 mM Tris/Cl pH6,8 100 mM DTT 2% (w/v) SDS 10% Glyzerin 0,05 % Bromphenolblau |

3.2.8.3 Elektrophorese von Proteinen unter nicht-denaturierenden Bedingungen

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter nicht-denaturierenden Bedingungen erfolgte durch eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1994). Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden 7,5%ige Trenn-Gele verwendet mit einem Acrylamid/Bisacrylamid-Verhältnis von 29 zu 1. Die Konzentration von Tris/Cl pH 8,8 im Trenngel betrug 750 mM. Die Konzentration von Tris/Cl pH 7 im 5%igem Sammelgel betrug 150 mM. Zur Verbesserung der Laufeigenschaften enthielten die Gele 0,1 % NonidetP-40. Die Elektrophorese erfolgte vertikal bei einer Spannung von 10V/cm.

| | |
|------------------|--|
| 1x Probenpuffer: | 20 mM Tris/Cl pH 7 3% Glyzerin 0,01 % Bromphenolblau |
|------------------|--|

| | |
|-------------|-----------------------------|
| Laufpuffer: | 25 mM Tris 200 mM Glycin |
|-------------|-----------------------------|

3.2.9 Proteinbiochemische Methoden

3.2.9.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration in Lösung wurde durch die Bradford-Methode bestimmt (Bradford, 1976). Die Messung basiert auf der Absorptionsänderung des gebundenen Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau bei einer Wellenlänge von 595 nm.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine im Handel erhältliche, konzentrierte Bradford-Reagenzlösung (BioRad) 1:5 mit H₂O verdünnt. Jeweils 1 ml dieser verdünnten Farbstofflösung wurde mit 10 µl der Proteinprobe unbekannter Konzentration vermischt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine Eichkurve verschiedener bekannter Konzentrationen erstellt, BSA als Standardprotein (1, 2, 5, 10, 20 und 30 µg/ml) (Sigma, Fraktion V). Der erhaltene Meßwert wurde anschließend mit den Daten der Eichkurve verglichen und somit die Proteinkonzentration ermittelt.

3.2.9.2 Färbung von Proteinen in Gelen durch Coomassie-blau

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden durch Coomassie-blau-Färbung der Polyacrylamidgele visualisiert. Das Polyacrylamidgel wurde hierzu etwa 60 Min. bei RT auf einem Tischschüttler bei 60 Upm in der Färbelösung geschwenkt und anschließend dreimal 30 Min. in der Entfärbelösung gewaschen. Zum Trocknen wurde das Gel luftblasenfrei auf ein Filterpapier aufgebracht und für 1 Stunde bei 80°C in einem Vakuum-Geltrockner getrocknet.

Färbelösung: 50% (v/v) Methanol
 10% (v/v) Essigsäure
 0,2% (w/v) Coomassie-blau R-250
 H₂O als Lösungsmittel

Entfärbelösung: 20% (v/v) Isopropanol
 10% (v/v) Essigsäure
 H₂O als Lösungsmittel

3.2.9.3 Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur Gewinnung reiner Proteine wurden die gewünschten Proteine rekombinant in *E. coli* exprimiert, mit einem N-terminaler Fusionsanteil, bestehend aus dem Glutathion-S-Transferase-Protein. Die jeweilige cDNA wurde hierzu in dem Vektor pGEX-2T (Amersham Pharmacia Biotech) subkloniert und in *E. coli* BL21DE3 transformiert. 200 ml einer Flüssigkultur der rekombinanten *E. coli*-Bakterien wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bei 37°C unter aeroben Bedingungen inkubiert und zur Induktion des Promotors des Expressionsplasmids mit 2 mM IPTG versetzt. Nach weiteren 4 Stunden wurden die Bakterienkulturen abzentrifugiert, in 6 ml Lysepuffer resuspendiert und durch Ultraschall

lysiert. Die Lysate wurden zunächst bei 30000x g und folgend bei 100000x g abzentrifugiert und der klare Überstand mit 0,5 ml GSH-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) für 1 Stunde unter Schwenken bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in TBS mit 2 mM DTT wurde die GSH-Sepharose einmal in 50 mM Tris, pH 8, 2 mM DTT gewaschen und anschließend das GST-Fusionsprotein in 500 µl 50 mM Tris, pH 8 mit 10 mM GSH eluiert. Die Proteine wurden gegen 50 mM NaCl, 20 mM Tris/Cl, pH 7,2 dialysiert und bei -20°C gelagert.

Lysepuffer: 20 mM Tris pH 8
100 mM NaCl
1 mM EDTA
2 mM DTT
0,1 mM PMSF
2 mM Benzamidin

3.2.9.4 Reinigung von Hexahistidin-Fusionsproteinen

Zur Gewinnung reiner Proteine wurden die gewünschten Proteine rekombinant mit einem N-terminalen Hexahistidin-Fusionsanteil in *E. coli* exprimiert, unter Verwendung des Vektors pT7Hxpflu. Bei diesem Vektor wird das klonierte Gen (6xHis-Fusionskonstrukt) unter der Kontrolle des T7-Bakteriophagen-Promotors exprimiert. Das Plasmid enthält den lac-Operator und die Sequenz des lac-Repressors. Mit Hilfe des *E. coli*-Stammes BL21DE3 (Studier und Moffat, 1986), der chromosomal das T7-RNA-Polymerasegen trägt, wird das klonierte Gen exprimiert. Durch Induktion mit IPTG, das den lac-Repressor bindet und so die T7-RNA-Polymerase getriebene Expression induziert, erfolgt hier die Expression analog dem pT7-Expressionssystem (Tabor und Richardson, 1985).

Die jeweiligen cDNAs wurden in dem Vektor pT7Hxpflu subkloniert und in *E. coli* BL21DE3 transformiert. 200 ml einer Flüssigkultur der rekombinanten *E. coli*-Bakterien wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bei 37°C unter aeroben Bedingungen inkubiert und zur Induktion der Expression mit 2 mM IPTG versetzt. Nach weiteren 4 Stunden wurden die Bakterienkulturen abzentrifugiert, in 6 ml Lysepuffer resuspendiert und durch Ultraschall lysiert. Die Lysate wurden zunächst bei 30000x g und folgend bei 100000x g abzentrifugiert und der klare Überstand mit 0,5 ml Nickel-NTA-Agarose für 1 Stunde unter Schwenken bei 4°C inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit je 50 ml Waschpuffer wurde das gebundene 6xHis-Fusionsprotein in zwei Schritten mit je 2,5 ml Elutionspuffer bei 4°C während 10

Minuten eluiert. Die Proteine wurden gegen 50 mM NaCl, 20 mM Tris/Cl, pH 7,2 dialysiert und bei -20°C gelagert.

Lysepuffer: 50 mM Tris/Cl, pH 8,0
 300 mM NaCl
 2 mM Benzamidin
 100 µg/ml Lysozym
 5 µg/ml Aprotinin
 5 µg/ml Leupeptin

Waschpuffer: 50 mM Tris/Cl, pH 8,0
 300 mM NaCl
 5 mM Imidazol
 10% (v/v) Glycerin

Elutionspuffer: 50 mM Tris/Cl, pH 8,0
 300 mM NaCl
 200 mM Imidazol
 10% (v/v) Glycerin

3.2.9.5 Zelluläre Fraktionierung

Zur Separierung von zytoplasmatischer, zellmembranhaltiger, zytoskeletthaltiger und zellkernhaltiger Fraktion wurde die zelluläre Fraktionierung in Anlehnung an das Protokoll von Meller durchgeführt (Meller *et al.*, 1996).

Die Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen, bei 1000x g zentrifugiert und das resultierende Zellsediment in 0,5 ml eiskaltem hypotonischen Puffer resuspendiert. Zur besseren Lyse und Scherung der Zellen wurde die Zellsuspension 15 mal mit einer Spritze durch eine Kanüle mit 0,2 mm Durchmesser auf- und abpipettiert. Die Zellkerne wurde anschließend durch Zentrifugation bei 1000x g für 10 Min. abgetrennt und der resultierende Überstand zur weiteren Fraktionierung verwendet.

- a) Sollten die Membran-, Zytoskelett- und die zytoplasmatische-Fraktion voneinander separiert werden wurde wie folgt verfahren:

Der Überstand wurde bei 50000x g für 30 Min. zentrifugiert, um Membranfragmente so wie Zytoskelettkomponenten abzutrennen. Der resultierende Überstand bestand hauptsächlich aus den zytoplasmatischen Bestandteilen der Zelle und konnte zu weiteren Analysezwecken verwendet werden, während das Sediment weiter aufgetrennt wurde. Das Sediment wurde in hypotonischem Puffer resuspendiert, der zusätzlich 150 mM NaCl und 1 % (v/v) des nicht ionischen Detergenzes Nonidet P-40 enthielt. Die Suspension wurde folgend bei 15000x g für 30 Min. zentrifugiert. Das resultierende Sediment enthielt hauptsächlich Zytoskelettkomponenten, während sich die gelösten Membranbestandteile im Überstand befanden. Die so gewonnenen Fraktionen wurden zu weiteren Analyse verwendet.

- b) Sollte ausschließlich die zytoskeletthaltige Fraktion präpariert werden, wurde wie folgt verfahren:

Der Überstand wurde mit 2 M NaCl bis zu einer Konzentration von 150 mM NaCl angereichert und mit Nonidet P-40 versetzt, so daß eine Endkonzentration von 1 % (v/v) erreicht wurde. Durch Zentrifugation bei 15000x g für 30 Min. wurden die Zellfraktionen separiert. Im resultierenden Sediment befanden sich hauptsächlich Zytoskelettkomponenten, während sich im Überstand die zytoplasmatischen Bestandteile sowie die gelösten Membranbestandteile befanden. Die so erhaltenen Fraktionen wurden zur weiteren Analyse verwendet

Hypotonischer Puffer: 10 mM Hepes, pH 7,5
 10 mM KCl
 10 mM MgCl₂
 0,5 mM DTT
 10 µg/ml Leupeptin
 10 µg/ml Aprotinin
 1 mM PMSF

3.2.9.6 Gesamtzellysat

Gesamtzellysate wurden von Säugerzellen angefertigt, um für weitere Analysen verwendet zu werden. Die Zellen wurden geerntet, abzentrifugiert und zweimal mit 1x PBS gewaschen. Die durch Zentrifugation sedimentierten Zellen wurden in 500 µl eiskaltem Triton-X-100-Lysispuffer resuspendiert und für 30 Min. unter Schwenken auf Eis inkubiert. Folgend

wurden unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 20800x g und 4°C für 15 Min. abgetrennt. Der resultierende Überstand, das Gesamtzellsat, wurde abgenommen und zur Analyse einer Immunpräzipitation (3.2.11.2) oder direkt einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.2.8.2) unterzogen.

Triton-X-100-Lysispuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8,0
150 mM NaCl
1% (v/v) Triton-X-100

3.2.10 Proteinbiophysikalische Methoden

3.2.10.1 Messung von Protein-Lipid-Interaktionen

Die Interaktion der Cytohesin-1-PH-Domäne mit Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PI(3,4,5)P₃) wurde mit Hilfe der IAsys™ Affinity-Sensor-Technologie nachgewiesen, in Anlehnung an das zuvor beschriebene Verfahren von W. Nagel (Nagel *et al.*, 1998b).

Eine hydrophobe Küvette (FCH-0601) wurde mit einem Lipidmonolayer bestehend aus 70% β -palmitoyl- γ -oleoyl-L- α -phosphatidylcholin (POPC), 30 % Dioleoyl-l- α -phosphatidyl-DL-glycerol (POPG) oder einer Lipidmischung aus 60 % POPC, 30 % POPG und 10% PI(3,4,5)P₃ beschichtet. Die Küvette wurde folgend nacheinander mit 0,1 M HCl, PBS, 10 mM NaOH und abschließend mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Küvette mit Bindungspuffer äquilibriert und gereinigtes GST-Fusionsprotein (3.2.9.3) gelöst in Bindungspuffer, zugesetzt, so daß eine Endkonzentration von 150 nM erreicht wurde. Die Bindungskinetik der GST-Fusionsproteine wurde über einen Zeitraum von 500 Sekunden dokumentiert. Die GST-Fusionsproteinlösung wurde folgend durch Bindungspuffer ersetzt und damit die Dissoziation der Proteine eingeleitet. Die Interaktionsprofile für jedes Fusionsprotein wurden mit Hilfe der gerätespezifischen Software „FASTfit kinetics Analyse“ von IAsys™ aufgezeichnet.

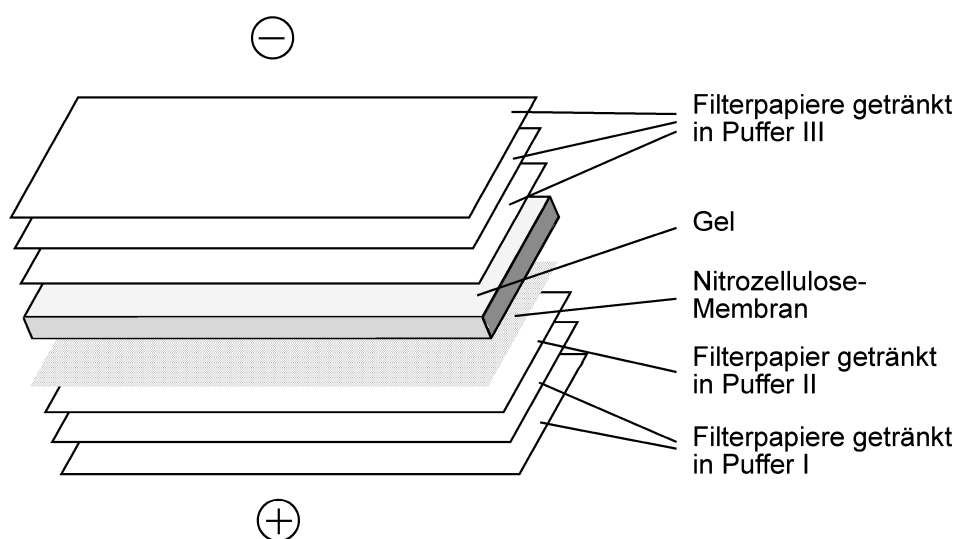
3.2.11 Proteinimmunologische Methoden

3.2.11.1 Immunoblot

Proteine wurden durch Elektrophorese in Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt (3.2.8.2 u. 3.2.8.3) und anschließend auf Nitrozellulose-Membranen übertragen. Der Transfer erfolgte nach dem „Semi-Dry-Blotting-Verfahren“ zwischen zwei Carbonglaselektroden bei einer Spannung von

20 V/cm während 1 Stunde. Hierzu wurden sechs Whatman (3MM) Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran mit den Ausmaßen des Gels vorbereitet. Zwei mit Puffer-I getränkte Filterpapiere, gefolgt von einem Filterpapier getränkt in Puffer-II, wurden deckungsgleich auf die kathodische Elektrode aufgelegt. Die Nitrozellulosemembran, getränkt in Puffer-II wurde ebenfalls deckungsgleich auf die vorhandenen Filterpapiere aufgebracht. Darauf wurde das Gel luftblasenfrei appliziert. Auf das Gel folgten drei Filterpapiere getränkt in Puffer-III. Den Abschluß bildet die anodische Elektrode.

Annordnung der Apparatur siehe schematische Skizze:



Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulose-Membran in 2 % Magermilchpulver in TBS unter Schwenken während 30 Min. bei RT abgesättigt, die Membran in TBS mit 0,5 % Magermilchpulver überführt, die den primären Antikörper in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration enthielt. Nach zweistündiger Inkubation wurde die Membran mehrmals mit großem Volumen TBS gewaschen und in TBS mit 0,5 % Magermilch überführt, welche den sekundären Antikörper enthielt. Nach einstündiger Inkubation wurde die Membran mit großen Volumina H₂O gewaschen und mit Chemolumineszenz-Reagenz (Renaissance, NEN; Boston, USA) nach Angaben des Herstellers behandelt. Die Aufnahme des Chemoluminogramms erfolgte mit einem Röntgenfilm (Kodak X-OMAT-AR) während einer Expositionsdauer von 1 Sek. bis 30 Min..

3.2.11.2 Immunpräzipitation

Immunpräzipitationen wurden zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen oder zur Protein-Expressionskontrolle durchgeführt.

a) Präzipitation von Immunglobulin-IgG1-Fusionsproteinen

Für die direkte Immunpräzipitation von Proteinen wurde die CH2- und CH3-Domäne von humanem IgG1 als N-terminaler Fusionspartner gewählt. Dieser einzelkettige Immunglobulinanteil verhält sich in Hinsicht auf die Lokalisation des Fusionsproteinpartners neutral und ist deshalb auch gut für zytoplasmatische Proteine geeignet. Dieser Fusionsanteil wird im Folgenden als cIg (cytoplasmic immunoglobulin) bezeichnet. Zur Direktpräzipitation von cIg-Fusionsproteinen wurden Gesamtzellysate (3.2.9.6) eingesetzt. In der Regel wurden 500 µl Gesamtzellysat mit 30 µl Matrix-gekoppeltem Protein-A (Pharmacia) versetzt und für 1 Stunde bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Die Bindekapazität des Matrix-gekoppelten Protein-A betrug laut Herstellerangaben 10 µg humanes Immunglobulin pro µl Matrix/Protein-A-Suspension. Protein-A war folglich im Überschuß vorhanden, was eine quantitative Präzipitation der Fusionsproteine gewährleistete.

Nach beendeter Präzipitation wurde die Matrix 1 Min. bei 1000x g und 4°C abzentrifugiert und mehrfach mit 1 ml des entsprechenden Lysispuffer gewaschen. Das so präzipitierte, an die Matrix gekoppelte Fusionsprotein konnte nun zur Präzipitation eines Interaktionspartners aus Totallysaten verwendet werden. Hierzu wurden 500 µl Gesamtzellysat, wie für die Präzipitation von cIg-Fusionsproteinen beschrieben, mit dem Matrix-gekoppelten Fusionsprotein präzipitiert.

Zur Analyse der präzipitierten Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde die Matrix mit 30 µl 1x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 Min. bei 95°C inkubiert.

b) Präzipitation von Proteinen durch GST-Fusionsproteine

Bakterielle, rekombinante, gereinigte GST-Fusionsproteine (3.2.9.3) wurden in Lösung an GSH-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) durch 30 minütige Inkubation bei 4°C an die Matrix gebunden. Mit dieser Matrix konnten nun Proteine, welche an das betreffende GST-Fusionsprotein binden konnten, aus Totallysaten präzipitiert werden (3.2.11.2a)

3.2.11.3 Durchflußzytometrie

Zur Expressionskontrolle wurde die fluoreszenzaktivierte Zelltrennung (FACS; fluorescence activated cell sorting) verwendet. Mit dieser Methode können Proteine in intakten Zellen detektiert werden, somit läßt sich im Gegensatz zum Immunoblot der Zellanteil quantifizieren, der ein bestimmtes Protein exprimiert.

Ca. 3×10^6 Zellen wurden 5 Min. bei $1000 \times g$ in einem 15ml-Gefäß sedimentiert und mit 5 ml PBS gewaschen. Zur Anfärbung von zellulären Proteinen wurden die Zellen in 2 ml 3%iger Formaldehydlösung in PBS für 15 Min. fixiert. Zum Inaktivieren des Formaldehyds wurden die Zellen zweimal mit PBS/ 2% Glycin gewaschen, anschließend in 1 ml PBS/0,2% Triton-X-100 aufgenommen und mit einem spezifischen Antikörper, in einer geeigneten Verdünnung, 1 Stunde bei 4°C inkubiert (3.1.9). Die Zellen wurden zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und in 1 ml PBS/0,2% Triton-X-100 mit einem sekundären Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) -konjugierten Antikörper (gerichtet gegen den primären Antikörper) für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und zur Detektion in 1 ml PBS resuspendiert. Die Analyse der Proben erfolgte mit Hilfe eines FACS-Meßgerätes (Epics XL, Coulter).

3.2.11.4 Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Zur Visualisierung der rekombinant exprimierten cIg-Fusions-Proteine wurden die entsprechenden Zellen in serumfreiem Medium aufgenommen, auf poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht und für 1h in einem Inkubator bei 37°C , 5% CO_2 und 96% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die nicht adhärenen Zellen wurden mit „Hank`s buffered saline“ heruntergewaschen und die adhärenen Zellen mit 2%igem Formaldehyd in PBS während 1 Stunde bei 4°C fixiert. Nacheinander wurden die Zellen mit 0,2% (v/v) Triton-X-100 in PBS für 15 Min. permeabilisiert, mit 2% Glycin in PBS blockiert und mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) -konjugierten goat anti-human IgG Antikörpern (Fc γ -spezifisch, Dianova) in PBS für 2 Stunden bei RT inkubiert. Für Aktin-Färbungen wurden die Zellen mit einem Kaninchen anti-Aktin Antikörper (ANTI-ACTIN, Sigma Aldrich) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Folgend wurden die Objektträger mit PBS gewaschen und mit Texas-Red-konjugiertem Esel anti-Kaninchen IgG Antikörper (Dianova) für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit PBS gewaschen, die Zellen mit einer 9:1 Mischung Glycerin und 100 mM Tris/Cl, pH 9 mit 20 mg/ml n-Propylgallat als Antibleichmittel überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Proben wurden mit einem „Konfokalen Laser Scanning System“ (Leica TCS-NT system, Leica) analysiert,

welches an ein Leica DM IRB Mikroskop mit einem PLAPO 63x1,32 Ölimmersionsobjektiv angeschlossen war.

3.2.12 Biochemische und physiologische Funktionsanalysen

3.2.12.1 LFA-1-abhängige Zelladhäsion an ICAM-1-Fc

Die Adhäsion von Zellen an immobilisiertes ICAM-1 (inter-cellular adhesion molecule-1) wurde zur funktionalen Charakterisierung der Leukozyten Integrin LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) -vermittelten Zelladhäsion durchgeführt. Als LFA-1-Ligand diente hierbei ein lösliches Fusionsprotein von ICAM-1, ICAM-1-Fc, das sich aus der extrazellulären Domäne von ICAM-1 zusammensetzte, die über eine Hinge-Domäne N-terminal an die CH2- und CH3-Domäne von humanem IgG1 fusioniert war (Kolanus *et al.*, 1996).

Stabil transfizierte oder mit rekombinanten Vaccinia-Viren infizierte Zellen (3.2.7) wurden durch Zusatz von 12 µg/ml Bisbenzimid-H33342-Fluorochrom-Trihydrochlorid (Calbiochem) für 30 Min. bei 37°C gefärbt, durch Zentrifugation geerntet, in „Hank's buffered saline“ (HBSS) resuspendiert und auf „96 well plates“ (NUNC, Maxisorp) zu einer Zelldichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Napf verteilt. Zuvor wurden die Platten mit Ziege anti-human IgG (Fcγ-spezifisch) Antikörper zu je 0,85 µg/Napf beschichtet, anschließend während 90 Min. bei 25°C mit 1%iger BSA Lösung in PBS abgesättigt, und folgend mit Zellkulturüberständen versetzt, die ICAM-1-Ig-Fusionsprotein enthielten. Diese Zellkulturüberstände stammten von ICAM-1-Ig-exprimierenden COS7-Zellen. Nach 1 Stunde wurden die Nöpfe der Platten zweimal mit HBSS gewaschen und dann für die Adhäsionsanalyse eingesetzt. Die Zellen wurden zur Adhäsion für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nicht-adhärente Zellen wurden anschließend vorsichtig mit dreimal 300 µl HBSS heruntergewaschen. Die gebundenen Zellen wurden in 100 µl 2% (v/v) Formaldehyd in PBS mit einem Fluoreszenz-Platten-Lesegerät (Zytofluor I, PerSeptive) erfasst (Wellenlänge der Anregung = 360 nm; Wellenlänge der Emission = 490 nm). Das Signal von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Napf entsprach 100 % Adhäsion.

3.2.12.2 Cytohesin-1-stimulierter GDP/GTP Austausch von ARF-1 *in vitro*

Künstliche Liposomen wurden als unilamellare Vesikel *in vitro* präpariert, so daß im Gegensatz zu zellulären Membranvesikeln eine stets spezifische kontinuierliche Zusammensetzung der künstlichen Lipidvesikel gewährleistet werden konnte. An diesen

artifiziellen Liposomen wurde anschließend der Cytohesin-1 (Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor) -stimulierte GDP/GTP-Austausch an ADP-Ribosylierungs-Faktor 1 (ARF1), katalysiert.

a) Liposomenpräparation

Die Liposomen wurden nach einem modifizierten Verfahren durch Reversphasen-Evaporation nach dem Prinzip einer Wasser in Öl-Emulsion hergestellt (Szoka und Papahadjopoulos, 1978). Hierzu wurden 3 mg Dioleoyl-L- α -phosphatidyl-DL-glycerol, 7 mg L- α -phosphatidylcholin- β -palmitoyl- γ -oleoyl und 15 mg des Detergenzes Octyl- β -D-Thioglucopyranosid in Methanol/Chloroform (1:2) aufgenommen und in einen Glaskolben überführt. Folgend wurde in einem Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur das Lösungsmittel während 2 Stunden evaporiert, so daß sich ein gleichmäßiger Lipid-Niederschlag an der Gefäßwand ausbildete. Der Niederschlag wurde in 1 ml Liposomenpuffer aufgenommen und zur Dialyse in einen Dialyseschlauch überführt. Während der dreimaligen Dialyse von 4 Stunden bei 4°C gegen je 500 ml Dialysepuffer wurde das Detergenz entfernt, so daß sich die Liposomen endgültig formieren konnten.

Liposomenpuffer: 10 mM Hepes, pH 7,4
 80 mM KCl
 15 mM NaCl
 0,7 mM NaH₂PO₄
 1 mM EGTA
 50 mM n-Octyl- β -D-glucoopyranosid

Dialysepuffer: 10 mM Hepes, pH 7,4
 80 mM KCl
 15 mM NaCl
 0,7 mM NaH₂PO₄
 1 mM EGTA

b) GDP/GTP-Austausch:

Der Guaninnukleotidaustauschtest wurde in Anlehnung an das Verfahren von Cherfils durchgeführt (Cherfils *et al.*, 1998). Die Konzentrationen der eingesetzten Komponenten betragen: 2000 nM myrestoyliertes ARF1-Protein (Chardin, Paris), 100 nM Cytohesin-1 oder phosphoryliertes Cytohesin-1 (3.2.12.7) und 16 µl/ml der Liposomenpräparation. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µCi [³⁵S]GTP γ S gestartet und der Ansatz bei 37°C inkubiert. Zu den Messzeitpunkten wurden je 40 µl der Proben entnommen und auf Nitrozellulose appliziert, die in Stoppuffer vorinkubiert war. Die Nitrozellulosefilter wurden folgend dreimal mit Stoppuffer gewaschen, und anschließend die verbliebene Radioaktivität auf der Nitrozellulosemembran mittels Phosphoimager (Molekular Dynamics) quantifiziert.

Austauschpuffer: 50 mM Hepes, pH 7,4
 1 mM MgCl₂
 1mM DTT

Stoppuffer: 20 mM Hepes, pH 7,4
 10 mM MgCl₂
 100 mM NaCl
 1mM DTT

3.2.12.3 ³²P-Orthophosphat-Markierung von Cytohesin-1 in Zellkultur

1,6 x 10⁷ Jurkat E6 Zellen wurden mit rekombinanten Vaccinia-Viren infiziert (3.2.7.5). Eine Stunde nach der Infektion wurden die Zellen mit phosphatfreiem RPMI-Medium gewaschen und anschließend darin aufgenommen, mit 1000 µCi ³²P-Orthophosphat/ml versetzt und für 5 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Folgend wurden 40 ng/ml PMA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) zugesetzt. Nach 30 minütiger Inkubation wurden die Zellen geerntet und in Lysispuffer lysiert. Die Proben wurden bei 30000x g zentrifugiert und die resultierenden Überstände mit Protein A Sepharose™ 6MB (Amersham Pharmacia) inkubiert. Die Matrix wurde vielfach mit Lysispuffer gewaschen und anschließend einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.2.8.2) mit folgendem Immunoblot (3.2.11.1) unterzogen.

Lysispuffer: 100 mM Tris/Cl, pH 8,0
150 mM NaCl
2 mM EDTA
1% Triton-X 100
10 µg/ml Leupeptin
10 µg/ml Aprotinin
1 mM PMSF

3.2.12.4 PMA-induzierte Phosphorylierung in Zellkultur

Jurkat E6 Zellen oder transfizierte COS7-Zellen wurden für 1 Stunde mit 40 ng/ml PMA inkubiert, die Zellen geerntet und die zellulären Fraktionen von einander separiert (3.2.9.5). Die zytoplasmatische Fraktion wurde zur Analyse einer nicht-denaturierenden Gelelektrophorese (3.2.8.3) unterzogen. Die Proteine wurden anschließend im Immunoblot (3.2.11.1) visualisiert.

3.2.12.5 Dephosphorylierung von Cytohesin-1 *in vitro*

Mit für Cytohesin-1 kodierender cDNA transfizierte COS7-Zellen wurden wie in 3.2.12.4 beschrieben behandelt. Vor der Gelelektrophorese wurde den Proben 5 Units alkalische Phosphatase (calf intestine phosphatase, Boeringer) pro 50 µl zytoplasmatischer Fraktion zugesetzt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Proben zur Analyse einer nicht-denaturierenden Gelelektrophorese (3.2.8.3) unterzogen. Die Proteine wurden anschließend im Immunoblot (3.2.11.1) visualisiert.

3.2.12.6 Phosphorylierung von Cytohesin-1 *in vitro*

COS7-Zellen die transient durch DEAE/Dextran Transfektion (3.2.6.1) mit einer für Cytohesin-1 kodierenden cDNA transfiziert wurden, wurden geerntet, in hypotonischem Puffer (10 mM Hepes, pH 7.5, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT) mit 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin, 2 mM Benzamidin und 1mM PMSF resuspendiert und mechanisch geschert. Zur Entfernung der Kerne und unlöslichen Komponenten wurden die Proben bei 21000x g für 15 Min. zentrifugiert. Die resultierende zytoplasmatische, Cytohesin-1-enthaltende Fraktion wurde für die Phosphorylierung *in vitro* unter folgenden Reaktionsbedingungen verwendet.: 50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 10 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 200 µg/ml Phosphatidylserin, 20 µg/ml PMA, 2 mM ATP, 0.05 % Nonidet P-40 und 20 µg/ml PKCδ bei pH 7,4 und 30°C für 120 Min..

3.2.12.7 Phosphorylierung von rekombinantem GST-Fusionsproteinen oder His-Fusionsprotein *in vitro*

Zur Phosphorylierung von gereinigten GST-Cytohesin-1, GST-PHc, bzw. Phosphorylierung von 6xHis-Cytohesin-1 (his-Cytohesin-1) wurden folgende Reaktionsbedingungen gewählt: 10 mM HEPES, 50 mM KCL, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 200 µg/ml Phosphatidylserin, 20 µg/ml PMA, 200 µM ATP, 0.05 % Nonidet P-40, 100 µg/ml Substrat-Protein und 1 µg/ml PKCδ bei pH 7,5 und 30°C für 60 Min..

4 Ergebnisse

4.1 Cytohesin-1-induzierte Zelladhäsion

Cytohesin-1 wurde als Interaktionspartner der zytoplasmatischen Domäne von CD18, der β -Untereinheit des Lymphozyten-Integrins LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1), durch Analyse im „Yeast-Two-Hybrid-System“ („Interaction-Trap“) identifiziert (Kolanus *et al.*, 1996). Studien in Lymphozyten zeigten, daß die Überexpression von Cytohesin-1, die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion an ICAM-1 (inter-cellular adhesion molecule-1) induziert. Die PH-Domäne von Cytohesin-1 ist ein Modul, das die Bindung des Proteins an die Phospholipide der Plasmamembran erlaubt. So bindet Cytohesin-1 hochaffin an Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP3), dem Produkt der PI3-Kinase. Signalwege, die zu einer Aktivierung der PI3-Kinase führen, können somit eine verstärkte Rekrutierung von Cytohesin-1 bewirken. Die Bindung von Cytohesin-1 an das Phospholipid PIP3 wird wahrscheinlich zusätzlich durch die c-Domäne des Proteins stabilisiert. Diese Plasmamembranbindung begünstigt die Interaktion von Cytohesin-1 mit dem integralen Membranprotein LFA-1. Über diese Interaktion aktiviert Cytohesin-1 LFA-1. Durch Überexpression der isolierten C-terminalen PHc-Domäne von Cytohesin-1 wird die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion an ICAM-1 dominant-negativ inhibiert, im Gegensatz zur Überexpression des vollständigen Cytohesin-1. Die PHc-Domäne verdrängt womöglich kompetitiv endogenes Cytohesin-1 von der Plasmamembran. Cytohesin-1 befindet sich somit nicht mehr in dem Kompartiment mit LFA-1 und kann deshalb wahrscheinlich nicht mehr die Zelladhäsion über dieses Integrin induzieren. Wird die isolierte PH-Domäne ohne c-Domäne überexprimiert, erfolgt keine effiziente Membranrekrutierung des Proteins. Dieses Konstrukt kann daher nicht mit endogenem Cytohesin-1 interferieren. Die Zelladhäsion wird folglich nicht beeinflusst. Diese Beobachtung ist konsistent mit dem Modell der kompetitiven Verdrängung des endogenen Cytohesins durch die überexprimierte PHc-Domäne (Kolanus *et al.*, 1996; Nagel *et al.*, 1998a und 1998b).

Diese Studien zeigten, daß Cytohesin-1 eine entscheidende Rolle in der LFA-1-vermittelten Zelladhäsion spielt. In den folgenden Experimenten sollte nun gezeigt werden, ob die Funktion von Cytohesin-1 durch posttranslationale reversible Modifikationen reguliert werden kann.

4.1.1 Phorbolster-induzierte Phosphorylierung von Cytohesin-1 in Zellen

Radioaktive Markierungsexperimente zeigten, daß in phorbolsterstimulierten Jurkat E6 Zellen Cytohesin-1 massiv phosphoryliert wird (J. Kolanus, siehe Abb. 1). Cytohesin-1 wurde rekombinant mit Hilfe eines Vaccinia-Virus-Expressionssystems exprimiert. Auf genetischer Ebene wurde Cytohesin-1 C-terminal mit dem CH2- und CH3-Anteil des humanen IgG₁ (Immunglobulin G₁) fusioniert. Dieser Fusionsanteil, im Folgenden als cIg (cytoplasmic Ig) bezeichnet, verhält sich neutral in Bezug auf Lokalisierung und Aktivität des Cytohesin-1-Proteins (Kolanus *et al.*, 1996).

COS7-Zellen wurden mit einer für cIg-Cytohesin-1-Fusionsprotein kodierenden cDNA oder zur Kontrolle mit cIg-kodierender cDNA transfiziert (Abb.1). Diese Zellen wurden mit 2mCi/ml ³²P-Orthophosphat inkubiert und für eine Stunde mit PMA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) stimuliert, einem potenten Aktivator der Protein Kinasen C (PKC). Nach dieser Behandlung wurden die Zellen geerntet, lysiert, deren Proteine an Protein A präzipitiert und durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und im Chemoluminogramm oder Autoradiogramm visualisiert.

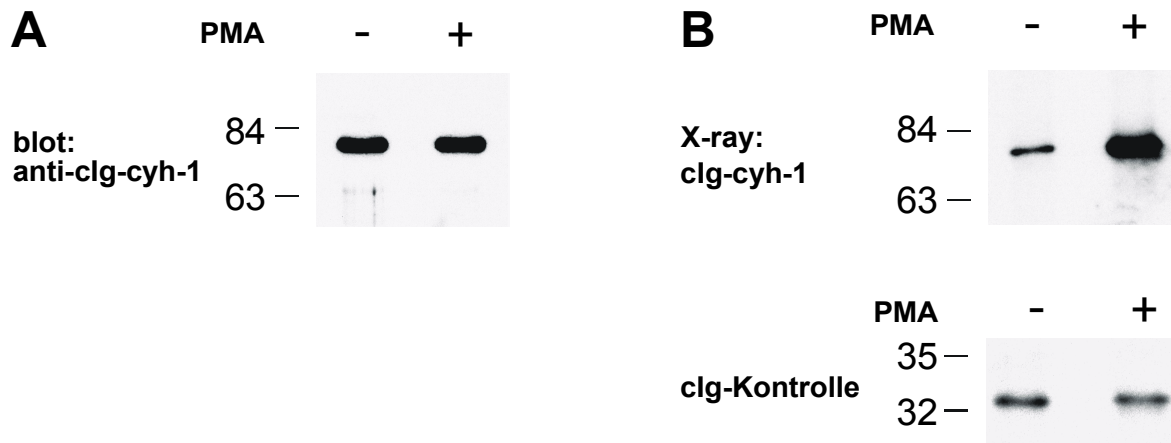


Abb.1 Cytohesin-1 cIg-Fusionsprotein wird in COS7-Zellen nach Phorbol-12-myristat-13-acetat-Stimulierung phosphoryliert.

In diesem Experiment wurden zytoplasmatische Immunglobulin (cIg) -Fusionsproteine verwendet. Die Proteine wurden in COS7-Zellen exprimiert, durch ^{32}P -Orthophosphat markiert und folgend an Protein A präzipitiert. Die Proben der Zellen die mit PMA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) vorinkubiert wurden sind durch ein (+) gekennzeichnet. Der anti-human IgG Immunoblot zeigt gleiche cIg-Cytohesin-1 Proteinmengen in unbehandelten Zellen, im Vergleich zu PMA-behandelten Zellen (Abb.1A). Identische Aliquots dieser Proben wurden einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unterzogen, folgend auf Nitrozellulose transferiert und durch Autoradiographie visualisiert. Nach PMA-Stimulierung (+) wurde ein drastischer Anstieg der ^{32}P -Orthophosphat-Inkorporation in cIg-Cytohesin-1 detektiert (Abb. 1B oberes Feld). Die unspezifische Hintergrundphosphorylierung wurde mittels der Expression der isolierten cIg-Domäne dokumentiert. Die ^{32}P -Orthophosphat-Inkorporation in das cIg-Protein wurde nicht durch PMA-Stimulierung der Zellen verstärkt (Abb. 1B unteres Feld).

Abbildung 1 zeigt den starken spezifischen Anstieg der ^{32}P -Orthophosphat-Inkorporation in cIg-Cytohesin-1-Protein nach PMA-Stimulierung der Zellen, während die Hintergrundphosphorylierung des cIg-Kontrollproteins konstant bleibt (Abb. 1B). Phosphorylierung von Cytohesin-1 wird demnach durch Phorbol-12-myristat-13-acetat-Stimulierung der Zellen induziert.

4.1.2 Nachweis der Phosphorylierung durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese

Die Detektion der Phosphorylierung von Cytohesin-1 durch radioaktive Markierung der Proteine mit ^{32}P -Orthophosphat hat den Vorteil hoher Sensitivität und ist daher zur initialen Untersuchung der Phosphorylierung geeignet. In diesem System ist aber keine schnelle gleichzeitige Detektion von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Cytohesin-1 möglich. Ein System ohne diese Nachteile ist die nicht-denaturierende Gelelektrophorese. Sie ermöglicht die Separation von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Cytohesin-1. Die Mengen des phosphorylierten und unphosphorylierten Proteins können hier unmittelbar anhand des Immunoblots abgeschätzt werden.

Zellen der T-Zelllinie Jurkat E6 wurden für die Dauer einer Stunde mit PMA stimuliert, folgend lysiert, die Proteine im nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und im Chemoluminogramm visualisiert.

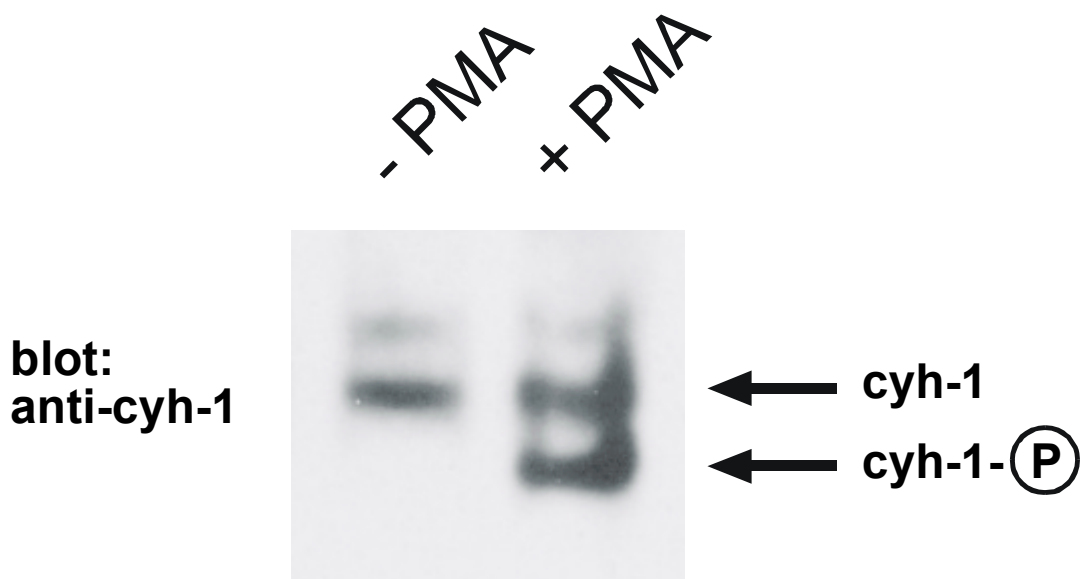


Abb. 2: PMA-induzierte Phosphorylierung von endogenem Cytohesin-1 in Jurkat E6 Zellen.

Endogenes Cytohesin-1 aus Jurkat E6 Zellen wurde mit Hilfe der nicht-denaturierenden Gelelektrophorese analysiert. Linke Spur: Kontrolle; unstimulierte Zellen. Rechte Spur: In PMA-stimulierten Zellen ist eine schneller migrierende, zusätzliche Bande detektierbar. Diese entspricht phosphoryliertem Cytohesin-1. Die Detektion erfolgte mit dem Cytohesin-1-spezifischen monoklonalen Antikörper 7H2.

Die Abbildung 2 zeigt endogenes Cytohesin-1 aus Jurkat E6 Zellen. Nach PMA-Behandlung ist im Vergleich zu unstimulierten Zellen eine schneller migrierende, zusätzliche Bande erkennbar. Die Phosphorylierung fügt den Proteinen zusätzliche negative Ladungen zu. In nicht-denaturierenden Gelen führt dies in der Regel zu einer erhöhten Elektromotilität der phosphorylierten Proteine (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1994). Die schnell migrierende Bande reagierte spezifisch mit einem monoklonalen Antikörper gegen Cytohesin-1. Dies deutet daraufhin, daß diese Bande phosphoryliertem Cytohesin-1 entspricht.

4.1.2.1 Bestätigung der Phosphorylierung von Cytohesin-1

COS7-Zellen wurden mit einer für Cytohesin-1 kodierenden cDNA transfiziert, für eine Stunde mit PMA stimuliert, folgend lysiert, die Proteine im nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und im Chemoluminogramm visualisiert.

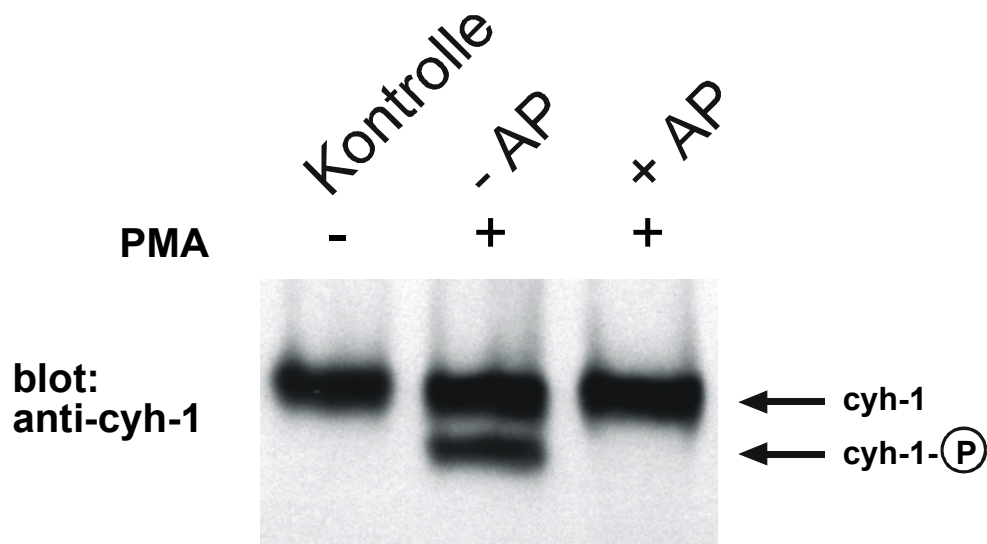


Abb. 3 **Nach PMA-Stimulierung kann phosphoryliertes Cytohesin-1 durch alkalische Phosphatase *in vitro* wieder dephosphoryliert werden.**

Cytohesin-1 wurde in COS7-Zellen exprimiert und durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese analysiert. Linke Spur: Kontrolle; unstimulierte Zellen. Mittlere Spur: In PMA-stimulierten Zellen ist eine schneller migrierende, zusätzliche Bande erkennbar. Diese entspricht phosphoryliertem Cytohesin-1. Rechte Spur: Die schneller migrierende untere Bande ist nach der Inkubation mit alkalischer Phosphatase nicht mehr erkennbar. Die Detektion erfolgte mit Cytohesin-1-spezifischem monoklonalem Antikörper 7H2.

Vor der Gelelektrophorese wurde ein Aliquot der Probe aus den Phorbol ester-behandelten Zellen mit alkalischer Phosphatase behandelt. Dies führte zur spezifischen quantitativen Entfernung der schneller migrierenden Bande (Abb. 3). Dies war konsistent mit der Annahme, daß die schneller migrierende untere Bande phosphoryliertem Cytohesin-1 entsprechen könnten, und daß durch die PMA-Stimulierung keine andere Isoform von Cytohesin-1 induziert wurde, oder eine andere Modifikation vorlag.

4.1.3 Kartierung der phosphorylierten Aminosäurereste von Cytohesin-1

Zunächst sollte geklärt werden, ob die vorliegende Phosphorylierung Serin/Threonin- oder Tyrosin-spezifisch ist. In Lysaten PMA-stimulierter Jurkat E6 Zellen konnten mit Hilfe eines anti-Phosphotyrosin Antikörpers keine Proteine detektiert werden, die aufgrund ihrer Größe Cytohesin-1 entsprachen (Abb. 4). Dies führte zu der Annahme, daß es sich bei der PMA-induzierten Modifikation nicht um eine Tyrosinphosphorylierung, sondern wahrscheinlich um eine Serin- oder Threonin-Phosphorylierung handelte.

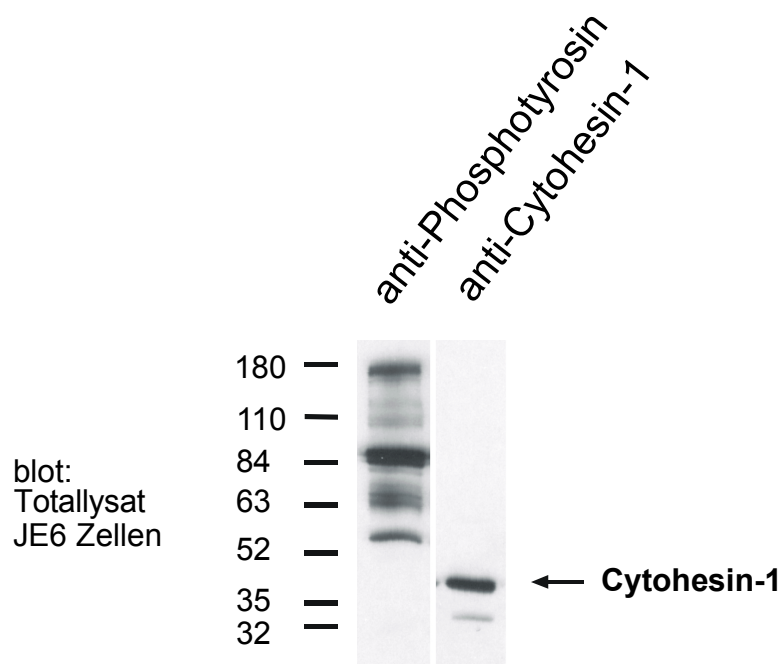


Abb. 4 Anti-Phosphotyrosin-Blot versus anti-Cytohesin-1-Blot aus PMA stimulierten Jurkat E6 Zellen.

Jurkat E6 Zellen wurde mit PMA stimuliert, folgend lysiert und zwei gleiche Aliquots des Lysats durch Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und im Immunoblot analysiert. Linke Spur: Detektion mit anti-Phosphotyrosin Antikörper 4G10. Rechte Spur: Detektion mit monoklonalem anti-Cytohesin-1 Antikörper 7H2.

4.1.3.1 Phosphorylierung verschiedener Mitglieder der Cytohesin-Familie

Cytohesin-1 gehört zu einer Familie hochkonservierter Proteine in Säugern. Proteine dieser Familie wurden auf ihre Phosphorylierbarkeit untersucht, mit dem bisher verwendeten System der nicht-denaturierenden Gelelektrophorese. Ein spezifischer Antikörper der ausschließlich gegen Cytohesin-1 gerichtet war stand zur Verfügung. Spezifische Antikörper gegen ARNO (Cytohesin-2) oder GRP1 (Cytohesin-3) waren jedoch nicht erhältlich. Deshalb wurden diese Proteine auf genetischer Ebene aminoterminal mit kurzen „flag-tags“ versehen. Größere Fusionspartner, wie z.B. der zuvor beschriebene cIg-Anteil waren mit einer Auftrennung von phosphorylierten und unphosphorylierten Isoformen der Cytohesine unvereinbar.

Jurkat E6 Zellen wurden mit einer cDNA kodierend für flag-Cytohesin-1, flag-ARNO und flag-GRP1 transfiziert, für eine Stunde mit PMA stimuliert und folgend lysiert. Anschließend wurden die Proteine im nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und im Chemoluminogramm visualisiert (Abb. 5)

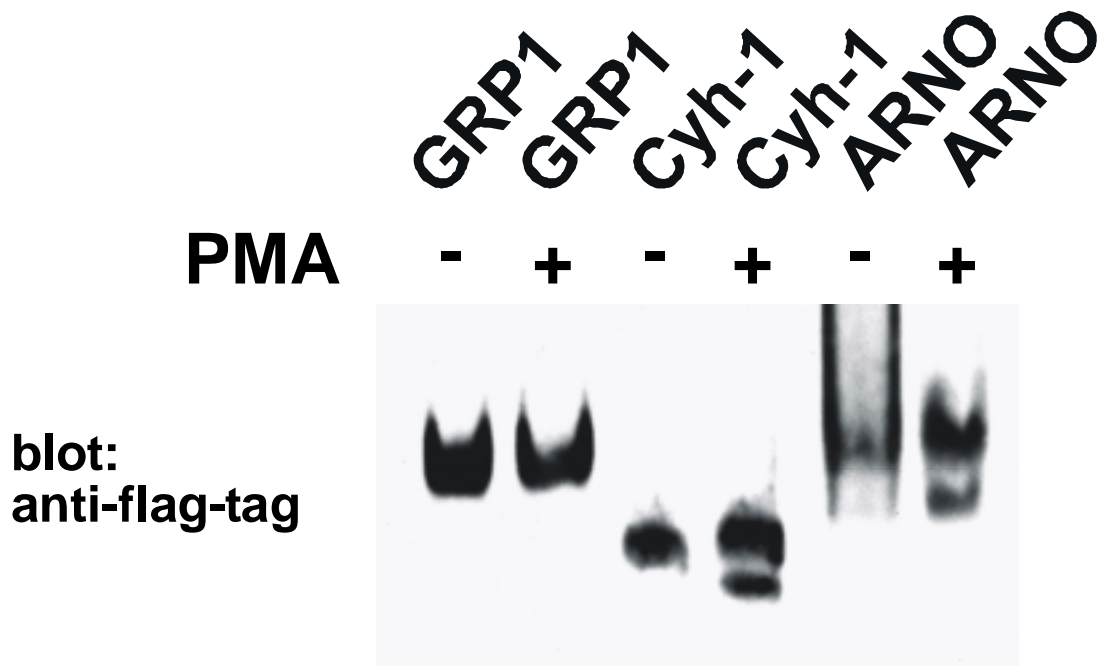


Abb. 5 Cytohesin-1 und ARNO, aber nicht GRP1, werden nach PMA-Stimulierung phosphoryliert.

Jurkat E6 Zellen wurden mit flag-GRP1, flag-Cytohesin-1 und flag-ARNO kodierender cDNA transfiziert. Die Proteine wurden anschließend durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Zellen wurden mit PMA stimuliert, wie gekennzeichnet (+). Detektion der Proteine erfolgte mittels anti-flag Antikörper. Im Falle von Cytohesin-1 und ARNO tritt eine schneller migrierende Spezies in den Proben PMA-behandelter Zellen auf. Im Gegensatz dazu bleibt die Elektromotilität bei GRP1 unverändert.

Ein Vergleich der Proben zeigte, daß nach PMA-Stimulierung der Zellen in Proben mit Cytohesin-1 und ARNO eine spezifische Bande mit erhöhter Elektromotilität auftrat. In mehrfach wiederholten Experimenten konnte mit diesem System jedoch kein Hinweis für eine Phosphorylierung von GRP1 gefunden werden.

4.1.3.2 Identifizierung der Phosphorylierungsstellen von Cytohesin-1

Ein Vergleich der Proteinsequenzen von Cytohesin-1, ARNO und GRP1 ermöglichte eine Eingrenzung der putativen Phosphorylierungsstellen von Cytohesin-1. In diesen Proteinen finden sich mehrere PKC-Phosphorylierungs-Konsensussequenzen, wovon die meisten aber innerhalb dieser Proteinfamilie konserviert sind. Die carboxyterminale polybasische Region (c-Domäne) stellt eine Ausnahme dar, da sie die divergenteste Domäne innerhalb der sonst hochkonservierten Proteine ist. Funktionale Untersuchungen zeigten für Cytohesin-1, daß die c-Domäne und die PH-Domäne kooperativ in die Membranrekrutierung und Phospholipidbindung des Proteins involviert sind (Nagel *et al.*, 1998b). Sequenzanalysen der c-Domänen weisen auf zwei putative PKC-Phosphorylierungsstellen in Cytohesin-1 hin, nämlich Serin 394 und Threonin 395. In ARNO ist in dieser Region nur eine PKC-Phosphorylierungsstelle vorhanden, nämlich Serin 392, welches dem Serin 394 von Cytohesin-1 entspricht. GRP1 weist keine putativen PKC-Phosphorylierungsstellen in dieser Domäne auf (Abb. 6), dies ist konsistent mit den Ergebnissen aus 4.1.3.1 .

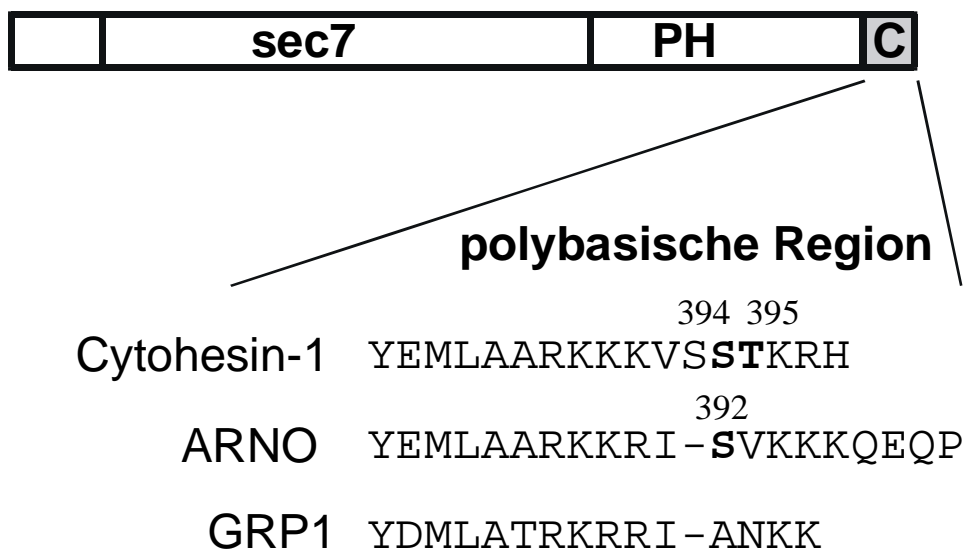


Abb. 6 Peptid-Sequenzvergleich der polybasischen Regionen (c-Domänen)

Sequenzvergleich der C-terminalen polybasischen Region von Cytohesin-1, ARNO und GRP1. Die PKC-Konsensus-Phosphorylierungsstellen der Proteine sind durch verstärkte Lettern mit Numerierung hervorgehoben.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde angenommen, daß die Phosphorylierungsstellen sich innerhalb der c-Domäne befinden. Durch ortsspezifische Mutagenese sollten die phosphorylierbaren Aminosäurereste in Cytohesin-1 sukzessive ermittelt werden. Sämtliche Konstrukte wurden durch PCR-Mutagenese (3.2.3.2) hergestellt und durch Doppelstrang-Sequenzierung überprüft. Durch Analyse der Cytohesin-1-Mutanten mit Hilfe der nicht-denaturierenden Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, daß sowohl Serin 394 als auch Threonin 395 den Phosphorylierungsstatus von Cytohesin-1 beeinflussen (Abb. 7A). Vollständige Inhibition der Phosphorylierung konnte allerdings nur erreicht werden, wenn diese beiden Reste simultan durch Glycin bzw. Alanin substituiert wurden. Diese Resultate führten zu dem Schluß, daß Serin 394 und Threonin 395 in Cytohesin-1 phosphoryliert werden können. Theoretisch bestand die Möglichkeit, daß durch die Substitution dieser beiden Aminosäuren nur eine regulatorische Region getroffen wurde, die selbst unphosphoryliert bleibt. Dadurch würde indirekt die Phosphorylierung des Proteins inhibiert. Um diesem Sachverhalt Rechnung zu tragen, wurden alle übrigen PKC-Konsensus-Phosphorylierungsstellen substituiert. Übereinstimmend mit den vorhergehenden Experimenten, beeinflusste keine dieser Substitutionen die Phosphorylierung des Proteins (Abb. 7B).

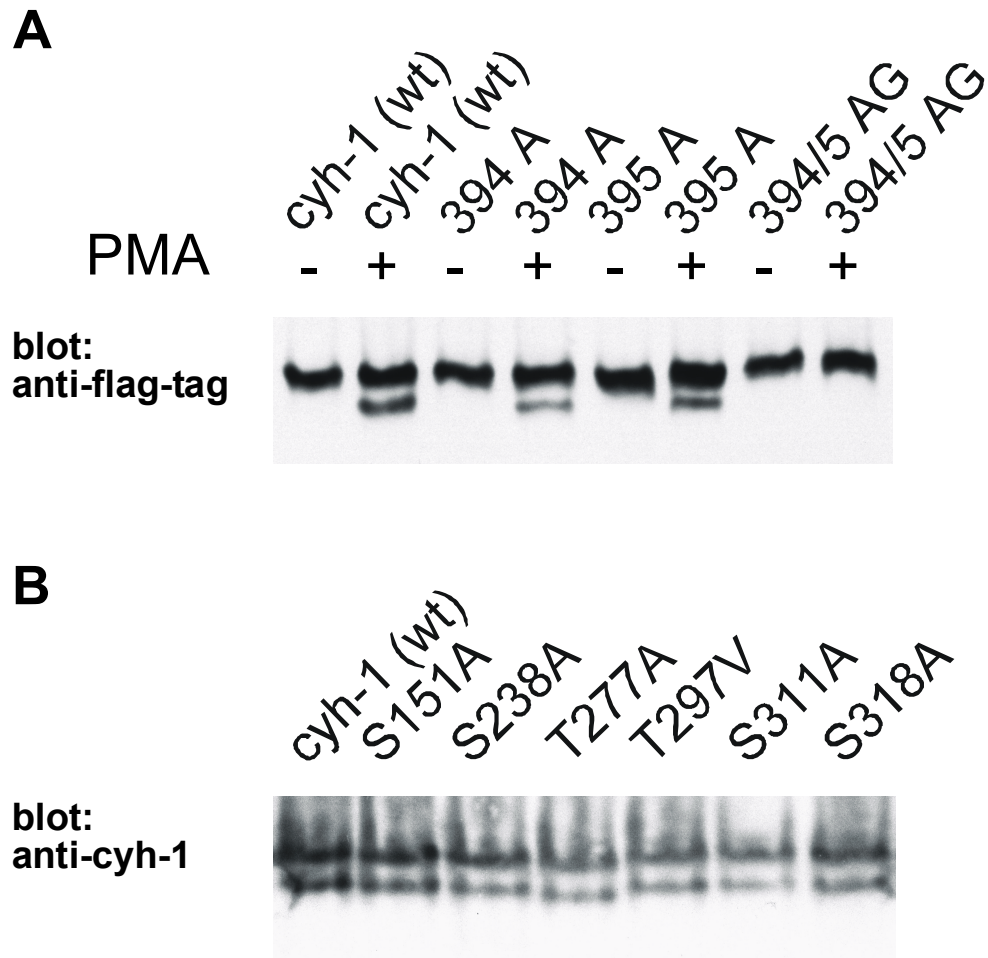


Abb. 7 Identifikation der Phosphorylierungsstellen von Cytohesin-1

A: Flag-Cytohesin-1 Konstrukte, Mutanten oder Wildtyp, wurden in COS7-Zellen transfiziert und die Proteine durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Zellen wurden mit PMA stimuliert, wie gekennzeichnet (+). Eine Cytohesin-1-Mutante die beide Reste 394S und 395T entbehrt (Spuren gekennzeichnet mit 394/95 AG), wurde nach PMA-Stimulierung nicht mehr phosphoryliert. Bei der Substitution nur eines Restes (394A und 395A) war die Phosphorylierung des Proteins gegenüber dem Wildtyp vermindert.

B: Alle Zellen dieses Experimentes wurden mit PMA stimuliert. Die übrigen PKC-Phosphorylierungsstellen wurden zur Kontrolle durch Alanin bzw. Valin substituiert. Sämtliche Mutanten reagierten weiterhin auf PMA-Stimulierung in gleicher Weise, wie Cytohesin-1 (Wildtyp) mit der entsprechenden Phosphorylierung.

Diese Ergebnisse zeigten, daß Cytohesin-1 exklusiv an Serin 394 und Threonin 395 nach PMA-Stimulierung phosphoryliert wird.

4.1.4 Phosphorylierung und Membraninteraktion von Cytohesin-1

Die Phosphorylierungsstellen von Cytohesin-1 befinden sich in einer Region die eine entscheidende Rolle für die Plasmamembranbindung von Cytohesin-1 spielt (Nagel *et al.*, 1998b). Daher ergab sich die Annahme, daß die Phosphorylierung der c-Domäne von Cytohesin-1 möglicherweise spezifisch die Assoziation des Proteins mit Phospholipiden der Plasmamembran beeinflusst.

Phosphoryliertes Cytohesin-1 sollte imitiert werden, indem die phosphorylierbaren Aminosäurereste durch saure Aminosäurereste ersetzt wurden. Durch Aspartat und Glutamat sollten daher zusätzliche negative Ladungen an den spezifischen Phosphorylierungsstellen permanent in Cytohesin-1 eingebracht werden. Dieser Ansatz wurde gewählt, da häufig zu beobachten ist, daß negativ geladene Aminosäuren funktional phosphorylierte Serine oder Threonine ersetzen können (Santy *et al.*, 1999).

4.1.4.1 Lokalisation von Cytohesin-1

Die Cytohesin-1-Mutanten S394D und T395E bzw. die entsprechende Doppelmutante S394D/T395E wurden generiert, um konstitutiv phosphoryliertes Cytohesin-1 zu imitieren. Diese Cytohesin-1-Mutanten und die phosphorylierungs-negativen Mutanten S394A, T395A und S394A/T395G wurden mit Hilfe rekombinanter Vaccinia-Viren in Jurkat E6 Zellen als cIg-Fusionsproteine exprimiert. Die Lokalisierung der entsprechenden Proteine wurde durch konfokale Lasermikroskopie analysiert (Abb. 8).

Die subzelluläre Lokalisierung von Cytohesin-1 und den phosphorylierungs-negativen Mutanten S394A, T395A und S394A/T395G war sehr ähnlich. Diese Lokalisierungsmuster entsprachen der Lokalisation die für Cytohesin-1 (Wildtyp) bekannt war (Nagel *et al.* 1998a und 1998b). Überraschenderweise zeigten die Mutanten (S394D, T395E und S394D/T395E), die eine konstitutive Phosphorylierung imitieren sollten, kein abweichendes Lokalisierungsmuster. Außerdem zeigten phorbolsterstimulierte Zellen die Cytohesin-1 (Wildtyp) exprimierten, keinen großen Unterschied in Bezug auf die Lokalisierung von Cytohesin-1, verglichen mit unstimulierten Zellen. Die cIg-Fusionsproteine von Cytohesin-1 oder der Mutanten waren einerseits im Zytoplasma zu finden, andererseits war aber ein großer Anteil mit dem Zellkortex assoziiert (Abb. 8).

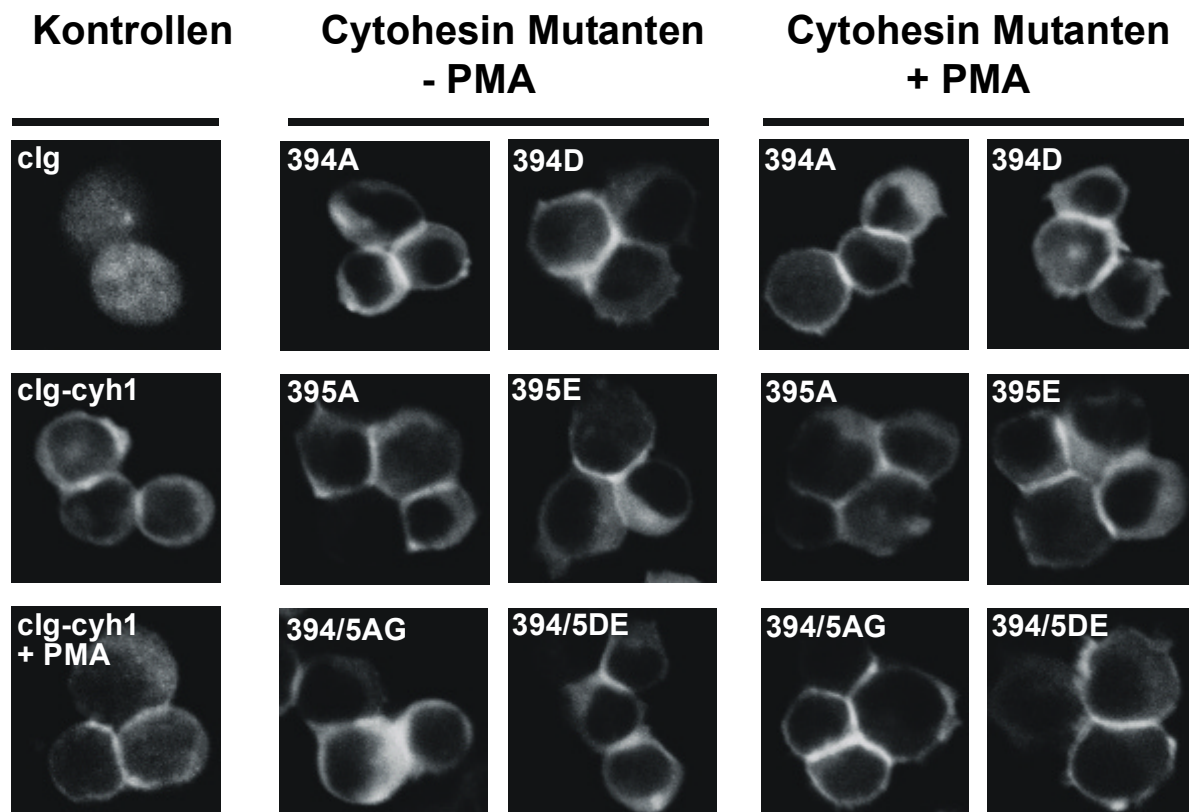


Abb. 8 Subzelluläre Lokalisierung von Cytohesin-1 oder Cytohesin-1-Mutanten

Konfokale Lasermikroskopie von Jurkat E6 Zellen. Sämtliche Konstrukte wurden als cIg-Fusionsproteine mit Hilfe rekombinanter Vaccinia-Viren exprimiert. Überexprimiertes Cytohesin-1 (Wildtyp; cIg-cyh-1) und alle Mutanten waren hauptsächlich mit dem Zellkortex assoziiert. Dies galt sowohl für unstimulierte als auch für PMA-stimulierte Zellen. Die Mutanten mit zusätzlicher negativer Ladung S394D (394D), T395E (394E) und die Doppelmutante S394D/T395E (394/5DE) zeigten eine gleiche Lokalisierung, wie die phosphorylierungs-negativen Mutanten S394A (394A), T395A (395A) und wie die Doppelmutante S394A/T395G (394/5AG). Cytohesin-1 und sämtliche Mutanten waren in der kortikalen Region der Zelle zu detektieren. Außerdem waren diese Proteine auch vermehrt in den Regionen von Zell-Zell-Kontakten zu finden.

Diese Beobachtungen waren unerwartet und führten zur Annahme, daß die *in vivo*-Effekte der Cytohesin-1-Phosphorylierung mit diesem System nur unzureichend darstellbar sind. Deshalb wurde die spezifische Phosphorylierung von Cytohesin-1 *in vitro* analysiert.

4.1.4.2 Phosphorylierung von Cytohesin-1 *in vitro*

COS7-Zellysate, die rekombinant exprimiertes flag-Cytohesin-1 oder Kontrollprotein enthielten, wurden mit gereinigter PKC δ in Gegenwart von ATP inkubiert. Mit Hilfe der nicht-denaturierenden Gelelektrophorese wird in Abbildung 9 gezeigt, daß durch PKC δ *in vitro* eine schneller migrierende Spezies von Cytohesin-1 induziert wird. Dies entspricht dem Resultat das mit PMA-stimulierten Zellen zuvor gewonnen wurde (4.1.2). Konsistenterweise wurde in den Proben mit flag-Cytohesin-1 S394A/T395G keine schneller migrierende Bande detektiert. Dies zeigte, daß die spezifische Phosphorylierung von Cytohesin-1 durch die Behandlung mit PKC δ *in vitro* erhalten werden kann.

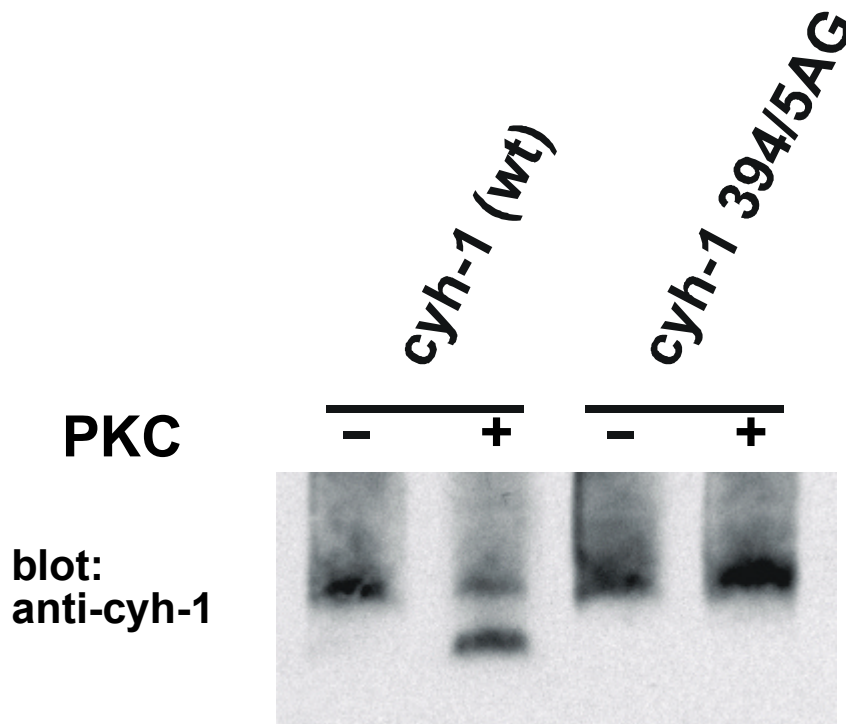


Abb. 9 Phosphorylierung von Cytohesin-1 durch PKC δ *in vitro*

Flag-Cytohesin-1 (cyh-1 (wt)) oder flag-Cytohesin-1 S394A/T395G (cyh-1 394/5AG) wurden in COS7-Zellen überexprimiert. Zellextrakte wurden *in vitro* mit PKC δ inkubiert, gekennzeichnet durch (+) und folgend durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese analysiert. Ohne den Zusatz von PKC δ war nur die obere Bande detektierbar, die dem unphosphorylierten Cytohesin-1 entspricht (linke Spur). In Gegenwart von PKC δ wurde die phosphorylierte Form stark induziert, die der unteren Bande entspricht (zweite Spur). Die schneller migrierende, phosphorylierte Isoform wurde nur im Falle von Cytohesin-1 (Wildtyp) induziert (linke Hälfte), während das Migrationsverhalten der nicht-phosphorylierbaren Mutante unverändert blieb (rechte Hälfte).

4.1.4.3 Interaktion von phosphoryliertem Cytohesin-1 mit Phospholipiden *in vitro*

Die PH-Domäne bindet, kooperativ unterstützt von der c-Domäne, mit hoher Spezifität an Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP3). Diese Bindung kann in einem *in vitro*-System mit Hilfe der IAsys-Biosensortechnologie analysiert werden (Nagel *et al.*, 1998b).

GST-Fusionsproteine, die die PH-Domäne von Cytohesin-1 (GST-PH) oder die PH-Domäne inklusive der polybasische Region (GST-PHc) trugen, wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert und folgend aufgereinigt (Abb. 10A). Diese Proteine wurden anschließend *in vitro* mit gereinigter PKC δ phosphoryliert. Das Bindungsverhalten des phosphorylierten oder des unphosphorylierten GST-PHc-Proteins an PIP3-haltige Lipidschichten wurde mit Hilfe der IAsys-Biosensortechnologie analysiert. Wie aus Abbildung 10B hervorgeht, wurde in diesem *in vitro*-System das Bindungsverhalten des Proteins durch die Phosphorylierung nicht beeinflusst. Die Phospholipidbindung war spezifisch, da das GST-Kontrollprotein keine Affinität zur der PIP3-derivatisierten Matrix aufwies. Außerdem führte, wie zuvor beschrieben, die Deletion der polybasischen c-Domäne zu einer stark verminderten Affinität des GST-PH-Fusionsproteins für PIP3 (Nagel *et al.*, 1998b). Die Resultate dieser Experimente führten daher zu dem Schluß, daß die Phosphorylierung von Cytohesin-1 wahrscheinlich keinen Effekt auf dessen Assoziation mit Phospholipidmembranen ausübt.

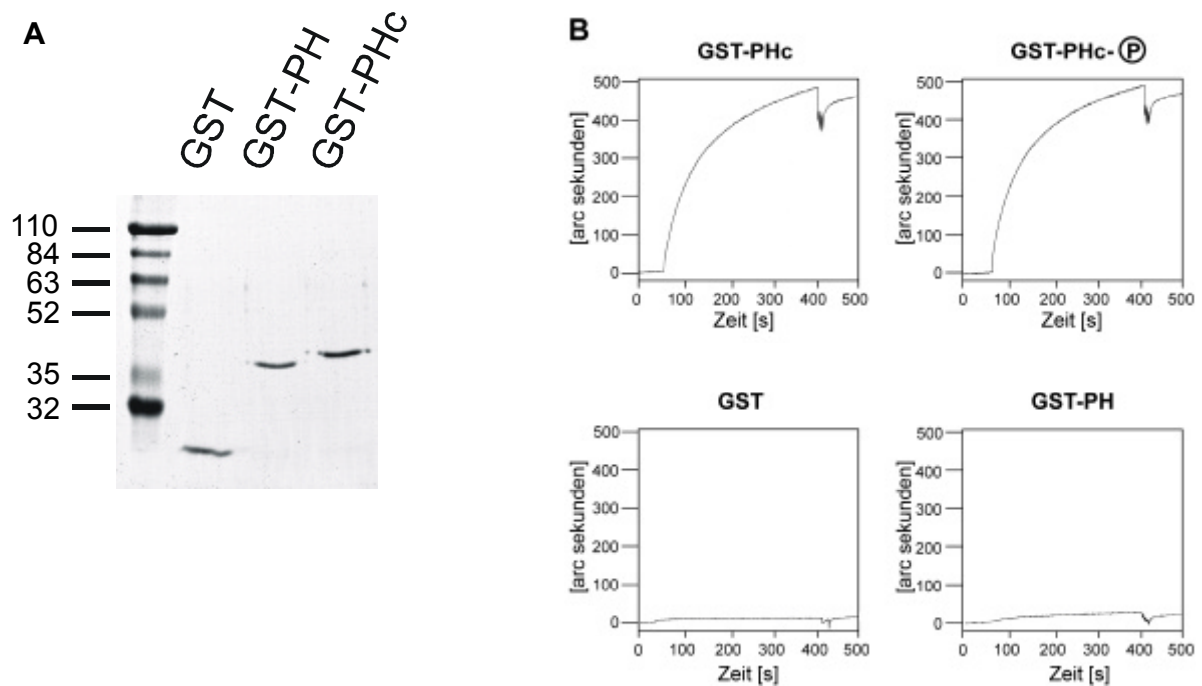


Abb. 10 PIP3-Bindung von phosphorylierten und unphosphorylierten GST-PHc-Fusionsproteinen

A: Coomassie-blau-Färbung der gereinigten GST-Fusionsproteine in einem 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gel.

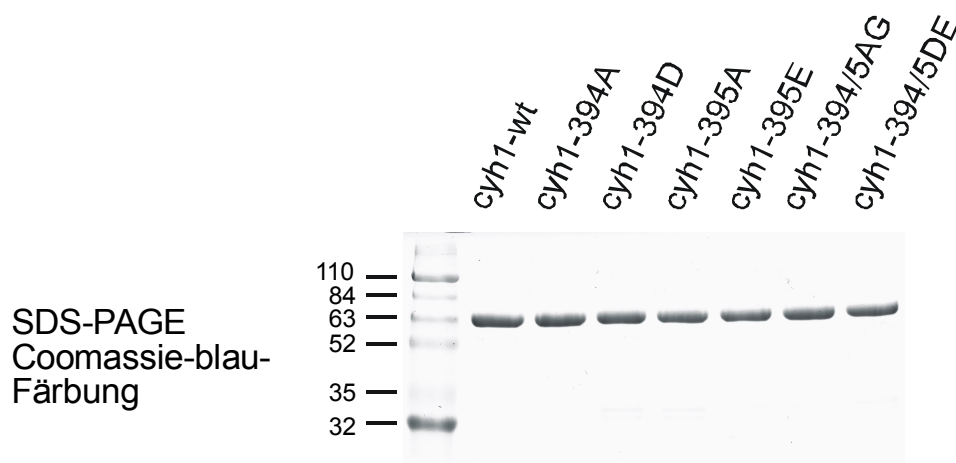
B: Proteinkonzentrationen der GST-Fusionsproteine: jeweils 150 nM. Bindungsverhalten von GST-PH und GST-PHc an immobilisierte PIP3-haltige Lipidschichten. Messung der Bindung mit Hilfe der IAsys-Biosensortechnologie. Die Assoziation wurde während der Zeitspanne von 50 bis 400 Sekunden gemessen. Nach 400 Sekunden wurde die Dissoziation eingeleitet. Die PHc-Fusionsproteine wurden phosphoryliert (P) und unphosphoryliert eingesetzt.

4.1.5 Zytoskelettassoziation von Cytohesin-1

Mikroskopische Aufnahmen gestatteten nicht die Unterscheidung der Plasmamembranbindung Cytohesins von einer kortikalen Assoziation mit dem Zytoskelett. Interessanterweise wurde eine Cytohesin-1-Mutante beschrieben, die nach Überexpression in peripheren mononukleären Blutzellen oder in Jurkat-Zellen das Ausbreiten und das Anheften dieser Zellen auf einer spezifischen Matrix verhindert und die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion an ICAM-1 dominant-negativ inhibiert (Geiger *et al.*, 2000). Im Prozeß der Zelladhäsion spielen die Zytoskelettorganisation und die Bindung der Integrine an das Zytoskelett eine entscheidende Rolle (Kooyk und Figdor; 2000), daher wurde in diesem Kontext die Phosphorylierung von Cytohesin-1 untersucht.

4.1.5.1 Phosphoryliertes Cytohesin-1 interagiert mit dem Zytoskelett

Die Assoziation von Cytohesin-1 mit dem Zytoskelett wurde mit Hilfe von zellulären nativen Zytoskelettfractionen analysiert. Diese wurden aus frisch präparierten Zellen durch zelluläre Fraktionierung gewonnen. Rekombinantes GST-Cytohesin-1 wurde mit PKC δ zur Phosphorylierung in Gegenwart oder Abwesenheit von ATP vorinkubiert, wie in Abbildung 11 dargestellt. Diese Proben wurden mit einer Suspension der zytoskeletthaltigen Zellfraktion versetzt, welche zuvor durch nicht-ionische Detergentien von Membrankomponenten befreit wurden. Nach einer Periode der Koinkubation der zytoskeletthaltigen Proben mit Cytohesin-1, wurden diese Ansätze zentrifugiert. Die resultierenden Sedimente (Sed.), die die Zytoskelettkomponenten und assoziiertes Cytohesin-1 enthielten und die dazugehörigen Überstände (Ü), die nicht gebundenes Cytohesin-1 enthielten, wurden mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert. Abbildung 11B zeigt, daß GST-Cytohesin-1 bevorzugt mit der zytoskeletthaltigen sedimentierbaren Fraktion präzipitiert, wenn es mit PKC δ und ATP vorinkubiert wurde. Diese Assoziation von Cytohesin-1 ist aber nahezu völlig inhibiert, wenn die Proben mit Cytochalasin D vorinkubiert wurden, einem Agens, welches die Polymerisation von Aktin hemmt. Das gleiche Assoziationsverhalten mit der zytoskeletthaltigen Zellfraktionen, in Bezug auf die An- bzw. Abwesenheit von Cytochalasin D, wurde in phorbolsterbehandelten Jurkat-Zellen bei endogenem Cytohesin-1 beobachtet (Abb. 11C).

A

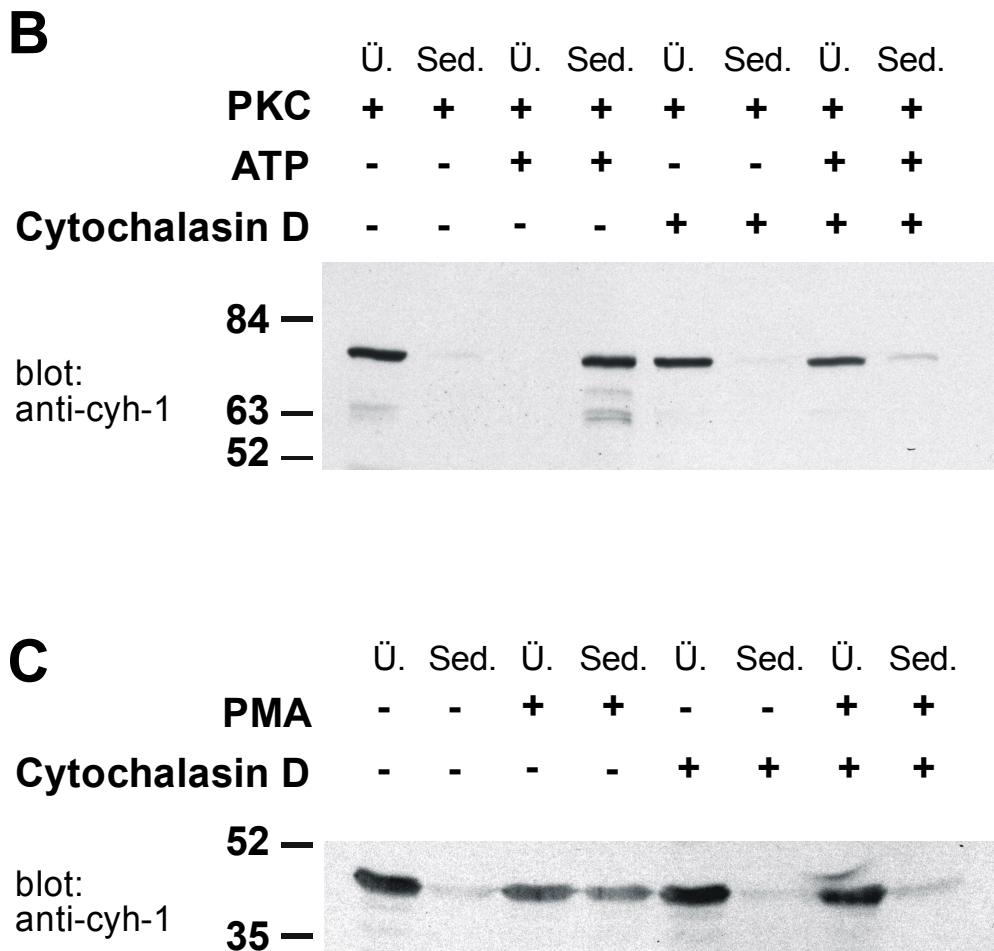


Abb. 11 Phosphoryliertes Cytohesin-1 assoziiert mit dem Aktin-Zytoskelett

A: Coomassie-blau-Färbung von gereinigten GST-Cytohesin-1-Fusionsproteinen (Wildtyp und Mutanten) in 10%igem SDS-Polyacrylamidgel.

B: Phosphoryliertes GST-Cytohesin-1 assoziiert mit der zytoskeletthaltigen Fraktion von Jurkat E6 Zellen *in vitro*. Cytohesin-1, gebunden in der zytoskeletthaltigen Fraktion (Sed.). Nicht-zytoskelettassoziiertes Cytohesin-1 (Ü). GST-Cytohesin-1 wurde mit PKC δ und ATP vorinkubiert, falls angezeigt (+) und mit der zytoskeletthaltigen Teilfraktionen koinkubiert. Die Zellen, die Lysate und die daraus resultierenden zytoskeletthaltigen Zellfraktionen wurden mit Cytochalasin D inkubiert, wie angezeigt (+). Nichtgebundenes, im Überstand (Ü.) befindliches GST-Cytohesin-1-Fusionsprotein (linke Spur) assoziiert nach Vorinkubation mit PKC und ATP mit der zytoskeletthaltigen Fraktion (Sed.) (vierte Spur von links). Diese Assoziation wird fast vollständig inhibiert, wenn die Zellen mit Cytochalasin D inkubiert wurden (äußerst rechte Spur).

C: Vergleichbares Experiment zu 11B, jedoch wird hier die Assoziation von endogenem Cytohesin-1 in Jurkat E6 Zellen mit deren zytoskeletthaltigen Fraktion gezeigt. Phorbolster-Stimulierung der Zellen induziert die Assoziation mit der unlöslichen zytoskeletthaltigen Fraktion (vierte Spur von links). Diese Assoziation wird hingegen in Anwesenheit von Cytochalasin D inhibiert (äußerst rechte Spur).

Das endogene Cytohesin-1 assoziierte in diesem Experiment nach Phorbolsterstimulation nur partiell mit der Zytoskelettfraktion dieser Zellen. Diese Beobachtung war konsistent mit den Erkenntnissen aus den vorangegangene Experimenten (4.1.2 u. 4.1.3), die zeigten, daß nach Phorbolsterstimulierung das zelluläre Cytohesin-1 nur partiell phosphoryliert werden kann.

Abbildung 12 zeigt ein Kontrollexperiment, bei dem die Zellen statt mit Cytochalasin D, mit Nocodazol vorinkubiert wurden, einem Agens, welches Mikrotubuli depolymerisiert. Nocodazol inhibiert im Gegensatz zu Cytochalasin D nicht die Assoziation von Cytohesin-1 mit der zytoskeletthaltigen Fraktion. Zusammenfassend ließ sich aus den vorhergehenden Experimenten schließen, daß durch die Phosphorylierung der carboxyterminalen polybasischen Region von Cytohesin-1, dessen Assoziation mit dem zellulären Aktinzytoskelett reguliert wird und nicht dessen Bindung an Phospholipide der Zellmembran.

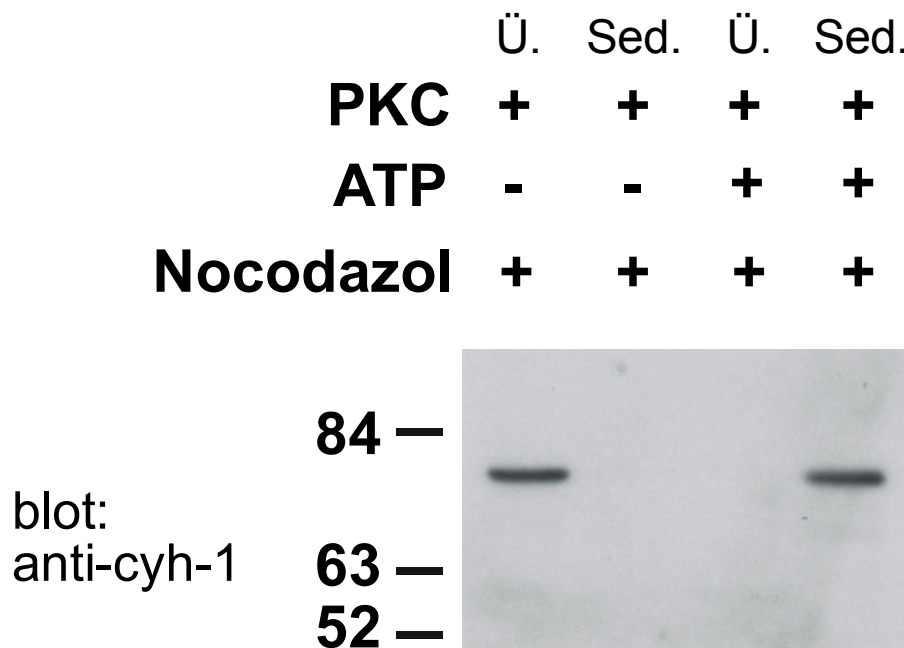


Abb. 12 **Nocodazol hat keinen Effekt auf die Assoziation von Cytohesin-1 mit dem Zytoskelett.**
 Vergleichbares Experiment wie in Abb. 11B. Cytohesin-1, gebunden in der zytoskeletthaltigen Fraktion (Sed.) Nicht-zytoskelettassoziiertes Cytohesin-1 (Ü). Alle Zellen wurden mit Nocodazol behandelt. In Abwesenheit von ATP assoziiert Cytohesin-1 nicht mit der zytoskeletthaltigen Fraktion (linke Hälfte). In Gegenwart von ATP und PKC assoziiert Cytohesin-1 mit der zytoskeletthaltigen Fraktion (rechte Hälfte).

Dieses Kontrollexperiment zeigte, daß das Mikrotubulstruktur-zerstörende Agens Nocodazol keinen Effekt auf die PKC-abhängige Assoziation von Cytohesin-1 mit der zytoskeletthaltigen Fraktion hat. Daraus folgte der Schluß, daß Cytohesin-1 mit dem Aktinzytoskelett *in vitro* assoziiert, aber nicht mit Mikrotubuli oder damit assoziierten Komponenten. Die Abbildung 13 zeigt, daß beide PKC-Phosphorylierungsstellen in Cytohesin-1 für die Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett verantwortlich sind.

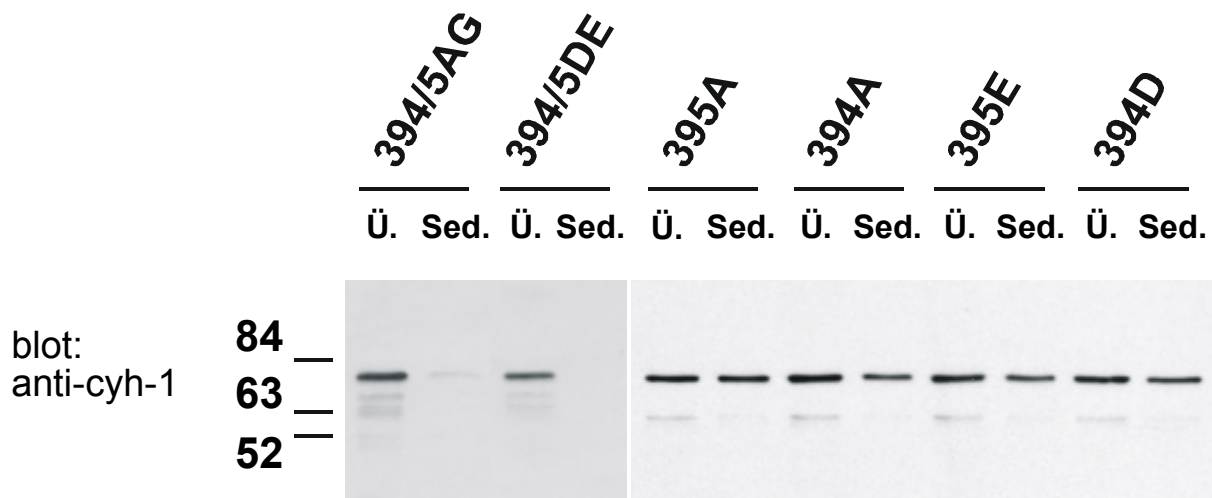


Abb. 13 Beide PKC-Phosphorylierungsstellen tragen zur Assoziation mit dem Zytoskelett bei.

Analyse der Mutanten von GST-Cytohesin-1-Fusionsproteinen mit substituierten PKC-Phosphorylierungsstellen auf Assoziation mit der zytoskeletthaltigen Fraktion. Doppelmутanten: S394A/T395G (394/5AG) und S394D/T395E (394/5DE). Einzelmутanten: T395A (395A), S394A (394A), T395E (395E) und S394D (394D). Cytohesin-1, gebunden in der zytoskeletthaltigen Fraktion (Sed.); Nicht-zytoskelettassoziiertes Cytohesin-1 (Ü.). Sämtliche Fusionsproteine wurden mit PKC und ATP vorinkubiert. Die Substitution beider Phosphorylierungsstellen ist notwendig für komplette Inhibition der Assoziation mit der zytoskeletthaltigen Fraktion (linker Blot), während Einzelsubstitutionen nur zur partiellen Inhibition führen (rechter Blot). Die Ladung der zur Substitution verwendeten Aminosäurereste hat keinen Einfluß auf das Assoziationsverhalten.

Die simultane Substitution beider Phosphorylierungsstellen inhibierte die Assoziation mit dem Zytoskelett bei den Doppelmутanten vollständig, während die Einzelmутanten nur eine partielle Assoziation zeigten. Die Mutanten zeigten gleiches Assoziationsverhalten mit dem Zytoskelett, unabhängig von der Substitution mit sauren Aminosäuren oder neutralen Aminosäuren. Die negative Ladung der sauren Aminosäuren spielte folglich keine Rolle für

die Assoziation. Diese Ergebnisse wiesen daraufhin, daß die Funktion der Phosphorylierung von Cytohesin-1 nicht nur auf einen simplen elektrostatischen Effekt zurückzuführen war, weil die Addition negativer Ladungen durch Substitution der Phosphorylierungsstellen mit Aspartat und Glutamat die Phosphorylierung nicht funktional ersetzen konnte.

4.1.6 Regulation der Zelladhäsion durch Cytohesin-1

Es sollte untersucht werden, ob durch Phosphorylierung von Cytohesin-1 die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion an ICAM-1 reguliert werden kann. Die in den vorhergehenden Experimenten beschriebenen Cytohesin-1-Mutanten wurden in Jurkat E6 Zellen rekombinant mit Hilfe von Vaccinia-Viren exprimiert (Abb. 14). Die Expressionshöhen von Cytohesin-1 und den Konstrukten, deren Phosphorylierungsstellen substituiert wurden, waren etwa gleich und lagen bei ca. 70 %. Die Zelladhäsion dieser Zellen wurde wie zuvor beschrieben analysiert, mit Hilfe immobilisierter ICAM-1-Fc-Chimären (Kolanus *et al.*, 1996).

Die Abbildung 15 zeigt die Resultate des Adhäsionstests von Jurkat E6 Zellen. Die Überexpression von Cytohesin-1 induzierte die Zelladhäsion an ICAM-1 ca. 8 fach, während die Überexpression der isolierten PHc-Domäne von Cytohesin-1 oder der E157K Mutante die Adhäsion dominant-negativ inhibierten (Kolanus *et al.*, 1996, Nagel *et al.*, 1998a, Geiger *et al.*, 2000, Abschnitt 4.2 dieser Arbeit). Im Vergleich zu Cytohesin-1 (Wildtyp) wiesen die Phosphorylierungsmutanten keinen meßbaren Unterschied in Bezug auf die basale Adhäsion auf. Im Gegensatz hierzu zeigte sich, daß durch die Überexpression der Mutanten die PMA-stimulierte Zelladhäsion signifikant reduziert wurde, verglichen mit Cytohesin-1 (Wildtyp). Im Falle der Doppelmutanten wurde die Adhäsionsrate auf das Niveau der Ig-Kontrollen reduziert (Abb. 15A).

Wurden die Zellen mit Cytochalasin-D-Konzentrationen, die mit der Aktinpolymerisation interferierten vorbehandelt, zeigte sich eine signifikant reduzierte Zelladhäsion an ICAM-1, in Übereinstimmung mit den vorhergehenden Beobachtungen. Sämtliche Cytohesin-1-Konstrukte, exprimiert in PMA-stimulierten, Cytochalasin-D-behandelten Zellen, induzierten die Zelladhäsion schwach, aber in gleicher Stärke (Abb. 15B). Die Mutanten zeigten hier keinen adhäsionsreduzierenden Einfluß, im Gegensatz zu Zellen, die nicht mit Cytochalasin D behandelt wurden.

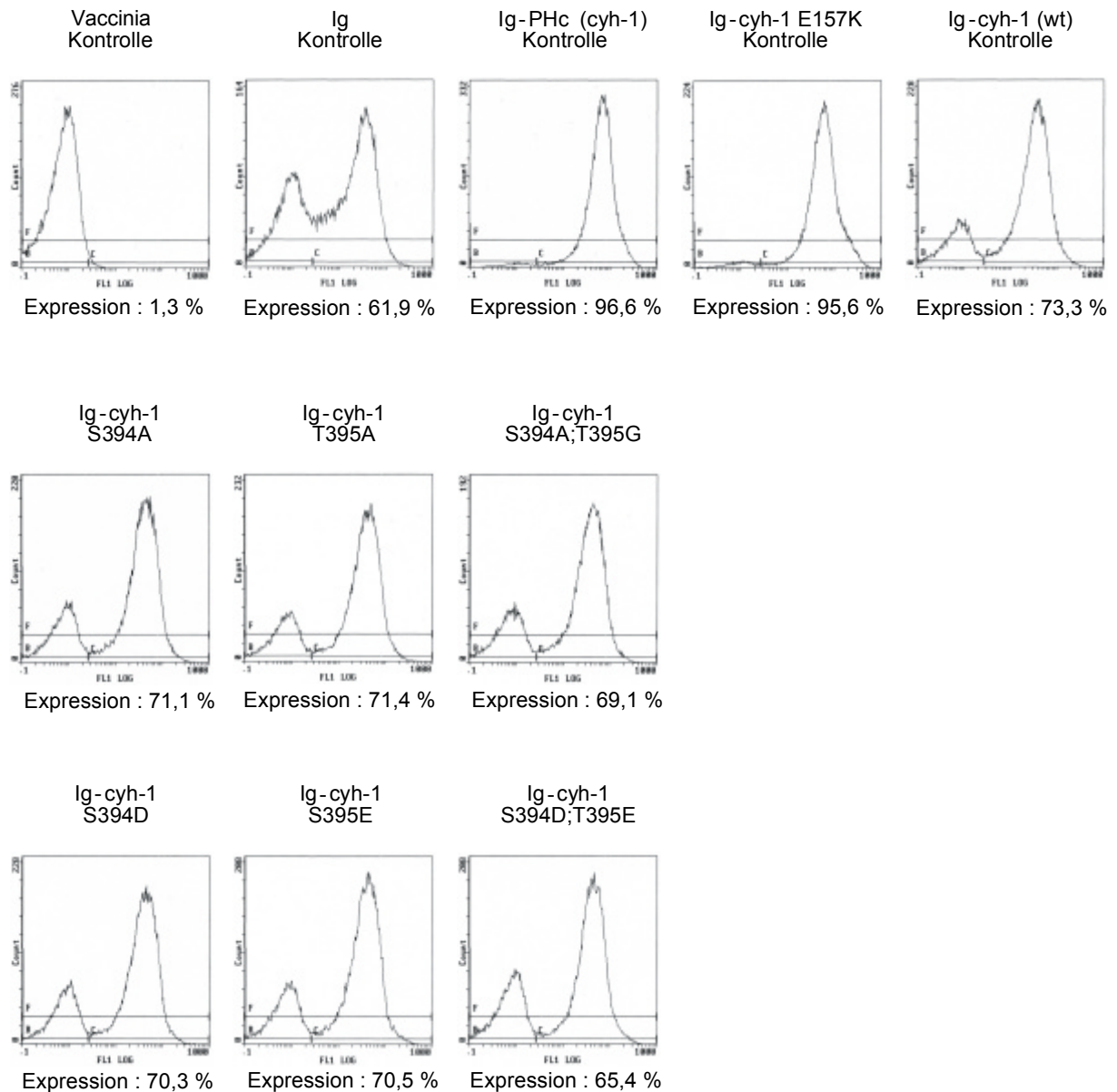


Abb. 14 Expressionsvergleich der verwendeten Cytohesin-1-Mutanten in Jurkat E6 Zellen mittels FACS-Analyse.

Jurkat E6 Zellen wurden mit rekombinanten Vaccinia-Viren infiziert. Markierung des IgG-Fusionsanteils der exprimierten Proteine mit Fluoresceinisothiocyanat konjugiertem Antikörper. Die relative Zellzahl wird als logarithmische Funktion der Fluoreszenzintensität dargestellt. Die in den Graphen nach rechts verschobenen Zellpopulationen exprimieren das entsprechende Konstrukt. Erster Graph: Negativkontrolle; Vaccinia-Virus. Zweiter Graph: Negativkontrolle; cIg-Protein. Übrige Graphen: Expression der verwendeten Konstrukte von Cytohesin-1. Die Zellen die das entsprechende Protein exprimieren sind als prozentualer Anteil der Gesamtzellzahl erfaßt.

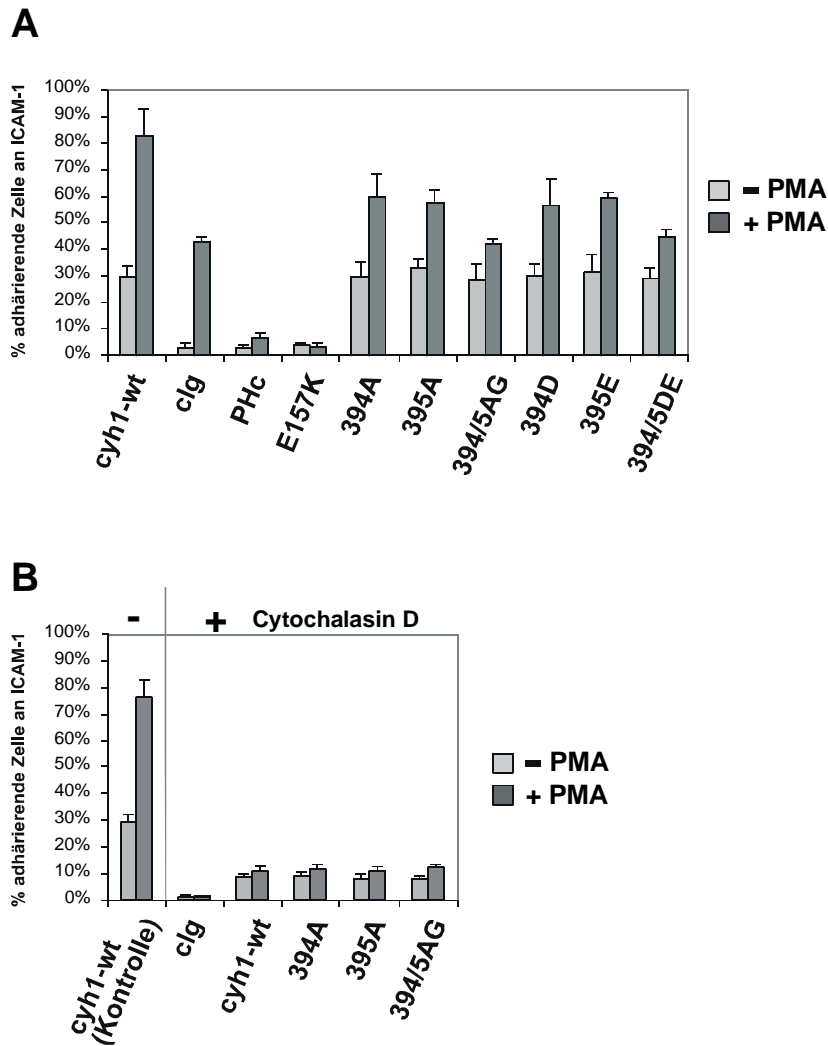


Abb. 15 Phosphorylierung von Cytohesin-1 moduliert die PMA-stimulierte Zelladhäsion

A: Basale Adhäsion (hellgraue Balken) von Jurkat E6 Zellen an ICAM-1 wird durch die Überexpression von cIg-Cytohesin-1-Fusionsprotein (cyh1-wt) stark induziert, verglichen mit der Kontrolle (cIg-Fusionsprotein). Sämtliche verwendete phosphorylierungs-negative Mutanten S394A (394A), T395A (395A), S394D (394D), T395E (395E), S394A/T395G (394/5AG) und S394D/T395E (394/5DE) haben den gleichen Einfluß wie Cytohesin-1 (Wildtyp) auf die basale Zelladhäsion. Hingegen wird bei der PMA-stimulierten Zelladhäsion die Adhäsion auf ca. 60 % im Falle der Einzelmutanten (394A, 395A, 394D und 395E) und auf ca. 40 % im Falle der Doppelmutanten (394/5AG und 394/5 DE) reduziert, verglichen mit ca. 80% Adhäsion im Falle von Cytohesin-1 (Wildtyp). Überexpression der PH-Domäne inklusive der C-terminalen polybasischen Region von Cytohesin-1 (PHc) oder Cytohesin-1-Mutante (E157K) führt zur Inhibition der basalen und stimulierten Zelladhäsion

B: Der zelladhäsionsstimulierende Effekt der Cytohesin-1-Überexpression ist in den Zellen, die mit 10mg/ml Cytochalasin D behandelt wurden stark vermindert. Stimulierung mit PMA vermag die Zelladhäsion nicht mehr stark zu induzieren, im Vergleich zur basalen Adhäsion. Cytohesin-1 (Wildtyp) und die phosphorylierungs-negativen Mutanten induzieren hier in geringem Maße die Zelladhäsion, aber etwa in gleicher Stärke. Die Zelladhäsionsdaten wurden jeweils in vier parallel-Proben pro Konstrukt gemessen. Die resultierenden Mittelwerte aus drei Experimenten wurden im Diagramm dargestellt, \pm der Standardabweichung.

Die Erkenntnisse aus diesen Experimenten zeigten, daß die Phosphorylierung von Cytohesin-1 in PMA-stimulierten Zellen, einen zusätzlich steigernden Effekt auf die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion ausübt. Im Gegensatz dazu erfolgte in Zellen, deren Aktinzytoskelett durch Cytochalasin-D-Behandlung zerstört wurde, keine zusätzliche Steigerung der LFA-1-vermittelten Zelladhäsion durch Phosphorylierung von Cytohesin-1, denn die phosphorylierungs-negativen Mutanten induzierten hier in gleicher Größenordnung die Adhäsion. Diese Resultate deuteten daraufhin, daß die Zytoskelettassoziation von Cytohesin-1 wahrscheinlich einen Beitrag zur Regulierung der LFA-1-Aktivität leistet.

4.1.7 Membranassoziation versus Aktinzytoskelett-Lokalisierung

Mit Hilfe indirekter konfokaler Laser-Fluoreszenz-Mikroskopie (3.2.11.4) sollte in Zellen gezeigt werden, ob die Membranlokalisierung von Cytohesin-1 von der Phosphorylierung und Zytoskelettinteraktion des Proteins abhängt. Hierzu wurde die subzelluläre Lokalisation von Cytohesin-1 und der phosphorylierungs-negativen Mutante (S394A/T395G) in Cytochalasin-D-behandelten Jurkat E6 Zellen untersucht. Die Phosphorylierung von Cytohesin-1 wurde durch PMA-Behandlung der Zellen induziert. Abbildung 16 zeigt, daß in Gegenwart des Aktinzytoskelett-zerstörenden Agens Cytochalasin D die subzelluläre Distribution der Cytohesin-1 Konstrukte nicht aufgehoben wird; konsistent mit der Annahme, daß die kortikale Assoziation des Proteins primär phospholipidvermittelt ist. Die Beste kortikale Assoziation von Cytohesin-1 ist in den PMA-stimulierten Zellen zu erkennen, die Cytohesin-1 (Wildtyp) exprimieren. Zusammenfassend wiesen die vorhergehenden Experimente daraufhin, daß die Membranrekrutierung und die Zytoskelettassoziation von Cytohesin-1 wahrscheinlich kooperative Effekte sind.

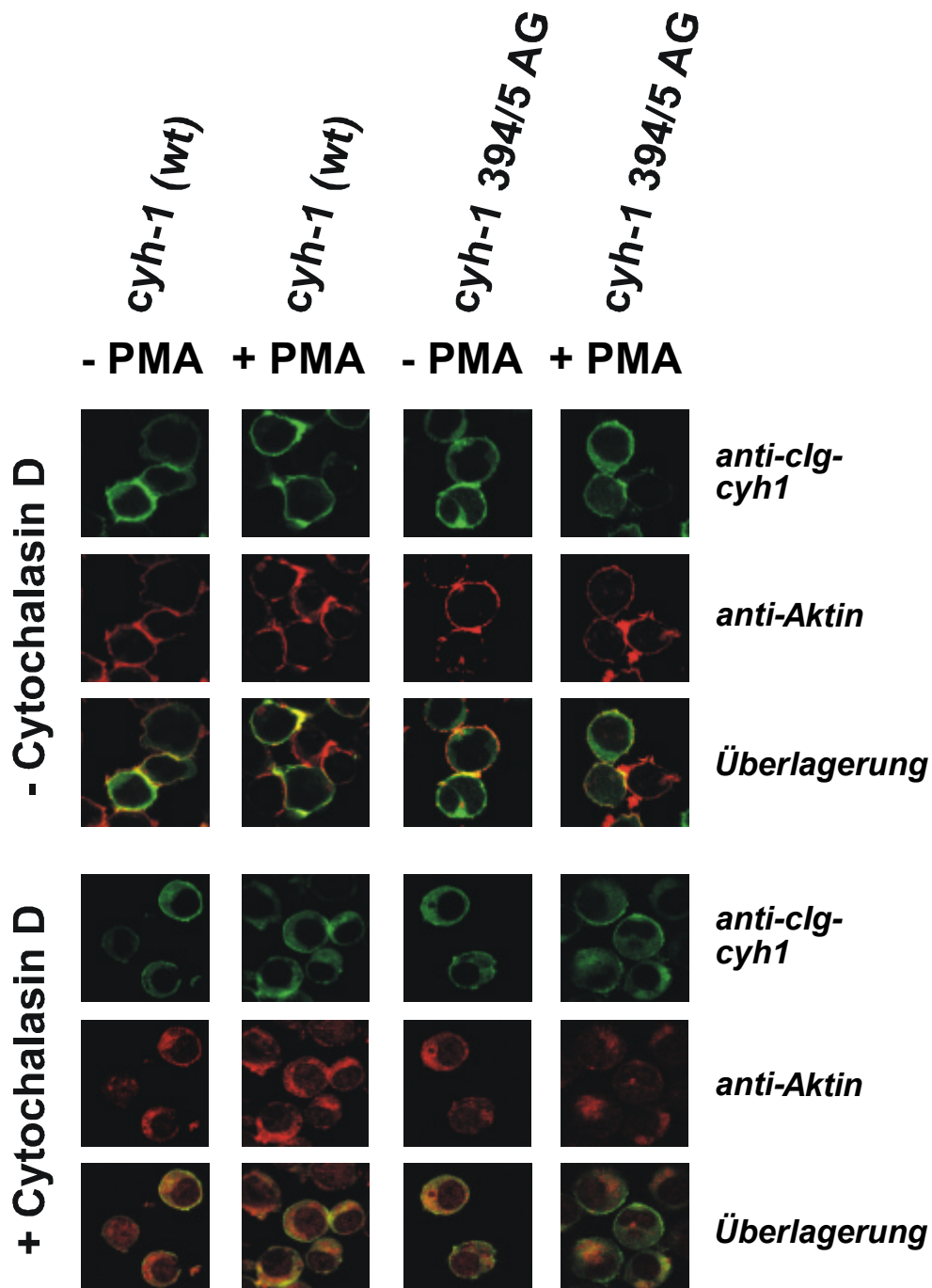


Abb. 16 Subzelluläre Lokalisation von Cytohesin-1 und Cytohesin-1-Doppelmutante S394A/T395G in Cytochalasin-D-behandelten Jurkat E6 Zellen.

Die Proteine wurden als cIg-Fusionsproteine in Jurkat E6 Zellen exprimiert. Die Zellen wurden mit 40ng/ml Phorbol ester (PMA) oder 10µg/ml Cytochalasin D wie angezeigt inkubiert. In Gegenwart von Cytochalasin D ist das kortikale F-Aktin depolymerisiert, was zur diffusen Lokalisation des Aktins im Zytoplasma führt (rote Aufnahmen, unterer Abschnitt), während Cytohesin-1 und die Doppelmutante S394A/T395G weiterhin an der Membran lokalisiert sind (grüne Aufnahmen, unterer Abschnitt). Die Überlagerung der Aufnahmen (Aktin: rot; Cytohesin-1: grün) zeigt partielle Kolokalisation von Cytohesin-1 mit dem kortikalen Aktin in den Zellen, die nicht mit Cytochalasin D behandelt wurden (oberer Abschnitt).

4.2 Cytohesin-1 ist ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für ARF1

Cytohesin-1 und Cytohesin-2 (ARNO) wurden als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF; guanine nucleotide exchange factors) von ARF1 identifiziert (Meacci *et al.*, 1997; Chardin *et al.*, 1996). Weiterhin wurde gezeigt, daß die Sec7-Domäne der Cytohesine den GDP/GTP-Austausch an ARF1 katalysiert. Eine Mutante von Cytohesin-2, bei der im katalytischen Zentrum der Sec7-Domäne die Aminosäure Glutamat 156 durch Lysin substituiert wurde, konnte den GDP/GTP-Austausch nicht mehr stimulieren (Mossessova *et al.*, 1998). Die analoge Mutation in Cytohesin-1 (E157K) war ebenfalls als GEF katalytisch inaktiv (Knorr *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß die Mutante E157K von Cytohesin-1 „cell-spreading“ inhibiert (Geiger *et al.*, 2000).

4.2.1 Die Cytohesin-1-Mutante E157K inhibiert die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion an ICAM-1

Die Mutante Cytohesin-1 E157K (Abb. 17A) wurde durch ortsspezifische PCR-Mutagenese hergestellt (3.2.3.2). Die Überexpression der PHc-Domäne in Jurkat T-Zellen inhibiert dominant-negativ die stimulierte Zelladhäsion an ICAM-1 (Kolanus *et al.*, 1996). Cytohesin-1 E157K enthält die vollständige Sec7-Domäne, die aber durch die Punktmutation E157K katalytisch inaktiv ist, während bei dem PHc-Konstrukt die komplette Sec7-Domäne deletiert ist. Cytohesin-1 E157K sollte mit dem bisher angewendeten Zelladhäsionssystem untersucht werden.

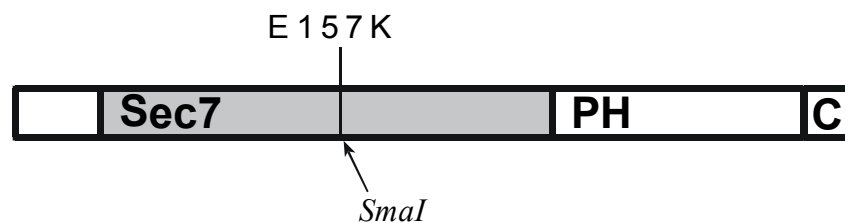
Zur Analyse wurden in Jurkat E6 T-Zellen, SKW3 T-Zellen und J19 T-Zellen, die in Abbildung 17B gezeigten Proteine, rekombinant durch Vaccinia-Viren exprimiert. Die Adhäsion dieser Zellen an immobilisiertes ICAM-1 wurde wie zuvor beschrieben gemessen (Kolanus *et al.*, 1996). Die J19 Zellen (Weber K., unpubliziert) zeichnen sich durch konstitutiv aktiviertes LFA-1 aus, und daher adhären diese Zellen auch konstitutiv an ICAM-1. Dieser Phänotyp ließ die J19-Zellen als besonders geeignet für die Analyse von inhibierenden Effekten auf die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion erscheinen.

Abbildung 17 zeigt die Resultate aus den Adhäsionstests. Die Überexpression von Cytohesin-1 führte bei allen untersuchten Zelllinien zu einer Steigerung der basalen sowie der stimulierten Zelladhäsion, wie schon zuvor für Jurkat-Zellen beschrieben (Kolanus *et al.*, 1996). Dieser Effekt fiel bei den J19 Zellen, die aufgrund ihres Phänotyps schon eine hohe basale Adhäsion zeigten, geringer aus, als bei Jurkat E6 oder SKW3 Zellen. Die Überexpression von Cytohesin-1 E157K resultierte hingegen bei allen getesteten Zellen in der

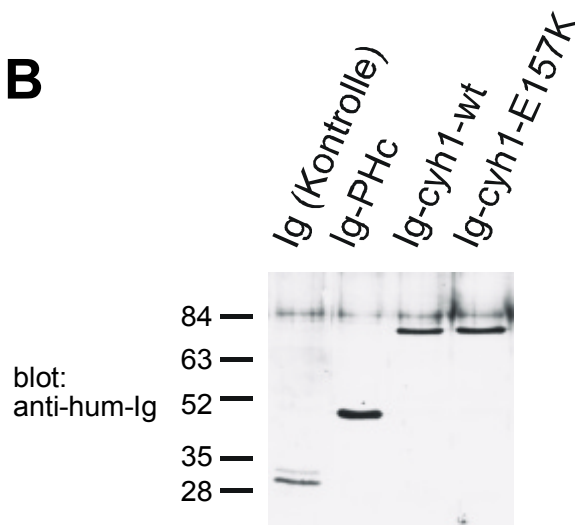
vollständigen Inhibition der stimulierten Zelladhäsion. Im Gegensatz zu der, in Jurkat E6 Zellen beschriebenen Inhibition der stimulierten Zelladhäsion durch die Überexpression der isolierten PHc-Domäne (Kolanus *et al.*, 1996), hatte die Überexpression der PHc-Domäne keinen inhibitorischen Effekt auf die stimulierte Zelladhäsion bei J19-Zellen. Verglichen mit der cIg-Kontrolle war die Adhäsionsrate etwa gleich hoch. Zusammenfassend zeigte sich, daß die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion an ICAM-1 inhibiert wird, durch Überexpression der Cytohesin-1 E157K Mutante. Auch in J19-Zellen wurde durch Überexpression der als GEF inaktiven Cytohesin-1 E157K Mutante die Zelladhäsion massiv inhibiert. Während die Überexpression des isolierten PHc-Domänenkonstruktes hier keinen inhibitorischen Effekt zeigte.

A

Cytohesin-1 E157K



B



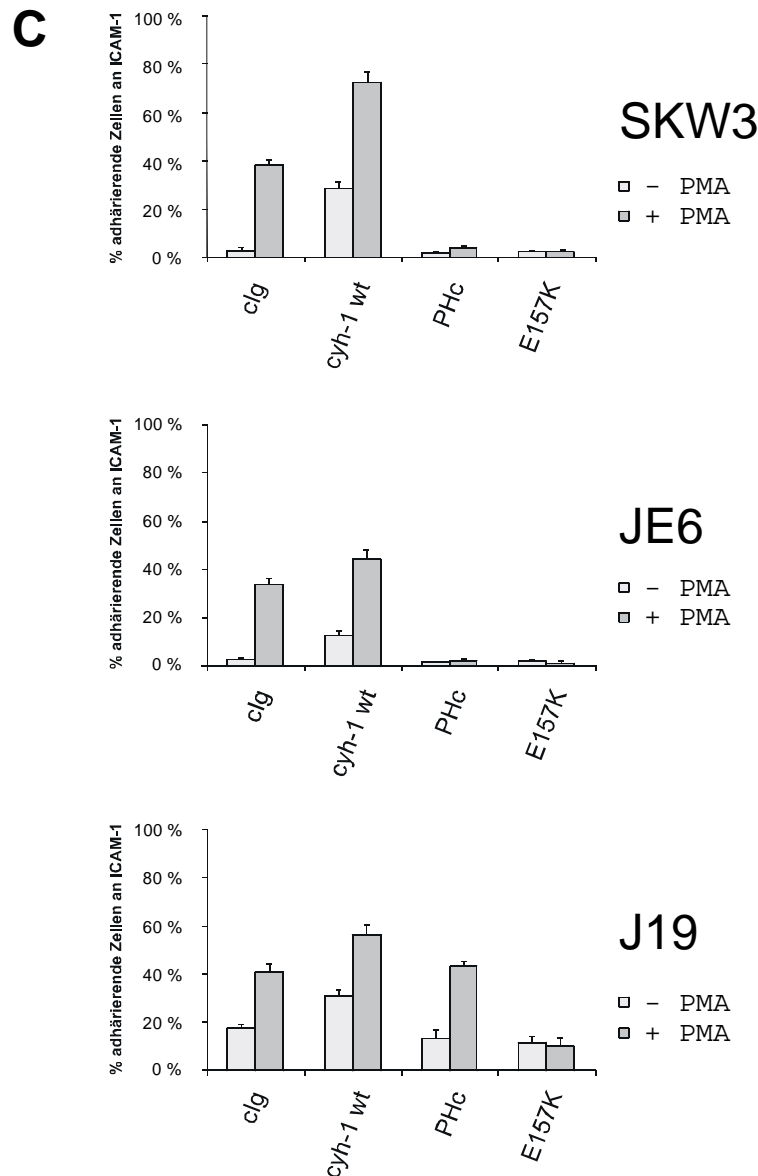


Abb. 17 Cytohesin-1 E157K inhibiert dominant-negativ die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion an ICAM-1

Alle verwendeten Konstrukte wurden als zytoplasmatische Immunglobulin-Fusionsproteine mit Hilfe rekombinanter Vaccinia-Viren exprimiert.

A: Schematische Darstellung der Cytohesin-1-Mutante E157K mit Gliederung der Domänenstruktur.

B: Die verwendeten cIg-Fusionsproteine wurden in SKW3-Zellen exprimiert, durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und im Chemoluminogramm visualisiert.

C: Basale Adhäsion: hellgraue Balken. PMA-stimulierte Adhäsion: dunkelgraue Balken. Zytoplasmatisch exprimiertes Ig-Proteine ohne Fusionspartner (cIg). Durch die Überexpression von cIg-Cytohesin-1 Fusionsprotein (cyh1-1 wt) wird die Zelladhäsion in den getesteten Zelllinien generell gesteigert, verglichen mit den cIg Kontrollen. Die Überexpression von cIg-PHc (PHc) inhibiert die PMA-stimulierte Zelladhäsion in Jurkat E6-Zellen und SKW3-Zellen, während keine meßbare Inhibition in J19-Zellen auftritt. Die Überexpression von Cytohesin-1 E157K führt in allen Zelllinien zur Inhibition der LFA-1-vermittelten Zelladhäsion an ICAM-1.

In den vorhergehenden Experimenten wurde gezeigt, daß durch die Phosphorylierung in der carboxyterminalen polybasischen Region von Cytohesin-1 die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion an ICAM-1 reguliert wird (4.1.6). Die Überexpression der als GEF inaktiven Cytohesin-1 E157K Mutante inhibierte bei sämtlichen getesteten Zelllinien die PMA-stimulierte Zelladhäsion. Die Funktion von Cytohesin-1 als GEF ist demnach wahrscheinlich essentiell für die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion. Aufgrund dieser Resultate sollte daher folgend untersucht werden, ob die Phosphorylierung von Cytohesin-1 auch den Cytohesin-1-katalysierten GDP/GTP-Austausch an ARF1 reguliert.

4.2.2 Cytohesin-1 wird durch Phosphorylierung *in vitro* in seiner GEF-Aktivität reguliert

Der Cytohesin-1-katalysierte GDP/GTP-Austausch an ARF1 wurde in Anlehnung an das Verfahren von Chardin durchgeführt (Chardin *et al.*, 1996; Knorr *et al.*, 2000). In Gegenwart von Liposomen wurde myrestoyliertes ARF1-Protein mit phosphoryliertem oder unphosphoryliertem 6xHis-Cytohesin-1 inkubiert (3.2.12.2). Der GDP/GTP-Austausch wurde durch Zugabe von GTP gestartet und durch Messung der Inkorporation von radioaktivem [³⁵S]GTP γ S in ARF1 dokumentiert. Abbildung 18 zeigt den zeitlichen Verlauf des [³⁵S]GTP γ S-Einbaus in ARF1. Die Inkorporation von [³⁵S]GTP γ S in ARF1, in Gegenwart von phosphoryliertem Cytohesin-1, verlief signifikant schneller, als in Gegenwart von unphosphoryliertem Cytohesin-1. In Abwesenheit des Austauschfaktors Cytohesin-1 erfolgte nur geringer [³⁵S]GTP γ S-Einbau in ARF1.

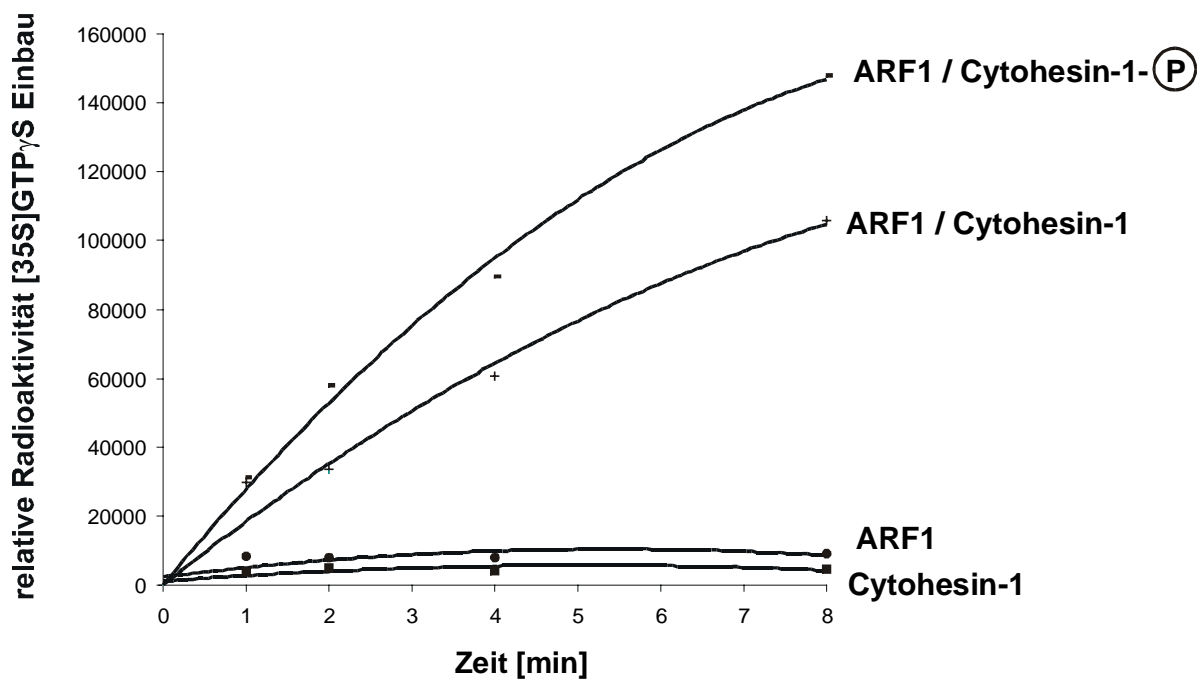


Abb. 18 Die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 wird durch Phosphorylierung reguliert

Bindung von $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ an $2\ \mu\text{M}$ myrestoyliertes ARF1-Protein in Gegenwart von Liposomen und $1\ \text{mM}$ Mg^{2+} , katalysiert durch $100\ \text{nM}$ phosphoryliertes 6xHis-Cytohesin-1 (Cytohesin-1-P) oder $100\ \text{nM}$ unphosphoryliertes 6xHis-Cytohesin-1. Zur Kontrolle wurde die Bindung an ARF1 in Abwesenheit des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors Cytohesin-1 gemessen. Unspezifische Bindung an die Nitrozellulosefilter, Liposomen oder 6xHis-Cytohesin-1 wurde in Abwesenheit von ARF1 gemessen (unterste Meßkurve).

Die Phosphorylierung von Cytohesin-1 in der C-terminalen polybasischen Region steigert den GDP/GTP-Austausch an ARF1 *in vitro*. In den Zelladhäsions-Experimenten (4.2.1) konnte gezeigt werden, daß Cytohesin-1 die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion induzieren kann. Jedoch wird die Zelladhäsion von der GEF-inaktiven Cytohesin-1-Mutante E157K dominant negativ inhibiert. Der GDP/GTP-Austauschtest zeigte, daß die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 durch Phosphorylierung reguliert wird. Über diesen Mechanismus könnte Cytohesin-1 die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion regulieren.

5 Diskussion

Die Regulation der Integrin-vermittelten Zelladhäsion ist von entscheidender Bedeutung für die Prozesse von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen innerhalb des Immunsystems. Die Affinität der Integrine zu ihren Liganden ist abhängig vom Aktivierungszustand der Integrine. Protein-Tyrosin-Kinase oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren lösen intrazelluläre Signalwege aus, die über zytoplasmatische Faktoren die Aktivität der Integrine und damit die Zelladhäsivität regulieren. Diese Art der Regulation wurde als „inside-out-signalling“ bezeichnet. In diesem Kontext wurde das zytoplasmatische Protein Cytohesin-1 als Interaktor des Leukozyten-Integrins LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$; lymphocyte function-associated antigen 1) identifiziert (Kolanus *et al.*, 1996). Die Interaktion von Cytohesin-1 mit LFA-1 wurde im „Yeast-Two-Hybrid-System“ und durch Kopräzipitation in Zellen gezeigt (Kolanus *et al.*, 1996; Geiger *et al.*, 2000). Weiterhin kann Cytohesin-1 die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion an ICAM-1 (inter-cellular adhesion molecule 1) induzieren (Kolanus *et al.*, 1996; Kolanus und Seed, 1997).

5.1 Cytohesin-1 wird in Jurkat-Zellen nach PMA-Stimulierung phosphoryliert

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß durch Phorbolster-Stimulierung Cytohesin-1 in Jurkat T-Zellen phosphoryliert wird. Erste Hinweise für eine Phosphorylierung von Cytohesin-1 wurden durch radioaktive Markierungsexperimente mit ^{32}P -Orthophosphat gewonnen (J. Kolanus, siehe Abbildung 1). Die Kartierung der Phosphorylierungsstellen von Cytohesin-1 erfolgte durch eine nicht-denaturierende alkalische Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Diese Technik ermöglicht es, das phosphorylierte und das unphosphorylierte Cytohesin-1 im Gel zu separieren, um es im Immunoblot zu detektieren. Bei PMA-behandelten Jurkat-Zellen konnte mit dieser Methode eine zusätzliche, schneller migrierende Bande im Immunoblot detektiert werden. Diese zusätzliche Bande trat nicht in Proben auf, die vor der Elektrophorese mit alkalischer Phosphatase behandelt wurden. Dies zeigte, daß die zusätzliche Bande dem phosphorylierten Cytohesin-1-Protein entsprach. Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist häufig zu beobachten, daß phosphorylierte Proteine eine niedrigere Elektromotilität gegenüber ihren unphosphorylierten Isoformen aufweisen (Danielian *et al.*, 1990). Hingegen weisen phosphorylierte Proteine im nicht-denaturierenden Gel in der Regel eine erhöhte Elektromotilität auf (Forchhammer und

Tandeu de Marsac, 1994). Der Massezuwachs durch die zusätzliche Phosphatgruppe wird hier durch den Ladungszuwachs überkompensiert, der entscheidend zur Elektromotilität des Proteins beiträgt. Mit Hilfe der nicht-denaturierenden alkalischen Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde die Phosphorylierung von Cytohesin-1 näher untersucht.

5.2 Serin 394 und Threonin 395 von Cytohesin-1 werden phosphoryliert

In phorbolsterstimulierten (PMA; 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) Zellen werden die Aminosäurereste Serin 394 und Threonin 395 von Cytohesin-1 phosphoryliert. Weitere Untersuchungen zeigten, daß auch *in vitro* durch PKC δ Cytohesin-1 spezifisch an Serin 394 und Threonin 395 phosphoryliert werden kann. Beide Phosphorylierungsstellen sind in eine Umgebung eingebettet, die für PKC-Phosphorylierungen Konsensusmotive (S/T)X(K/R) aufweisen (Pearson und Kemp, 1991). Diese Erkenntnisse deuten daraufhin, daß Cytohesin-1 auch *in vivo* durch ein Mitglied der PKC-Familie phosphoryliert wird, da Phorbolster bekannterweise die PKC-Aktivität stimuliert (Nishizuka, 1984). Durchaus besteht aber auch die Möglichkeit, daß Cytohesin-1 *in vivo* durch eine Kinase phosphoryliert wird, die der PKC im Signalweg folgt. Weitere Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, daß auch ARNO (Cytohesin-2), nicht aber GRP1 (Cytohesin-3) nach Phorbolster-Stimulation phosphoryliert wird. Dies ist konsistent mit den Daten aus dem Aminosäuresequenzvergleich dieser Proteine. GRP1 enthält keine putativen Phosphorylierungsstellen. Dagegen weist ARNO eine Phosphorylierungsstelle auf, nämlich Serin 392. Diese Phosphorylierungsstelle ist homolog zum Serin 394 in Cytohesin-1 und wurde inzwischen kartiert (Frank *et al.*, 1998). Cytohesin-4, ein erst kürzlich entdecktes Protein der Cytohesinfamilie, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert. Der Aminosäuresequenzvergleich ergab, daß Cytohesin-4 zwei putative Phosphorylierungsstellen enthält, nämlich Serin 384 und Threonin 385.

5.3 Plasmamembranassoziation von Cytohesin-1

Vorangegangene Studien zeigten, daß Cytohesin-1, Cytohesin-2 und Cytohesin-3 an die Plasmamembran rekrutiert werden können. Signaltransmissionen über Zelloberflächenrezeptoren können zur Aktivierung der PI3-Kinase führen. Dies führt zur Synthese von PIP3 (Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat), einem Ligand der Cytohesine (Nagel *et al.*, 1998a und 1998b; Venkateswarlu *et al.*, 1998; Klarlund *et al.*, 1997). Cytohesin-1 assoziiert mit der Plasmamembran über Phospholipide. Die PH-Domäne von Cytohesin-1 vermag PIP3

hochaffin zu binden. Diese PH-Domänen-vermittelte Bindung an die Plasmamembran wird durch die c-Domäne von Cytohesin-1 stabilisiert (Nagel *et al.*, 1998b). Die zwei identifizierten Phosphorylierungsstellen von Cytohesin-1 liegen in der carboxyterminalen c-Domäne. Wie beschrieben spielt die c-Domäne eine Rolle bei der Rekrutierung von Cytohesin-1 zum Plasmamembran-kompartiment (Nagel *et al.*, 1998b). Daher wurde vermutet, daß diese Funktion der c-Domäne durch die Phosphorylierung beeinflusst wird. Fluoreszenzmikroskopische Analysen zeigten aber keinen eindeutigen Effekt der Phosphorylierung von Cytohesin-1 in Bezug auf die Plasmamembranlokalisierung des Proteins. Liganden-Bindungsstudien wurden anhand der PHc-Domäne von Cytohesin-1 *in vitro* durchgeführt. Die Phosphorylierung von Cytohesin-1 hatte hier keinen Einfluß auf die Bindung des Liganden PIP3. Auch PHc-Domänen-Konstrukte, die eine konstitutive Phosphorylierung des Proteins durch Substitution von Serin 394 und Threonin 395 mit den sauren, negativ geladenen Aminosäuren Aspartat und Glutamat imitieren sollten, zeigten in den durchgeführten Bindungsstudien kein verändertes Bindungsverhalten gegenüber dem Wildtypprotein von Cytohesin-1. Im Gegensatz zu Cytohesin-1 konnte gezeigt werden, daß die Phosphorylierung des carboxyterminalen Serins 392 von ARNO (Cytohesin-2) womöglich einen elektrostatischen Abstoßungseffekt bewirkt (Frank *et al.*, 1998; Santy *et al.*, 1999). Dieser soll zur Dissoziation des Proteins von dem Phospholipidliganden PIP3 führen. So würde die Plasmamembranbindung des Proteins verhindert werden. Die Substitution des Serins 392 durch Glutamat hatte hier den gleichen Effekt wie die Phosphorylierung des Proteins. Überraschenderweise scheint dieser Mechanismus nicht für Cytohesin-1 zu gelten, obwohl hier zwei Phosphorylierungsstellen im carboxyterminalen Bereich enthalten sind. Durch Phosphorylierung von Cytohesin-1, oder durch Substitution der respektiven Phosphorylierungsstellen durch Aspartat bzw. Glutamat, sollte daher eine elektrostatische Abstoßung effizienter als bei ARNO in Erscheinung treten. Inzwischen wurde eine neuere Studie veröffentlicht, die mit großem Aufwand sehr detailliert die Konsequenzen der Phosphorylierung von ARNO untersuchte. Die Autoren konnten zeigen, daß die spezifische Bindung von ARNO an PIP3 in keiner Weise negativ durch die Phosphorylierung des Serinrestes 392 beeinflusst wird. Hingegen konnte gezeigt werden, daß unspezifische Bindungen von phosphoryliertem ARNO an saure Lipide, wie Phosphatidylserin, vermindert werden (Macia *et al.*, 2000). Aufgrund der Erkenntnisse aus dieser Studie und der vorliegenden Arbeit kann geschlossen werden, daß die Membranassoziation von Cytohesin-1 über spezifische Bindung an PIP3 nicht durch die Phosphorylierung des Proteins beeinflusst wird. Cytohesin-1 und Cytohesin-2 werden *in vivo* häufig koexprimiert. Mögliche

Unterschiede in der Konsequenz der Phosphorylierung könnte somit eine differenzierte Regulierung dieser beiden Cytohesine gewährleisten.

5.4 Phosphoryliertes Cytohesin-1 assoziiert mit dem Aktinzytoskelett

Studien über Zelladhäsion zeigen, daß das Zytoskelett der Leukozyten entscheidend an den Prozessen der LFA-1-vermittelte Zelladhäsion beteiligt ist (Peter und O'Toole, 1995; Kooyk *et al.*, 1999; Kooyk und Figdor, 2000; Geiger *et al.*, 2000). Deshalb wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob Cytohesin-1 mit dem Zytoskelett der Zellen interagiert und wie diese Interaktion reguliert wird. Die Phosphorylierung von Cytohesin-1 reguliert nicht dessen spezifische Bindung an die Plasmamembran. Hingegen korrelierte die Phosphorylierung von Cytohesin-1 stark und klar mit dessen Assoziation mit dem Aktinzytoskelett *in vitro* und in Zellen. So assoziiert PKC-phosphoryliertes Cytohesin-1 *in vitro* mit zellulären Zytoskelettfractionen. Diese Zytoskelettfractionen enthalten neben den Zytoskelettanteilen noch weitere unlösliche Komponenten. Zellkerne und Membranen wurden jedoch zuvor entfernt. Die Assoziation von Cytohesin-1 mit dem Aktinzytoskelett wurde durch Behandlung der Zellen mit Cytochalasin D gezeigt, einem Agens, welches spezifisch mit der Ausbildung des F-Aktins interferiert (Godman *et al.*, 1980, Casella *et al.*, 1981; Schliwa *et al.*, 1982; Rodgers *et al.*, 2001). So wurde die Assoziation von Cytohesin-1 mit der Zytoskelettfraction durch Behandlung mit Cytochalasin D spezifisch und vollständig inhibiert. Die Distribution von rekombinant exprimiertem Cytohesin-1 in Jurkat E6 Zellen wurde mit Hilfe konfokaler Laser-Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Generell war zu erkennen, daß Cytohesin-1 hauptsächlich im Zellkortexbereich lokalisiert ist. Diese Lokalisierung wurde nach PMA-induzierter Phosphorylierung von Cytohesin-1 verstärkt. Einen weiteren Beitrag zur kortikalen Assoziation trägt die PHc-Domäne bei, durch Bindung an die Phospholipide der Plasmamembran. Auch nach Zersprengen des Aktinzytoskeletts, durch Cytochalasin-D-Behandlung der Jurkat T-Zellen, blieb die Membranassoziation von Cytohesin-1 bestehen. Die Assoziation mit dem Zytoskelett von phosphoryliertem Cytohesin-1 ist demnach nicht allein verantwortlich für die kortikale Lokalisation des Proteins. Wie zuvor beschrieben, bewirken Signale, die über Membranrezeptoren übertragen werden und zur Aktivierung der PI3-Kinase führen, eine verstärkte Plasmamembranrekrutierung von Cytohesin-1. Diese Rekrutierung wird durch hochaffine Bindung von Cytohesin-1 an PIP3 gewährleistet (Nagel *et al.*, 1998a). Plasmamembranrekrutierung und phosphorylierungsabhängige Zytoskelettassoziation von Cytohesin-1 sind wahrscheinlich kooperative Effekte, sie

gewährleisten so gemeinsam eine stabile Lokalisierung des Proteins im kortikalen Bereich der Zellen.

5.5 Funktionale Rolle der Zytoskelettassoziation von Cytohesin-1

Welche mechanistische und funktionale Rolle spielt die Regulierung der Aktinzytoskelettassoziation von Cytohesin-1? In vorhergehenden Studien wurde gezeigt, daß Cytohesin-1 spezifisch mit der β_2 -Untereinheit (CD18) des Integrins LFA-1 interagiert (Kolanus *et al.*, 1996; Geiger *et al.*, 2000). Des weiteren induzieren Phorbolster, wie PMA, die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion an ICAM-1 (Kooyk *et al.*, 1999). Cytohesin-1 wird wie zuvor beschrieben in Phorbolster-stimulierten Zellen an das Aktinzytoskelett rekrutiert. Zusätzlich führt auch die Bindung von Cytohesin-1 an die Plasmamembran zur kortikalen Assoziation des Proteins. Diese Prozesse bewirken eine Lokalisierung von Cytohesin-1, die eine Interaktion mit LFA-1 begünstigt. Zelladhäsionstests sollten die Analyse der Zytoskelettassoziation auf funktionaler Ebene ermöglichen. Die phosphorylierungs-negativen Mutanten von Cytohesin-1 beeinflussen regulatorisch die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion an ICAM-1. In phorbolsterstimulierten Zellen, die die phosphorylierungs-negativen Mutanten von Cytohesin-1 überexprimierten, war die Zelladhäsion drastisch reduziert, gegenüber den Zellen die Cytohesin-1 (Wildtyp) überexprimierten. Diese Ergebnisse korrelierten sehr gut mit der Beobachtung, daß Cytohesin-1 (Wildtyp) in phorbolsterstimulierten Zellen phosphoryliert wird. Konsequenterweise trat dieser Einfluß der phosphorylierungs-negativen Mutanten nur nach PMA-Stimulierung der Zellen auf. Die basale, unstimulierte Zelladhäsion wurde durch die Überexpression von Cytohesin-1 (Wildtyp) und phosphorylierungs-negativen Mutanten hingegen in gleichem Maße induziert.

Die Art und Weise, wie die Assoziation von Cytohesin-1 mit Komponenten des Aktinzytoskeletts die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion reguliert, konnte noch nicht geklärt werden. So ist ebenfalls unklar, mit welchen Elementen des Aktinzytoskeletts phosphoryliertes Cytohesin-1 interagiert. Die polybasische c-Domäne von Cytohesin-1, die die Phosphorylierungsstellen birgt, muß nicht notwendigerweise diese Interaktion direkt vermitteln. Möglicherweise kann durch die Phosphorylierung von Cytohesin-1 eine Konformationsänderung des Proteins bewirkt werden, die neue Interaktionen ermöglicht. Darüber hinaus wurde allerdings deutlich gezeigt, daß die Aktinzytoskelettorganisation eine Schlüsselrolle in der Zelladhäsion spielt (Kooyk und Figdor, 2000). Es wurde ein Modell entworfen, welches hochdynamische Interaktionen der zytoplasmatischen Domänen von

LFA-1 mit dem Aktinzytoskelett beschreibt (Lub *et al.*, 1995). Nach diesem Modell wird die Ligandenbindung von LFA-1 durch Ablösen des relativ unbeweglichen Proteins von dem Aktinzytoskelett initiiert. Dies ermöglicht dann laterale Bewegungen von LFA-1 innerhalb der Plasmamembran und erlaubt dadurch eine Oligomerisierung und „Cluster-Formation“ der Adhäsionsmoleküle, was die Ligandenbindung fördert. Nach der Ligandenbindung kann die Assoziation mit dem Zytoskelett wiederhergestellt werden, was zur Stabilisierung der Zelladhäsion notwendig ist. Cytohesin-1 könnte in diesen Prozessen eine Rolle spielen. Entweder durch das Vermitteln der initialen Ablösung des Integrins LFA-1 vom Zytoskelett (Stewart *et al.*, 1998) oder durch spätere Stabilisierung der Adhäsionskomplexe durch Bindung von Cytohesin-1 an das Aktinzytoskelett. Durch Assoziation von Cytohesin-1 und LFA-1 mit dem Zytoskelett, könnte eine stabile Interaktion der beiden Komponenten gewährleistet werden. Dies könnte die Aktivierung von LFA-1 aufrechterhalten, was für die Zelladhäsion unabdingbar ist (Geiger *et al.*, 2000). Es wurde in Betracht gezogen, daß Cytohesin-1 ein direkter Adapter zwischen dem Zytoskelett und LFA-1 sein könnte. Bisher konnten allerdings keine Hinweise gefunden werden, die auf eine phosphorylierungsabhängige Interaktion von Cytohesin-1 mit LFA-1 deuten. Andererseits ist es jedoch möglich, daß die Phosphorylierung von Cytohesin-1 die LFA-1-Funktion indirekt beeinflusst, durch Regulierung der Integrin-Bindung an „Linkerproteine“ des Zytoskeletts. So konnte gezeigt werden, daß LFA-1 Proteine bindet, wie α -Aktinin (Critcheley *et al.*, 1999), Talin (Monks *et al.*, 1998) oder Filamin (Sharma *et al.*, 1995).

Cytohesin-1 gehört außerdem zu einer Familie von Molekülen, die eine spezifische Guanin-Nukleotid-Austauschaktivität für ARF-GTPasen aufweist (Meacci *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 2000; Donaldson und Jackson, 2000). Da ARF-Proteine eine entscheidende Rolle in der Zytoskelettorganisation spielen (Donaldson und Klausner, 1994), wurde in diesem Zusammenhang die Funktion von Cytohesin-1 als GEF (guanine nucleotide exchange factor) untersucht.

5.6 Die Phosphorylierung von Cytohesin-1 steigert dessen GEF-Aktivität

Cytohesin-1 ist ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF; guanine nucleotide exchange factor) für ARF1 (ADP-ribosylation factor-1) *in vitro* (Meacci *et al.*, 1997). GEF-Proteine katalysieren den Austausch von GDP durch GTP an ARF-Proteinen, durch beschleunigen der Dissoziation von gebundenem GDP. Die Bindung von GTP an ARF-Proteine überführt diese dann in ihre funktional aktive Form. Die Sec7-Domäne ist die GEF-Funktion-bereitstellende

Domäne von Cytohesin-1. Die isolierte Sec7-Domäne ist hinreichend für die katalytische Aktivität von Cytohesin-1 als GEF. Jedoch wird die GEF-Aktivität auf ARF-Proteine deutlich gesteigert, wenn das komplette Cytohesin-1-Protein im GDP/GTP-Austauschexperiment eingesetzt wird (Pacheco-Rodriguez *et al.*, 1998). Die Anwesenheit von künstlichen Liposomen steigert zusätzlich den GDP/GTP-Austausch an ARF1 *in vitro* durch die Bindung von Cytohesin-1 und ARF1 an die Liposomenmembranen (Chardin *et al.*, 1996; Meacci *et al.*, 1997; Knorr *et al.*, 2000). Die ADP-Ribosylierungs-Faktoren (ARF) gehören zur Superfamilie der RAS-GTPasen. ARF-Proteine spielen eine Rolle in der Regulation des intrazellulären Vesikeltransportes und der Organisation des Zytoskeletts (Donaldson und Klausner, 1994; Donaldson und Jackson, 2000). Weitere Studien zeigten, daß ARF-Proteine an der Regulation der zellulären Aktinstruktur und an der Ausbildung von Lamellapodien beteiligt sind (Radhakrishna *et al.*, 1996; D'Souza-Schorey *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 2000, Mazaki *et al.*, 2001). ARF1, ARF5 und ARF6 sind außerdem potente Aktivatoren der Phospholipase D (PLD) (Brown *et al.*, 1993; Massenburg *et al.*, 1994, Lee *et al.*, 2001, Skippen *et al.*, 2001). Durch die enzymatische Tätigkeit der PLD werden dann Phosphatidate freigesetzt. Wahrscheinlich spielt die lokale Produktion von Phosphatidaten eine wichtige Rolle bei der Organisation des Aktinzytoskeletts (Ha und Exton, 1993; Cross *et al.*, 1996). Cytohesin-2 (ARNO) ist ein GEF für ARF1 und ARF6 (Chardin *et al.*, 1996; Klarlund *et al.*, 1997; Meacci *et al.*, 1997). Die transiente Expression von Cytohesin-2 in phorbolsteraktivierten HeLa-Zellen deutete daraufhin, daß Cytohesin-2 an der Ausbildung von Membranauswüchsen bzw. der Bildung von Lamellapodien beteiligt ist, über eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts (Frank *et al.*, 1998).

Cytohesin-1 assoziiert mit dem Aktinzytoskelett, diese Assoziation ist regulierbar. Wie zuvor beschrieben, spielt die F-Aktinreorganisation eine entscheidende Rolle in der Regulation der Zelladhäsion (Peter und O'Toole, 1995; Kooyk und Figdor, 2000). Die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 ist essentiell für die Induktion der LFA-1-vermittelten Zelladhäsion. Dies konnte mit Hilfe der GEF-inaktiven Cytohesin-1-Mutante E157K anhand von Zelladhäsionsexperimenten gezeigt werden. Experimente *in vitro* zeigten weiterhin, daß Cytohesin-1 durch Phosphorylierung in seiner GEF-Aktivität positiv reguliert wird. Die Phosphorylierungsstellen von Cytohesin-1 befinden sich in der c-Domäne, die carboxyterminal der PH-Domäne liegt. Die N-terminal gelegene Sec7-Domäne von Cytohesin-1 katalysiert den Guanin-Nukleotid-Austausch. Aufgrund der Lage der Domänen von Cytohesin-1 wird die GEF-Aktivität möglicherweise durch eine phosphorylierungsinduzierte Konformationsänderung des Proteins reguliert.

Die Proteine der Cytohesinfamilie weisen eine große Homologie auf Aminosäureebene auf. Die Sec7-Domänen der Cytohesine sind zu über 90 % homolog zueinander. Die funktionalen Eigenschaften dieser Sec7-Domänen lassen sich im GDP/GTP-Austauschexperiment an ARF-Proteinen analysieren. Die isolierte Sec7-Domäne von Cytohesin-1 ist z.B. ein potenter GEF für ARF1, 2, 3, 4, 5 und 6 im *in vitro* Test und zeigt hier nur geringfügige Spezifität gegenüber den verschiedenen ARF-Proteinen. Es stellt sich die Frage, wie die Cytohesine trotz der großen Gemeinsamkeiten in Bezug auf ihre GEF-Funktion, differenzierte physiologische Funktionen erfüllen können. Erst der Einsatz des vollständigen Cytohesin-1-Proteins im GDP/GTP-Austauschtest, konnte eine signifikante Spezifität gegenüber ARF1 und ARF3 *in vitro* zeigen (Pacheco-Rodriguez *et al.*, 1998). Die Spezifität von Cytohesin-1 hängt folglich auch wesentlich von der PHc-Domäne ab. Auch die weiteren Mitglieder der Cytohesinfamilie können *in vitro* für mehrere ARF-Proteine als Austauschfaktor agieren. Cytohesin-4 ist beispielsweise ein GEF für ARF 1 und ARF 5 (Cherfils *et al.*, 1998; Franco *et al.*, 1998; Ogasawara *et al.*, 2000). Die PHc-Domäne der Cytohesine könnte auf die Konformation des Gesamtproteins einwirken und so Spezifität gegenüber bestimmten ARF-Proteinen gewährleisten. Für die Spezifität der Cytohesine *in vivo* kommen weitere Effekte zum Tragen. So unterscheiden sich die PHc-Domänen der Cytohesine in Spezifität und Affinität zu ihren Phospholipidliganden der Plasmamembran (Klarlund *et al.*, 1997; Nagel *et al.*, 1998a und 1998b; Macia *et al.*, 2000). Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß die Phosphorylierung von Cytohesin-1 dessen Assoziation mit dem Aktinzytoskelett reguliert. Die Lokalisierung bzw. die Kompartimentierung der Cytohesine in der Zelle könnte zusätzliche Spezifität gegenüber bestimmten ARF-Proteinen bewirken.

5.7 Modell der Cytohesin-1-regulierten Zelladhäsion

Abbildung 19 zeigt ein mögliches Modell, wie z.B. T-Zellrezeptor- oder Chemokinrezeptor-vermittelte Signale die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion induzieren können. Diese Signale konvergieren in Cytohesin-1, dem zytoplasmatischen Regulator der LFA-1-vermittelten Zelladhäsion. Cytohesin-1 wird durch PIP3 (Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat), dem Produkt der PI3-Kinase (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase), an die Plasmamembran rekrutiert und dann durch PKC phosphoryliert. Dies ermöglicht die Assoziation mit dem Aktinzytoskelett über einen noch unbekanntem Interaktor. Membranrekrutierung und Zytoskelettassoziation begünstigen vermutlich die Interaktion von Cytohesin-1 mit der zytoplasmatischen Domäne CD18 (β_2) von LFA-1. Der molekulare Schalter Cytohesin-1 kann

über diese direkte Interaktion die Aktivierung des Integrins LFA-1 bewirken. Des Weiteren wird durch Phosphorylierung von Cytohesin-1 der GDP/GTP-Austausch an ARF-Proteinen reguliert. ARF-GTP-induziert erfolgen dann „Integrinclustering“ und Zytoskelett-rearrangements. Dadurch wird die Avidität von LFA-1 zu seinem physiologischen Liganden ICAM-1 erhöht. Cytohesin-1 kann demnach auf mehreren Ebenen die ICAM-1-Bindung durch LFA-1 regulieren. Die Steuerung von stetiger und dynamischer Zelladhäsion wird so ermöglicht. Dies ist eine Voraussetzung für physiologische Prozesse, wie z.B. für die vermittelte Zellyse durch zytotoxische T-Zellen.

Vorangegangene Untersuchungen in peripheren Blutlymphozyten oder T-Zelllinien zeigten außerdem, daß durch Phorbolster, einem potenten Aktivator der PKC, die Cytohesin-1-induzierte Zelladhäsion stimuliert wird (Kolanus *et al.*, 1996; Geiger *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß Cytohesin-1 *in vitro* durch PKC und in Zellen nach Phorbolsterstimulierung phosphoryliert wird. Die Membranrekrutierung und die Zytoskelettassoziation von Cytohesin-1 begünstigen dessen Interaktion mit LFA-1. Des Weiteren spielt die Zytoskelettorganisation im Prozeß der LFA-1-vermittelten Zelladhäsion eine entscheidende Rolle (Kooyk und Figdor, 2000). Diese Zytoskelettorganisation könnte durch ARF-Proteine reguliert werden. Die Aktivität der ARF-Proteine, bzw. der GDP/GTP-Austausch, wird durch Cytohesin-1 reguliert. Dabei wird die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 durch dessen Phosphorylierung gesteuert. Die gezielte Lokalisierung von Cytohesin-1 einerseits und andererseits die Modulation der GEF-Funktion von Cytohesin-1 durch dessen reversible Modifikation, können eine strenge und dynamische Regulierung der LFA-1-vermittelten Zelladhäsion gewährleisten.

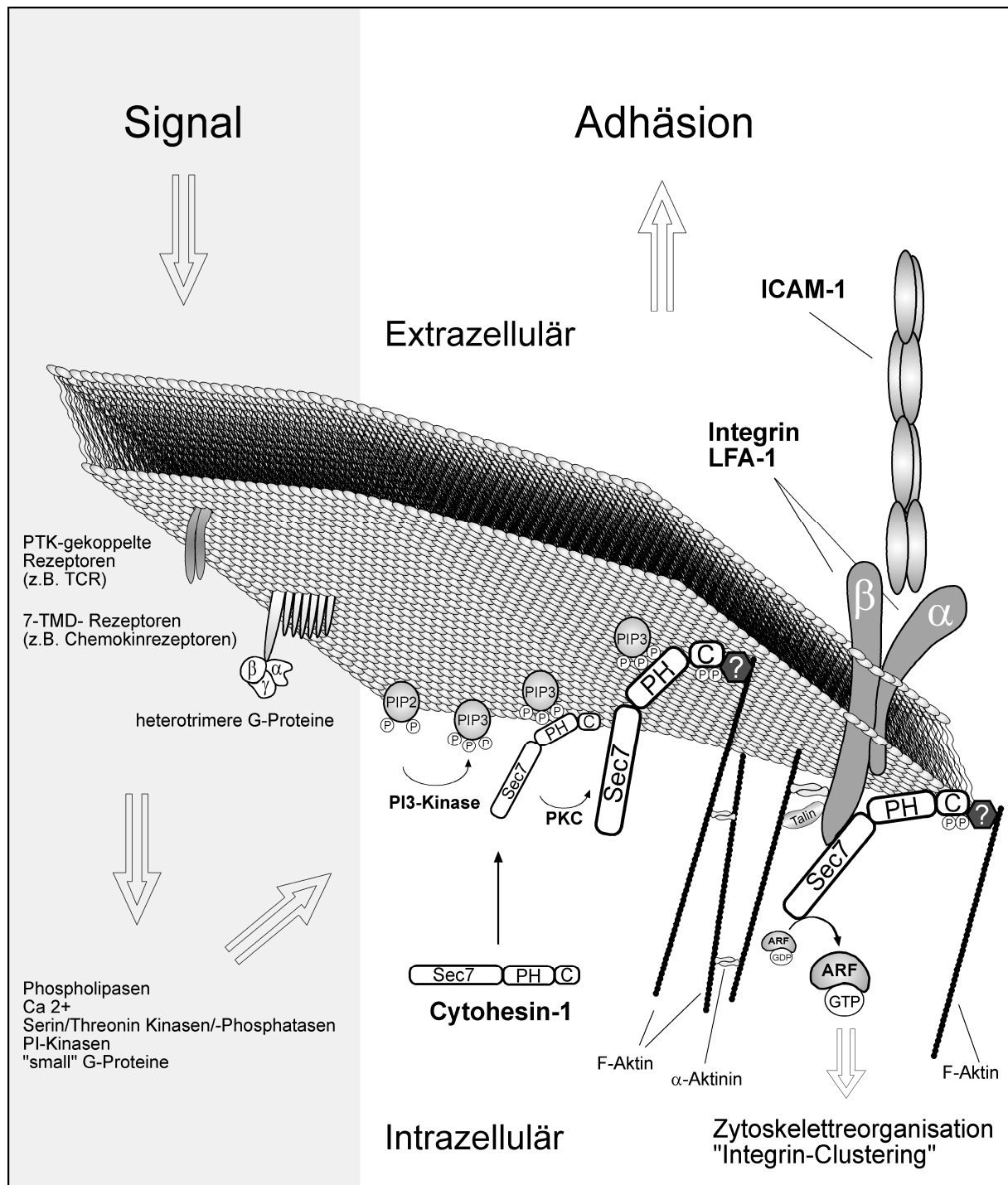


Abb. 19 Cytohesin-1 ist der zytoplasmatische Regulator der LFA-1-vermittelten Zelladhäsion

Im ersten Schritt werden Signale über Protein-Tyrosin-Kinase (PTK) gekoppelte Rezeptoren, wie z.B. den T-Zellrezeptor oder über 7-Trans-Membran-Domänen-Rezeptoren (7-TMD) und heterotrimerische G-Proteine in die Zelle transduziert. Es kommt zur Freisetzung von „second messengern“ und zur Induktion intrazellulärer Signalkaskaden. Hierbei kommt der Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) und der PKC für die Induzierung der Zelladhäsion eine besondere Rolle zu. Im zweiten Schritt wird Cytohesin-1 über Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP3) an die Plasmamembran rekrutiert und anschließend durch PKC phosphoryliert. Phosphoryliertes Cytohesin-1 kann nun mit dem Aktinzytoskelett über einen noch unbekannt

Faktor (?) assoziieren. Membranrekrutierung und Zytoskelettassoziation begünstigen die Interaktion von Cytohesin-1 mit LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1). Dies führt in der Folge zur Aktivierung von LFA-1. Das aktivierte LFA-1 bindet dann seine physiologischen Liganden, wie z.B. ICAM-1 (inter-cellular adhesion molecule-1). Zusätzlich wird die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 durch dessen Phosphorylierung positiv reguliert. Dadurch wird der GDP/GTP-Austausch an ARF (ADP-ribosylation factor) gesteigert, was zum „Clustering“ der Integrine und zur Zytoskelettorganisation führt. In diesem Prozeß wird LFA-1 über Linkerproteine, wie α Aktinin und Talin, mit dem Aktinzytoskelett neu verknüpft. Die Aktivierung von LFA-1 und das „Clustering“ der Integrine zur Erhöhung der Avidität bewirken die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion an ICAM-1.

6 Ausblick

Die Phosphorylierung von Cytohesin-1 konnte *in vitro* durch Behandlung mit PKC δ erhalten werden und durch Phorbolsterstimulierung in Zellen induziert werden. Welche der PKC-Isoformen *in vivo* für die Phosphorylierung verantwortlich ist, soll durch weitere Studien geklärt werden. Neben breitbandigen Inhibitoren sind spezifische membrangängige Peptidinhibitoren für einzelne PKC-Isoformen kommerziell erhältlich. Mit Hilfe solcher Inhibitoren könnte die PKC identifiziert werden, die für die Phosphorylierung von Cytohesin-1 verantwortlich ist.

Die Assoziation des phosphorylierten Cytohesin-1 mit dem Aktinzytoskelett soll in Hinsicht auf die Zytoskelettkomponenten analysiert werden, die an dieser Interaktion beteiligt sind. In Frage kommende Komponenten wären „Linkerproteine“, wie α -Aktinin oder Talin, mit denen auch LFA-1 selbst interagiert und über die es an das Aktinzytoskelett gekoppelt werden kann. Einen Einfluß der Phosphorylierung von Cytohesin-1 auf die Bindung zum Integrin LFA-1 selbst, konnte in bisherige Untersuchungen nicht gezeigt werden.

Durch PKC-Phosphorylierung konnte *in vitro* die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 reguliert werden. ARNO (Cytohesin-2) besitzt eine, Cytohesin-4 wahrscheinlich zwei und Cytohesin-3 (GRP1) keine PKC-Phosphorylierungsstellen. Dies deutet daraufhin, daß GRP1 nicht in seiner GEF-Aktivität regulierbar ist. Die übrigen Cytohesine könnten je nach ihrem Phosphorylierungspotential, in ihrer GEF-Aktivität reguliert werden. Neben diesen Regulierungsmechanismen spielt wahrscheinlich auch die differentielle Expression der Cytohesine *in vivo* eine entscheidende Rolle. So ist z.B. in anergen T-Zellen die Expression von GRP1 (Cytohesin-3) stark hochreguliert (Korthauer *et al.*, 2000). In Zukunft könnten Vergleichende Studien über die differentielle Expression der Cytohesine und über deren Regulation durch Phosphorylierung helfen, die Rolle dieser Proteinfamilie weitergehend zu analysieren.

7 Zusammenfassung

Die Integrinrezeptor-vermittelte Zelladhäsion wird durch intrazelluläre Signalkaskaden kontrolliert. Cytohesin-1 ist ein integrinbindendes Protein und ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF). Dieser aktiviert das β_2 -Integrin LFA-1 und induziert dessen Bindung an ICAM-1. Cytohesin-1 enthält eine PH-Domäne, diese ist an der funktionalen Regulation des Proteins beteiligt und vermittelt die Membranrekrutierung über Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat, dem Produkt der Phosphatidylinositol-3-Kinase. Die Phosphoinositid-vermittelte Membranbindung wird primär von der PH-Domäne bewirkt, jedoch wird diese Funktion von der carboxyterminalen polybasischen c-Domäne gestützt. In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, daß ein Serin/Threonin-Motiv innerhalb dieser c-Domäne durch gereinigte PKC δ *in vitro* und *in vivo* nach Phorbolsterstimulierung phosphoryliert wird. Biochemische und funktionale Analysen zeigten, daß phosphoryliertes Cytohesin-1 mit dem Aktinzytoskelett assoziiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß durch Phosphorylierung von Cytohesin-1 der Guanin-Nukleotid-Austausch an ARF1 *in vitro* reguliert wird. ARF-Proteine sind entscheidend an der Zytoskeltreorganisation beteiligt, die während Zelladhäsionsprozessen stattfindet. In Zellen zeigte sich, daß die LFA-1-abhängige Zelladhäsion an ICAM-1 durch phosphoryliertes Cytohesin-1 drastisch gesteigert wird. Zusammengefaßt zeigen diese Erkenntnisse, daß intrazelluläre Signalkaskaden über Phosphatidylinositol-3-Kinase und Protein-Kinase-C in Cytohesin-1 als funktionalem Integrator münden. Cytohesin-1 reguliert über diese Prozesse die β_2 -Integrin-vermittelte Zelladhäsion von T-Lymphozyten.

8 Literaturverzeichnis

- Andrew D, Shock A, Ball E, Ortlepp S, Bell J, Robinson M.** (1993)
KIM185, a monoclonal antibody to CD18 which induces a change in the conformation of CD18 and promotes both LFA-1- and CR3-dependent adhesion.
Eur J Immunol **23**, 2217-2222
- Arnaout MA.** (1990)
Leukocyte adhesion molecules deficiency: its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response.
Immunol Rev **114**, 145-180
- Arnaout MA, Dana N, Gupta SK, Tenen DG, Fathallah DM.** (1990)
Point mutations impairing cell surface expression of the common beta subunit (CD18) in a patient with leukocyte adhesion molecule (Leu-CAM) deficiency.
J Clin Invest **85**, 977-981
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K.** (1987)
Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Chap. 8.5, Suppl. 15, Greene and Wiley Interscience, New York
- Balch WE, Kahn RA, Schwaninger R.** (1992)
ADP-ribosylation factor is required for vesicular trafficking between the endoplasmic reticulum and the cis-Golgi compartment.
J Biol Chem **267**, 13053-13061
- Betz SF, Schnuchel A, Wang H, Olejniczak ET, Meadows RP, Lipsky BP, Harris EAS, Staunton DE, Fesik SW.** (1998)
Solution structure of the cytohesin-1 (B2-1) Sec7 domain and its interaction with the GTPase ADP ribosylation factor 1.
Proc Natl Acad Sci USA **95**, 7909-7914
- Birnboim HC, Doly J.** (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res **7**, 1513-1523
- Brown HA, Gutowski S, Moomaw CR, Slaughter C, Sternweis PC.** (1993)
ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity.
Cell **75**, 1137-1144
- Casadaban MJ, Cohen SN.** (1980)
Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*.
J Mol Biol **138**, 179-207

Casella JF, Flanagan MD, Lin S. (1981)

Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change.

Nature **293**, 302-305

Chardin P, Paris S, Antonny B, Robineau S, Beraud-Dufour S, Jackson CL, Chabre M. (1996)

A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains.

Nature **384**, 481-484

Cherfils J, Menetrey J, Mathieu M, Le Bras G, Robineau S, Beraud-Dufour S, Antonny B, Chardin P. (1998)

Structure of the Sec7 domain of the Arf exchange factor ARNO.

Nature **392**, 101-105

Critchley DR, Holt MR, Barry ST, Priddle H, Hemmings L, Norman J. (1999)

Integrin-mediated cell adhesion: the cytoskeletal connection.

Biochem Soc Symp **65**, 79-99

Cross MJ, Roberts S, Ridley AJ, Hodgkin MN, Stewart A, Claesson-Welsh L, Wakelam MJ. (1996)

Stimulation of actin stress fibre formation mediated by activation of phospholipase D.

Curr Biol **6**, 588-597

Danielian S, Fagard R, Boulet I, Fischer S. (1990)

The retarded electrophoretic migration of p56lck induced by vanadate in lymphoma cells correlates with modified kinase activity.

Biochimie **72**, 315-322

Dierks H, Kolanus J, Kolanus W. (2001)

Actin cytoskeletal association of cytohesin-1 is regulated by specific phosphorylation of its carboxyl-terminal polybasic domain.

J Biol Chem **276**, 37472-37481

Donaldson JG, Jackson CL. (2000)

Regulators and effectors of the ARF GTPases.

Curr Opin Cell Biol **12**, 475-482

Donaldson JG, Klausner RD. (1994)

ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure.

Curr Opin Cell Biol **6**, 527-532

Dransfield I, Hogg N. (1989)

Regulated expression of Mg²⁺ binding epitope on leukocyte integrin alpha subunits.

EMBO J **8**, 3759-3765

D'Souza-Schorey C, Boshans RL, McDonough M, Stahl PD, Van Aelst L. (1997)

A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements.

EMBO J **16**, 5445-5454

Dustin ML, Springer TA. (1989)

T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1.
Nature **341**, 619-624

Falkner FG, Moss B. (1988)

Escherichia coli gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors.
J Virol **62**, 1849-1854

van der Flier A, Sonnenberg A. (2001)

Function and interactions of integrins.
Cell Tissue Res **305**, 285-298

Forchhammer K, Tandeau de Marsac N. (1994)

The PII protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status.
J Bacteriol **176**, 84-91

Fornaro M, Languino LR. (1997)

Alternatively spliced variants: a new view of the integrin cytoplasmic domain.
Matrix Biol **16**, 185-193

Franco M, Boretto J, Robineau S, Monier S, Goud B, Chardin P, Chavrier P. (1998)

ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of Golgi structure and function.
Proc Natl Acad Sci USA **95**, 9926-9931

Frank SR, Hatfield JC, Casanova JE. (1998)

Remodeling of the actin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase C and the ADP-ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO.
Mol Biol Cell **9**, 3133-3146

Gahmberg CG. (1997)

Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules.
Curr Opin Cell Biol **9**, 643-650

Gahmberg CG, Tolvanen M, Kotovuori P. (1997)

Leukocyte adhesion- -structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands.
Eur J Biochem **245**, 215-232

Gawaz M, Besta F, Ylanne J, Knorr T, Dierks H, Bohm T, Kolanus W. (2001)

The NITY motif of the beta-chain cytoplasmic domain is involved in stimulated internalization of the beta3 integrin A isoform.
J Cell Sci **114**, 1101-1113

- Geiger C, Nagel W, Boehm T, van Kooyk Y, Figdor CG, Kremmer E, Hogg N, Zeitlmann, L, Dierks H, Weber KS, Kolanus W. (2000)**
Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1.
EMBO J **19**, 2525-2536
- Gluzman, Y. (1981)**
SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants.
Cell **23**, 175-182
- Godman G, Woda B, Kolberg R, Berl S. (1980)**
Redistribution of contractile and cytoskeletal components induced by cytochalasin. I. In Hmf cells, a nontransformed fibroblastoid line.
Eur J Cell Biol **22**, 733-744
- Ha KS, Exton JH. (1993)**
Activation of actin polymerization by phosphatidic acid derived from phosphatidylcholine in IIC9 fibroblasts.
J Cell Biol **123**, 1789-1796
- Hanahan, D. (1983)**
Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.
J Mol Biol **166**, 557-580
- Hemler ME. (1998)**
Integrin associated proteins.
Curr Opin Cell Biol **10**, 578-585
- Hemmings BA. (1997)**
PH domains- a universal membrane adapter.
Science **275**, 1899
- Hogg N, Stewart MP, Scarth SL, Newton R, Shaw JM, LawSK, Klein N. (1999)**
A novel leukocyte adhesion deficiency caused by expressed but nonfunctional beta2 integrins Mac-1 and LFA-1.
J Clin Invest **103**, 97-106
- Ish Horowicz D, Burke JF. (1981)**
Rapid and efficient cosmid cloning.
Nucleic Acids Res **9**, 2989-2998
- Jackson TR, Brown FD, Nie Z, Miura K, Foroni L, Sun J, Hsu VW, Donaldson JG, Randazzo PA. (2000)**
ACAPs are arf6 GTPase-activating proteins that function in the cell periphery.
J Cell Biol **151**, 627-638
- Jensen FC, Girardi AJ, Gilden RV, Koprowski H. (1964)**
Infection of human and simian tissue cultures with Rous sarcoma virus.
Proc Natl Acad Sci USA **52**, 53-59

Kahn RA, Gilman AG. (1986)

The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein.

J Biol Chem **261**, 7906-7911

Kamata T, Wright R, Takada Y. (1995)

Critical threonine and aspartic acid residues within the I domains of beta 2 integrins for interactions with intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and C3bi.

J Biol Chem **270**, 12531-12535

Klarlund JK, Guilherme A, Holik JJ, Virbasius JV, Chawla A, Czech MP. (1997)

Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains.

Science **275**, 1927-1930

Klarlund JK, Rameh LE, Cantley LC, Buxton JM, Holik JJ, Sakelis C, Patki V, Corvera S, Czech MP. (1998)

Regulation of GRP1-catalyzed ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate.

J Biol Chem **273**, 1859- 1862

Knorr R, Dustin ML. (1997)

The lymphocyte function-associated antigen 1 I domain is a transient binding module for intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and ICAM-3 in hydrodynamic flow.

J Exp Med **186**, 719-730

Knorr T, Nagel W, Kolanus W. (2000)

Phosphoinositides determine specificity of the guanine-nucleotide exchange activity of cytohesin-1 for ADP-ribosylation factors derived from a mammalian expression system.

Eur J Biochem **267**, 3784-3791

Kolanus W, Nagel W, Schiller B, Zeitlmann L, Godar S, Stockinger H, Seed B. (1996)

Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule.

Cell **86**, 233-242

Kolanus W, Seed B. (1997)

Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3.

Curr Opin Cell Biol **9**, 725-731

van Kooyk Y, Figdor CG. (2000)

Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion.

Curr Opin Cell Biol **12**, 542-547

van Kooyk Y, van Vliet SJ, Figdor CG. (1999)

The actin cytoskeleton regulates LFA-1 ligand binding through avidity rather than affinity changes.

J Biol Chem Sep **274**, 26869-26877

van Kooyk Y, van de Wiel-van Kemenade P, Weder P, Kuijpers TW, Figdor CG. (1989)
Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T lymphocytes.

Nature **342**, 811-813

Korthauer U, Nagel W, Davis EM, Le Beau MM, Menon RS, Mitchell EO, Kozak CA, Kolanus W, Bluestone JA. (2000)

Anergic T lymphocytes selectively express an integrin regulatory protein of the cytohesin family.

J Immunol **164**, 308-318

Kumar CC. (1998)

Signaling by integrin receptors.

Oncogene **17**, 365-373

Laemmli UK. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature **227**, 680-685

Larson RS, Springer TA. (1990)

Structure and function of leukocyte integrins.

Immunol Rev **114**, 181-217

Lee JO, Rieu P, Arnaout MA, Liddington R. (1995)

Crystal structure of the A domain from the β subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18).

Cell **80**, 631-638

Lee S, Park JB, Kim JH, Kim Y, Kim JH, Shin KJ, Lee JS, Ha SH, Suh PG, Ryu SH. (2001)

Actin directly interacts with phospholipase D, inhibiting its activity.

J Biol Chem **276**, 28252-28260

Lee SY, Pohajdak B. (2000)

N-terminal targeting of guanine nucleotide exchange factors (GEF) for ADP ribosylation factors (ARF) to the Golgi.

J Cell Sci **113**, 1883-1889

Lemmon MA, Ferguson KM, Schlessinger J. (1996)

PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface.

Cell **85**, 621-624

Liliental J, Chang DD. (1998)

Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin beta subunit.

J Biol Chem **273**, 2379-2383

Liu L, Pohajdak B. (1992)

Cloning and sequencing of a human cDNA from cytolytic NK/T cells with homology to yeast SEC7.

Biochim Biophys Acta **1132**, 75-78

Lopata MA, Cleveland DW, Sollner Webb B. (1984)

High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment.

Nucleic Acids Res **12**, 5707-5717

Lopez Rodriguez C, Nueda A, GrosPierre B, Sanchez-Madrid F, Fischer A, Springer TA, Corbi AL. (1993)

Characterization of two new CD18 alleles causing severe leukocyte adhesion deficiency.

Eur J Immunol **23**, 2792-2798

Lub M, van Kooyk Y, Figdor CF. (1995)

Ins and outs of LFA-1.

Immunol Today **16**, 479-483

Macia E, Paris S, Chabre M (2000)

Binding of the PH and polybasic C-terminal domains of ARNO to phosphoinositides and to acidic lipids.

Biochemistry **39**, 5893-5901

Mackett M, Smith GL, Moss B. (1982)

Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector.

Proc Natl Acad Sci USA **79**, 7415-7419

Massenburg D, Han JS, Liyanage M, Patton WA, Rhee SG, Moss J, Vaughan M. (1994)

Activation of rat brain phospholipase D by ADP-ribosylation factors 1,5, and 6: separation of ADP-ribosylation factor-dependent and oleate-dependent enzymes.

Proc Natl Acad Sci USA **91**, 11718-11722

Mazaki Y, Hashimoto S, Okawa K, Tsubouchi A, Nakamura K, Yagi R, Yano H, Kondo A, Iwamatsu A, Mizoguchi A, Sabe H. (2001)

An ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein Git2-short/KIAA0148 is involved in subcellular localization of paxillin and actin cytoskeletal organization.

Mol Biol Cell **12**, 645-662

Meacci E, Tsai SC, Adamik R, Moss J, Vaughan M. (1997)

Cytohesin-1, a cytosolic guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor.

Proc Natl Acad Sci USA **94**, 1745- 1748

Meller N, Liu YC, Collins TL, Bonnefoyberard N, Baier G, Isakov N, Altman ARA. (1996)

Direct interaction between protein kinase C theta (PKC theta) and 14-3-3 tau in T cells: 14-3-3 overexpression results in inhibition of PKC theta translocation and function.

Mol Cell Biol **16**, 5782-5791

- Michiels F, Stam JC, Hordijk PL, van der Kammer RA, Ruuls-Van Stalle L, Feltkamp CA, Collard JG.** (1997)
Regulated membrane localization of Tiam1, mediated by the NH2-terminal pleckstrin homology domain, is required for Rac-dependent membrane ruffling and C-Jun NH2-terminal kinase activation.
J Cell Biol **137**, 387-398
- Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A.** (1998)
Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells.
Nature **395**, 82-86
- Mossessova E, Gulbis JM, Goldberg J.** (1998)
Structure of the guanine nucleotide exchange factor Sec7 domain of human arno and analysis of the interaction with ARF GTPase.
Cell **92**, 415-423
- Mould AP.** (1996)
Getting integrins into shape: recent insights into how integrin activity is regulated by conformational changes.
J Cell Sci **109**, 2613-2618
- Mullis KB, Faloona FA.** (1987)
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.
Methods Enzymol **155**, 335-350
- Nagel W, Schilcher P, Zeitlmann L, Kolanus W.** (1998b)
The PH domain and the polybasic c domain of cytohesin-1 cooperate specifically in plasma membrane association and cellular function.
Mol Biol Cell **9**, 1981-1994
- Nagel W, Zeitlmann L, Schilcher P, Geiger C, Kolanus J, Kolanus W.** (1998a)
Phosphoinositide 3-OH kinase activates the beta2 integrin adhesion pathway and induces membrane recruitment of cytohesin-1.
J Biol Chem **273**, 14853-14861
- Nishizuka Y.** (1984)
The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion.
Nature **308**, 693-698
- Ogasawara M, Kim SC, Adamik R, Togawa A, Ferrans VJ, Takeda K, Kirby M, Moss J, Vaughan M.** (2000)
Similarities in function and gene structure of cytohesin-4 and cytohesin-1, guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors.
J Biol Chem **275**, 3221-3230
- Otey CA, Pavalko FM, Burridge K.** (1990)
An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro.
J Cell Biol **111**, 721-729

O'Toole TE. (1997)

Integrin signaling: building connections beyond the focal contact?
Matrix Biol **16**, 165-171

Pacheco-Rodriguez G, Meacci E, Vitale N, Moss J, Vaughan M. (1998)

Guanine nucleotide exchange on ADP-ribosylation factors catalyzed by cytohesin-1 and its Sec7 domain.
J Biol Chem **273**, 26543-26548

Panicali D, Paoletti E. (1982)

Construction of poxvirus as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus.
Proc Natl Acad Sci USA **79**, 4927-4931

Pavalko FM, LaRoche SM. (1993)

Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin beta 2-subunit (CD18) and the actin binding protein alpha-actinin.
J Immunol **151**, 3795-3807

Pawson T. (1995)

Protein modules and signalling networks.
Nature **373**, 573-580

Pearson RB, Kemp BE. (1991)

Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations.
Methods Enzymol **200**, 62-81

Peter K, O'Toole TE. (1995)

Modulation of cell adhesion by changes in alpha L beta 2 (LFA-1, CD11a/CD18) cytoplasmic domain/cytoskeleton interaction.
J Exp Med **181**, 315-326

Peyroche A, Paris S, Jackson CL. (1996)

Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein.
Nature 1996 **384**, 479-481

Pfaff M, Liu S, Erle DJ, Ginsberg MH. (1998)

Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins.
J Biol Chem **273**, 6104-6109

Radhakrishna H, Klausner RD, Donaldson JG. (1996)

Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase.
J Cell Biol **134**, 935-947

Renshaw MW, Price LS, Schwartz MA. (1999)

Focal adhesion kinase mediates the integrin signaling requirement for growth factor activation of MAP kinase.
J Cell Biol **147**, 611-618

Rodgers W, Zavzavadjian J. (2001)

Glycolipid-enriched membrane domains are assembled into membrane patches by associating with the actin cytoskeleton.

Exp Cell Res **267**, 173-183

Romeo C, Seed B. (1991)

Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides.

Cell **64**, 1037-1046

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988)

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

Science **239**, 487-491

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. (1985)

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

Science **230**, 1350-1354

Santy LC, Frank SR, Hatfield JC, Casanova JE. (1999)

Regulation of ARNO nucleotide exchange by a PH domain electrostatic switch.

Curr Biol **9**, 1173-1176

Schlaepfer DD, Jones KC, Hunter T. (1998)

Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events.

Mol Cell Biol **18**, 2571-2585

Schliwa M. (1982)

Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks.

J Cell Biol **92**, 79-91

Seed, B. (1987)

An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid-linked membrane protein homologous to its receptor CD2.

Nature **329**, 840-842

Sharma, CP, Ezzell RM, Arnaout MA. (1995)

Direct interaction of filamin (ABP-280) with the beta 2-integrin subunit CD18.

J Immunol **154**, 3461-3470

Shaw G. (1996)

The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module.

Bioessays **18**, 35-46

Shimizu Y, van Seyenter GA, Ennis E, Newman W, Horgan KJ, Shaw S. (1992)

Crosslinking of the T cell-specific accessory molecules CD7 and CD28 modulates T cell adhesion.

J Exp Med **175**, 577-582

Skippen A, Jones DH, Morgan CP, Li M, Cockcroft S. (2001)

Mechanism of ARF-stimulated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in HL60 cells.
J Biol Chem Dec 14 [e-pub. bevor Druck]

Springer TA. (1990)

Adhesion receptors of the immune system.
Nature **346**, 425-434

Stewart M, Thiel M, Hogg N. (1995)

Leukocyte integrins.
Curr Opin Cell Biol **7**, 690-696

Stewart MP, McDowall A, and Hogg N. (1998)

LFA-1-mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by a Ca²⁺-dependent protease, calpain.
J Cell Biol **140**, 699-707

Studier FW, Moffatt BA. (1986)

Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.
J Mol Biol **189**, 113-130

Sussman DJ, Milman G. (1984)

Short-term, high-efficiency expression of transfected DNA.
Mol Cell Biol **4**, 1641-1643

Szoka F, Jr Papahadjopoulos D. (1978)

Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation.
Proc Natl Acad Sci USA **75**, 4194-4198

Tabor S, Richardson CC. (1985)

A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes.
Proc Natl Acad Sci USA **82**, 1074-1078

Takada Y, Kamata T, Irie A, Puzon-McLaughlin W, Zhang XP. (1997)

Structural basis of integrin-mediated signal transduction.
Matrix Biol **16**, 143-151

Tian L, Kilgannon P, Yoshihara Y, Mori K, Gallatin WM, Carpen O, Gahmberg CG. (2000)

Binding of T lymphocytes to hippocampal neurons through ICAM-5 (telencephalin) and characterization of its interaction with the leukocyte integrin CD11a/CD18.
Eur J Immunol **30**, 810-818

Tsai SC, Noda M, Adamik R, Moss J, Vaughan M. (1987)

Enhancement of cholera toxin ADP-ribosyltransferase activities by guanyl nucleotides and a 19-kDa membrane protein.
Proc Natl Acad Sci USA **84**, 5139-5142

Tuckwell DS, Brass A, Humphries MJ. (1992)

Homology modelling of integrin EF-hands. Evidence for widespread use of a conserved cation-binding site.

Biochem J **285**, 325-331

Venkateswarlu K, Gunn-Moore F, Oatey PB, Tavare JM, Cullen PJ. (1998)

Nerve growth factor- and epidermal growth factor-stimulated translocation of the ADP-ribosylation factor-exchange factor GRP1 to the plasma membrane of PC12 cells requires activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the GRP1 pleckstrin homology domain.

Biochem J **335**, 139-146

Weber KS, Weber C, Ostermann G, Dierks H, Nagel W, Kolanus W. (2001)

Cytohesin-1 is a dynamic regulator of distinct LFA-1 functions in leukocyte arrest and transmigration triggered by chemokines.

Curr Biol **11**, 1969-1974

Weber KS, York MR, Springer TA, Klickstein LB. (1997)

Characterization of lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)-deficient T cell lines.

J Immunol **158**, 273-279

Weiss A, Wiskocil RL, Stobo JD. (1984)

The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level.

J Immunol **133**, 123-128

Williams MJ, Hughes PE, O'Toole TE, Ginsberg MH. (1994)

The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains.

Trends Cell Biol **4**, 109-112

Zhang Z, Vuori K, Wang H, Reed JC, Ruoslahti E. (1996)

Integrin activation by R-ras.

Cell **85**, 61-69

9 Abkürzungen

| | |
|----------------|---|
| A _x | Absorption bei einer Wellenlänge von x nm |
| Abb. | Abbildung |
| abs. | absolut |
| ADP | Adenosin-5'-diphosphat |
| amp | Ampizilin |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| APC | Antigenpräsentierende Zelle (<u>antigen presenting cell</u>) |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ARF | ADP-Ribosylierungsfaktor (<u>ADP-ribo</u> sylation <u>f</u> actor) |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| BCIP | 5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat |
| bidest. | zweifach destilliert |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin (<u>bovine serum albumin</u>) |
| °C | Grad Celsius |
| CD | Zelloberflächenmarker (<u>cluster of differentiation</u>) |
| cDNA | komplementäre DNA |
| Ci | Curie (3,7 x 10 ¹⁰ Zerfälle pro Sekunde) |
| cIg | cytoplasmatisches Immunglobulin |
| Cyh-1 | Cytohesin-1 |
| dATP | Desoxyadenosin-5'-triphosphat |
| dCTP | Desoxycytidin-5'-triphosphat |
| DEAE | Diethylaminoethyl |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<u>desoxyribo-nucleic acid</u>) |
| dNTP | Desoxynukleosid-5'-triphosphat |
| dsDNA | doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| dTTP | Desoxythymidin-5'-triphosphat |
| dUTP | Desoxyguanosin-5'-triphosphat |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ECL | enhanced chemiluminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetats |
| e-pub. | elektronisch publiziert |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| EtOH | Ethanol |
| F | Farad |
| FACS | fluoreszenzaktivierte Zelltrennung (<u>fluorescence activated cell sorting</u>) |
| Fc | fragment crystallizable |
| FCS | Fötale Kälberserum (fetal calf serum) |
| FITC | Fluorescein-isothiocyanat |
| g | Gramm |
| GAP | GTPase-Aktivierungsprotein |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GEF | Guaninnukleotid-Austauschfaktor (<u>guanine nucleotide exchange factor</u>) |
| GTP | Guanosin-5'-triphosphat |

| | |
|-----------------|--|
| GTPase | Guanosin-5'-triphosphat hydrolysierendes Enzym |
| HBSS | Hank's buffered salt solution |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| HRP | Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase) |
| ICAM | interzelluläres Adhäsionsmolekül (<u>inter-cellular adhesion molecule</u>) |
| IF | Immunfluoreszenz |
| Ig | Immunglobulin |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL | Interleukin |
| IP3 | Inositol-(1,4,5)-triphosphat |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| kan | Kanamycin |
| kB | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| l | Liter |
| LAD | Leukocyten-Adhäsionsdefizienz |
| LB | Luria-Broth |
| LFA-1 | <u>lymphocyte function-associated antigen 1</u> |
| Lsg. | Lösung |
| M | molar |
| m | Meter |
| MadCAM-1 | mucosal cell adhesion molecule 1 |
| mAB | monoclonal antibody |
| mAk | monoklonaler Antikörper |
| MAP-Kinase | mitogenaktivierte Proteinkinase |
| max. | maximal |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex) |
| Min. | Minute |
| MOI | multiplicity of infection |
| mol | Mol |
| MPA | Mycophenolsäure (<u>myco-phenolic acid</u>) |
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| NBT | Nitroblau-tetrazoliumchlorid |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| NP40 | nichtionisches Detergenz P40 (Nonidet P40) |
| OD _x | optische Dichte bei x nm |
| p.a. | zur Analyse (pro analysis) |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| PEG | Polyethylenglykol |
| pfu | Plaque bildende Einheiten (plaque forming units) |
| PH | Pleckstrin-Homologie |
| PI3-Kinase | Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase |
| PKC | Proteinkinase C |
| PLD | Phospholipase D |
| PMA | Phorbol 12-myristate 13-acetate |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PIP3 | Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat |
| RNA | Ribonukleinsäure (ribonucleic acid) |
| RNase A | Ribonuklease A |

| | |
|----------------------|---|
| RT | Raumtemperatur |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bäckerhefe) |
| SDS | Natriumdodecylphosphat (sodium dodecyl sulfate) |
| Sek. | Sekunden |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA Pufferlösung |
| TBS | Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris-buffered saline) |
| TCR | T-Zell-Rezeptor (T-cell receptor) |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Enzymeinheiten (units) |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV | ultraviolett |
| V | Volt |
| VLA | <u>v</u> ery <u>l</u> ate-activation <u>a</u> ntigen |
| v/v | Volumen pro Volumen (volume per volume) |
| VCAM | <u>v</u> ascular <u>c</u> ell <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule |
| Vol. | Volumen |
| w/v | Gewicht pro Volumen (weight per volume) |
| WB | Western Blot |
| wt | Wildtyp |
| x g | x-fache Erdbeschleunigung |

Danksagung

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Genzentrums, allen Kolleginnen und Kollegen, die während meiner Doktorarbeit mit mir kooperierten und mich bei meiner Arbeit unterstützten.

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Waldemar Kolanus für die Vergabe des interessanten Themas, die fruchtbaren Anregungen und Diskussionen und die Betreuung meiner Doktorarbeit. Die stetige Unterstützung und die Gelegenheit an wissenschaftlichen Tagungen teilzunehmen schätzte ich besonders.

Herrn Prof. Dr. Grosschedl danke ich für die Leitung des Genzentrums und die Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses. Danken möchte ich auch für die vielfältig geschaffenen Möglichkeiten, die das Genzentrum zur wissenschaftlichen Weiterbildung bietet.

Meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe „Kolanus“ möchte ich ganz besonders danken, für das gute Teamwork, die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und das freundschaftliche Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt jedoch meinen Eltern, die mich während meines Studiums und meiner Doktorarbeit in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Herzlich möchte ich meiner Freundin Christine danken, die mich geduldig während meiner Arbeit unterstützte und mir stets liebevoll zur Seite stand.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Dierks, Henning
Geburtsdatum: 31. Oktober 1970
Geburtsort: Rotenburg a. d. Fulda
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Anschrift: Henning Dierks, Stephan-Lochner-Str. 5, 80686 München

Wohnsitze

1970 – 1973 Rotenburg a. d. Fulda
1973 – 1974 Pembroke, Großbritannien
1974 – 1976 Sonthofen
1976 – 1990 Wetzlar
1990 – 1992 Mittenwald
1992 – 1994 Fürstfeldbruck
seit 1994 München

Schulbildung

1976 – 1981 Grundschule: Albert-Schweitzer-Schule, Wetzlar
1981 – 1987 Gesamtschule: Freiherr-vom-Stein-Schule, Wetzlar
1987 – 1990 Gymnasium: Goethe-Schule, Wetzlar
Schulabschluß: Abitur (allgemeine Hochschulreife), 13. Juni 1990

Bundeswehr

1990 – 1992 Wehrdienst in Mittenwald bei der 1. Gebirgsdivision. Zweijährige
Ausbildung zum Reserveoffizier.
seit 1992 Reservist
Dienstgrad: Leutnant der Reserve

Studium

1992 Immatrikulation zum Wintersemester an der Ludwig-Maximilians-
Universität in München im Fach Biologie
1994 Vordiplom im Fach Biologie
1994 – 1996 Hauptstudium, Prüfung in den Fächern:
Mikrobiologie (Hauptfach), Genetik, Biochemie, organische Chemie
1996 – 1997 Neunmonatige Diplomarbeit im Hauptfach Mikrobiologie
Hochschulabschluß: Diplom-Biologe Univ., 14. März 1997

Promotion

seit Mai 1997 Institut: Genzentrum München, Ludwig-Maximilians-Universität
Doktorvater: Prof. Dr. Waldemar Kolanus