

**Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Mikrobiologie
Vorstand: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann**

**Institut für Prophylaxe und
Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten
Direktor: Prof. Dr. P.C. Weber**

Der Rho-GTPase Effektor WAVE1 im endosomal-lysosomalen *Pathway* in primären Makrophagen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Florian Gundel

aus

Würzburg

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Stefan Linder

**Mitberichterstatter: PD Dr. M. Siebels
PD Dr. D. Rapaport**

Dekan: Prof. Dr. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2006

I. EINLEITUNG	4
I.1. Makrophagen	4
I.1.1. Funktion von Makrophagen	4
I.1.2. Aktin-Zytoskelett von Makrophagen	5
I.2. Aufnahme von Partikeln in die Zelle	9
I.2.1. Clathrin-abhängige Aufnahme extrazellulären Materials	9
I.2.1.1. Clathrin-beschichtete Vesikel	9
I.2.1.2. Der endo-lysosomale <i>Pathway</i> und seine Kompartimente	10
I.2.2. Clathrin-unabhängige Aufnahme: Phagozytose und Makropinozytose	13
I.2.2.1. Phagozytose	13
I.2.2.1.1. Fc-Rezeptor vermittelte Phagozytose	14
I.2.2.1.2. Komplementrezeptor-vermittelte Phagozytose	15
I.2.2.2. Makropinozytose	16
I.2.3. Endozytose und das Aktin-Zytoskelett	17
I.3. Proteine der WASp-Familie	18
I.3.1. Allgemeines zur WASp-Familie	18
I.3.2. Allgemeines zu WAVE	19
I.3.3. Funktionen von WAVE	21
I.3.4. Aktivierungsmechanismen von WAVE	21
I.4. Interaktionspartner von WAVE1	24
I.5. Fragestellung	25
II. MATERIAL	26
II.1. Antikörper	26
II.1.1. Primäre Antikörper	26
II.1.2. Sekundäre Antikörper	26
II.2. Bakterienstämme	27
II.3. Chemikalien	27
II.4. Enzyme	27
II.5. Kit-Systeme	28
II.6. Laborausstattung	28
II.7. Oligonukleotide für Klonierungen	29
II.8. Plasmide	30
II.8.1. Kommerziell erworbene Plasmide	30
II.8.2. Konstrukte von Kooperationspartnern	30
II.9. Sequenzierungs-Primer	31
II.10. Transfektionsreagenzien	31
II.11. Modulierende und inhibierende Substanzen	31
III. METHODEN	32
III.1. Arbeiten mit Nukleinsäuren	32
III.1.1. DNA-Präparation	32
III.1.1.1. Plasmidisolierung	32
III.1.1.2. Gelelektion	32
III.1.2. DNA-Restriktionsverdau	32
III.1.3. Ligation	33
III.1.3.1. Präparation von Vektoren und DNA-Fragmenten	33
III.1.3.2. Allgemeiner PCR-Ansatz	33
III.1.3.2.1. Aufreinigung von PCR-Produkten	34
III.1.3.2.2. Klonierung mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide	34

III.1.3.3. Ligation mit T4-Ligase.....	35
III.1.3.4. Ligation mit Alligator Kit	35
III.1.4. Transformation in elektrokompente Zellen.....	36
III.1.4.1. Herstellung elektrokompenter <i>E.coli</i> DH5 α	36
III.1.4.2. Transformation mittels Elektroporation.....	36
III.1.5. Bakterien-PCR (Kolonie-PCR).....	36
III.2. Arbeiten mit Proteinen.....	37
III.2.1. Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie.....	37
III.2.1.1. GST-Fusionsproteine	37
III.2.2. Proteinbestimmung.....	39
III.2.3. Western Blot.....	39
III.2.3.1. Puffer und Lösungen	39
III.2.3.1.1. Proben-Puffer (SDS-Probenpuffer).....	39
III.2.3.1.2. Puffer für SDS-PAGE	40
III.2.3.2. Herstellung von SDS-Gelen	40
III.2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
III.2.3.4. Western Blot.....	41
III.2.3.4.1. Vorbereitung der PVDF-Membran und <i>Blotting</i>	41
III.2.3.4.2. Detektion	41
III.3. Arbeiten mit Zellen.....	42
III.3.1. Zellkultur.....	42
III.3.2. Isolation primärer humaner Makrophagen aus menschlichem Blut.....	42
III.3.3. Mikroinjektion.....	44
III.3.3.1. Vorbereitung der Injektionslösung.....	44
III.3.3.2. Mikroinjektion.....	45
III.3.4. Transfektion von Zell-Linien	46
III.3.4.1. Transfektion muriner J774-Makrophagen.....	46
III.3.4.2. Transfektion primärer humaner Makrophagen	47
III.4. Mikroskopische Methoden.....	47
III.4.1. Indirekte Immunfluoreszenz	47
III.4.1.1. Fixierung und Lyse von Zellen	47
III.4.1.1.1. Formaldehyd/Aceton.....	47
III.4.1.1.2. Formaldehyd/Triton	48
III.4.1.1.3. Methanol.....	48
III.4.1.1.4. PHEM.....	48
III.4.1.2. Färbung mittels spezifischer Antikörper	48
III.4.2. Fluoreszenzmikroskopie.....	49
IV. ERGEBNISSE	50
IV.1. Vorbemerkung	50
IV.2. Akkumulation von WAVE1 in Vesikeln	50
IV.2.1. Induktion WAVE1-haltiger Vesikel	52
IV.3. Charakterisierung WAVE1-haltiger Vesikel	52
IV.3.1. Phagozytose: WAVE1-GFP an Latex- <i>beads</i> enthaltenden Phagosomen	52
IV.3.2. Pinozytose	53
IV.3.3. Kolokalisation von WAVE1 mit pinozytotischen Markern.....	53
IV.3.4. Kolokalisierung mit anderen Proteinen.....	55
IV.4. Regulation von WAVE1	57
IV.4.1. Aktin-Abhängigkeit	58

IV.4.2. Mikrotubuli-Abhängigkeit	60
IV.5. Funktionsanalyse von WAVE1	62
IV.5.1. WAVE1 - Konstrukte.....	62
IV.5.2. WAVE1-Konstrukte und die Bildung WAVE1- und Dextran-haltiger Vesikel.....	63
IV.6. Interaktionspartner von WAVE1	65
IV.6.1. Mögliche Interaktionspartner	65
IV.6.2. NCK-1	65
IV.6.3. PAK1	67
IV.7.1. Einfluss der MAP Kinase auf WAVE1.....	68
IV.7.2. Inhibition der MAP Kinase führt zu Reduktion der Vesikel-Bildung	69
V. DISKUSSION	71
V.1. Intrazelluläre Lokalisation von WAVE	71
V.2. Charakterisierung von WAVE1-Vesikeln	72
V.3. Rolle der verschiedenen WAVE1-Domänen	74
V.4. Regulation von WAVE1	75
V.5. Ausblick	78
VI. ZUSAMMENFASSUNG	79
VII. LITERATUR	82
VIII. ANHANG	97
VIII.1. Primer-Sequenzen	97
VIII.1.1. Zur Sequenzierung verwendete <i>Primer</i>	97
VIII.2. Zur Klonierung verwendete Oligonukleotide	97
VIII.3. Vektorenkarten	97
VIII.4. DNA- und Proteinsequenz von WAVE1	98
VIII.4.1. DNA-Sequenz	98
VIII.4.2. Protein-Sequenz.....	98
IX. ABKÜRZUNGEN	100
X. DANKSAGUNG	104
XI. LEBENS LAUF	105

I. EINLEITUNG

I.1. Makrophagen

I.1.1. Funktion von Makrophagen

Makrophagen zählen zu den Zellen des Immunsystems. Sie entstehen aus Monozyten, die im Knochenmark aus Blutstammzellen gebildet werden. Von dort gelangen sie für kurze Zeit in den Blutkreislauf, bevor sie an Endothelzellen adhären und durch Interzellularspalten die Gefäßwand verlassen (Johnson-Leger *et al.*, 2000). Die Ausdifferenzierung zu Makrophagen erfolgt anschließend in den verschiedenen Geweben. Mit den im Blut zirkulierenden Monozyten werden Makrophagen zum sogenannten mononukleären Phagozytensystem zusammengefasst (vgl. Abb. 1).

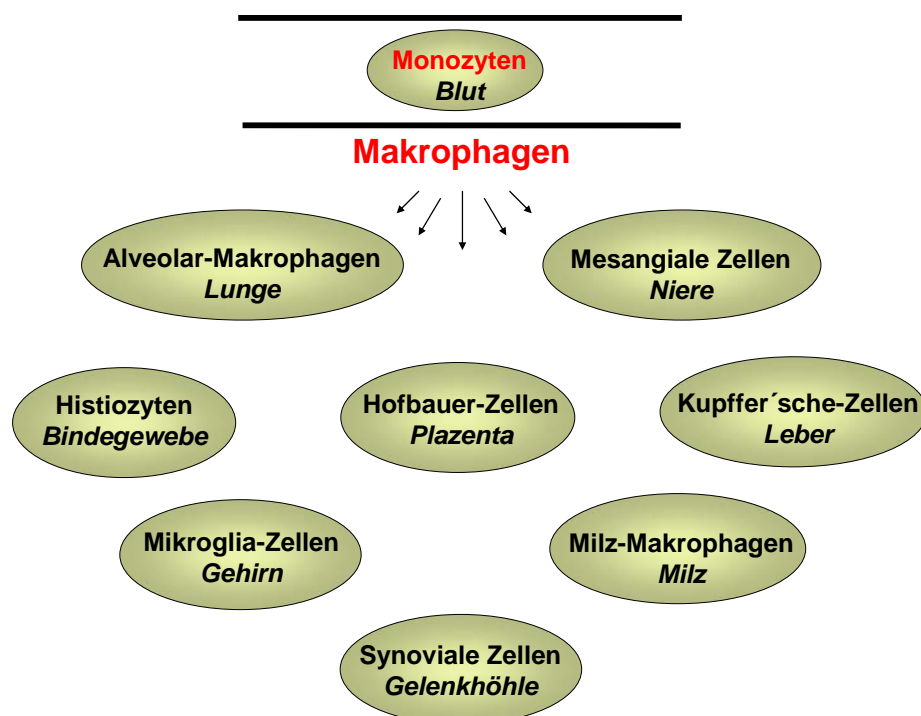


Abb. 1: Übersicht über das mononukleäre Phagozytensystem

Makrophagen können an aktivierte Endothelzellen adhären, zwischen diesen die Gefäßwand penetrieren und auf einen Entzündungsherd zuwandern. Dabei fungieren als Signale körpereigene Zytokine oder bakterielle Substanzen wie LPS oder fMLP (Raetz, 1993; Jones, 2000).

Im Rahmen der angeborenen Immunität stellen Makrophagen eine erste Verteidigungslinie gegen Krankheitserreger dar. Dazu befinden sich auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, die die Zellen zum Erkennen von Komponenten befähigen, die vielen Mikroorganismen gemein sind. Zu diesen Rezeptoren zählen der Mannose-Rezeptor, *scavenger*-Rezeptoren, CD14 oder die *Toll like receptors* (TLRs; Übersicht bei Akira, 2003).

Als Antigen-präsentierende Zellen sind Makrophagen in der Lage, fremdes Material zu prozessieren, Peptidfragmente an den MHC-II-Rezeptor zu binden und diese auf ihrer Zelloberfläche Lymphozyten zu präsentieren. Makrophagen kommt auch eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung des Gewebeumsatzes zu, indem sie körpereigene Zellen (z.B. alte Erythrozyten aus der Milz), apoptotische Zellen oder Tumorzellen phagozytieren und abbauen, ohne dabei gesundes Gewebe zu schädigen.

Die Auswirkungen genetischer Defekte können die Monozyten-Funktion stören, was zu Krankheiten wie Asthma, Arthritis, Multiple Sklerose, Psoriasis und WAS (Wiskott-Aldrich Syndrom) führen bzw. beitragen kann (Rollins, 1996). Bei der Atherosklerose spielen Makrophagen in allen Stadien eine wichtige Rolle (Gerrity, 1981). So finden sich in atherosklerotischen Frühläsionen Makrophagen in der Intima in Form von Schaumzellen. Die von ihnen produzierten Matrix-Metalloproteasen sollen bei der Plaqueruptur eine wichtige Rolle spielen (Aquel *et al.*, 1984; Fabunmi *et al.*, 1998; Hegyi *et al.*, 2001).

I.1.2. Aktin-Zytoskelett von Makrophagen

Zellteilung, Adhäsion, Polarisation, Motilität und Phagozytose erfordern eine stetige Änderung der Zellform. Dabei spielt das Aktin-Zytoskelett eine entscheidende Rolle (Übersicht bei Remedios *et al.*, 2002).

Das Zytoskelett besteht aus drei verschiedenen Arten von Filamenten: Intermediärfilamente, Mikrotubuli und Aktin. Im Hinblick auf die oben beschriebenen Makrophagenfunktionen ist vor allem die Dynamik des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts ein wichtiger Faktor.

In eukaryotischen Zellen ist Aktin mit einem Anteil von ca. 5 % an der Gesamtproteinmenge das am häufigsten vorkommende Protein (Kabsch *et al.*, 1992). Aktin kommt sowohl als Monomer (G-Aktin) als auch filamentös in Form von Netzwerken (F-Aktin) vor. Das Gleichgewicht zwischen beiden Formen wird durch eine Vielzahl von Proteinen reguliert (Ayscough, 1998). Aktinfilamente bestehen aus zwei gegeneinander verdrehten Polymeren gleicher Orientierung. Das sogenannte „stumpfe“ Ende (*barbed end*) des Filamentes wächst dabei ca. 10-fach schneller als das „spitze“ Ende (*pointed end*) (Lorenz *et al.*, 2004). Wachsende Aktinfilamente bilden die

Grundlage zur Ausbildung zellulärer Fortsätze wie Lamellipodien und Filopodien und befähigen die Zelle u. a. zur Migration (Tilney *et al.*, 1981; Pollard *et al.*, 2003). Im Vergleich zum Wachstum bereits vorhandener Filamente ist die spontane Nukleation von Aktinfilamenten jedoch energetisch ungünstig und daher recht selten (Pollard und Cooper, 1984).

In vivo gelten drei Mechanismen für das Wachstum von Aktinfilamenten als wesentlich (Higgs *et al.*, 1999), auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Zum einen ermöglicht das Entfernen von sogenannten *capping*-Proteinen von den *barbed ends* neues Filamentwachstum. Zum anderen werden durch die Zerlegung bestehender Filamente in Teilfragmente neue Filamentenden generiert, an denen weiteres Wachstum erfolgen kann (McGrath *et al.*, 2000). Als wohl wichtigster Mechanismus gilt die Nutzung eines molekularen Katalysators, der als Keimzelle für neue Filamente dienen und somit Aktin-Nukleation induzieren kann. Der bisher am besten erforschte Aktivator ist der Arp2/3-Komplex. Er besteht aus sieben Untereinheiten, wobei die beiden namengebenden *actin-related proteins* (Arps) mit Aktin verwandt sind (Machesky *et al.*, 1994; Machesky und Insall, 1998).

Untersuchungen zur Funktion und Regulation dieses Komplexes führten zum Modell der dendritischen Aktin-Nukleation (Mullins *et al.*, 1998; Pollard *et al.*, 2001; siehe Abb. 2). Dieses Modell besagt, dass die Nukleation neuer Aktin-Filamente am vorderen Ende der Zelle (*leading edge*) durch den Arp2/3-Komplex reguliert wird. Der an sich inaktive Komplex wird durch Bindung von Regulatoren wie denen der WASp-Familie aktiviert. Dadurch kann es zu einer Konformationsänderung des Komplexes kommen, wobei Arp2 und Arp3 in direkte räumliche Nähe gebracht werden. Strukturell sind sie dann einem Aktin-Dimer ähnlich und können nach Bindung an ein Aktin-Monomer als Filament-Keim („Nukleus“) dienen (Mullins *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 2001). Der Arp2/3-Komplex kann auch an die Seite bereits vorhandener Filamente binden und dort die Aussprossung neuer Filamente initiieren (Mullins *et al.*, 1998; Carlsson *et al.*, 2004).

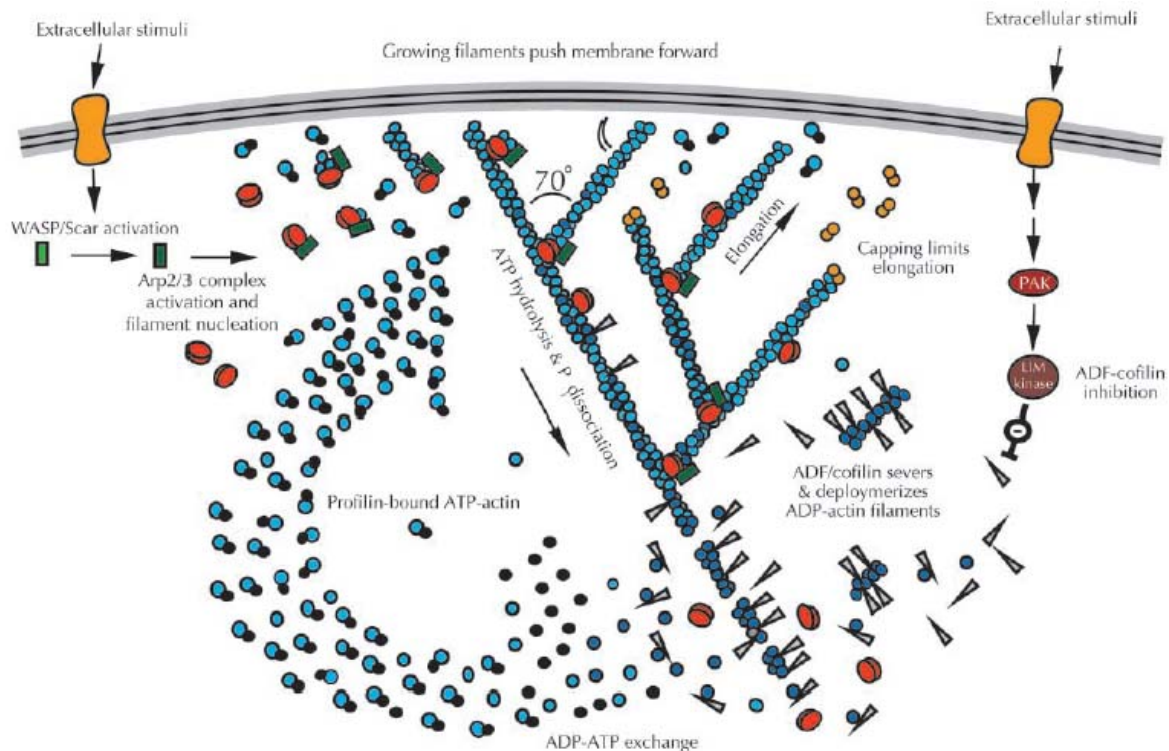


Abb. 2: Modell der dendritischen Aktin-Nukleation (Pollard *et al.*, 2001)

Die Abbildung zeigt die Theorie der dendritischen Aktin-Nukleation für die Anreicherung von Aktin-Filamenten an der Zellfront migrierender Zellen.

In diesem Modell findet sich das Aktinmonomer-bindende Protein Profilin (schwarz) in einem Pool nicht-polymerisierter ATP-Aktin Untereinheiten (hellblau). Extrazelluläre Stimuli wie chemotaktische Faktoren binden an Rezeptoren der Plasmamembran und aktivieren dabei intrazelluläre Signalmoleküle wie solche der Rho-GTPasen. Diese GTPasen binden und aktivieren WASP- oder WAVE / SCAR-Proteine (grün). Aktive WASP- oder WAVE / SCAR-Proteine führen zur Bindung von Monomeren an Arp2/3-Komplex (rot) und Aktinmonomeren. Arp2/3-Komplex initiiert dann das Wachstum eines neuen Aktin-Filamentes als Zweig eines bereits existierenden alten Aktin-Filamentes. Die Verzweigung wächst rasch an den sog. *barbed ends* durch das Vorhandensein von Aktin-Profilin-Komplexen, was zur Protrusionen der Plasmamembran führt. Das neue Filament wächst um weitere Filamente bevor es durch sog. *capping proteins* (gelb) abgeschlossen wird. Der Einbau von ATP-Aktin in das Filament induziert die Hydrolyse von gebundenem ATP. Gamma-Phosphat dissoziiert langsam von polymerisiertem ADP-P-Aktin Untereinheiten, es sei denn ADF/Cofilin (grau) bindet an eine Untereinheit und beschleunigt die Phosphat-Dissoziation. Diese Dissoziation induziert die Lösung des Arp2/3-Komplexes und die Bindung von ADF/Cofilin an ADP-Aktin Untereinheiten (dunkelblau). An Filamente gebundenes ADF/Cofilin führt zu Trennung der Filamente und Dissoziation des an ADF/Cofilin gebundenen ADP-Aktin. Profilin als sog. *nucleotide exchange factor* von Aktin induziert den Austausch von ADP zu ATP. Profilin bindet ATP-Aktinmonomere, wodurch der Monomer-Pool wieder aufgefüllt wird. Die Rho-GTPasen aktivieren *p21-activated protein kinase* (PAK), was wiederum zur Phosphorylierung von ADF/Cofilin durch LIM-Kinasen führt. Die Phosphorylierung inaktiviert ADF/Cofilin und verlangsamt den Prozess der Filament-Dissoziation.

Einige Pathogene, wie z. B. *Listeria monocytogenes*, machen sich die Aktin-Nukleationsmaschinerie der Zelle zunutze, indem sie den primär inaktiven Arp2/3-Komplex aktivieren und sich dann mit Hilfe von Aktinschweiften in der Zelle fortbewegen (Übersicht bei Cossart; 2000, Pantaloni *et al.*, 2001). Tatsächlich stammt das erste Arp2/3-Komplex-aktivierende Protein, das identifiziert wurde, ActA, aus *Listeria monocytogenes* (Welch *et al.*, 1998).

Stimulatoren des Arp2/3-Komplexes und damit zentrale Regulatoren der Aktin-Polymerisation finden sich auch in eukaryotischen Zellen. Zu diesen gehören u.a. die Proteine der sogenannten WASp (**W**iskott-**A**ldrich-**S**yndrom **P**rotein)-Familie (Übersicht bei Higgs und Pollard, 2001) wie das ausschließlich hämatopoetisch exprimierte WASp (Machesky und Insall, 1998), sowie die ubiquitär vorkommenden Proteine N-WASP (Rohatgi *et al.*, 1999) und WAVE/SCAR 1-3 (Miki *et al.*, 1998; Machesky *et al.*, 1999). Die Proteine der WASp-Familie werden wiederum durch die kleinen GTPasen der Rho-Familie, z.B. Rac und Cdc42 reguliert (Aspenström *et al.*, 1996).

Die Regulation des Aktin-Zytoskeletts spielt auch in Adhäsionsstrukturen eine wichtige Rolle. Adhärente humane Monozyten/Makrophagen weisen typischerweise Aktin-reiche, punktförmige Adhäsionsstrukturen, sogenannte Podosomen auf (Lehto *et al.*, 1982; Übersicht bei Linder und Aepfelbacher, 2003; Linder und Kopp, 2005). Auch in anderen monozytären Zellen wie Osteoklasten, dendritischen Zellen (Marchisio *et al.*, 1984; West *et al.*, 2000), Endothelzellen (Osiak *et al.*, 2005), sowie in einigen Krebszellen und in v-Src transformierten Fibroblasten (Tarone *et al.*, 1985; Schuurin *et al.*, 1993) wurden Podosomen nachgewiesen. Podosomen wird eine Rolle bei der Invasion von Zellen und Degradierung der extrazellulären Matrix zugesprochen (Chen *et al.*, 1984; Mizutani *et al.*, 2002; Linder und Kopp, 2005), da sie insbesondere in motilen Zellen vorkommen und dort die Aktivität von Matrix-Metalloproteasen kontrollieren. Daneben kommt ihnen wahrscheinlich eine wichtige Funktion bei der Adhäsion und Migration von Zellen zu (Linder *et al.*, 1999). Podosomen bestehen aus einer Aktin-reichen Kernstruktur, die von einem Ring Aktin-assoziiierter Proteine wie Vinkulin, Talin oder Paxillin umgeben ist. Die Halbwertszeit dieser dynamischen Strukturen beträgt 2 bis 12 min (Kanehisa *et al.*, 1990). Über Integrine können sie Kontakt zur extrazellulären Matrix herstellen (Marchisio *et al.*, 1988).

Das Aktin-Zytoskelett lässt sich durch Substanzen manipulieren, die die Dynamik des gesamten Netzwerkes zerstören. Dazu gehören u.a. Pilzgifte wie z.B. Cytochalasine (Cytochalasin B und

D). Diese verhindern durch Bindung an das *barbed end* eines Aktinfilaments die weitere Anlagerung von Monomeren und damit das Filamentwachstum (Mousa *et al.*, 1978).

Defekte in der Aktinregulation primärer Makrophagen können zu Krankheitsbildern wie dem Wiskott-Aldrich-Syndrom oder seiner milderen Form XLT (*X-linked thrombocytopenia*) beitragen. Betroffene Patienten leiden unter Ekzembildung, Thrombozytopenie und einer deutlichen Immunschwäche (Snapper *et al.*, 1999; Übersicht bei Ochs, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Makrophagen von WAS-Patienten keine Podosomen aufweisen (Badolato *et al.*, 1998) und eine damit einhergehend deutlich verminderte Polarisations- und Migrationsfähigkeit besitzen (Linder *et al.*, 2000).

I.2. Aufnahme von Partikeln in die Zelle

Für ihre Funktion als professionelle Phagozyten benötigen Makrophagen ein effektives Endozytose-/Phagozytosesystem. Unter Endozytose versteht man die Internalisierung von Proteinen und Lipiden der Plasmamembran, extrazellulärer Moleküle, Flüssigkeiten, Partikeln, Viren und Bakterien. Im Allgemeinen können endozytotische Prozesse in unterschiedliche Schritte unterteilt werden: Invagination der Plasmamembran, Abschnürung des gebildeten Vesikels, Eintritt in den endozytotischen *Pathway* und Abbau der aufgenommenen Partikel in den Lysosomen.

Der initiale Aufnahmemechanismus kann generell in Clathrin-abhängige und -unabhängige Endozytose unterteilt werden. Die Rezeptor-vermittelte Endozytose von z.B. LDL, Transferrin, Wachstumsfaktoren oder Insulin zählt zu den Clathrin-abhängigen Mechanismen. Dagegen stellen Fc- oder Komplementrezeptor-vermittelte Phagozytose, Makropinozytose und die Aufnahme über Caveolae Clathrin-unabhängige Internalisierungsformen dar (Conner und Schmid, 2003). Die Internalisierungsform hängt desweiteren von dem aufzunehmenden Objekt, der Größe der Vesikel, der verwendeten molekularen Mechanismen und der Art der Regulation ab. Am Beispiel der Rezeptor-vermittelten Endozytose über Clathrin-beschichtete Vesikel soll im Folgenden der endosomale *Pathway* kurz beschrieben werden.

I.2.1. Clathrin-abhängige Aufnahme extrazellulären Materials

I.2.1.1. Clathrin-beschichtete Vesikel

Die am besten untersuchte Clathrin-abhängige Internalisierungsform ist die Aufnahme von Proteinen über Rezeptor-vermittelte Endozytose. Nach der Interaktion eines Liganden mit seinem Rezeptor erfolgt die initiale Aufnahme hierbei über Clathrin-beschichtete Vesikel (*Clathrin-*

coated vesicles, CCV). Für die Entstehung der CCVs wird eine Vielzahl weiterer Proteine benötigt. Zum Beispiel fördern Adapterkomplexe die Polymerisation der Clathrinmoleküle, was u.a für die Bildung der für die CCV typischen Clathrin-Käfigstruktur essentiell ist. Es existieren unterschiedliche Arten von Adapterkomplexen, AP1-AP4, die aus verschiedenen, aber verwandten Untereinheiten zusammengesetzt sind (Übersicht bei Kirchhausen, 2000). AP2 ist an der Plasmamembran bei der Bildung der CCV beteiligt. Es bindet an die zytosolischen Domänen von Plasmamembran-Rezeptoren (wie z.B. den LDL-oder Transferrin-Rezeptor) und sorgt u.a dafür, dass die zu internalisierenden Rezeptor-Liganden-Komplexe an Stellen der sich bildenden CCVs konzentriert werden (Pearse *et al.*, 2000). Desweiteren sind die Adapterkomplexe mitverantwortlich für die Rekrutierung einer Reihe akzessorischer und regulatorischer Proteine, die in den Endozytoseprozeß involviert sind. Dazu zählen z.B. Amphiphysin und Epsin in den frühen Stadien des *coat assembly* (Traub *et al.*, 1999; Owen *et al.*, 1999), Dynamin zur Abschnürung des Vesikels von der Plasmamembran (Hinshaw und Schmid, 1995; Schmid *et al.*, 1998; Henley *et al.*, 1999), sowie SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor adaptor protein receptor*) für spätere Fusionsereignisse (Nichols *et al.*, 1997; Skehel und Wiley, 1998), z.B. mit den frühen Endosomen (siehe I.2.1.2. Der endo-lysosomale *Pathway* und seine Kompartimente).

I.2.1.2. Der endo-lysosomale *Pathway* und seine Kompartimente

Die einzelnen Kompartimente des endo-lysosomalen *Pathway* lassen sich grob schematisch in drei Gruppen einteilen: frühe Endosomen (*early endosomes*), späte Endosomen (*late endosomes*) und Lysosomen (Perret *et al.*, 2005).

Nach Abschnürung eines Vesikels von der Plasmamembran führt die Aktivierung von Auxillin und Hsc70 (Ungewickell, 1999) zum sog. *uncoating* der Clathrin-Hülle. In einem als Reifung bezeichneten Prozess wandert das so entstandene Endosom entlang von Mikrotubuli ins Zellinnere. Dort findet letztlich die Verschmelzung von Endosom und Lysosomen statt.

Als **frühe Endosomen** (*early endosomes*) bezeichnet man dabei alle Organellen, die durch Verlust der Clathrin-Hülle entstanden sind sowie Organellen, die durch Clathrin-unabhängige Mechanismen in die Zelle gelangt sind, z.B. pinozytotische Vesikel. In frühen Endosomen findet bereits eine erste Sortierung des aufgenommenen Materials statt, wodurch dieses gemäß seiner Bestimmung weitergeleitet wird. Daher werden frühe Endosomen mitunter auch als *sorting endosomes* bezeichnet.

Frühe Endosomen sind jedoch stark pleiomorphe Kompartimente, die zisternenartige, tubuläre und vesikuläre Regionen in sich vereinen. Die tubulären Elemente entsprechen aufgrund der Lipidzusammensetzung ihrer Membran Teilen des *recycling*-Endosoms. In diesem Kompartiment findet man von den internalisierten Bestandteilen all diejenigen wieder, die zurück zur Plasmamembran transportiert werden sollen (Sheff *et al.*, 1999).

Das für die Degradierung bestimmte Material wird ausgehend von den Endosomen in sogenannte *endocytic carrier vesicles* überführt und anschließend späten Endosomen und Lysosomen zugeführt.

Hauptmerkmal **später Endosomen** und Lysosomen ist ihr saurer pH-Wert. Späte endosomale Kompartimente zeigen in hämatopoetischen Zellen sekretorisches Potential (Blott und Griffiths, 2002). Dies ist im Bezug auf die Antigenpräsentation von großer Bedeutung, da azidische Vesikel, in denen die Beladung der MHC II-Moleküle stattfindet, in der Lage sind, mit der Plasmamembran zu fusionieren (Raposo *et al.*, 1996; Boes *et al.*, 2002; Chow *et al.*, 2002).

In den **Lysosomen**, die mit einem pH-Wert zwischen 4,5 und 5 deutlich saurer sind als die späten Endosomen, werden Proteine und Partikel enzymatisch abgebaut. Zu den lysosomalen Enzymen zählen nur im sauren Bereich aktive Hydrolasen wie Phosphatasen, lysosomale Nukleasen und Proteasen. Deren Aktivität wird durch Protonenpumpen gewährleistet, die die intralysosomalen pH-Werte konstant halten.

Den einzelnen endosomalen Kompartimenten können unterschiedliche **Markerproteine** zugeordnet werden. Hierbei wurden insbesondere kleine GTPasen der Rab-Familie gut charakterisiert (siehe Abb. 3). Rab4 lokalisiert an frühen und *recycling*-Endosomen und reguliert den Rücktransport von internalisiertem Material zur Plasmamembran (Daro *et al.*, 1996; Mohrmann und van der Sluijs, 1999). Rab5 ist an frühen Endosomen zu finden und katalysiert deren homotypische Fusion (Chavrier *et al.*, 1997; Gorvel *et al.*, 1991; Bucci *et al.*, 1992). Rab5 ist in den Transport von *early endosomes* entlang von Mikrotubuli involviert (Nielsen *et al.*, 1999). Rab7 und Rab9 lokalisieren an späten Endosomen, haben aber unterschiedliche Funktionen. Rab7 reguliert den Transport von frühen zu späten Endosomen (Feng *et al.*, 1995; Mukhopadhyay *et al.*, 1997), wohingegen Rab9 Transportprozesse von späten Endosomen zum trans-Golgi-Netzwerk (TGN) moduliert (Lombardi *et al.*, 1993). Die größte Akkumulation von Rab11 findet sich an *recycling*-Endosomen. In Epithelzellen wird Rab11 für den Transport von apikalen *recycling*-Endosomen zur Plasmamembran benötigt (Calhoun *et al.*, 1998; Duman *et al.*, 1999). Rab11 wird aber auch eine Rolle in Exozytoseprozessen, ausgehend vom Golgi-Apparat,

zugesprochen (Chen *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 1998). Oft ist eine klare Trennung zwischen den einzelnen Kompartimenten nicht möglich, da es sehr viele Übergänge und Überlappungen zwischen den verschiedenen Stadien des endozytotischen *Pathways* gibt (Perret *et al.*, 2005).

In Abbildung 3 ist die Lokalisation unterschiedlicher Markerproteine mit einem Fokus auf RabGTPasen an Strukturen des endo-lysosomalen *Pathways* in einer Übersicht zusammengefasst. Bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose erfolgt die Dissoziation von Rezeptor und Ligand erst in den späten Endosomen. Dort wird die sonst sehr feste Rezeptor-Ligand-Bindung durch den sauren pH-Wert gelöst. Aus diesem Grund wird dieses Kompartiment auch als CURL (*compartment of uncoupling receptor from ligand*) bezeichnet. Unligierte Rezeptoren unterliegen einem permanenten Endozytose-Exozytose-Zyklus. Innerhalb dieses Zyklus werden sie den *recycling endosomes* zugeführt und wieder zurück zur Plasmamembran gebracht. Trägt der Rezeptor jedoch ein Ubiquitinierungssignal im zytoplasmatischen Bereich, wird er späten Endosomen und anschließend Lysosomen zugeführt und degradiert.

Das bereits erwähnte sekretorische Potential der späten Endosomen macht sich bspw. das Lentivirus HIV-1 zunutze, indem es in solchen Endomembranstrukturen akkumuliert, um anschließend unter Ausnutzung der Exozytosemaschinerie der Zelle an der Plasmamembran zu assemblieren (Pornillos *et al.*, 2002). Interessanterweise konnte in Makrophagen nachgewiesen werden, dass HIV-1 dort vor allem in einem speziellen, endosomalen Kompartiment, dem sogenannten *multivesicular body*, assembliert und der Hauptanteil infektiöser Partikel aus diesem Kompartiment freigesetzt wird (Raposo *et al.*, 2002; Pelchen-Matthews *et al.*, 2003).

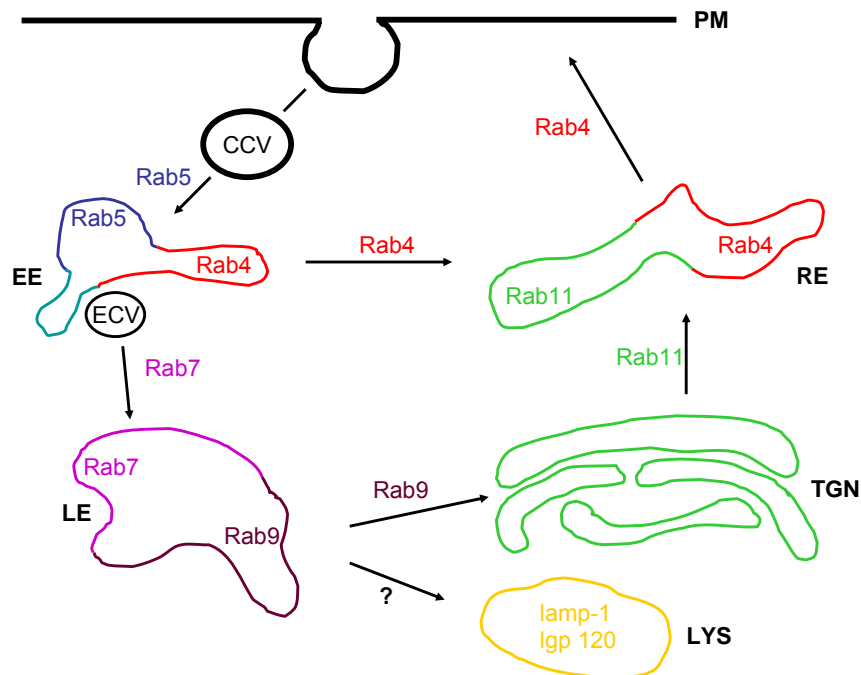


Abb. 3: Koordinierte Regulation des endozytischen Pathways durch Rab-Proteine.

Moleküle, die über Clathrin-beschichtete Vesikel aufgenommen werden, gelangen in frühe Endosomen (*early endosomes*). Von dort können sie zu den späten Endosomen (*late endosomes*) und schließlich zu Lysosomen gelangen, in denen sie degradiert werden. Alternativ können diese Moleküle, z.B. Rezeptoren, auch über *recycling-endosomes* zurück zur Plasmamembran transportiert werden. Ebenso kann das aufgenommene Material an unterschiedlichen Punkten dem Golgi-Apparat zugeführt und ausgehend von diesem auch wieder zur Plasmamembran zurück transportiert werden. Die Proteine, die als Markerproteine für die verschiedenen Organellen dienen und die Rab-Proteine, von denen bekannt ist, dass sie den Transport zwischen einzelnen Organellen regulieren, sind angegeben. CCV: *clathrin-coated vesicle*, EE: *early endosome*, LE: *late endosome*, LYS: Lysosom, RE: *recycling endosome*, TGN: Trans-Golgi-Netzwerk, ECV: *endocytic carrier vesicle*. Abbildung adaptiert nach Somsel und Wandinger-Ness (2000) und Miaczynska und Zerial (2002).

I.2.2. Clathrin-unabhängige Aufnahme: Phagozytose und Makropinozytose

I.2.2.1. Phagozytose

Unter Phagozytose versteht man die Aufnahme 0,5 bis 5 μm großer Partikel über einen Aktin-abhängigen (Kaplan, 1977), aber Clathrin-unabhängigen Mechanismus. Die effizientesten Phagozytosemechanismen findet man in einzelligen und in spezialisierten Zellen höher entwickelter Organismen, d.h. in Monozyten/Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und B-Zellen. In Monozyten/Makrophagen spielt Phagozytose v.a. hinsichtlich ihrer Aufgabe bei der Immunantwort eine wichtige Rolle.

Auf der Oberfläche von Makrophagen befinden sich zur Unterscheidung von „körperfremd“ und „körpereigen“ diverse Rezeptoren. Dazu zählen z.B. die sogenannten *pattern-recognition*

receptors (PRRs; Janeway 1992; Sastry und Ezekowitz, 1993), die bestimmte Pathogen-assoziierte Motive wie formylierte bakterielle Peptide und Polysaccharide oder Lipoteichonsäuren bzw. Lipopolysaccharide aus der Zellmembran gram-positiver bzw. gram-negativer Bakterien erkennen. PRR's sind identisch mit *Toll-like receptors* (Aderem und Ulevitch, 2000; Akira *et al.*, 2001), von denen bis dato in Säugern 10 Isoformen identifiziert wurden. Der *Toll-like receptor 4* (TLR4) ist essentiell für LPS-induzierte Immunantwort (Poltorak *et al.*, 1998; Hoshino *et al.*, 1999). Durch die Bindung von LPS an diesen Rezeptor wird in Makrophagen u.a. die Produktion von IL-1 β , IFN- γ , IL-12 und die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) induziert (Jones *et al.*, 2001). Generell führt die Bindung unterschiedlicher Pathogenkomponenten an spezifische TLRs zu inflammatorischen Antworten. Darüber hinaus finden sich auf der Oberfläche von Makrophagen *scavenger*-Rezeptoren (Platt *et al.*, 1998), CD14 (Devitt *et al.*, 1998), der Mannose-Rezeptor (Stahl und Ezekowitz, 1998) und Integrine (Blystone *et al.*, 1994).

Durch Immunglobuline opsonierte Fremdkörper werden über den Fc-Teil des Immunglobulins an Fc-Rezeptoren (FcR) gebunden und internalisiert (Ravetch, 1997; Ravetch und Clynes, 1998). Alternativ werden Pathogene durch Komponenten des Komplementsystems opsoniert. Dieses System besteht aus einer Reihe von Plasmaproteinen, die extrazelluläre Krankheitserreger angreifen, und ergänzt die Antikörper-vermittelte Abwehr des Organismus zum Schutz gegen Infektionen. Die Komplementkaskade wird z.B. durch Bindung von IgM an ein Pathogen aktiviert. Infolge mehrerer Prozessierungsschritte entstehen unterschiedliche Komplementkomponenten mit diversen Funktionen. Eine solche Komponente stellt C3bi dar, über die opsonierte Pathogene über den Komplementrezeptor 3 (CR3) internalisiert und phagozytiert werden (Sengelov, 1995; Carroll, 1998).

I.2.2.1.1. Fc-Rezeptor vermittelte Phagozytose

Die Internalisierung eines mit Immunglobulinen opsonierten Partikels über Fc-Rezeptoren (FcR) erfolgt sehr rasch. Die Interaktion von Rezeptor und Ligand führt zur Phosphorylierung spezifischer Tyr-Reste im Rezeptor (Isakov, 1997), vermittelt durch Mitglieder der src-Familie (Ghazizadeh und Fleit, 1994). Die Aktivierung des Fc-Rezeptors führt zur Rekrutierung der kleinen Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 (Caron und Hall, 1998). Diese regulieren zusammen mit einigen Effektormolekülen, wie z.B. Mitgliedern der WASp-Familie, dem Arp2/3-Komplex (May *et al.*, 2000) und PAK-1 (Diakonova, 2002) Formänderungen des Aktin-Zytoskeletts und

bewirken so die Aufnahme des Partikels (Massol *et al.*, 1998). Die sogenannte Reifung des Phagosoms wird u.a. durch PI3-Kinase (Ninomiya *et al.*, 1994), Proteinkinase C (Zheleznyak und Brown, 1992) und Motorproteine der Myosin-Familie (Stendahl *et al.*, 1980; Swanson *et al.*, 1999) reguliert. In Makrophagen führt die Fc-Rezeptor vermittelte Phagozytose zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies oder Arachidonsäurederivate (Aderem *et al.*, 1985; Wright und Silverstein, 1983), die in späten Stadien der Immunantwort zur Abtötung pathogener Keime benötigt werden.

Im Gegensatz dazu finden die beschriebenen Prozesse bei der Komplementrezeptor-vermittelten Phagozytose nicht statt und auch sonst unterscheiden sich beide Phagozytotypen deutlich voneinander.

I.2.2.1.2. Komplementrezeptor-vermittelte Phagozytose

Im Gegensatz zur Fc-Rezeptor vermittelten Phagozytose werden bei der Komplementrezeptor-vermittelten Phagozytose keine deutlichen Membranprotrusionen gebildet. Vielmehr „sinken“ die opsonisierten Pathogene in die Phagozyten ein (Caron und Hall, 1998; Kaplan, 1977). Trotzdem spielt auch hier die dynamische Regulation des Aktin-Zytoskeletts eine wichtige Rolle. Durch die Erkennung des Komplement-Fragmentes C3bi durch das $\alpha M/\beta 2$ -Integrin auf der Zelloberfläche des Phagozyten wird die Phagozytose induziert. Vor allem die Rho-GTPase RhoA und deren Effektor Rho-Kinase (ROCK) spielen bei der Regulation dieser Art der Phagozytose eine Rolle. RhoA wird zur Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes und zur Aktinnukleation benötigt (May *et al.*, 2000). Wie diese Verknüpfung von RhoA und Arp2/3 zustande kommt, ist noch unklar, allerdings lassen erste Ergebnisse auf eine Beteiligung von ROCK schließen (Olazabal *et al.*, 2002).

Unabhängig vom initialen Aufnahmemechanismus wird der F-Aktin-Anteil des entstehenden Phagosoms sehr schnell abgebaut, worauf eine Interaktion mit verschiedenen Kompartimenten des endo-lysosomalen *Pathways* erfolgt. Phagosom und Lysosomen verschmelzen zum Phagolysosom, und die aufgenommenen Partikel werden degradiert. Je nach Art des phagozytierten Materials kann die Zeitspanne bis zur Fusion mit den Lysosomen und damit auch der Abbau des aufgenommenen Partikels von 30 min bis zu mehreren Stunden variieren (Pitt *et al.*, 1992; Racoosin und Swanson, 1993; Desjardins *et al.*, 1994).

Manchen Mikroorganismen gelingt es jedoch, dem lysosomalen Abbau zu entgehen. Dies erfolgt z.B. durch Umstrukturierung des Phagosoms (Mycobakterien), Ausbruch aus dem Phagosom

(*Listeria*) bzw. durch Strategien, die das Überleben im Lysosom ermöglichen (*Coxiella*, *Salmonella*, *Legionella*). Bakterielle Proteine, die an solchen Vorgängen beteiligt sind, stellen ein wertvolles Mittel dar, gezielt bestimmte Stadien des endozytotischen Weges zu modulieren und damit neue Erkenntnisse über die Abläufe z.B. von Fusionsereignissen zwischen endosomalen Kompartimenten zu gewinnen.

I.2.2.2. Makropinozytose

Makropinozytose beschreibt die Bildung 0,5 – 5 µm großer Vesikel in einem Clathrin-unabhängigen Mechanismus. Über Makropinozytose werden alle Stoffe internalisiert, die für die Aufnahme über Clathrin-abhängige Mechanismen zu groß sind und nicht an einen Rezeptor binden, der phagozytäre Aufnahmeprozesse aktiviert.

In dendritischen Zellen wurde nachgewiesen, dass für Bildung und Transport makropinozytischer Vesikel ein intaktes Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett essentiell ist. Das aufgenommene Material wird entweder dem endozytotischen Pathway oder wieder dem extrazellulären Raum zugeführt (Amyere *et al.*, 2002). In höheren Eukaryonten findet sich die sogenannte konstitutive Makropinozytose. Diese ist jedoch auf unreife dendritische Zellen (Steinman und Swanson, 1995) oder aktivierte Makrophagen beschränkt. In den meisten anderen Zelltypen können makropinozytische Vorgänge zumindest transient (für ca. 5-10 min) induziert werden, z.B. durch Wachstumsfaktoren oder den PKC-Aktivator PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat). Auch einige Pathogene wie z.B. Pathogene der Spezies *Salmonella* oder *Shigella* (Alpuche-Aranda *et al.*, 1994; Finlay und Cossart, 1997) nutzen solche Prozesse, um in Wirtszellen zu gelangen und sich dort zu vermehren.

Makropinozytische Prozesse werden initiiert, indem extrazelluläre Stimuli wie PDGF (*platelet derived growth factor*) oder GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*) an der Plasmamembran Signale erzeugen. Diese werden an Enzyme wie z.B. PI3-Kinase weitergeleitet, die ihrerseits mit *downstream*-Effektoren wie Rho-GTPasen in Kontakt treten, was letztlich zum *membrane ruffling* führt. Durch Rückfaltung der *ruffles* bilden sich intrazelluläre Vesikel, die Makropinosomen. Je nach Zelltyp kann der weitere Weg der Makropinosomen unterschiedlich sein. In Makrophagen wandern sie in Richtung Zellkern, schrumpfen dabei und werden innerhalb von 15 Minuten angesäuert. Dies entspricht dem klassischen endozytotischen Weg von frühen Endosomen zu Lysosomen (Racoosin und Swanson, 1993).

Zu den Regulatoren makropinozytotischer Prozesse zählen die Rho-GTPase Rac1, die das *ruffling* kontrolliert (Ridley *et al.*, 1992), der Rac-Effektor PAK-1 (*p21-activated kinase 1*) (Dharmawardhane *et al.*, 2000) und PI3-Kinase (Amyere *et al.*, 2000; Araki *et al.*, 1996).

Viele weitere Regulatoren greifen in die beschriebenen Mechanismen ein und bilden so ein Netz von Signaltransduktionskaskaden, welches den Ablauf makropinozytotischer Vorgänge steuert (Übersicht bei Amyere *et al.*, 2002).

I.2.3. Endozytose und das Aktin-Zytoskelett

Im Allgemeinen findet sich die stärkste Akkumulation an Aktinfilamenten in der Region direkt unter der Zellmembran, dem sogenannten Cortex. Die Bedeutung von cortikalem Aktin hinsichtlich der Endozytose/Phagozytose ist noch nicht völlig geklärt, jedoch könnte die Beteiligung des Aktins folgendermaßen aussehen (adaptiert nach Qualmann *et al.*, 2000): Cortikales Aktin reguliert die räumliche Anordnung der Endozytosemaschinerie an der Plasmamembran. Aktin fungiert dabei als physikalische Barriere, die die benötigten Komponenten an der lateralen Mobilität hindert. Durch die Aktin-Umorganisation kommt es zu einer Deformation der Plasmamembran. Dies hat entweder Ausstülpungen der Plasmamembran (wie z.B. Filopodienbildung bei der FcR-vermittelten Phagozytose) oder deren Einstülpung (wie z.B. bei der Endozytose oder CR-vermittelten Phagozytose) zur Folge.

Aktin kann auch direkt Vesikelbewegungen im Zytoplasma durch eine vesikelständige Aktin-Polymerisationsmaschinerie regulieren, die die Vesikel, ähnlich wie für das intrazelluläre Pathogen *Listeria monocytogenes* gezeigt, auf einem Aktinschweif vorantreibt. Aktin-abhängige Bewegung durch das Zytoplasma wurde *in vivo* z.B. gezeigt für Endosomen, Pinosomen, Clathrin-beschichtete und sekretorische Vesikel (Merrifield *et al.*, 1999; Frischknecht *et al.*, 1999; Rozelle *et al.*, 2000) sowie *in vitro* für Lysosomen (Taunton *et al.*, 2000).

Mittlerweile sind einige Moleküle bekannt, die das Aktin-Zytoskelett mit der Endozytosemaschinerie verbinden. Dazu gehören z.B. das mit Clathrin-Vesikeln assoziierte Molekül Hip1R (Engqvist-Goldstein, 1999), Abp1, das mit Dynamin interagieren kann (Übersicht bei Qualmann *et al.*, 2000) oder Syndapin, das sowohl mit N-WASP als auch mit dem Arp2/3-Komplex in Kontakt treten kann (Qualmann *et al.*, 1999). Synaptojanin I interagiert mit einigen SH3-Proteinen, die in der Clathrin vermittelten Endozytose eine Rolle spielen (Übersicht bei McPherson *et al.*, 1996).

Neben Aktin kommen in der Zelle v.a. Mikrotubuli eine wichtige Bedeutung bspw. im Bezug auf den intrazellulären Transport von Vesikeln zu. Mikrotubuli dienen als „Schienen“, an denen entlang Vesikel durch das Zytoplasma in anterograder ebenso wie in retrograder Weise transportiert werden können. Rab5 und PI3-Kinase modulieren den Transport von *sorting endosomes* entlang der Mikrotubuli in Richtung Zellinneres (Nielsen *et al.*, 1999). Auch der Transport von *early* zu *late endosomes* erfolgt entlang von Mikrotubuli (Apodaca, 2001; Jordens *et al.*, 2001).

I.3. Proteine der WASp-Familie

I.3.1. Allgemeines zur WASp-Familie

WASP-Proteine nehmen eine zentrale Rolle in der Aktin-Regulation ein. WASP steht für Wiskott-Aldrich-Syndrom. Mutationen im WASp-Gen führen zu WAS, einer X-chromosomal vererbten Krankheit, die mit Ekzemen, Thrombozytopenien und Immunschwäche einhergeht.

Die Familie der WASp-Proteine besteht aus fünf Mitgliedern: WASp, N-WASP sowie WAVE / Scar-1, -2 und -3. Sie alle weisen eine Multidomänenstruktur auf, durch die sie mit zahlreichen Interaktionspartnern in Wechselwirkung treten können. Diese Eigenschaft macht die Mitglieder der WASp-Familie zu zentralen Regulatoren diverser Signaltransduktionswege (siehe Abb. 4).

Für die in allen WASp-Proteinen enthaltene Prolin-reiche Domäne wurden zahlreiche Interaktionen nachgewiesen. So bindet diese Domäne u.a. an die Adapter-Moleküle Grb2 (Miki *et al.*, 1996; She *et al.*, 1997; Carlier *et al.*, 2000), NCK (Rivero-Lescano *et al.*, 1995), PSTPIP_2 („*proline, serine, threonin phosphatase interacting protein*“; Wu *et al.*, 1998), Phospholipase C γ 1 (Finan *et al.*, 1996), die 85 kDa Untereinheit der PI3-Kinase (Finan *et al.*, 1996), VASP („*vasodilatator-stimulated phosphoprotein*“; Castellano *et al.*, 2001), WISH („*WASP-interacting SH3 protein*“; Fukuoka *et al.*, 2001) und Profilin (Suetsugu *et al.*, 1998).

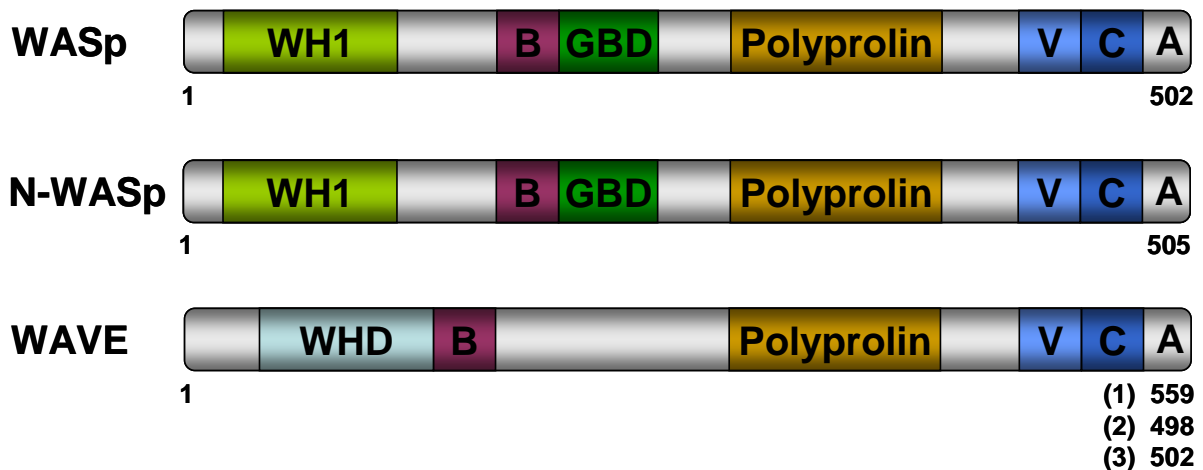


Abb. 4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Mitglieder der WASp-Familie
WH1: WASp Homologie Domäne 1; **B:** Basische Region; **GBD:** GTPase Bindungsdomäne; **Polyprolin:** Prolin-reiche Domäne; **V:** Verprolin-ähnliche Domäne; **C:** *connecting*-Domäne; **A:** Azidische Domäne; **WHD:** WAVE Homologie Domäne. Die Zahlen bezeichnen die erste und letzte Aminosäure des Moleküls. (1)-(3) bezeichnen die WAVE-Isoformen.

Die einzelnen Mitglieder der WASp-Familie zeigen unterschiedliche Expressionsmuster. So wird WASp vornehmlich hämatopoietisch exprimiert, wohingegen N-WASP ubiquitär vorkommt. WASp und N-WASP zählen zu den Effektoren der Rho-GTPase CDC42. Im Gegensatz dazu fungieren die WAVE-Proteine als Rac-Effektoren. Auf struktureller Ebene ist allen Mitgliedern der WASp-Familie eine C-terminal gelegene Verprolin-homologe, Connecting und Azidische Region gemein, die zusammen als **VCA**-Domäne beschrieben wird.

Als zusammenhängendes Polypeptid kann die VC-Domäne direkt an monomeres Aktin binden als auch Aktinnukleation über Arp2/3-Komplex initiieren. Somit können auch Konstrukte, die die A-Region entbehren, Arp2/3-Komplex binden und aktivieren (Hüfner *et al.*, 2001).

I.3.2. Allgemeines zu WAVE

WAVE steht für WASp-family Verprolin homologous protein. Es existieren drei Isoformen: WAVE1, WAVE2 und WAVE3. Der strukturelle Aufbau der drei Isoformen ist sehr ähnlich (siehe Abb. 5). WAVE-Proteine besitzen am N-Terminus eine WAVE- / Scar-homologe Domäne (WHD /SHD). Zentral finden sich eine Basische Domäne (B) und eine Prolin-reiche Domäne (P). Im Gegensatz zur Prolin-reichen Domäne von WASp ist die von WAVE bisher nicht eingehend untersucht. Am C-Terminus besitzen die WAVE-Isoformen ebenso wie WASp und N-WASP eine VCA-Domäne. Die Verprolin- und *Connecting*-Domänen werden im Folgenden, wie auch in der Literatur zu finden, als W-Domäne zusammengefasst. Ebenso wie bei WASp und N-WASP

kann die VCA-Domäne direkt an monomeres Aktin binden als auch Aktinnukleation über Arp2/3-Komplex initiieren.

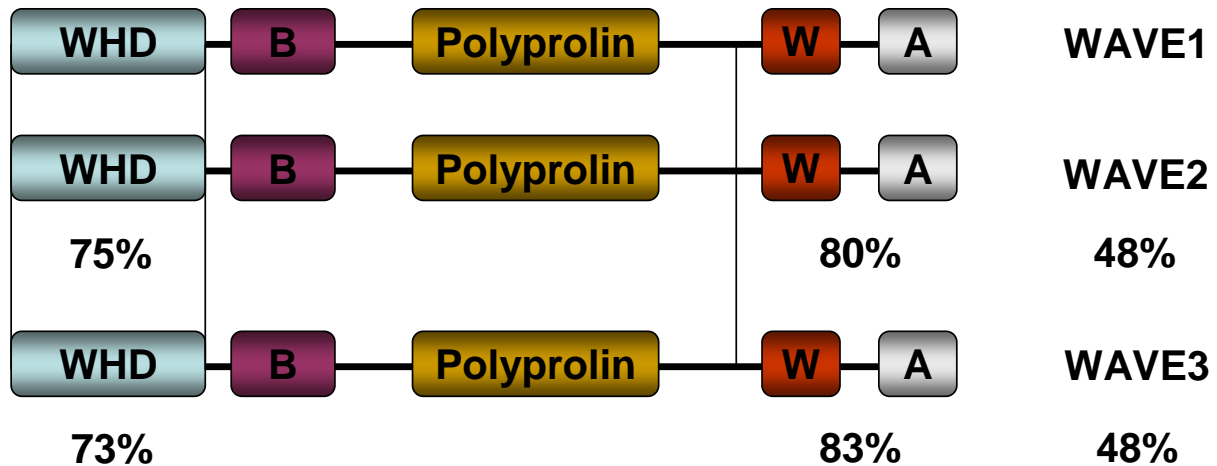


Abb. 5: Domänenstruktur der drei WAVE-Isoformen (nach Suetsugu *et al.*, 1999)

Die Zahlen in Prozent geben die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von WAVE2 und WAVE3 mit WAVE1 an. **WHD:** WAVE Homologie Domäne; **B:** Basische Domäne; **W:** WH-Domäne; **A:** Azidische Domäne.

Die drei WAVE-Isoformen sind in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen worden. In der embryonalen Entwicklung werden zunächst alle Isoformen in allen fetalen Geweben exprimiert. Danach wurde WAVE1-Expression primär im Gehirn und in der Lunge, aber auch in der Plazenta, der Leber und im Pankreas nachgewiesen (Sossey-Alaoui *et al.*, 2003). WAVE2-Expression konnte dagegen u.a. in Gefäßen, Plazenta- und Lungengewebe gezeigt werden. WAVE3 wird vorwiegend im Gehirn exprimiert, aber auch in anderen Gewebearten wie Lunge, Hoden, Niere und Skelettmuskel.

Als Effektorproteine von Rho-GTPasen und Aktin-Regulatoren spielen die WAVE-Proteine eine bedeutende Rolle in allen Prozessen, in denen eine Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts nötig ist. In diesem Zusammenhang konnte WAVE1 am *leading edge* von Zellen und in Lamellipodien, jedoch nicht in Filopodien nachgewiesen werden (Hahne *et al.*, 2001). WAVE2 und WAVE3 lokalisieren an Initiationsregionen von *microspikes* und konzentrieren sich an den Spitzen sich bildender Lamellipodien und Filopodien, an denen sie auch während der gesamten Elongation zu finden sind (Suetsugu *et al.*, 2003).

I.3.3. Funktionen von WAVE

Die WAVE-Proteine konnten bisher für eine Reihe zellulärer Prozesse verantwortlich gemacht werden. In embryonalen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass WAVE1 und WAVE2 zusammen mit Matrixmetalloproteasen für die Migration und Invasion in die extrazelluläre Matrix verantwortlich sind (Suetsugu *et al.*, 2003). In Leber-Mitochondrien wurde für WAVE1 eine Rolle in der Glykolyse nachgewiesen (Danial *et al.*, 2003). Desweiteren gibt es Hinweise, dass WAVE1 an der Phagozytose von Amyloid beteiligt ist (Kitamura *et al.*, 2003).

WAVE1 soll auch bei der intrazellulären Fortbewegung von *Listeria monocytogenes* eine Rolle spielen. Dieses Bakterium bewegt sich in der Zelle mittels eines Aktinschweifes fort. Dazu bedient sich das Bakterium der Aktin-Polymerisationsmaschinerie der Wirtszelle, wobei WAVE1 beteiligt ist (May *et al.*, 1999).

In Mäusen wurde gezeigt, dass WAVE2 für die kardiovaskuläre Entwicklung und Angiogenese während der Embryogenese von entscheidender Bedeutung ist (Yamazaki *et al.*, 2003).

WAVE3 ist die derzeit einzige WAVE-Isoform, die mit einer Krankheit in Verbindung gebracht werden konnte. In Neuroblastomen findet sich eine inaktive Form von WAVE3 (Sossey-Alaoui *et al.*, 2002).

I.3.4. Aktivierungsmechanismen von WAVE

Obwohl sich WASp und WAVE in ihrem strukturellen Aufbau sehr ähnlich sind, ist die Regulation beider Proteine als Aktivatoren der Arp2/3-abhängigen Aktin-Polymerisation unterschiedlich. Im Folgenden wird auf den Aktivierungsmechanismus von WAVE näher eingegangen.

WAVE1 konnte als Teil eines pentameren Komplexes nachgewiesen werden. Dieser Komplex besteht aus PIR121 (*p53 inducible messenger RNA*), Nap1 (*Nck-associated protein*), Abi (*Abl interactor*) und HSPC300 (Eden *et al.*, 2003). PIR121 stellt wahrscheinlich die Verbindung zwischen dem pentameren Komplex und Rac dar (Kobayashi *et al.*, 1998). PIR121 vermittelt wahrscheinlich ebenso die Interaktion zwischen Nck und Nap1 (Kitamura *et al.*, 1996), das seinerseits wiederum mit Abi interagiert (Gautrau *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2001). Abi verbindet Pir121/Nap1 mit WAVE-Proteinen über deren WHD-Domäne (Echarri *et al.*, 2004; Gautrau *et al.*, 2004; Innocenti *et al.*, 2004). HSPC300 interagiert mit Abi und der WHD von WAVE.

Ursprünglich war man der Meinung, WAVE1 könne *in vitro* nicht innerhalb des pentameren Komplexes den Arp2/3-Komplex aktivieren. Zur Aktin-Polymerisation käme es nur in

Anwesenheit von Rac oder des Adapterproteins Nck, durch dessen Bindung PIR121, Nap1 und Abi vom WAVE1/HSPC300-Subkomplex wegdissoziieren (Eden *et al.*, 2002).

Neue Daten fordern dieses Modell heraus. In zwei unabhängigen Studien konnte ein stabiler WAVE-enthaltender Komplex *in vivo* selbst nach Aktivierung durch Rac nachgewiesen werden (Innocenti *et al.*, 2004; Steffen *et al.*, 2004). Darüber hinaus inhibierte der PIR121/Nap1/Abi-Komplex nicht die Fähigkeit von WAVE1 Arp2/3-Komplex *in vitro* zu aktivieren. Die offensichtliche Diskrepanz dieser zwei möglichen Aktivierungsmechanismen, Dissoziation versus stabile Assoziation, könnte durch unterschiedliche Herangehensweisen erklärbar sein. Sowohl posttranslationale Modifikation von Proteinen des WAVE-Komplexes als auch zusätzliche Moleküle könnten eine entscheidende Rolle in der Regulation der WAVE-Funktion spielen und fehlen in dem heutigen Erklärungsmodell. Ebenso scheint die Vollständigkeit des pentameren Komplexes für die Stimulus-induzierte und lokalisierte Aktivierung des Arp2/3-Komplexes durch die WAVE-Proteine wichtig zu sein. Dabei ist die Rekrutierung des aktiven WAVE-Komplexes der wichtigste regulatorische Schritt in der WAVE-induzierten Aktin-Polymerisation. Möglicherweise spielen dabei einerseits die Stärke des WAVE-aktivierenden Signals und andererseits die Anwesenheit möglicher Coaktivatoren wie Aktinfilamente eine weitere Rolle.

Phosphorylierung, eine weitere posttranslationale Modifikation reguliert ebenfalls die Aktivität von Proteinen der WASp-Familie. So findet sich WAVE1 konstitutiv phosphoryliert an Serin/Threonin-Resten in Maus-Fibroblasten (Miki *et al.*, 1999). PDGF-Behandlung führt zu MAP-Kinase abhängiger Phosphorylierung an unspezifischen Serin/Threonin-Resten. Die Rolle solcher Phosphorylierung ist jedoch bisher unbekannt.

In den letzten Jahren wurden vier, sich teilweise überlappende, Regulationsebenen in der Aktivierung von Proteinen der WASp-Familie offensichtlich: Interaktion mit Bindungspartnern, Stabilität / Degradierung, Phosphorylierung und subzelluläre Verteilung. Dadurch ist ein besseres Verständnis der Regulationsmechanismen bei der Kontrolle der lokalisierten Arp2/3-Aktivierung möglich.

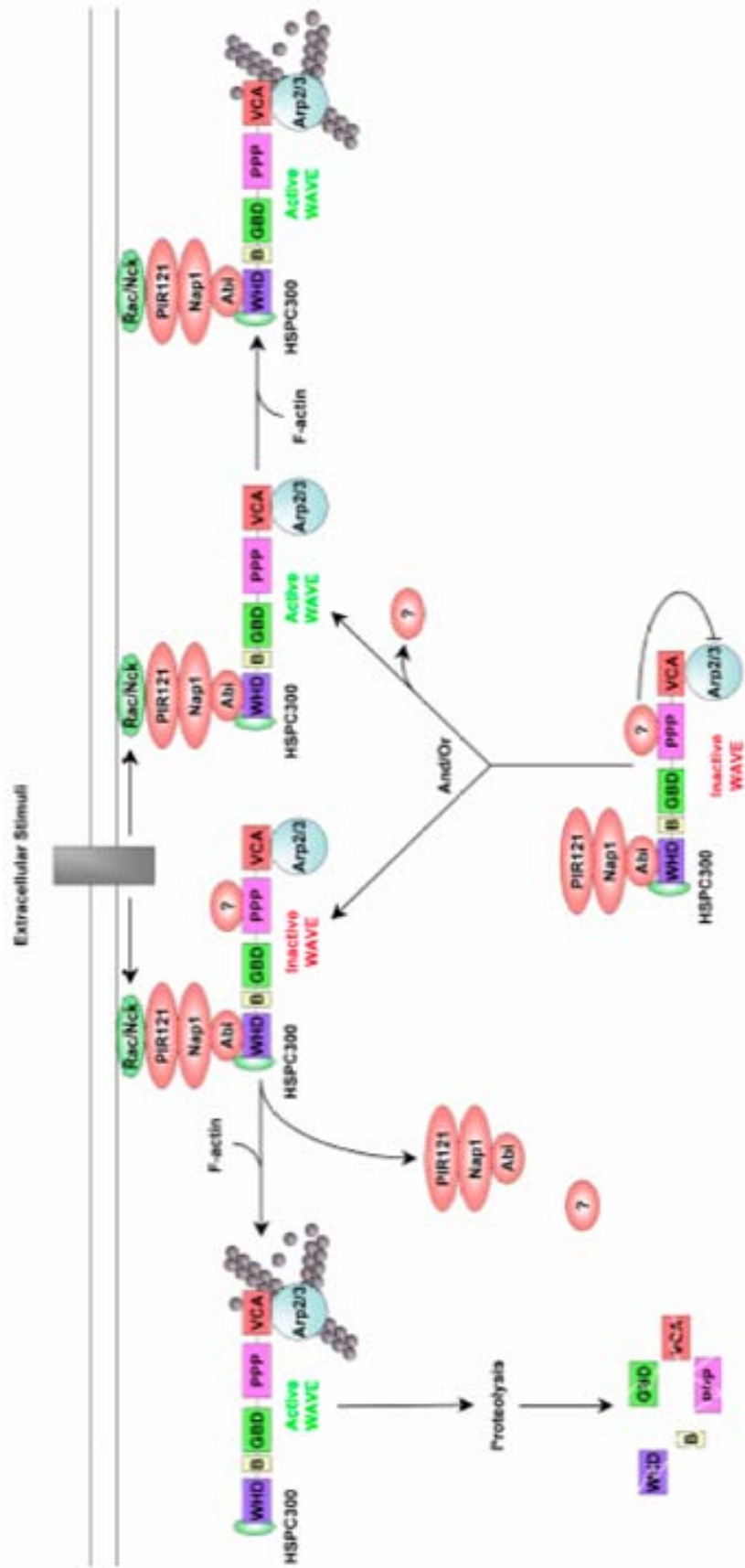


Abb. 6: Modell für WAVE Regulation (Bompard und Caron, 2004)

In diesem Modell interagiert WAVE konstitutiv mit dem Arp2/3-Komplex. Unter Ruhebedingungen ist Arp2/3 nicht aktiv, entweder weil die Bindung von WAVE an den PIR121-Nap1-Abi-HSPC300-Komplex die Interaktion von WAVE-Arp2/3 mit einem essentiellen Coaktivator (z.B. F-Aktin) verhindert oder weil der Komplex nicht korrekt lokalisiert ist. Die Beteiligung eines inhibitorischen Proteins wie bspw. Slal und Bbc1 (als „?“ markiert) konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Extrazelluläre Stimuli, durch die Aktivierung von Rac oder die Mobilisation von Nck, rekrutieren den pentameren Komplex an die Plasmamembran. Die Aktivierung von WAVE erfordert die richtige Lokalisation sowie, wie in diesem Modell gezeigt, die Anwesenheit von F-Aktin und/oder die Abspaltung zusätzlicher Proteine. Alternativ dissoziiert zunächst der Komplex bestehend aus WAVE, HSPC300 und Arp2/3 bevor die Aktivierung in Anwesenheit von F-Aktin stattfindet und der Vorgang durch die Degradierung freier WAVE-Proteine beendet wird.

I.4. Interaktionspartner von WAVE1

Ebenso wie für WASp sind auch für WAVE1 Interaktionen mit anderen Proteinen bekannt:

NCK ist ein Adapterprotein, das aus mehreren Src homologen (SH) Domänen besteht: drei SH3-Domänen am N-Terminus und eine SH2 Domäne am C-Terminus (Lehmann *et al.*, 1990). Es stellt eine wichtige Verbindung zwischen extrazellulären Signalen und dem Zytoskelett dar. Die SH2- und SH3-Domänen binden Prolin-reiche Domänen von Adapterproteinen wie z.B. PAK und Effektorproteinen wie z.B. denen der WASp-Familie (Li *et al.*, 2001; Buday *et al.*, 2002; siehe schematische Darstellung IV.6.2. NCK-1).

Die p21 aktivierte Kinase 1 (Pak1) ist eine Serin-/Threonin-Kinase (Manser *et al.*, 1994), die in die Regulation von Gentranskription, Zellmorphologie, Motilität und Apoptose involviert ist. Pak1 setzt sich aus mehreren Prolin-reichen Domänen, einer p21 bindenden Domäne (PBD), einer autoinhibitorischen Domäne (AID), einer azidischen Region und einer Kinase Domäne zusammen. Im inaktiven Zustand liegt Pak1 in autoinhibitorischer Konformation vor. Dabei interagiert die N-terminal gelegene AID mit der Kinase-Domäne am C-Terminus. Durch die Bindung von aktiviertem Rac oder Cdc42 an die PBD kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch die Aktivierung von Pak ermöglicht wird (Zenke *et al.*, 1999). Dabei kann es durch die Auffaltung innerhalb der Kinase-Domäne an Thr423 zu einer Autophosphorylierung kommen, die eine erneute Rückfaltung verhindert. Pak interagiert bspw. direkt mit den N-terminal gelegenen Prolin-reichen Domänen von NCK (Galisteo *et al.*, 1996; Bokoch *et al.*, 1996). Andererseits kann durch Rac aktiviertes Pak die MAPK (siehe unten) aktivieren.

Die *mitogen activated protein kinase* (MAPK) wird durch verschiedene externe Stimuli aktiviert. Sie reguliert zahlreiche zelluläre Prozesse, darunter Zellwachstum und -differenzierung. Die bekannteste Funktion der MAPK ist die Weiterleitung von Ras-vermittelten Signalen an den

Nukleus, um dort die Transkription spezifischer Zielgene zu induzieren. Desweiteren finden sich Hinweise, dass MAPK auch zytoplasmatische Vorgänge wie Zellmotilität reguliert (Klemke *et al.*, 1997). In diesem Zusammenhang kann WAVE1 als Effektorprotein der MAPK fungieren und durch diese phosphoryliert werden (Miki *et al.*, 1999). Die Aktivierung der MAPK erfolgt Rac-abhängig durch Pak (Frost *et al.*, 1996; Frost *et al.*, 1997). Damit ergibt sich eine Möglichkeit der WAVE1-Aktivierung, denn eine direkte Interaktion von WAVE1 und Rac wurde bisher nicht gezeigt.

I.5. Fragestellung

Die Rolle von WAVE-Proteinen in der Aktin-Regulation ist Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Forschung. Ebenso findet sich eine Fülle von Daten, die über die subzelluläre Lokalisation der WAVE-Isoformen und ihre Rolle in der Aktinregulation Aufschluss geben. In unserer Arbeitsgruppe wurde vor Beginn der vorliegenden Arbeit WAVE erstmals an vesikulären Strukturen nachgewiesen (Dissertation Schell, 2003). Dies legt nahe, dass WAVE hinsichtlich Vesikelbildung und -regulation eine Bedeutung zukommt, die bisher noch nicht näher untersucht worden ist.

Daraus ergaben sich folgende Fragen:

- 1. Welche Isoform(en) von WAVE lokalisieren spezifisch an vesikulären Strukturen?**
- 2. Lässt sich die vesikuläre Verteilung von WAVE durch Stimuli induzieren?**
- 3. Können WAVE-Vesikel bestimmten Kompartimenten des endo-lysosomalen Pathway zugeordnet werden?**
- 4. Wie lassen sich WAVE-Vesikel bzgl. ihrer molekularen Zusammensetzung charakterisieren?**
- 5. Können bestimmte Domänen identifiziert werden, die für die vesikuläre Lokalisation von WAVE verantwortlich sind?**
- 6. Welche Funktion haben WAVE-Vesikel?**
- 7. Gibt es Interaktionspartner, die die Bildung bzw. eine mögliche Funktion der WAVE-Vesikel beeinflussen?**

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden in primären humanen Makrophagen, teils auch in einer monozytären Zelllinie, zellbiologische und biochemische Untersuchungen durchgeführt.

II. MATERIAL

II.1. Antikörper

II.1.1. Primäre Antikörper

Die für diese Arbeit verwendeten, kommerziell erworbenen primären Antikörper sind nachfolgend alphabetisch aufgeführt:

Antikörper gegen	Hersteller
β-Aktin	Chemicon
Flag-tag	Sigma
GRB-2	Transduction Lab.
HA-tag	Roche Diagnostics
NCK	Transduction Lab
Anti-PAK (C-19)	Santa Cruz
p47Phox	BD Biosciences
WAVE1	Chemicon
WAVE1	Upstate

Tab. 1: Übersicht über die kommerziell erworbenen primären Antikörper

Folgende Antikörper wurden freundlicherweise von nachfolgend genannten Personen zur Verfügung gestellt:

- anti-GFP (Maus) von Dr. H. Faix, Adolf-Butenandt-Institut, Zellbiologie, LMU München (Deutschland)
- anti-pan-WAVE (Kaninchen) von T. Takenawa, Institut für Medizinische Forschung, Abteilung Biochemie, Universität Tokio (Japan)
- Myc-Antikörper (Maus): Robert Zumbühl, Université de Montpellier II (France)

II.1.2. Sekundäre Antikörper

Die für diese Arbeit verwendeten, sekundären Antikörper für Immunfluoreszenz und *Western Blot* sind nachfolgend alphabetisch aufgeführt:

Antikörperbezeichnung	Hersteller
Cy TM 5-conj. F(ab) ₂ fragment goat anti-mouse IgG	Dianova
Cy TM 5-conj. AffiniPure donkey anti-mouse IgG	Dianova
Alexa Fluor [®] 488 goat anti-mouse IgG (H+L)	Molecular Probes
Alexa Fluor [®] 568 goat anti-mouse IgG (H+L)	Molecular Probes
Alexa Fluor [®] 568 F(ab) ₂ fragment of goat anti-mouse IgG (H+L)	Molecular Probes
Alexa Fluor [®] 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Molecular Probes

Alexa Fluor [®] 568 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Molecular Probes
Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase-linked whole antibody (from sheep)	Amersham Pharmacia
Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-linked F(ab') ₂ fragment (from donkey)	Amersham Pharmacia

Tab. 2: Übersicht über die sekundären Antikörper für Immunfluoreszenz und *Western Blot*

II.2. Bakterienstämme

- *Escherichia coli* DH5 α : F⁻ ϕ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_K,m_K⁻) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1* (GibcoBRL)
- *Escherichia coli* BL 21 DE3: F⁻ *dcm omp T hsd S*(r_B⁻m_B⁻) *gal* λ (DE3)

II.3. Chemikalien

Die aufgeführten Agenzien hatten p.a. Qualität. Sie stammen von folgenden Firmen:

- Amersham Pharmacia / Deutschland
- Bio Whittaker Molecular Applications / Dänemark
- Biozym / Deutschland
- Dianova / Deutschland
- Difco / Deutschland
- Merck / Deutschland
- Roche Diagnostics GmbH / Deutschland
- Sigma-Aldrich / Deutschland

II.4. Enzyme

- *Bam* HI New England Biolabs / Deutschland
- *Bgl* II New England Biolabs / Deutschland
- *Eco* RI New England Biolabs / Deutschland
- *Hind* III New England Biolabs / Deutschland
- *Sal* I New England Biolabs / Deutschland

- *Xho* I New England Biolabs / Deutschland
- Deep Vent DNA-Polymerase New England Biolabs / Deutschland
- T4-Polynukleotidkinase Promega GmbH / Deutschland
- T4-DNA-Ligase Roche Diagnostics GmbH / Deutschland

II.5. Kit-Systeme

- QIAquick™ PCR-Purification Kit Qiagen GmbH / Deutschland
- QIAquick™ Gel-Extraction Kit Qiagen GmbH / Deutschland
- QIA® Spin Miniprep Kit Qiagen GmbH / Deutschland
- Endofree® Plasmid Maxi Kit Qiagen GmbH / Deutschland
- Nucleobond AX100 Midiprep Kit Macherey-Nagel GmbH & Co. KG / Deutschland
- *Taq* PCR Core Kit Qiagen GmbH / Deutschland
- MiniMACS CD14 *Microbeads* Miltenyi Biotech GmbH / Deutschland
- Alligator™ Ligation Kit Genaxxon Bioscience / Deutschland

II.6. Laborausstattung

- Autoklav Bioclav, Schütt Labortechnik GmbH / Göttingen, Deutschland
- Eismaschine Flockeneisbereiter AF-10, Scotsman / Vernon Hills, IL, USA
- Elektroporator Gene-Pulser II, Biorad / Hercules, CA, USA
- Feinwaage Sartorius AG / Göttingen, Deutschland
- Gelapparaturen PeqLab Biotechnologie GmbH / Erlangen, Deutschland
- Grobwaage Sartorius AG / Göttingen, Deutschland
- Inkubatoren Binder Labortechnik / Tuttlingen, Deutschland
- Mikroinjektionsanlage Transjector 5246 und Mikromanipulator 5171, Eppendorf / Hamburg / Deutschland
- Netzgeräte Power Pac 200 & Power Pac 300 Power Supply, Biorad / Hercules, CA, USA

- Petrischalen Greiner Labortechnik / Frickenhausen, Deutschland
- pH-Meter Knick, Elektronische Messgeräte GmbH & Co. / Berlin, Deutschland
- Pinzetten neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs-GmbH / Heidelberg, Deutschland
- Pipetten Pipetman (10, 20, 200, 1000µl), Gilson International B.V. / Den Haag, Niederlande
- Schüttelinkubatoren GFL-3031, Gesellschaft für Labortechnik mbH / Burgwedel, Deutschland
- Spektrophotometer Kontron Instruments / Watford, England
- Speedvac UniVapo 150 H, UniEquip Laborgerätebau & Vertriebs GmbH / Martinsried, Deutschland
- Tischzentrifugen Biofuge *freSCO*, Heraeus Sepatech / Osterode, Deutschland
- Thermocycler Uni-Thermoblock, Biometra GmbH / Göttingen, Deutschland
Mastercycler gradient, Eppendorf / Hamburg, Germany
- Ultrazentrifuge Optima™ TK`LX Ultrazentrifuge, Beckman Coulter / Fullerton, USA
- Zentrifugen Centricon H-401, Kontron Instruments / Watford, England
Omnifuge 2.0RS, Heraeus Sepatech / Osterode, Deutschland
MR 1812, Jouan / Winchester, USA

II.7. Oligonukleotide für Klonierungen

Name	Verwendung	Hersteller
SHDGFP-f	Klonierung	MWG-Biotech AG
SHDGFP-r	Klonierung	MWG-Biotech AG
SHDMAL-f	Klonierung	MWG-Biotech AG
SHDMAL-r	Klonierung	MWG-Biotech AG
WAVE-CA-1	Klonierung	MWG-Biotech AG
WAVE-CA-2	Klonierung	MWG-Biotech AG

WaveP-f	Klonierung	MWG-Biotech AG
WaveP-r	Klonierung	MWG-Biotech AG

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide

Die Sequenzen der genannten Oligonukleotide sind im Anhang zu finden (siehe VIII.2. Zur Klonierung verwendete Oligonukleotide).

II.8. Plasmide

II.8.1. Kommerziell erworbene Plasmide

a) Bakterielle Expressionsplasmide

- pGEX-2T und pGEX-4T-2: Expressionsvektoren für GST-Fusionsproteine (Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg, Deutschland)
- pMAL-p2X: Expressionsvektor für MBP (*Maltose-binding protein*)-Fusionsproteine (New England Biolabs, Deutschland)

b) Eukaryontische Expressionsplasmide

- pEGFP-C1 und pEGFP-N1: Expressionsvektoren für GFP-Fusionsproteine (Clontech, vertrieben über BD Biosciences, Deutschland)

II.8.2. Konstrukte von Kooperationspartnern

a) Bakteriell Expressionsvektoren

- P47Phox-Konstrukte: pCINF-p47(FLAG-p47), pGEX-p47D (GST-p47(1-298)) von L. Terada, University of Texas Southwestern and The Dallas VA Medical Center, Dallas (USA)
- PAK-Konstrukte: PAK1 / PAK1K298A von M. Cobb, Department of Pharmacology, University of Texas Southwestern and The Dallas VA Medical Center, Dallas (USA)
- WAVE1-Konstrukte: WAVE1-PWA, -WA von L. Machesky, School of Biosciences, University of Birmingham, Birmingham (USA)
- NCK-Konstrukte: NCK all SH M, 3 SH3 M, SH2 M von L. Larose, McGill Centre for Research, Montreal, Quebec (Kanada)

b) Eukaryontische Expressionsvektoren

- WAVE1-GFP von J. V. Small, Institut für Molekularbiologie, Salzburg (Österreich)
- WAVE2-GFP von Clemens Rottner, GBF, Braunschweig (Deutschland)

II.9. Sequenzierungs-Primer

Name	Bindet	Entspricht den nt	Vektor
Gex-5	<i>upstream</i> der MCS	869-891	pGEX-2T und pGEX-4T-2
Gex-3	<i>downstream</i> der MCS	998-1020	pGEX-2T und pGEX-4T-2
MAL-f	<i>upstream</i> der MCS	2681-2702	pMAL-p2X
MAL-r	<i>downstream</i> der MCS	2851-2871	pMAL-p2X

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Sequenzierungs-Primer

Die Sequenzen der genannten Sequenzierungs-Primer sind im Anhang zu finden (siehe VIII.1.1.).

II.10. Transfektionsreagenzien

- Exgen 500 / MBI Fermentas, Germany
- Metafectene / Biontex, Germany
- *Nucleofector Solution 6857* / Amaxa GmbH, Germany

II.11. Modulierende und inhibierende Substanzen

Art der Modulation	Substanz	Beschreibung	Endkonzentration	Inkubation
Stimulation	fMLF	chemoattraktives Peptid	100 µg / ml (~ 2,3 µM)	5 min - 1 h
	LPS	bakterielles Lipopolysaccharid	100 µg / ml	5 min - 1 h
Manipulation des Zytoskeletts	Nocodazol	Mikrotubuli-depolymerisierendes Agens	300 ng / ml – 300 µg / ml	5 – 60 min
	Cytochalasin D	Induziert Aktindepolymerisierung	1 mg / ml (~ 2 mM)	5 – 60 min
Inhibition der MAP Kinase	PD98059	Inhibition der MAP Kinase	50 – 100 µm	1 – 3 h

Tab. 5: Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten modulierenden und inhibierenden Substanzen. Aufgeführt sind die jeweiligen Funktionen, benötigten Endkonzentrationen und Inkubationszeiten.

III. METHODEN

III.1. Arbeiten mit Nukleinsäuren

III.1.1. DNA-Präparation

III.1.1.1. Plasmidisolierung

Die Isolierung von Plasmiden aus Bakterien erfolgte entweder mit dem *QIA[®] Spin Miniprep Kit* von Qiagen oder dem *Nucleobond AX100 Midiprep Kit* von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers. Endotoxin-freie DNA für Transfektionen wurde mittels des *Endofree[®] Plasmid Maxi Kit* von Qiagen nach Anleitung des Herstellers präpariert.

III.1.1.2. Gelelution

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des *QIAquick[™] Gel-Extraction Kit* von Qiagen nach Anleitung des Herstellers aus Agarosegelen isoliert.

III.1.2. DNA-Restriktionsverdau

Ein DNA-Restriktionsverdau wird zum einen analytisch für die Größenkontrolle von Vektoren oder DNA-Fragmenten zum anderen präparativ z. B. als Vorbereitung für eine Ligation verwendet. Für den präparativen Verdau wird lediglich eine größere Menge DNA (ca. 10 µg) benötigt als für den analytischen (ca. 100-200 ng). Zur Ligation wird das gewünschte DNA-Fragment in einen bestimmten Vektor in die *Multiple Cloning Site (MCS)*, die bestimmte Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme aufweist, inkloniert. DNA-Fragment und Vektor müssen mit den gleichen Endonukleasen geschnitten werden, um für die Ligation passende Enden aufzuweisen.

Substanz	Menge
Vektor	10µg
10x Reaktionspuffer	5µl
Restriktionsenzyme	je 1µl
H ₂ O _{dd}	ad 50µl

Tab. 6: Reaktionsansatz für DNA-Restriktionsverdau

Je nach Enzym war die Zugabe von 0,5µl BSA erforderlich. Wurden zwei Restriktionsenzyme verwendet, gab es zwei Möglichkeiten. Waren für beide verwendeten Enzyme die gleichen Bedingungen angegeben, konnte der Verdau gleichzeitig erfolgen. Ansonsten wurde der Verdau sequentiell durchgeführt, wobei zwischendurch eine Umpufferung mit *QIAquick[™] PCR*

Purification Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers erfolgte. Der Ansatz wurde 90 min bei 37°C inkubiert, dann 10 min auf 65°C zum Abstoppen der Enzymaktivität erhitzt. Durch Fällung wurde die DNA aufgereinigt (siehe III.1.3.2.2. Klonierung mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide).

III.1.3. Ligation

III.1.3.1. Präparation von Vektoren und DNA-Fragmenten

Für die Ligation eines bestimmten DNA-Fragmentes in einen Zielvektor müssen beide die entsprechenden Schnittstellen aufweisen. Dies wird durch die Verwendung der gleichen Restriktionsenzyme gewährleistet. Die Schnittstellen können dabei als *sticky ends*, d.h. sich überlappende Enden, oder als *blunt ends*, sogenannte stumpfe Enden, gewählt werden.

III.1.3.2. Allgemeiner PCR-Ansatz

Für die PCR werden in der Regel ein DNA-Strang als Matrize, eine DNA-Polymerase zum Ablesen der Matrize, ein Mix aller vier Nukleotide sowie ein für die Polymerase optimaler Puffer benötigt. Ein Standard-PCR-Lauf erfolgte wie nachfolgend beschrieben. Die Reaktion wurde mit dem Deep Vent PCR-Kit von New England Biolabs durchgeführt.

Substanz	Menge
10x Puffer	5 µl
Nukleotid-Mix	1 µl
<i>Forward-Primer</i>	0,5 µl
<i>Reverse Primer</i>	0,5 µl
DNA	100 ng
Taq-Polymerase	1 µl
H ₂ O _{ad}	ad 50 µl

Tab. 7: Reaktionsansatz für PCR

Die DNA wurde in drei Schritten amplifiziert, wobei in Abhängigkeit von *Primer*-Paar und Länge der zu amplifizierenden DNA die *Annealing*-Temperaturen zwischen 50°C und 55°C und die *Elongation*-Zeit zwischen 30 sec und 2 min variieren konnte.

Schritt	Temperatur	Dauer
<i>denaturation</i> (Strangtrennung)	95°C	1min
<i>annealing</i> (<i>Primer</i> -Anlagerung)	50-55°C	30sec - 2min
<i>elongation</i> (DNA-Synthese)	74°C	30sec - 2min

Tab. 8: Übersicht über die verschiedenen PCR-Schritte

III.1.3.2.1. Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das *QIAquick™ PCR-Purification Kit* oder das *QIAquick™ Gel-Extraction Kit* von Qiagen verwendet.

III.1.3.2.2. Klonierung mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide

a) Annealing-Reaktion

Je 500 pmol der synthetisierten Oligonukleotide (*forward* und *revers*) wurden in 50 µl H₂O_{dd} gegeben und für 5 min auf 95°C erhitzt. In einem 60°C warmen Wasserbad wurde der Ansatz anschließend auf 30°C langsam abgekühlt. Hierbei erfolgte die Anlagerung (*Annealing*) der Einzelstränge. Die Reaktion ergab 10 pmol/µl hybridisiertes, doppelsträngiges Produkt. Davon wurden 10 µl für die folgende Phosphorylierung (siehe III.1.3.2.4.b) eingesetzt.

b) Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Die T4-DNA-Ligase benötigt zur Ligation DNA-Stränge, die am 5'-Ende eine Phosphatgruppe tragen. Da bei synthetisch erzeugten DNA-Strängen die Phosphatgruppen nicht vorhanden sind, muss der Ligation eine Phosphorylierungsreaktion vorausgehen, für die T4-Polynukleotidkinase (PNK) verwendet wurde.

Substanz	Menge
H ₂ O _{dd}	23,5 µl
10x Kinase-Puffer	4,0 µl
<i>Annealing</i> -Produkt (100pmol)	10 µl
ATP, neutralisiert (100 mM Stock)	0,5 µl
PNK (10 U/µl)	2 µl
Gesamtvolumen	40 µl

Tab. 9: Reaktionsansatz für Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die DNA durch Fällung aufgereinigt.

c) DNA-Fällung

Zur Beseitigung von Salzen und Enzymen wurde die DNA vor der Weiterverarbeitung mittels EtOH-Fällung aufgereinigt. Hierfür wurde der Reaktionsansatz mit H₂O_{dd} auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und 10 µl 5 M NaCl und 250 µl abs. EtOH zugegeben. Die Mischung wurde für 10 min bei -80°C inkubiert, dann bei 13000 rpm (Biofuge *fresco*) bei 4°C für 20 min

zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 70 % Ethanol gewaschen, anschließend luftgetrocknet und in 50 µl H₂O_{dd} aufgenommen.

III.1.3.3. Ligation mit T4-Ligase

Für eine Ligation wurden 50 bzw. 500 ng des präparierten DNA-Fragmentes und 50 ng geschnittener Vektor verwendet. Die Ansätze wurden bei 16°C über Nacht im Wasserbad inkubiert. 2-5 µl der aufgereinigten Ligation wurden in elektrokompente *E. coli* mittels Elektroporation transformiert, auf selektive LB-Agarplatten ausgestrichen und positive Klone mittels Bakterien-PCR identifiziert.

a) Reaktionsansatz

Substanz	Menge
Vektor	50 ng
<i>Insert</i>	50 (500) ng
5 x Ligasepuffer	2 µl
T4-Ligase	1 µl
H ₂ O _{dd}	ad 20 µl

Tab. 10: Reaktionsansatz für Ligation mit T4-Ligase

b) Reinigung des Ligationsansatzes

Für die Transformation in elektrokompente Bakterien wurde die Ionenstärke des Ligationsansatzes durch Umpuffern reduziert. Dafür wurde der oben angeführte Reaktionsansatz mit H₂O_{dd} auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt, 1/10 Vol. 5 M NaCl und 2,5 Vol. abs. EtOH zugegeben und wie unter Punkt III.1.3.2.4.c) beschrieben zentrifugiert.

III.1.3.4. Ligation mit Alligator Kit

a) Ligationsansatz

Zum Teil wurde die Ligation mit dem *Alligator*TM *Ligation Kit* von *Genaxxon bioscience* nach Anleitung des Herstellers verwendet. Diese Methode brachte eine meist höhere Effizienz und Zeitersparnis.

b) Herstellung Kalzium-kompetenter Zellen

Von einer ÜNK wurde 1 ml von *E.coli* BL 21 DR3 auf 100 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 schüttelnd inkubiert. Danach wurden die Bakterien 10 min bei 6000 rpm (Centricon H-401) und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Bakterienpellet wurde in 50 ml 100 mM MgCl₂ resuspendiert und für weitere 10 min bei 4°C und 6000 rpm zentrifugiert. Die Zellen

wurden in 50 ml 50 mM CaCl₂ resuspendiert und erneut für 10 min bei 4°C und 6000 rpm abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 5 ml 50 mM CaCl₂ aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl 10 % Glycerol resuspendiert, zu 50 µl in 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C eingelagert.

III.1.4. Transformation in elektrokompetente Zellen

III.1.4.1. Herstellung elektrokompetenter *E.coli* DH5α

Von einer ÜNK wurde 1 ml von *E.coli* DH5α auf 1 l LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 schüttelnd inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch zehninütiges Zentrifugieren bei 6000 rpm (Centricon H-401). Das Pellet wurde in 1 l kaltem H₂O_{dd} aufgenommen und erneut für 10 min zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 0,5 l kaltem H₂O_{dd} gelöst, die Zentrifugation wiederholt, das verbleibende Pellet in ca. 20 ml 10 % Glycerol resuspendiert und wie beschrieben zentrifugiert. Die kompetenten Zellen wurden in 2 ml 10 % Glycerol aufgenommen, auf Aliquots zu 50 µl in 1,5 ml Eppendorfgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

III.1.4.2. Transformation mittels Elektroporation

Die Elektroporationsküvetten wurden bei -20°C vorgekühlt, die elektrokompetenten Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. 2-5 µl der zu transformierenden DNA wurden mit den aufgetauten Bakterien gemischt, die Suspension anschließend in die gekühlten Küvetten pipettiert und bei 200 Ω, 25 µF und 2,5 kV transformiert. Die Zellen wurden in 1 ml kaltem LB-Medium mit 1 % Glucose aufgenommen und 30 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Unterschiedliche Mengen der Bakteriensuspension wurden auf Selektivagar ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

III.1.5. Bakterien-PCR (Kolonie-PCR)

Durch diese Methode ist es möglich, positive Klone direkt mittels PCR zu identifizieren, ohne die Plasmid-DNA isolieren zu müssen. Pro Platte wurden ca. 10 Klone mit steriler Spitze gepickt und in 15 µl H₂O_{dd} resuspendiert. 5 µl dieser Suspension wurden in 5 ml flüssigem LB-Medium mit selektivem Antibiotikum bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die restlichen 10 µl wurden zum Aufschluss der Bakterien für 5 min bei 95°C gekocht, wodurch die Plasmid-DNA freigesetzt wurde. Danach wurde die PCR nach Zugabe von Puffer, Nukleotid-Mix, Primer und *Taq*-Polymerase gestartet. Die für die Bakterien-PCR eingesetzten *Primer* mussten je nach Konstrukt

individuell gewählt werden. Die *Annealing*-Temperaturen lagen je nach *Primer*-Paar zwischen 55°C und 63°C. Die Bakterien-PCR wurde mit dem *Taq-PCR Core Kit* von Qiagen durchgeführt. Die Kontrolle erfolgte mittels Gelelektrophorese. War ein Klon positiv, wurde von der 5 ml Kultur eine 100 ml ÜNK angelegt, das Plasmid isoliert und sequenziert.

Substanz	Menge
H ₂ O _{dd}	37,5 µl
10 x Puffer	5,0 µl
Nukleotid-Mix	1,0 µl
<i>Forward-Primer</i>	0,5 µl
<i>Reverse Primer</i>	0,5 µl
DNA	5,0 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl
Gesamtvolumen	50,0 µl

Tab. 11: Allgemeiner Ansatz für die Bakterien-PCR

III.2. Arbeiten mit Proteinen

III.2.1. Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie

III.2.1.1. GST-Fusionsproteine

Für die Expression eines Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteins wurde ein 37°C ÜNK mit dem zu exprimierenden Plasmid in 100 ml LB-Medium mit selektivem Antibiotikum angeimpft. 1 ml dieser ÜNK wurde zu 1 l LB-Medium mit selektivem Antibiotikum gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 bei 37°C schüttelnd inkubiert. Daraufhin wurde die Proteinexpression mit IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert und für 2,5 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Bakterien wurden durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 6000 rpm (Centricon H-401) geerntet. Die Pellets wurden in kaltem PBS gelöst, in einem 50 ml Falcontube vereinigt, die Suspension mit kaltem PBS auf 50 ml aufgefüllt und für weitere 20 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert (MR-1812). Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment in 10-20 ml Lysepuffer resuspendiert.

Die Bakteriensuspension wurde insgesamt sechsmal mit für je 10 sec bei 65 W sonifiziert. Die Zellreste wurden in der UZ (Beckman-Optima™) für 30 min bei 35000 rpm abzentrifugiert. Währenddessen wurden 1-2 ml GST-Sepharose-*beads* 3 min bei 4°C in Lysepuffer äquilibriert und danach bei 1000 rpm für 2 min bei 4°C zentrifugiert (MR-1812). Zu den so vorbereiteten *beads* wurde der Überstand aus der Ultrazentrifugation auf die *beads* gegeben und 1 h bei 4°C

inkubiert. Anschließend wurden die *beads* fünfmal mit Lysepuffer ohne DTT und einmal mit Resuspensionspuffer gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert und das Protein von den *beads* eluiert.

Die Elution war auf zwei unterschiedliche Arten möglich: entweder mit Gluthation oder Thrombin. Letzteres führte zur Abspaltung des GST-Anteils, bei ersterem blieb das Fusionsprotein erhalten.

a) Elution mit Glutathion

Zur Elution des Fusionsproteins wurden die *beads* sechs- bis achtmal mit je 1 ml Resuspensionspuffer plus 10 mM Glutathion behandelt. Die *beads* wurden bei jedem Schritt vier- bis sechsmal mit der Puffer / Glutathion-Lösung gevortext und anschließend 5 min bei 5000 rpm abzenrifugiert. Die Überstände aus den Elutions- / Zentrifugationsschritten wurden vereinigt und gegen Dialysepuffer dialysiert.

Die Dialyse war notwendig, da die Proteine für Mikroinjektion verwendet werden sollten und dafür der für die Injektion erforderliche Puffer benötigt wurde. Nach der Dialyse wurde die Proteinmenge wie unter Punkt III.2.2. Proteinbestimmung beschrieben bestimmt.

b) Thrombinspaltung

Um das *protein of interest* vom GST-Anteil des Fusionsproteins, das noch an der Säule hängt, abzuspalten, wurden pro ml GST-*beads* nach dem letzten Waschschrift (s.o.) 2 U Thrombin gegeben und entweder über Nacht bei 4°C oder für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die *beads* bei 5000 rpm für 5 min abzentrifugiert (MR-1812) und der Überstand erneut dreimal mit 2 ml Resuspensionspuffer gewaschen. Zur Entfernung des Thrombins wurden zu dem gewaschenen Überstand 100 µl p-Aminobenzamidin-*beads* pipettiert und für 1h bei 4°C schüttelnd inkubiert. Danach erfolgte eine Pelletierung (MR 1812) der p-Aminobenzamidin-*beads* (mit dem anhaftenden Thrombin). Das im Überstand befindliche Protein wurde gegen Dialysepuffer dialysiert (siehe Punkt III.2.1.1.a). Nach der Dialyse wurde die Proteinmenge wie unter Punkt III.2.2. beschrieben bestimmt.

Puffer	Substanz
Lysepuffer	50 mM Tris pH 7,5 50 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 1 mM DTT Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin 1 µg/ml

	Aprotinin 475 µg/ml Pefabloc 1 µg/ml
Resuspensionspuffer	50 mM Tris pH 8 150 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 2,5 mM NaCl ₂ 1 mM DTT
Dialysepuffer	10 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 0,1 mM DTT

Tab. 12: Übersicht über die Zusammensetzungen verschiedener Puffer für GST-Fusionsproteine

III.2.2. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit BIO-RAD Protein Assay, das auf der Bradford-Methode beruht, durchgeführt (Bradford, 1976). Als Proteinstandard für den Protein-*Microassay* (1-20 µg Protein; ≤ 25 µg/ml) wurde BSA in den Konzentrationen 20 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml und 1 µg/ml verwendet. Die Proteinbestimmung wurde für alle Proben folgendermaßen durchgeführt:

Zu 800 µl Probe (Proteinstandard in der oben angegebenen Konzentration bzw. verdünnte Proteinlösung) wurden 200 µl *Dye Reagent Concentrate* gegeben. Als „Nullwert“ wurden 800 µl Puffer als Probe eingesetzt. Die so entstandenen Lösungen wurden durch kurzes Vortexen gemischt. Nach 5 min bis 1 h Inkubationszeit wurde die Absorption aller Proben bei 595 nm bestimmt. Die Standardwerte der BSA-Proben wurden gegen die eingesetzte Proteinmenge aufgetragen und dienten als Eichkurve. Aus der Eichkurve wurden dann die Konzentrationen der Proben abgelesen.

III.2.3. Western Blot

III.2.3.1. Puffer und Lösungen

III.2.3.1.1. Proben-Puffer (SDS-Probenpuffer)

Substanz	Menge
0,5 M Tris / HCl pH 6,8	5 ml
Glycerol	2 ml
SDS	0,8 g
0,5 % Bromphenolblau	1 ml
H ₂ O _{dd}	2 ml

Tab. 13: 5x Probenpuffer nach Lämmli

Nach Sterilfiltration der gelösten Bestandteile wurde diese 1:5 auf das Endvolumen zusammen mit 5 % -Mercaptoethanol (Endkonzentration) verdünnt.

III.2.3.1.2. Puffer für SDS-PAGE

Puffer	Substanz
<i>Blotting</i> -Puffer	25 mM Tris 96 mM Glycin
<i>Running</i> -Puffer	25 mM Tris 0,1 % SDS 192 mM Glycin
Trenngelpuffer	1,5 M Tris 1 g SDS ad 250 ml H ₂ O _{dd} , pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris 1 g SDS ad 250 ml H ₂ O _{dd} , pH 6,8
TBS	20 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl
TBST	TBS mit 0,3 % Tween

Tab. 14: Übersicht über die Zusammensetzung von Puffern für SDS-PAGE

III.2.3.2. Herstellung von SDS-Gelen

	Substanz	Trenngel		
		10,0 %	12,5 %	
MINIGEL	H ₂ O _{dd}	2,09 ml	1,60 ml	
	Trenngelpuffer	1,25 ml	1,25 ml	
	Acrylamid	1,67 ml	2,08 ml	
	APS (100 ng/ml)	25 µl	25 µl	
	TEMED	2,5 µl	2,5 µl	
	Sammelgel			
	H ₂ O _{dd}	1,55 ml		
	Sammelgelpuffer	625 µl		
	Acrylamid	325 µl		
	APS (100 ng/ml)	12,5 µl		
TEMED	2,5 µl			
GROSSES GEL	Trenngel			
	Substanz	10,0 %	12,5 %	
	H ₂ O _{dd}	20,25 ml	13,45 ml	
	Trenngelpuffer	12,5 ml	10 ml	
	Acrylamid	16,5 ml	16 ml	
	APS (100 ng/ml)	250 µl	200 µl	
	TEMED	25 µl	20 µl	
	Sammelgel			

	H ₂ O _{dd}	9,40 ml
	Sammelgelpuffer	3,75 ml
	Acrylamid	1,95 ml
	APS (100 ng/ml)	75 µl
	TEMED	15 µl

Tab. 15: Übersicht über die Zusammensetzung von SDS-Gelen

III.2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen aufgrund des Reibungskoeffizienten und damit letztlich nach ihrer Größe. Alle folgenden Angaben beziehen sich auf ein Minigel, die Werte für ein großes Gel stehen in Klammern. Die in SDS-Probenpuffer vorliegenden Zellysate wurden 5 min bei 99°C schüttelnd inkubiert. Davon wurden 30µl (60µl) pro Spur auf ein kleines Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurde zusätzlich eine Spur mit Proteinmarker geladen. Hierfür diente der *low range prestained* Proteinmarker (Biorad), von dem 5 µl (15µl) pro Spur aufgetragen wurde. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 100 V (45 mA). Das Sammelgel wurde entfernt und das Trenngel zum *Blotten* in *Blotting*-Puffer äquilibriert.

III.2.3.4. Western Blot

III.2.3.4.1. Vorbereitung der PVDF-Membran und *Blotting*

Die für das *Blotten* benötigte PVDF-Membran und das Whatman-Papier wurden entsprechend der Gelgröße zugeschnitten. Um die Membran zu äquilibrieren, wurde diese kurz in 100 % Methanol getaucht, für 10 min bei RT in *Blotting*-Puffer mit 20 % Methanol inkubiert und bis zum Gebrauch in *Blotting*-Puffer feucht gehalten. Der Protein-Transfer erfolgte für 1h bei 4°C bei konstant 80 V für ein kleines Gel und für 3 h unter Kühlung mit konstant 100 V für ein großes Gel.

III.2.3.4.2. Detektion

Die PVDF-Membran wurde nach dem Proteintransfer in TBST mit 5 % Milchpulver und 2 % BSA für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 5 min in TBST gewaschen und für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit einem gegen das Zielprotein gerichteten primären Antikörper inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden danach durch dreimaliges Waschen der Membran für je 5 min in TBST entfernt. Um den primären Antikörper zu detektieren wurde

die Membran mit einem gegen den ersten Antikörper gerichteten sekundären HRP-gekoppelten Antikörper 45 min behandelt. Nach erneutem Waschen erfolgte eine Weiterbehandlung der Membran für 15 min bei RT mit *Super Signal[®] West Pico Luminol Enhancer* und *Super Signal[®]*. Anschließend wurde diese in Folie eingelegt, zur Markierung mit Streifen von *GLOCOSTM II Autorad Markers* versehen, auf einen Kodak-Film für unterschiedliche Zeiten (entsprechend der Stärke des Signals) aufgelegt, entwickelt und fixiert.

III.3. Arbeiten mit Zellen

III.3.1. Zellkultur

Primäre humane Makrophagen sind aufgrund äußerst geringer Transfektionseffizienzen (< 0,1 %) und großer Mortalität für Transfektionen mittels Metafectene schwer zugänglich, weshalb im Laufe dieser Dissertation auf Transfektion mittels Amaxa[®] umgestellt wurde (siehe Punkt III.3.4.2. Transfektion primärer humaner Makrophagen).

Deshalb wurde zunächst nach einem für Makrophagen äquivalenten System gesucht. Die Anforderungen, denen die Zelllinie entsprechen musste, waren Ausbildung von WAVE-Vesikeln nach Stimulationen, die Kolokalisation der verschiedenen WAVE-Isoformen mit gelabelten Dextranen (unabhängig vom Fluorophor) und möglichst hohe Transfektionseffizienz. Die Zelllinie, die diese Anforderungen an Makropinozytose erfüllte war die Maus-Makrophagen-Linie J774. Diese Zellen waren adhärent, wurden wie primäre humane Makrophagen bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert und alle 3-5 Tage gesplittet.

Substanz
RPMI 1640
10 % FCS
2 mM L-Glutamin
100 µg/ml Gentamycin

Tab. 16: Zusammensetzung des Kulturmediums für die Zellkultur

III.3.2. Isolation primärer humaner Makrophagen aus menschlichem Blut

Primäre humane Monozyten/Makrophagen wurden wöchentlich frisch aus humanem Blut isoliert. Die Blutabnahme wurde mit 50 ml-Spritzen vorgenommen, in denen zuvor pro Spritze 500 µl Heparin vorgelegt wurde. Zur Isolation wurde zunächst ein Falcon-Röhrchen mit 15 ml Ficoll-Lösung vorbereitet, das vorsichtig mit 12,5 ml Blut überschichtet wurde. Anschließend wurde die überschichtete Lösung zur Ausbildung des Ficollgradienten bei 460 g und RT für 30 min

zentrifugiert. Die mononukleären Zellen wurden abpipettiert, je zwei *Samples* vereinigt und auf 50 ml mit kaltem RPMI aufgefüllt. Danach wurde 10 min bei 460 g und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden in kaltem RPMI gewaschen, und erneut wurden zwei *Samples* vereinigt, mit kaltem RPMI auf 50 ml aufgefüllt und wie beschrieben zentrifugiert. Der Waschschrift wurde wiederholt, jedoch ab hier mit RPMI* (RPMI mit 100 µg/µl Penicillin / Streptavidin). Die Pellets wurden in je 1 ml kaltem RPMI* aufgenommen, die Zellsuspension in Eppendorf-Gefäße transferiert und 2 min bei 4°C und 400 g zentrifugiert. Die Pellets wurden in je 400 µl Monopuffer (PBS + 5mM EDTA pH 7,4 + 0,5 % humanes Serumalbumin) resuspendiert, 100 µl anti-CD14-Antikörper-*Beads* zugegeben, vorsichtig, unter Vermeidung von Luftblasenbildung, gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Zwischenzeitlich wurden die Säulen mit 500 µl kaltem Monopuffer äquilibriert und ein 50 ml Falcon-Röhrchen mit 15-20 ml kaltem RPMI* vorbereitet. Die im Schritt zuvor entstandene Suspension wurde nach der Inkubation auf die Säule gegeben, diese nach dem Durchlauf mit 500 µl Monopuffer gewaschen, die Monozyten anschließend mit 1 ml Monopuffer schnell in das vorbereitete Falcon-Röhrchen eluiert und 10 min bei 460 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, die Pellets in 0,5-2 ml RPMI* (je nach Zelldichte) aufgenommen und in einer Neuenbauer Zählkammer gezählt. Daraufhin wurden die Zellen auf *Coverslips* ausgesät (auf *Cellocate Coverslips* mit einer Dichte von 5×10^4 / *Coverslip*; auf eckige [13,8 x 13,8 mm] die doppelte Menge). Nach 1,5-2 h wurde 1,5 ml Kulturmedium (RPMI* + 20 % autologes Serum) hinzugefügt und die Zellen bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt.

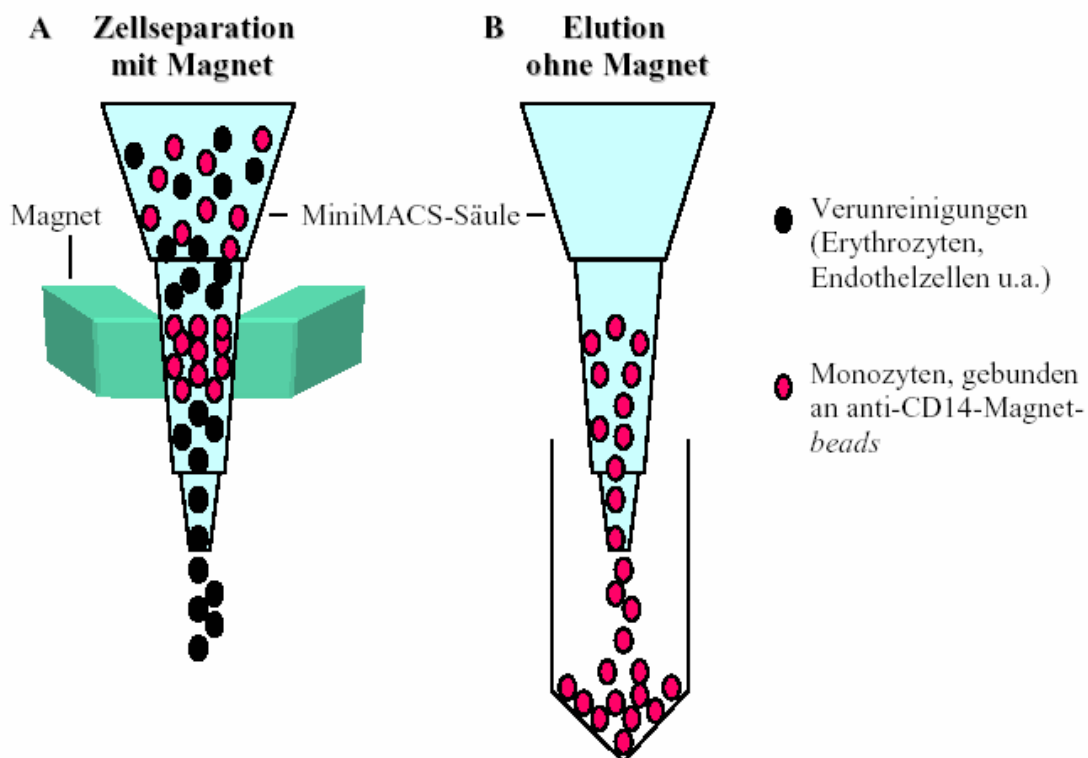


Abb. 7: Abtrennung der Monozyten durch CD14-Magnetbeads (Schell und Linder, 2001)

Monozyten binden an diese *beads* über das CD14-Molekül auf ihrer Oberfläche, während alle anderen mononukleären Zellen sowie Verunreinigungen durchfließen (A). Nach Entfernung des Magneten werden die an die *beads* gebundenen Monozyten eluiert (B).

III.3.3. Mikroinjektion

III.3.3.1. Vorbereitung der Injektionslösung

Zur Herstellung der Injektionslösung wurde die zu injizierende Proteinlösung mit Mikroinjektionspuffer verdünnt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Lösung nicht zu viskos wurde, d.h. die Maximalkonzentration von 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ nicht überschritten wurde. In der Regel genügte eine Proteinkonzentration von 0,2-0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Zusammen mit der Proteinlösung wurde eine Markersubstanz koinjiziert, um das Detektieren der injizierten Zellen zu ermöglichen. Dabei handelte es sich z.B. um Ratten-IgG (Endkonzentration 200 ng/ml) oder FITC-Dextran (Endkonzentration 1 mg/ml). Anschließend wurde die Injektionslösung bei 4°C, 13000 rpm (Biofuge *fresco*) 30 min lang zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt diente zur Entfernung von Aggregaten, um dadurch ein Verstopfen der Injektionskanüle zu verhindern. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert.

Substanz	Menge
MgCl ₂	5 mM
NaCl	150 mM
Tris pH 7,4	50 mM

Tab. 17: Zusammensetzung des Mikroinjektionspuffer

III.3.3.2. Mikroinjektion

Zur Mikroinjektion wurde eine Mikroinjektionsanlage verwendet, die aus einem Mikroskop mit angebautem Mikroinjektionsarm und einem Transjektor zur Druckerzeugung besteht. Die Mikroinjektion *per se* wurde Computer-unterstützt gesteuert und kann an einem Monitor verfolgt werden.

Zur Injektion wurden 3 µl Injektionslösung in ein sogenanntes Femtotip (eine spezielle Injektionskanüle, Eppendorf) gefüllt und ins Gewinde des Mikroinjektionsarms eingeschraubt. Die Injektion selbst erfolgt durch einen Druckimpuls, der ausgehend vom Transjektor über einen Schlauch an die Kanüle gelangt. Dabei muss ein bestimmter Kompensationsdruck gewährleistet sein, um den durch die Kapillarkräfte hervorgerufenen Einstrom von Flüssigkeit aus dem Medium in die Kanüle zu verhindern. Dieser Druck wird so gewählt, dass aus der Kapillare ein permanenter leichter Ausfluss gewährleistet ist. Der eigentliche Injektionsdruck ist nicht nur größer als der Haltedruck, sondern auch höher als der Innendruck der zu injizierenden Zelle.

Die Kulturschale mit ca. 2-4 ml Kulturmedium wurde im Heizring des Mikroskops eingesetzt, der *Coverslip* mit den Zellen im Strahlengang positioniert und leicht angedrückt. Dabei sorgt der Heizring dafür, dass die Zellen konstant bei 37°C gehalten werden. Dies war besonders für Makrophagen wichtig, da sich diese Zellen bei tieferen Temperaturen verkrampfen und vom Untergrund ablösen.

Zum Injizieren in die Zellen wurde nun die Spitze der Injektionskanüle am Bildschirm auf die Zellebene eingestellt, die Zellen mit der Maus angesteuert und ca. 30-80 Zellen injiziert.

Danach wurden die *Coverslips* mit den injizierten Zellen in Kulturmedium 10 min bis 2 h bei 37°C nachinkubiert. Dies geschah einerseits, um mögliche Schockeffekte, die durch zu heftiges Injizieren hervorgerufen werden können, zu umgehen, andererseits, um möglichen Effekten Zeit zu geben, sich zu manifestieren.

Die Zellen wurden anschließend fixiert und fluoreszenzgefärbt, injizierte Zellen wurden mit Hilfe des koinjizierten Markers detektiert.

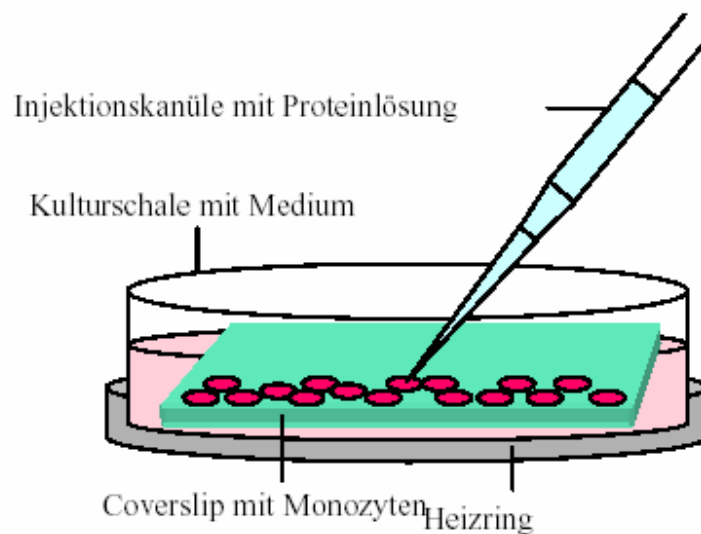


Abb.8: Mikroinjektion einer Protein-Lösung in primäre humane bzw. murine J774-Makrophagen (Schell und Linder, 2001)

III.3.4. Transfektion von Zell-Linien

III.3.4.1. Transfektion muriner J774-Makrophagen

Zur Vorbereitung der Transfektion wurden Zellen auf *Coverslips* mit einer Dichte von $0,8 \times 10^5$ Zellen pro *Coverslip* in 12-*well* Platten oder 2×10^5 Zellen pro *well* in 6-*well*-Platten ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde das Kulturmedium gegen RPMI-Medium ohne Antibiotika und Serum ausgetauscht. Die Transfektionslösung wurde zunächst in zwei getrennten Ansätzen pipettiert. Die Angaben beziehen sich auf die 12-*well* Platten, die in Klammern auf das 6-*well* Format. Im ersten Ansatz wurde je $1 \mu\text{g}$ ($2 \mu\text{g}$) DNA mit $50 \mu\text{l}$ ($100 \mu\text{l}$) RPMI-Medium vermischt, in einem zweiten Ansatz je $3 \mu\text{l}$ ($6 \mu\text{l}$) Metafectene in $50 \mu\text{l}$ ($100 \mu\text{l}$) RPMI-Medium gegeben. Anschließend wurden beide Lösungen vereinigt und für 10 min bei RT inkubiert, um die DNA-Lipid-Komplexbildung zu ermöglichen. Dieser Ansatz wurde direkt auf die Zellen pipettiert und die Platte 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionslösung entfernt und durch 1 ml Kulturmedium ersetzt. Nach 24-72 h wurde die Expression der transfizierten DNA kontrolliert.

III.3.4.2. Transfektion primärer humaner Makrophagen

Die Transfektion von primären humanen Makrophagen erfolgte mit einem *Nucleofector*TM-Kit von *Amaxa biosystems*, da durch herkömmliche Transfektion der mittels Metafectene nur sehr geringe Transfektionseffizienz erzielt wird (siehe Punkt III.3.1. Zellkultur).

Die Technik besteht aus einer Kombination von Elektroporation und Lipofektion. Je nach verwendetem Zelltyp werden für diese Zellen optimierte Elektroporationsprogramme und –lösungen verwendet. Da für Monozyten bzw. Makrophagen zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung noch keine zelloptimierte Lösung zur Verfügung stand, wurden die Versuche mit dem Optimierungs-Kit 6857 und dem Programm U-16 durchgeführt, welches in den Makrophagen Transfektions-Raten bis 50 % (GFP-Leervektor) ermöglichte.

Für optimale Ergebnisse wurden sechs bis acht Tage alte Zellen benötigt, die mit einer Dichte von 1 Million pro well in 6-well Platten ausgesät waren. Zur Vorbereitung auf die Transfektion wurden 500 µl RPMI-Medium plus 20 % Serum pro Ansatz in einem Eppendorfggefäß auf 37°C erwärmt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend zum Ablösen mit 400 µl Trypsin / EDTA bei 37°C ca. 5 min inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde die Trypsinaktivität durch Zugabe von 1,2 ml warmen RPMI-Medium plus 20 % Serum abgestoppt. Die Zellen wurden vorsichtig abgespült und in 15 ml Falcongefäße transferiert. Diese wurden 5 min bei 1500 rpm (*Biofuge fresco*) zentrifugiert. Das Medium wurde vollständig abgenommen und das Pellet in 100 µl Nucleofector-Lösung 6857 gelöst.

Für jeden Ansatz wurden 1-5 µg DNA zu den Zellen gegeben, gemischt und in die Transfektionsküvette überführt. Nach der Transfektion wurden die Zellen im vorgewärmten RPMI-Medium mit 20 % Serum resuspendiert und anschließend wurden je 80 µl auf *Coverslips* ausgesät (ergibt ca. 80 000 Zellen / *Coverslip*).

III.4. Mikroskopische Methoden

III.4.1. Indirekte Immunfluoreszenz

III.4.1.1. Fixierung und Lyse von Zellen

III.4.1.1.1. Formaldehyd/Aceton

Die Fixierung der auf *Coverslips* ausgesäten Zellen erfolgte mit 3,7 % Formaldehyd in PBS für 5-10 min bei RT. Permeabilisiert wurden die Zellen in eiskaltem Aceton bei -20°C für 5 min. Um

das restliche Aceton von den *Coverslips* zu entfernen wurden diese in PBS + 0,5 % BSA gewaschen.

III.4.1.1.2. Formaldehyd/Triton

Die Fixierung der auf *Coverslips* ausgesäten Zellen erfolgte mit 3,7 % Formaldehyd plus 0,18 % Triton X-100 in PBS für 10 min bei RT. Dadurch wurden die Zellen gleichzeitig permeabilisiert. Je nach verwendetem Antikörper war es für eine Signalverstärkung vorteilhaft, die Zellen zusätzlich mit Aceton zu permeabilisieren.

III.4.1.1.3. Methanol

Die Fixierung der auf *Coverslips* ausgesäten Zellen erfolgte in eiskaltem Methanol bei -20°C für 30-60 sec. Dadurch wurden die Zellen gleichzeitig permeabilisiert. Zur Entfernung des restlichen Methanols wurden die Zellen sofort in PBS mit 0,5 % BSA gewaschen.

III.4.1.1.4. PHEM

Die Zellen wurden in PHEM-Lyse-Puffer 1 min bei RT permeabilisiert, anschließend 1 min in PHEM-Puffer gewaschen und 10 min in PHEM-Puffer + 1 % Glutaraldehyd fixiert. Vor der Färbung erfolgte eine Absättigung von Aldehydgruppen, speziell des Glutaraldehyds, mit Natrium-Borhydrid. Die Zellen wurden zuletzt mehrmals in PBS / BSA gewaschen.

PBS 10x konzentriert	PHEM-Puffer 50 %	PHEM-Lysepuffer
1l H ₂ O _{dd} pH 7,3	H ₂ O	PHEM-Puffer 50 %
2g KCl	25mM HEPES pH 6,1	1mM Vanadat
2g KH ₂ PO ₄	20mM PIPES pH 6,1	5 % Hexylenglykol
80g NaCl	4mM EGTA	1 % Brij 58
14g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1mM MgCl ₂	

Tab. 18: Übersicht über Zusammensetzung der Puffer für Fixierung und Lyse mittels PHEM

III.4.1.2. Färbung mittels spezifischer Antikörper

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung erfolgte in einer feuchten Kammer, um einer Verdunstung der Lösungen vorzubeugen. Hierfür wurde in der Kammer Parafilm auf ein feuchtes Tuch gelegt und die Färbelösung auf Parafilm pipettiert. Die *Coverslips* wurden stets mit der Zellseite auf die vorpipettierte Lösung gelegt. Die Färbung erfolgte in drei durch Waschschriffe voneinander getrennten Schritten. Als erstes wurden unspezifische Bindungen mittels PBS plus 0,5 % BSA, 5 % NGS, 5 % NHS abgesättigt. Nach einem Waschschriff in PBS + 0,5 % BSA

wurden die Zellen mit dem ersten Antikörper für 45 min bei RT inkubiert. Sollten mehrere Zielproteine durch Färbung detektiert werden, mussten dafür die Zellen sukzessive mit den primären Antikörpern inkubiert werden, um Akkumulationen zu verhindern. Zur Entfernung nicht-gebundener primärer Antikörpermoleküle wurden die *Coverslips* dreimal mit PBS + 0,5 % BSA gewaschen und anschließend für 30 min mit dem (den) sekundären Antikörper(n) bei RT gefärbt. Es folgten zwei Waschstschritte in PBS + 0,5 % BSA und einer in PBS, bevor die *Coverslips* auf einem Objektträger in Mowiol eingebettet wurden.

Mowiol (enthält *p*-Phenylendiamin als Antibleichmittel) wurde bei 37°C vorgewärmt und auf einen Objektträger pipettiert. Für runde *Coverslips* wurden 3 µl Mowiol pro *Coverslip*, für eckige 4 µl benötigt. Die *Coverslips* wurden auch hier mit der Zellseite nach unten auf den Mowioltropfen gelegt und mit Nagellack versiegelt.

III.4.2. Fluoreszenzmikroskopie

Mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Leica) verbunden mit einer digitalen *Spot*-Kamera (Leica) oder mittels eines konfokalen *laser scanning* Mikroskops (Leica DM IRB) erfolgte die Analyse Fluoreszenz-markierter Präparate. Die Bildbearbeitung wurde mit der Software „Corel Draw[®]“ (Corel[®]), „Imaging“ (Microsoft[®]) und „Photoshop[®]“ (Adobe[®]) durchgeführt.

IV. ERGEBNISSE

IV.1. Vorbemerkung

Makrophagen spielen innerhalb des zellulären unspezifischen Abwehrsystems eine wesentliche Rolle. Für die Ausübung ihrer Funktion sind dynamische Änderungen des Zytoskeletts sowie Aufnahmeprozesse wie Endo-, Phago- und Pinozytose von entscheidender Bedeutung. Diese Prozesse werden u. a. von Rho-GTPasen und ihren Effektorproteinen reguliert. Zu diesen Effektorproteinen gehören die Proteine der WASp-Familie, die aus WASp, N-WASP und den drei WAVE-Isoformen besteht. Ihre Bedeutung bezüglich der Aktin-Regulation ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

In unserer Arbeitsgruppe konnten mittels eines pan-WAVE-Antikörpers die Akkumulation von WAVE an vesikulären Strukturen gezeigt werden (B. Schell und S. Linder, unveröffentlicht). Über eine Beteiligung von WAVE an der Regulation von Vesikeln ist bisher nichts bekannt. Deshalb beschäftigt sich diese Arbeit mit der Rolle und Funktion von WAVE im Rahmen der Vesikelregulation in Makrophagen.

IV.2. Akkumulation von WAVE1 in Vesikeln

Um die WAVE-Isoform zu bestimmen, die an Vesikeln lokalisiert, wurden primäre humane Makrophagen und J774-Makrophagen mit spezifischen Antikörpern gegen WAVE gefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

In beiden Fällen zeigte sich eine deutliche Kolo-kalisation von WAVE1 mit dem Aktin-Zytoskelett, vor allem an Lamellipodien und *membrane ruffles*. Zusätzlich konnte WAVE1- an vesikulären Strukturen nachgewiesen werden (siehe Abb. 9).

Die WAVE2-Färbung zeigte die bereits in der Literatur beschriebene Lokalisation des Proteins an Aktin-reichen Strukturen wie Filopodien. Allerdings konnte auch bei WAVE2, ebenso wie bei WAVE1 Akkumulationen an vesikulären Strukturen festgestellt werden, die jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt waren (siehe Abb. 9).

Eine mögliche Beteiligung von WAVE3 an den durch den pan-WAVE-Antikörper gezeigten vesikulären Strukturen konnte in einer spezifischen Färbung gegen WAVE3 nicht untersucht werden, da kein Isoform-spezifischer Antikörper zur Verfügung stand.

Nachdem die Färbungen einen Hinweis auf eine Lokalisation vor allem von WAVE1 an vesikulären Strukturen ergaben, sollten diese vesikulären Anreicherungen durch eine

unabhängige Methode, mittels Transfektion eines eukaryotischen Expressionsvektors für GFP-WAVE1 und -WAVE2 bestätigt werden.

Die Überexpression von WAVE1-GFP nach Transfektion in primäre humane Makrophagen bestätigte die in der Färbung gezeigte vesikuläre Lokalisation. Damit bestätigt die Transfektion von WAVE1-GFP die beobachtete vesikuläre Akkumulationen in primären humanen Makrophagen (Abb. 9).

WAVE2-GFP lokalisierte dagegen nur vereinzelt an vesikulären Strukturen (siehe Abb. 9).

Da WAVE1 die deutlichste vesikuläre Verteilung aller unterschiedlichen Isoformen aufwies wurde im Folgenden die Arbeit auf Untersuchungen an WAVE1 fokussiert.

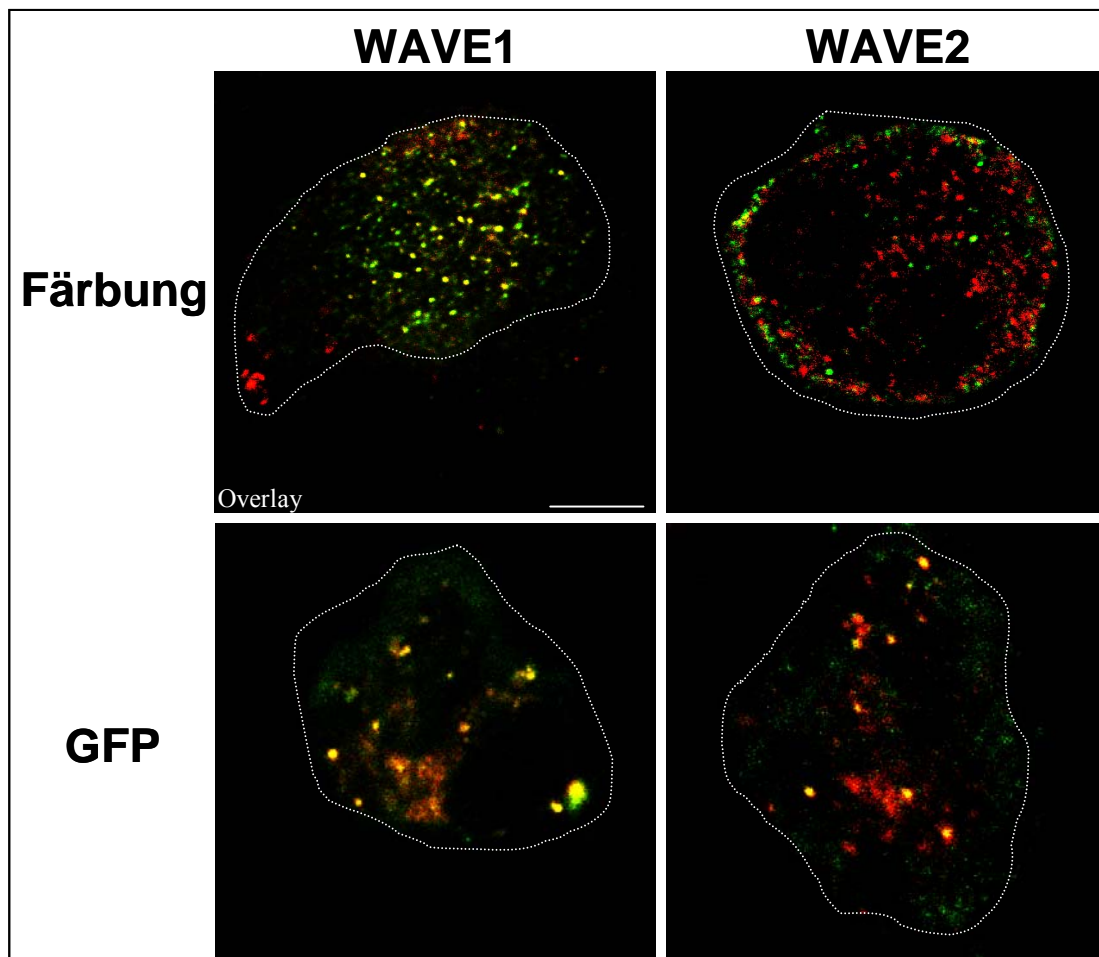


Abb. 9: Akkumulation von WAVE1 und WAVE2 in Vesikeln in Färbung und Überexpression mit GFP. Konfokalmikroskopische Aufnahmen primärer humaner Makrophagen.

Obere Reihe: (A) zeigt die Verteilung von WAVE1 (Grün), die Färbung gegen Aktin mittels Rhodamin-Phalloidin (Rot) sowie die Überlagerung (Gelb). (B) zeigt die Verteilung von WAVE2 (Grün), die Färbung gegen Aktin mittels Rhodamin-Phalloidin (Rot) sowie die Überlagerung (Gelb).

Untere Reihe: (C) zeigt die Verteilung von WAVE1-GFP nach Überexpression (Grün), die Färbung gegen Aktin mittels Rhodamin-Phalloidin (Rot) sowie die Überlagerung (Gelb). (D) zeigt die Verteilung

von WAVE2-GFP nach Überexpression (Grün), die Färbung gegen Aktin mittels Rhodamin-Phalloidin (Rot) sowie die Überlagerung (Gelb).

IV.2.1. Induktion WAVE1-haltiger Vesikel

In unbehandelten Makrophagen konnten nur wenige WAVE1-positive Vesikel beobachtet werden. Ein Teil der untersuchten Zellen in unbehandelten Populationen zeigte jedoch einen migratorischen Phänotyp, gekoppelt mit einer vermehrten Anzahl von WAVE1-Vesikeln. Daher wurde versucht, den Anteil an Zellen mit migratorischem Phänotyp durch Zugabe stimulierender Substanzen zu erhöhen, um somit die Anzahl von WAVE1-Vesikeln zu steigern. Die Migration und Polarisation von Makrophagen ist durch chemoattraktive Stoffe induzierbar. In primären humanen Makrophagen wurden als Stimulantien fMLP (formyl-Methionyl-Leucin-Phenylalanin), ein chemoattraktives bakterielles Peptid, sowie Lipopolysaccharid (LPS) aus der gram-negativen Bakterienzellwand eingesetzt. Eine Behandlung der Zellen mit fMLP und LPS führten sowohl zu einem erhöhten Prozentsatz von Zellen mit migratorischem Phänotyp als auch zu einer gesteigerten WAVE1-Vesikel Bildung (+ 19,2 % bei fMLP- und + 30,7 % bei LPS-Behandlung). Diese Resultate ließen sich in J774-Makrophagen mit LPS als stimulierender Substanz bestätigen.

Auch in dieser Zellreihe ließ sich damit der migratorische Phänotyp induzieren, und ebenso wie in primären humanen Makrophagen konnte durch diese Maßnahme die Vesikelbildung gesteigert werden.

Durch diese Experimente konnte WAVE an vesikulären Strukturen lokalisiert werden. Die Funktion dieser Vesikel war allerdings ungeklärt. Neben der Induktion von Vesikeln durch chemoattraktive Substanzen entstehen Vesikel auch bei der Endozytose im Rahmen der Phagozytose und Pinozytose. Daher wurde im Folgenden eine mögliche Rolle von WAVE bei der Vesikel-Regulation im Rahmen von Endozytose-Vorgängen untersucht.

IV.3. Charakterisierung WAVE1-haltiger Vesikel

IV.3.1. Phagozytose: WAVE1-GFP an Latex-beads enthaltenden Phagosomen

Im Rahmen ihrer Rolle als Fresszellen sind Makrophagen insbesondere zu Phagozytose und Pinozytose befähigt.

Als Phagozytose-Assay wurden auf primäre humane Makrophagen 4,0 µm große Latex-beschichtete *beads* aufzentrifugiert, die aufgenommen wurden und in den endosomalen Weg eintraten. Dabei erfolgte die initiale Aufnahme der *beads* in einem typischen Aktin-abhängigen

Phagozytose-Mechanismus, der sich u.a. durch Ausbildung eines Aktin-reichen *phagocytic cup* (Niedergang und Chavrier, 2004) um das *bead* auszeichnet. In der mikroskopischen Auswertung konnte bei ca. 5 % der Zellen eine erhöhte WAVE1-Dichte um die *phagocytic cups* festgestellt werden.

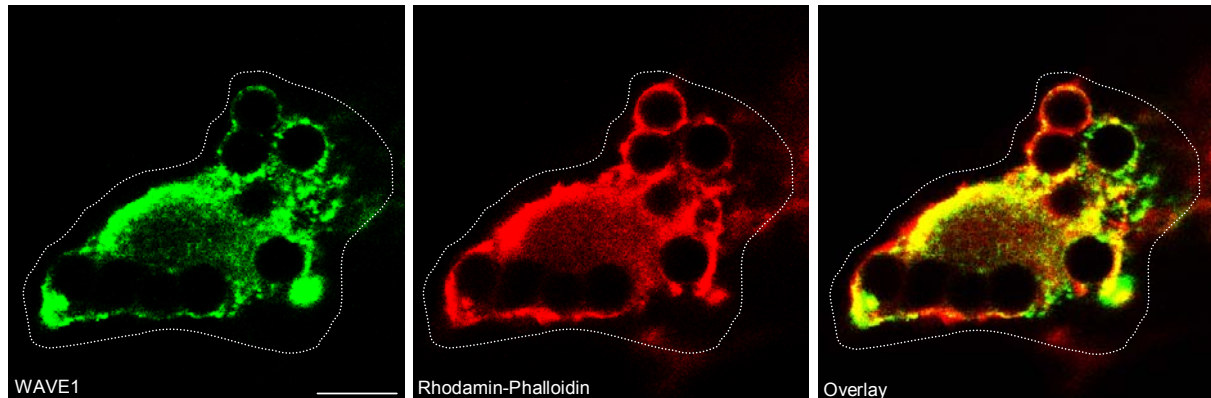


Abb. 10: Verteilung von WAVE1 nach Aufzentrifugation von 4,0 μm großen Latex-beschichteten *beads* auf primäre humane Makrophagen. Konfokalmikroskopische Aufnahmen primärer humaner Makrophagen nach Transfektion mit WAVE1-GFP (Grün), Aufzentrifugation von 4,0 μm großen Latex-beschichteten *beads* und Färbung von Aktin mit Rhodamin-Phalloidin (Rot). Die gelbe Farbe zeigt im Overlay die Kolokalisation an. Weißer Balken: 10 μm

IV.3.2. Pinozytose

Zur Simulation der Pinozytose wurden sogenannte *fluid phase marker* wie z. B. Dextrane verwendet. Zur besseren Sichtbarmachung waren die Dextrane fluoreszenzmarkiert (FITC-, TRITC- oder *Cascade Blue*-Konjugat). Wie die chemotaktischen Stimuli waren auch die *fluid phase marker*, unabhängig von der Art der gekoppelten Fluorophore, in der Lage, WAVE1-haltige Vesikel in den Makrophagen zu induzieren. Die WAVE1-Vesikel waren 45-60 min nach Dextranzugabe deutlich sichtbar. Das entspricht etwa der Zeit, die das internalisierte Dextran benötigt, um den gesamten endozytotischen Weg zu durchlaufen und in Lysosomen zu gelangen (Swanson *et al.*, 1986; Swanson *et al.*, 1987).

IV.3.3. Kolokalisation von WAVE1 mit pinozytotischen Markern

Um mit einer unabhängigen Methode die Kolokalisation von WAVE1 mit Pinozytose-induzierten Vesikeln zu überprüfen, wurden primäre humane Makrophagen mit einem eukaryotischen Expressionsvektor für GFP-WAVE1 transfiziert und mit Dextran inkubiert. Die konfokal aufgenommene Schnittbildserie in Abb. 12 zeigt auch hier eine deutliche Kolokalisation von WAVE1 und TRITC-Dextran und bestätigt somit die unter Punkt IV.3.2. Pinozytose aufgeführten Resultate.

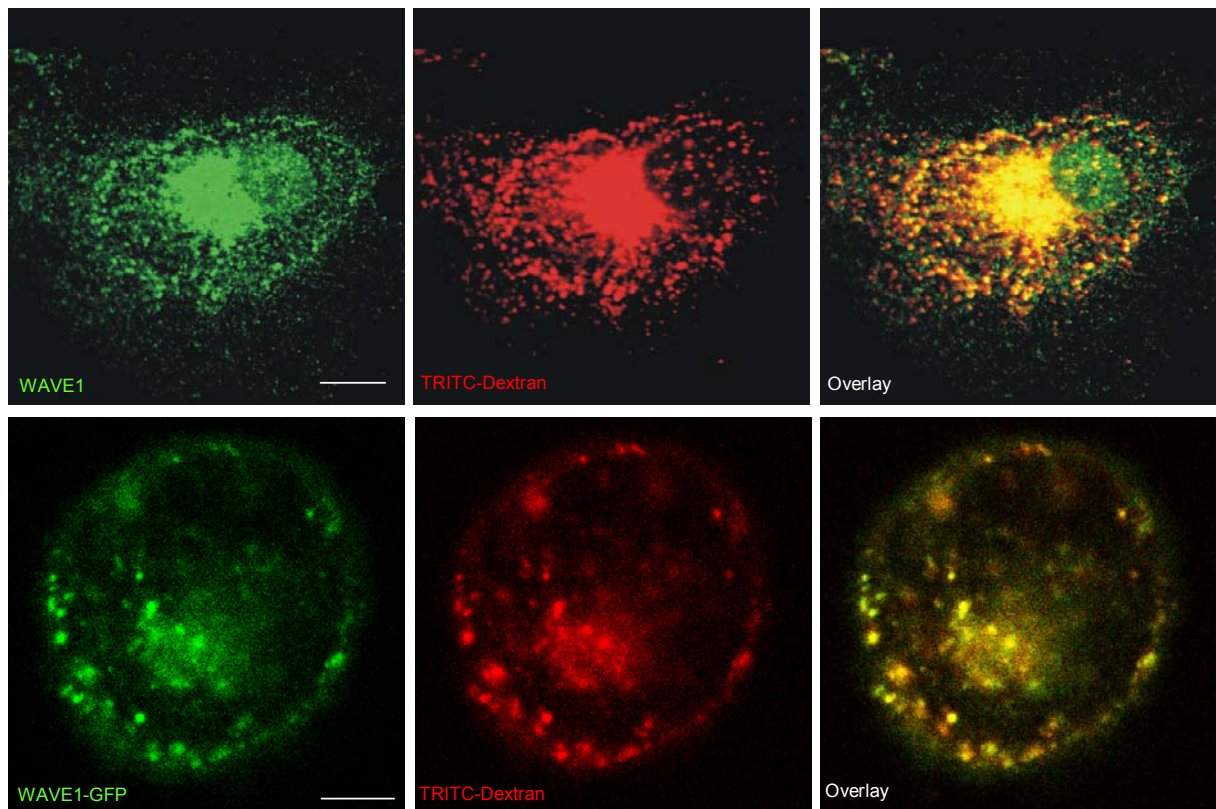


Abb. 11: WAVE1 kolokalisiert mit fluoreszenzmarkiertem Dextran in primären humanen Makrophagen. Konfokalmikroskopische Aufnahmen primärer humaner Makrophagen nach einstündiger Inkubation mit TRITC-Dextran (A-F)

Obere Reihe: (A) zeigt die Verteilung von WAVE1 (Grün), (B) die durch TRITC-Dextran gekennzeichneten pinozytotischen Vesikel (Rot). (C) Überlagerung von (A) und (B); die gelbe Farbe zeigt die Kolokalisation an. Weißer Balken in (A) und (D): 10µm.

Untere Reihe: (D) zeigt die Verteilung von WAVE1-GFP (Grün), (E) die durch TRITC-Dextran gekennzeichneten pinozytotischen Vesikel (Rot). (F) Überlagerung von (D) und (E); die gelbe Farbe zeigt die Kolokalisation an.

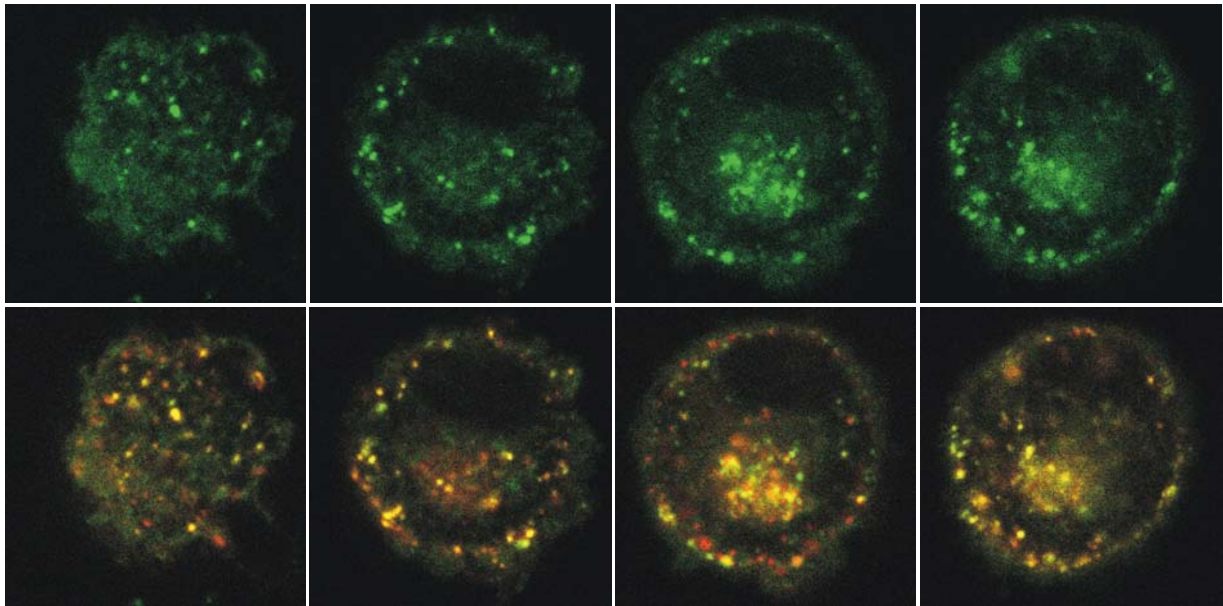


Abb. 12: WAVE1 kolokalisiert mit fluoreszenzmarkiertem Dextran in primären humanen Makrophagen. Konfokalmikroskopische Schnittbildserie primärer humaner Makrophagen nach einstündiger Inkubation mit TRITC-Dextran (A-H). Verschiedene Ebenen im Abstand von je ca. 5 µm. (A-D) zeigt die Verteilung von WAVE1-GFP (Grün). (E-H) zeigt die Überlagerungen von (A-D) mit durch TRITC-Dextran gekennzeichneten pinozytotischen Vesikel (Rot); die gelbe Farbe zeigt die Kolokalisation an.

Zusammengefasst zeigen die bisherigen Ergebnisse:

1. WAVE1 lokalisiert in primären humanen Makrophagen und in J774-Makrophagen nach Induktion an vesikulären Strukturen.
2. WAVE1-haltige Vesikel lassen sich sowohl durch chemotaktische als auch durch pinozytotische Agenzien induzieren.
3. WAVE1 kolokalisiert mit fluoreszenzmarkierten Dextranen in pinozytotischen Vesikeln.

Da A) die pinozytotische Induktion von WAVE1-Vesikeln mittels Dextran eine leicht zugängliche Methode darstellt, sowie
 B) die Kolokalisation mit fluoreszenzmarkierten Dextranen ein einfaches Modell für WAVE1-Funktionen darstellt

beschäftigt sich die weitere Arbeit mit durch Dextran induzierten WAVE1-Vesikeln.

IV.3.4. Kolokalisierung mit anderen Proteinen

Aus der Literatur sind Interaktionspartner von WAVE1 bekannt. Im Folgenden wurde untersucht, ob diese Interaktionspartner zusammen mit WAVE1 an pinozytotischen Vesikeln lokalisieren.

Von allen untersuchten Interaktionspartnern haben NCK-1 und PAK1 die deutlichsten Kolokalisationen ergeben.

Es wurden Kofärbungen von WAVE1 mit NCK-1 und PAK1 nach Stimulation mit TRITC-Dextran durchgeführt. In Abbildung 13 ist der Anteil der Zellen mit Vesikeln, an denen WAVE1 teilweise oder deutlich mit Interaktionspartnern kolokalisiert im Vergleich zur gesamten Zellpopulation nach konfokalmikroskopischer Auszählung gezeigt. So zeigte sich eine Kolokalisation von NCK-1 mit WAVE1 in 27,00 % und mit TRITC-Dextran in 23,67 %. PAK1 kolokalisierte mit WAVE1 in 22,67 % und mit TRITC-Dextran in 16,33 %.

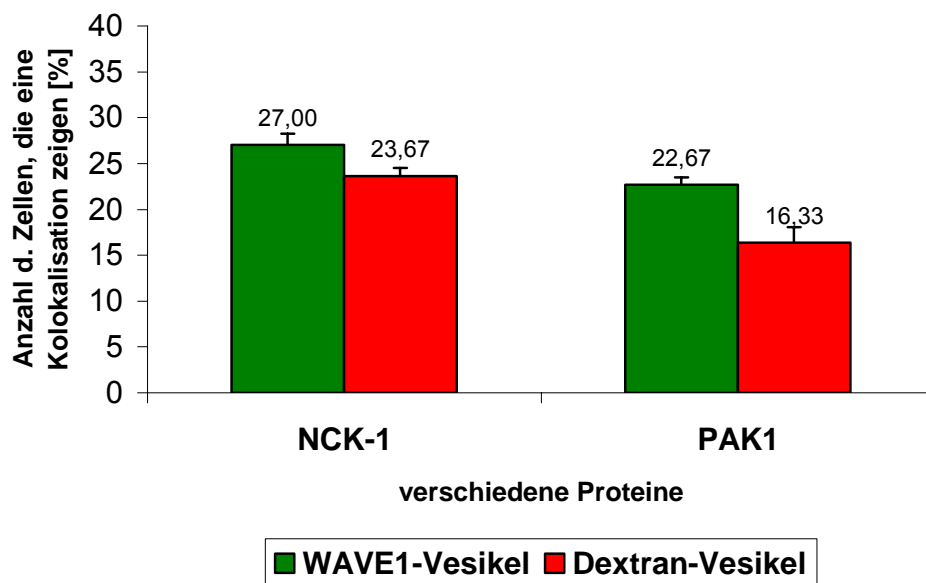


Abb. 13: Balkendiagrammdarstellung der Kolokalisierung von WAVE1- und Dextran-Vesikeln mit NCK-1 und PAK1. Gezeigt sind diese Effekte nach Stimulation primärer humaner Makrophagen mit fMLF. NCK-1, PAK1 und WAVE1 wurden mittels spezifischen Antikörpern detektiert. TRITC-Dextran war indirekt nachweisbar. Für jeden Wert wurden je 30 injizierte Zellen in drei verschiedenen Experimenten gezählt (n=3). Jeder Balken stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung dar.

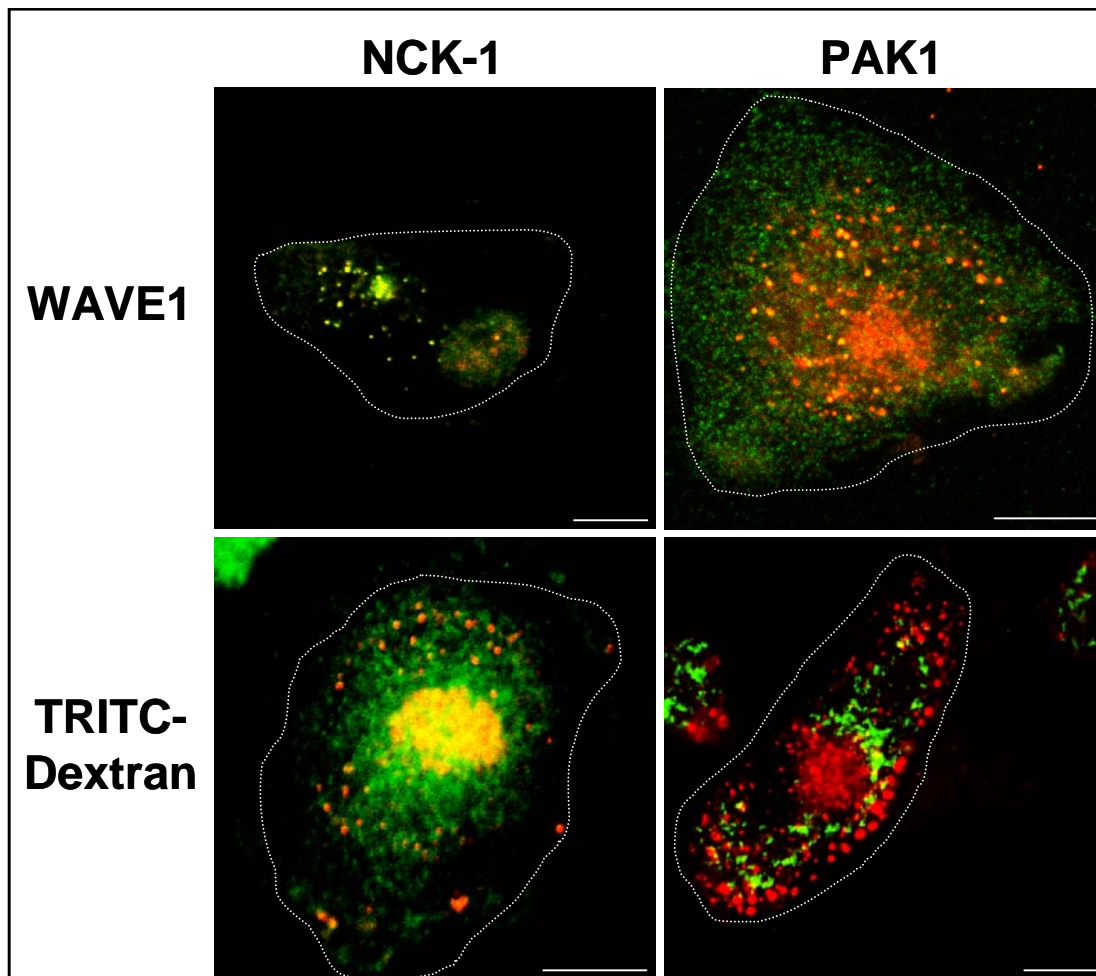


Abb. 14: NCK-1 und PAK1 kolokalisieren mit WAVE1 und fluoreszenzmarkiertem Dextran in primären humanen Makrophagen. Konfokalmikroskopische Aufnahmen primärer humaner Makrophagen nach einstündiger Inkubation von NCK-1 und PAK1 mit WAVE1 bzw. TRITC-Dextran.
Obere Reihe: (A) zeigt die Verteilung von WAVE1 (Grün) und NCK-1 (Rot) sowie die Kolokalisation (Gelb) in der Überlagerung. (B) zeigt die Verteilung von WAVE1 (Grün) und PAK1 (Rot) sowie die Kolokalisation (Gelb) in der Überlagerung.
Untere Reihe: (C) zeigt die Verteilung von NCK-1 (Grün) und TRITC-Dextran (Rot) sowie die Kolokalisation (Gelb) in der Überlagerung. (D) zeigt die Verteilung von PAK1 (Grün) und TRITC-Dextran (Rot) sowie die Kolokalisation (Gelb) in der Überlagerung.

Ein substantieller Anteil von NCK-1 und PAK1 zeigt eine Kolokalisation mit WAVE1- und Dextran-Vesikeln, was eine Interaktion mit diesen Proteinen nahe legt.

IV.4. Regulation von WAVE1

Endozytische Vorgänge sind hochregulierte Prozesse. Da sich Makropinozytose und der Vesikeltransport durch Manipulationen des Zytoskeletts inhibieren lassen, wurde im Folgenden

der Einfluss des Aktin- bzw. Mikrotubuli-Zytoskeletts auf die WAVE1-Vesikel Bildung untersucht.

IV.4.1. Aktin-Abhängigkeit

Es ist bekannt, dass der C-Terminus von WAVE1 über die Bindung des Arp2/3-Komplexes Aktin-Nukleation induziert. In diesem Kontext stellte sich die Frage, ob

1. WAVE1-Vesikel Aktin-abhängig gebildet werden
2. WAVE1 selbst als Aktin-Nukleator fungiert

Zur Inhibition der Aktin-Polymerisierung wurde Cytochalasin D, ein membrangängiges Toxin aus *Zygosporium mansonii*, verwendet. Es inhibiert die Depolymerisierung von F-Aktin, indem es die Addition von G-Aktin an das Plus-Ende (*fast growing end*) von Aktinfilamenten verhindert (Urbanik und Ware, 1989).

Primäre humane Makrophagen wurden mit Cytochalasin D in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und anschließend mit TRITC-Dextran stimuliert. WAVE1 wurde mit einem anti-WAVE1 Antikörper in der Immunfluoreszenz detektiert.

Abbildung 15 zeigt, dass WAVE1-Vesikel trotz des zerstörten Aktin-Zytoskeletts gebildet werden. Dieses Ergebnis war unabhängig von der Konzentration des eingesetzten Cytochalasin D (siehe Abb. 16). Die Bildung von Dextran-Vesikeln wurde hingegen wie erwartet durch die Behandlung der Zellen mit Cytochalasin D Konzentrations-abhängig inhibiert. Die Anzahl der Dextran-Vesikel ließ sich hierbei im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen auf $13,14 \% \pm 1,79 \%$ reduzieren (siehe Abb. 16).

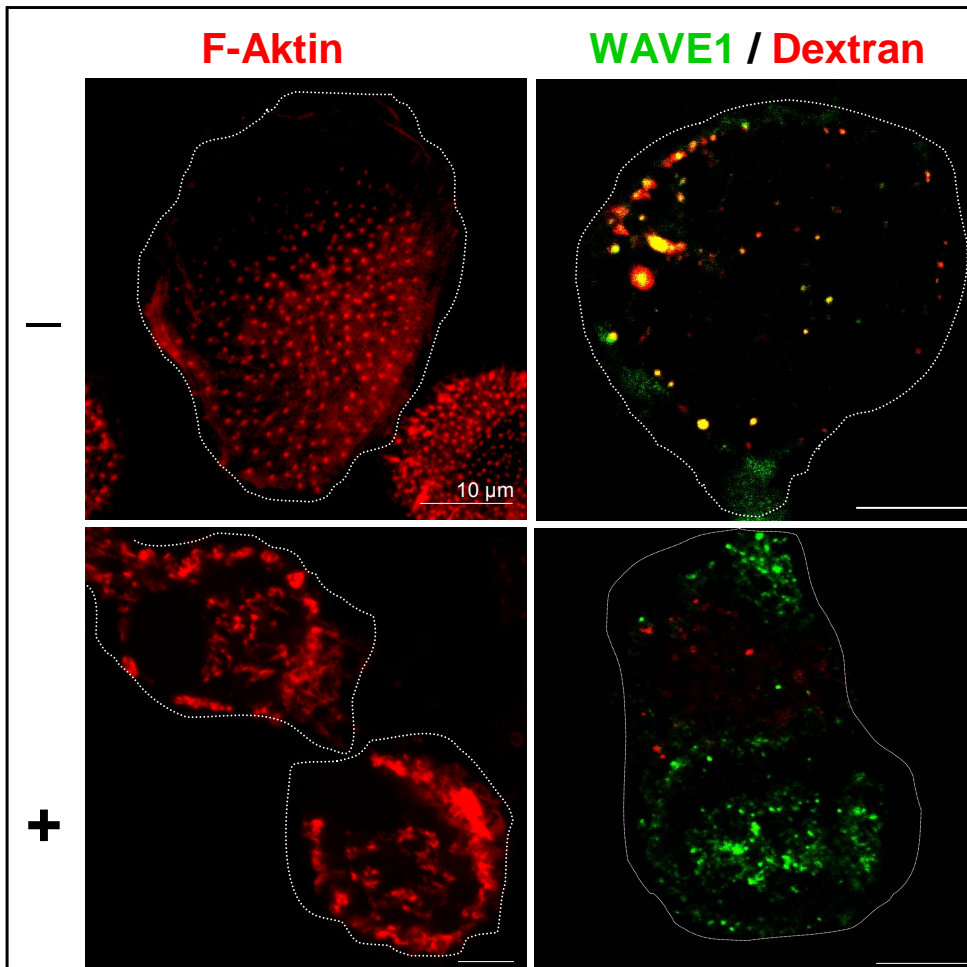


Abb. 15: Konfokalmikroskopische Aufnahmen primärer humaner Makrophagen. Darstellung von unbehandelten (-) und mit Cytochalasin behandelten (+) Zellen. **Linke Spalte:** Aktin-Färbung. **Rechte Spalte:** WAVE1-Färbung nach Stimulation mit TRITC-Dextran. **Reihe oben:** unbehandelte Zellen. **Reihe unten:** mit Cytochalasin D behandelte Zellen.

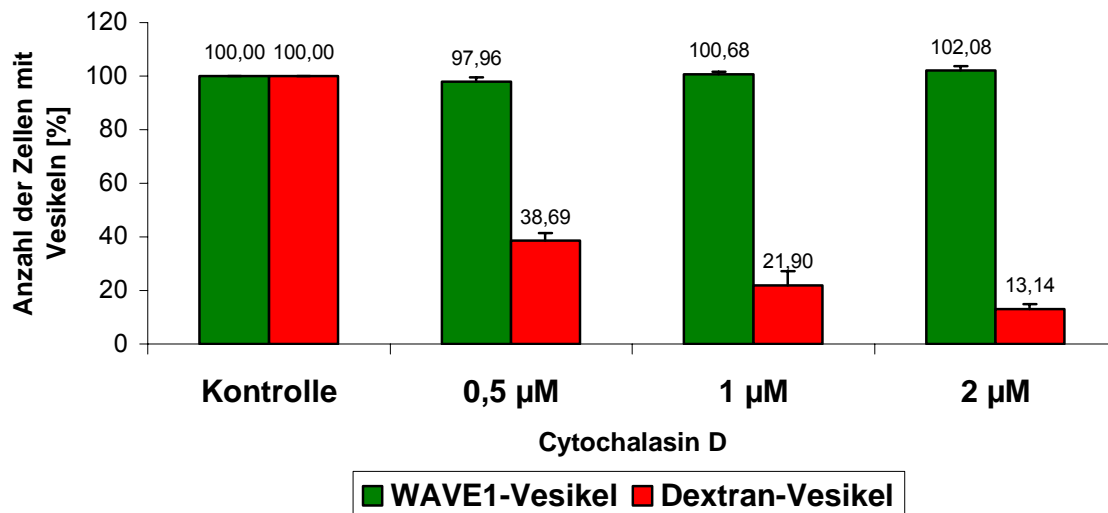


Abb. 16: Balkendiagramm-Darstellung der konzentrationsabhängigen Reduktion von Dextran-Vesikeln nach Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts. WAVE1-Vesikel bleiben von der Cytochalasin D-Behandlung unbeeinflusst. Kontrolle: Anzahl von WAVE1- und Dextran-Vesikeln in unbehandelten Zellen. WAVE1 wurde durch einen anti-WAVE1 Antikörper detektiert. TRITC-Dextran konnte direkt sichtbar gemacht werden. Aktin wurde mittels Rhodamin-Phalloidin dargestellt. Für jeden Wert wurden je 30 injizierte Zellen in drei verschiedenen Experimenten gezählt (n=3). Jeder Balken stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung dar.

IV.4.2. Mikrotubuli-Abhängigkeit

Der intrazelluläre Transport von Vesikeln findet entlang von Mikrotubuli statt. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob WAVE1-Vesikel Mikrotubuli-abhängig gebildet werden. Daher wurden primäre humane Makrophagen mit dem Mikrotubuli-zerstörenden Agens Nocodazol (Vasquez *et al.*, 1997), in verschiedenen Konzentrationen behandelt, anschließend mit TRITC-Dextran stimuliert und mit einem anti-WAVE1 Antikörper in der Immunfluoreszenz detektiert. Die mikroskopische Auswertung ergab, dass die Zerstörung der Mikrotubulstruktur keinerlei Einfluss auf die Bildung von WAVE1-Vesikeln hat.

Dextran-Vesikel wurden nach Zerstörung des Mikrotubuli-Zytoskeletts jedoch in verminderter Anzahl gegenüber der Kontrolle beobachtet. Abhängig von der Nocodazol-Konzentration ließen sich die Zellen mit Dextran-Vesikeln auf $59,40 \% \pm 8,51 \%$ vermindern.

Die gebildeten Dextran-Vesikel ließen sich nun vor allem nur noch randständig lokalisiert beobachten.

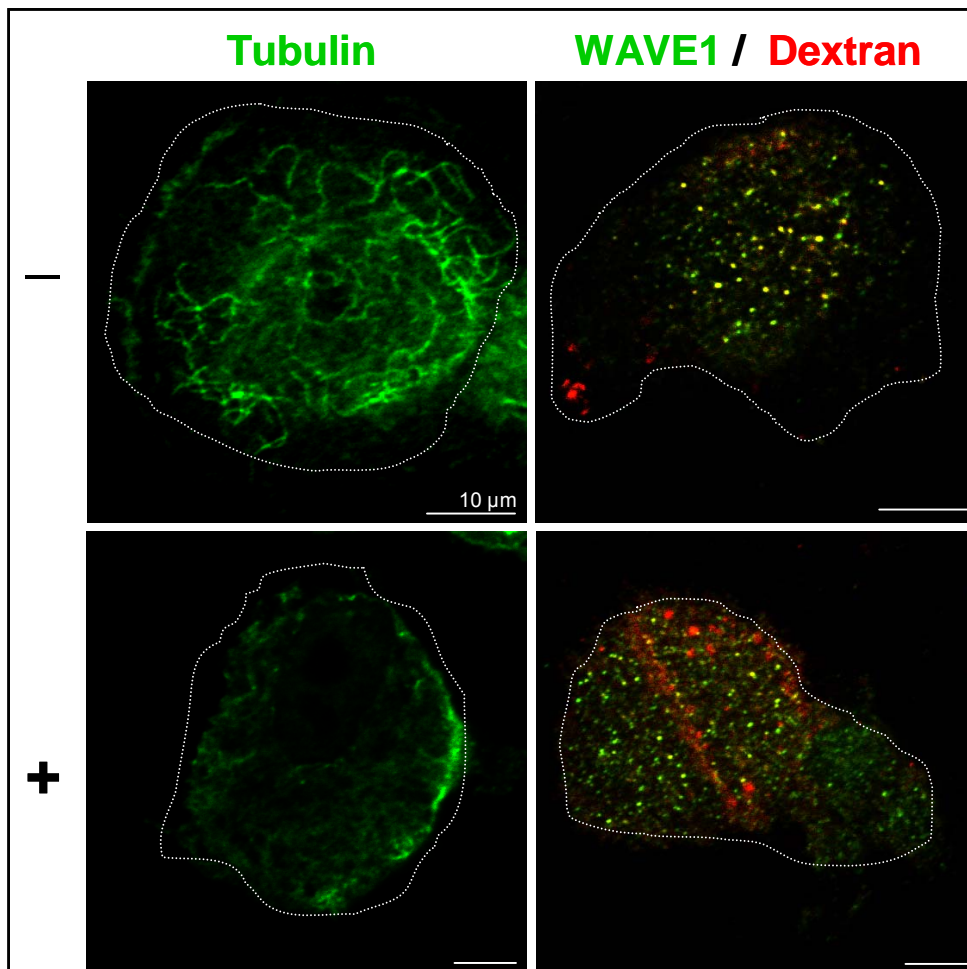


Abb. 17: Konfokalmikroskopische Aufnahmen primärer humaner Makrophagen. Darstellung von unbehandelten (-) und mit Nocodazol behandelten (+) Zellen. **Linke Spalte:** Tubulin-Färbung. **Rechte Spalte:** WAVE1-Färbung nach Stimulation mit TRITC-Dextran. **Reihe oben:** unbehandelte Zellen. **Reihe unten:** mit Nocodazol behandelte Zellen.

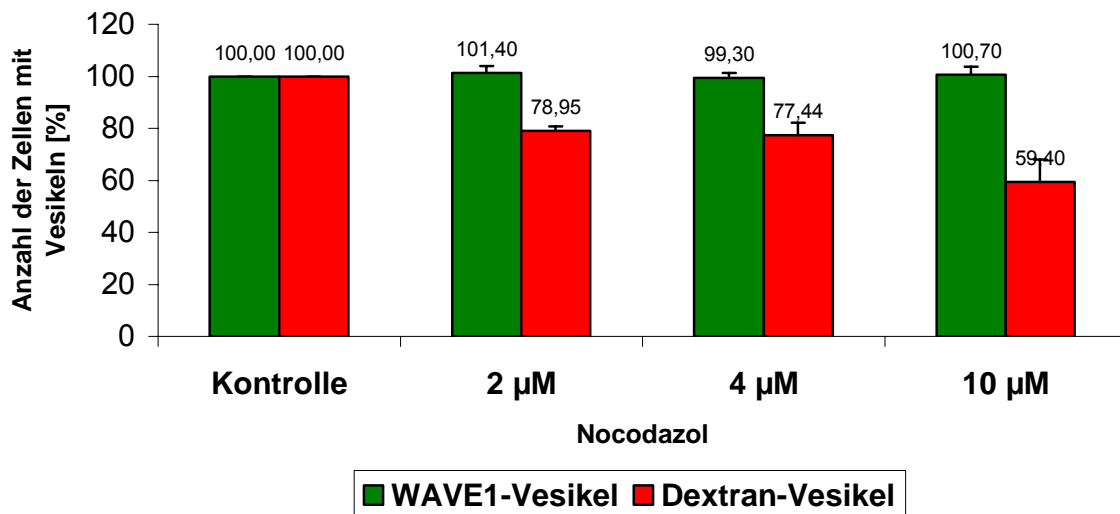


Abb. 18: Balkendiagramm-Darstellung der konzentrationsabhängigen Reduktion von Dextran-Vesikeln nach Zerstörung der Mikrotubuli. WAVE1-Vesikel bleiben von der Nocodazol-Behandlung unbeeinflusst. Kontrolle: Anzahl von WAVE1- und Dextran-Vesikeln in unbehandelten Zellen. WAVE1 wurde durch einen anti-WAVE1 Antikörper detektiert. TRITC-Dextran konnte indirekt sichtbar gemacht werden. Mikrotubuli wurden mittels anti-Tubulin Antikörper dargestellt. Für jeden Wert wurden je 30 injizierte Zellen in drei verschiedenen Experimenten gezählt (n=3). Jeder Balken stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung dar.

Zusammenfassend zeigen die dargelegten Ergebnisse:

1. Die Bildung von WAVE1-Vesikeln ist sowohl Aktin- als auch Mikrotubuli-unabhängig.
2. Die Ausbildung von Dextran-Vesikeln zeigt eine wie in der Literatur beschriebene deutliche Aktin-Abhängigkeit.
3. Nicht die Bildung, aber der intrazelluläre Transport der Dextran-Vesikel wird durch das Mikrotubuli-Zytoskelett beeinflusst.

IV.5. Funktionsanalyse von WAVE1

IV.5.1. WAVE1 - Konstrukte

Wie in der Einleitung beschrieben ist WAVE1 ein Multidomänenprotein. Um die Rolle der einzelnen Domänen von WAVE1 in Bezug auf die Bildung von WAVE1- und Dextran-Vesikeln zu analysieren, wurden für die Mikroinjektion verschiedene Mutanten von WAVE1 als GST-Fusionsproteine geschaffen. Die Konstrukte WAVE1-PWA und WAVE1-W erhielten wir von Laura Machesky (Birmingham, UK). In Abbildung 19 sind die einzelnen Konstrukte von WAVE1 für die Mikroinjektionsversuche aufgeführt.

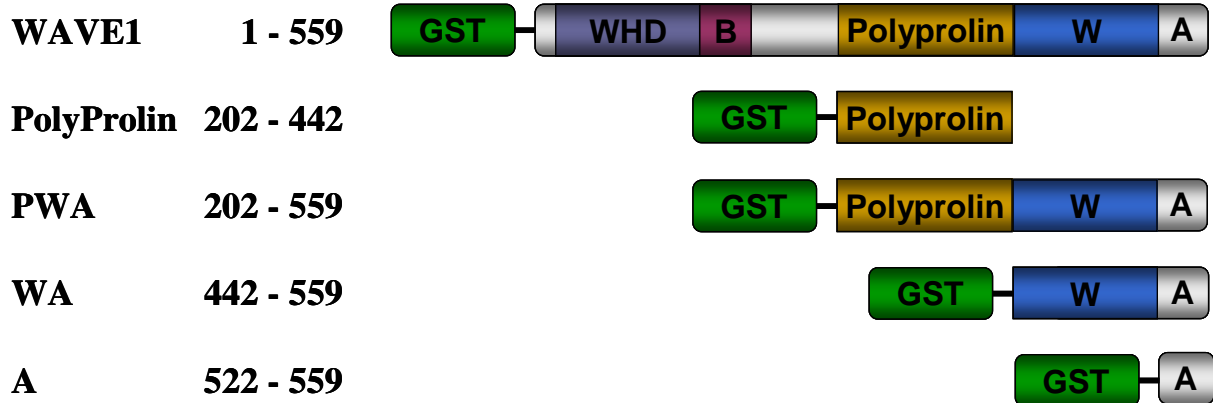


Abb. 19: Konstrukte von WAVE1 für Mikroinjektionsversuche

Die Zahlen geben den Bereich der einzelnen Konstrukte innerhalb der Nukleotidsequenz an. GST: Gluthation-S-Transferase; **P**: Prolin-reiche Domäne; **W**: W-Domäne; **A**: Azidische Domäne.

IV.5.2. WAVE1-Konstrukte und die Bildung WAVE1- und Dextran-haltiger Vesikel

In primäre humane Makrophagen wurden die Konstrukte WAVE1-P, -PWA, -WA und -A mikroinjiziert, die Zellen 1 h mit TRITC-Dextran stimuliert und gefärbt. Die durch die GST-Kontrollinjektion erreichten Werte für WAVE1- und Dextran-Vesikel wurden auf 100 % gesetzt.

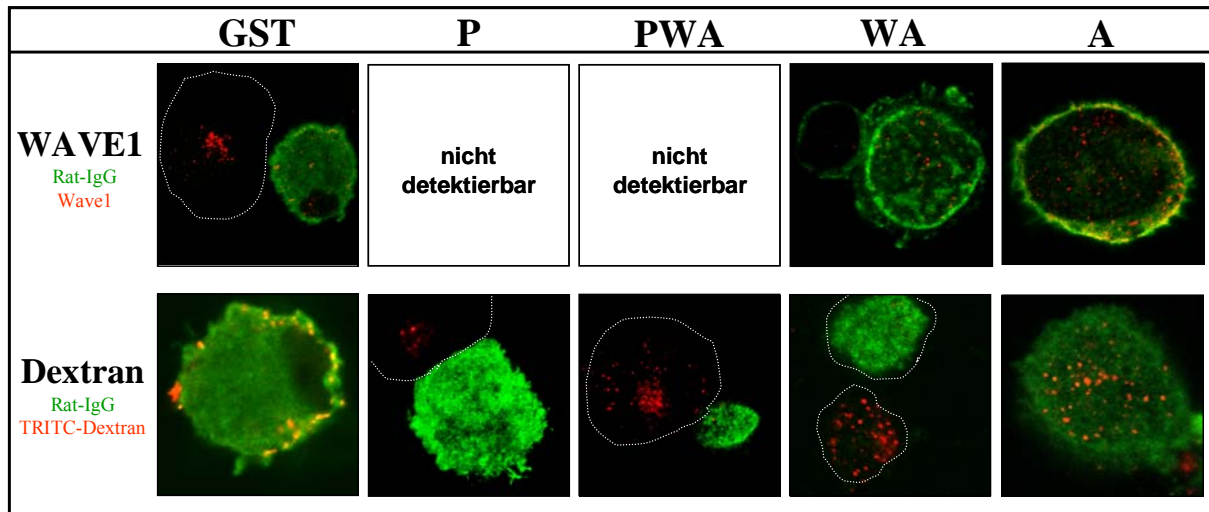


Abb. 20 A: Mikroinjektionen der einzelnen WAVE1-Konstrukte

Konfokalmikroskopische Aufnahmen primärer humaner Makrophagen: injizierte Zellen durch Färbung des Injektionsmarkers Ratten-IgG grün dargestellt. **Oben**: Darstellung der WAVE1-Vesikel in Rot nach Stimulation mit farblosem Dextran. **Unten**: Darstellung der Dextran-Vesikel in Rot nach Stimulation mit TRITC-Dextran. **Nicht detektierbar**: Eine Analyse der WAVE1-Vesikel konnte nicht erfolgen, da die verfügbaren WAVE1-Antikörper die injizierte Polyprolin-Domäne von WAVE1 als Epitop erkennen.

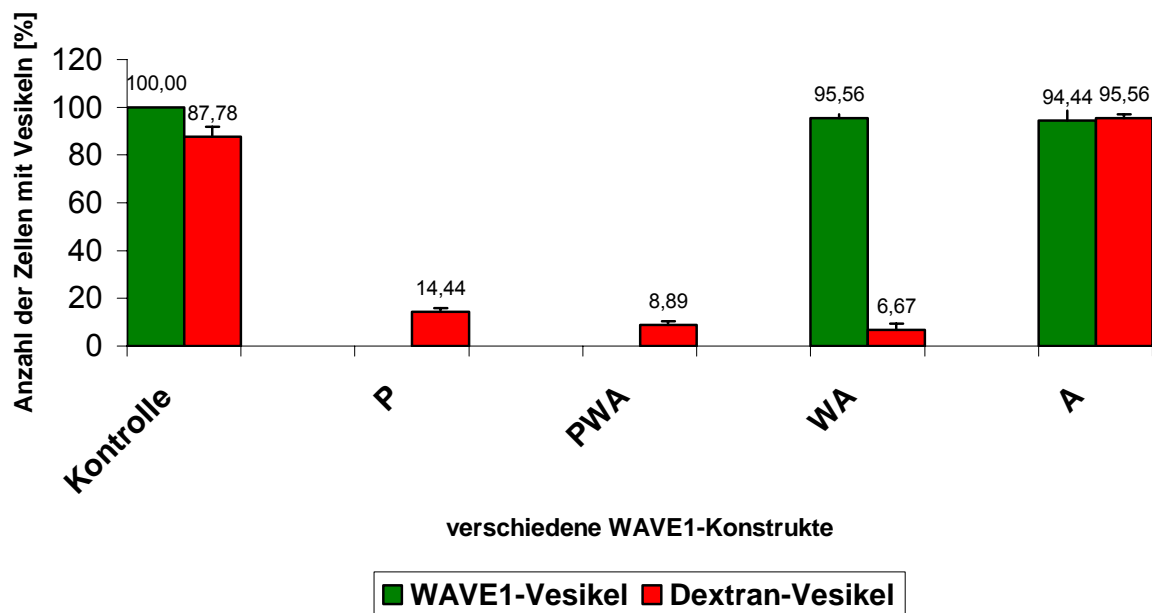


Abb. 20 B: Balkendiagrammdarstellung der Zellen mit WAVE1- bzw. Dextran-Vesikeln nach Mikroinjektion der verschiedenen WAVE1-Konstrukte. Die Makrophagen wurden nach Mikroinjektion für 1 h mit Dextran zur Ausbildung von Vesikeln inkubiert. TRITC-Dextran konnte direkt nachgewiesen werden, WAVE1 wurde durch einen anti-WAVE1-Antikörper detektiert. Für jeden Wert wurden je 30 injizierte Zellen in drei verschiedenen Experimenten gezählt (n=3). Jeder Balken stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung dar.

Die Mikroinjektion des WAVE1-A-Fusionsproteins führte zu geringer Minderung der WAVE1-Vesikel auf 94,44 % \pm 4,16 %. Die Verwendung von WAVE1-WA erbrachte ebenfalls nur eine leichte Reduktion der WAVE1-Vesikel auf 95,56 % \pm 1,57 %. Eine Analyse der WAVE1-Vesikel durch Mikroinjektion von WAVE1-P und -PWA konnte nicht erfolgen, da die verfügbaren WAVE1-Antikörper ein Epitop der PolyProlin-Domäne von WAVE1 erkannten.

Im Gegensatz dazu zeigte sich eine deutliche Reduktion der Dextran-Vesikel durch die verschiedenen WAVE1-Konstrukte. Zahlenmäßig zeigte sich nur eine leichte Veränderung durch Mikroinjektion von WAVE1-A, die zu einer Reduktion der Zellen mit Dextran-Vesikeln auf lediglich 95,56 % \pm 1,57 % führte. Durch die Verwendung von WAVE1-WA wurde jedoch eine starke Reduktion der Zellen mit Dextran-Vesikeln auf 6,67 % \pm 2,72 % erreicht. Durch Mikroinjektion von WAVE1-PWA wurde die Zellzahl mit Dextran-Vesikeln auf 8,89 % \pm 1,57 % reduziert. Durch die Verwendung der WAVE1-P wurde ein Wert von 14,44 % \pm 1,57 % erzielt.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse:

1. WAVE1-A hat weder einen Einfluss auf die Bildung der WAVE1- noch auf die Bildung der Dextran-Vesikel.
2. WAVE1-WA zeigt einen deutlichen Effekt auf die Bildung der Dextran-Vesikel.
3. WAVE1-P führte zu einer deutlichen Reduktion der Bildung von Dextran-Vesikeln.
4. WAVE1-PWA führt zu einer signifikanten Reduktion der Bildung von Dextran-Vesikeln.

IV.6. Interaktionspartner von WAVE1**IV.6.1. Mögliche Interaktionspartner**

Um einen möglichen Signalweg ausfindig zu machen, der die beschriebenen WAVE1- und Dextran-Vesikel beeinflusst, wurde versucht, bereits bekannte Interaktionspartner von WAVE1 zu identifizieren, die ebenfalls an der Vesikelbildung beteiligt sind. Unter Punkt IV.3.4. Kolokalisierung mit anderen Proteinen wurden bereits Kolokalisationen von WAVE1 mit anderen Proteinen beschrieben. NCK-1 und PAK1 sind zwei der Proteine, bei denen Effekte festgestellt werden konnten.

IV.6.2. NCK-1

Im Rahmen dieser Dissertation wurde bereits in der Immunfluoreszenzfärbung eine Kolokalisation von WAVE1 und NCK-1 gezeigt. Aufbau und Struktur von NCK-1 wurde unter Punkt I.4. Interaktionspartner von WAVE1 behandelt. Zur Charakterisierung der NCK-1-Funktion hinsichtlich der Ausbildung von WAVE1- und Dextran-Vesikeln wurden verschiedene Mutanten von NCK-1 verwendet (siehe Abb. 21). Die verwendeten Konstrukte unterschieden sich vom Wildtyp durch Punktmutationen in den verschiedenen SH-Domänen. ALLSHM wies die beschriebenen Punktmutationen in allen vier SH-Domänen auf. 3SH3M enthielt Mutationen nur in den drei SH3-Domänen, während SH2M eine Mutation lediglich in der SH2-Domäne aufwies. An die SH2-Domänen können Tyrosin-phosphorylierte Proteine binden, während die SH3-Domänen durch die Bindung an Prolin-reiche Domänen die Aktin-Polymerisierung durch Interaktion mit Effektorproteinen, wie z. B. den WASp- / WAVE-Proteinen, modulieren können (Kebache *et al.*, 2002). Im Folgenden sind die für Transfektionsversuche verwendeten Konstrukte aufgeführt, die von Louise Larose (Montreal, Kanada) stammen:

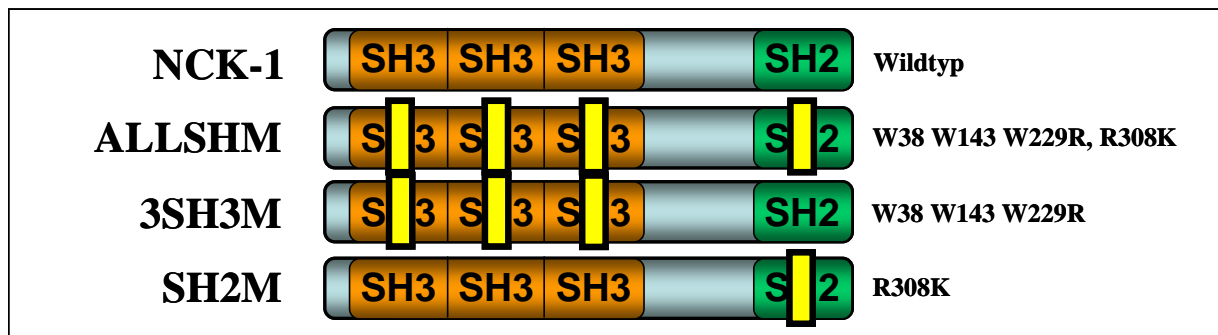


Abb. 21: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von NCK-1 und der für Transfektionsversuche in primäre humane Makrophagen verwendeten Mutanten (nach Kebache *et al.*, 2002). Die Konstrukte unterschieden sich vom Wildtyp NCK-1 durch Punktmutationen in den verschiedenen SH-Domänen. **3:** SH3-Domäne. **2:** SH2-Domäne. **ALLSHM:** Punktmutationen in allen SH-Domänen. **3SH3M:** Punktmutationen in allen SH3-Domänen. **SH2M:** Punktmutation in SH2-Domäne. **Rot / Grün:** Mutierte SH3-/SH2-Domäne.

Die beschriebenen Konstrukte wurden in primäre humane Makrophagen transfiziert, die Zellen 1 h mit TRITC-Dextran inkubiert, WAVE1 gefärbt und das Ergebnis mikroskopisch ausgewertet. Als Kontrolle dienten primäre humane Makrophagen, die ebenfalls 1 h mit TRITC-Dextran behandelt und WAVE1 gefärbt wurden. Die durch die Kontrolle erreichten Werte für WAVE1- und Dextran-Vesikel wurden auf 100 % gesetzt (siehe Abb. 22).

Transfektion der ALLSHM, bei der alle SH-Domänen punktmuiert sind, führte zu einer deutlichen Abnahme der Zellen mit WAVE1-Vesikeln auf $51,85 \% \pm 3,02 \%$ und zu einer Reduktion der Zellen mit Dextran-Vesikeln auf $24,44 \% \pm 2,22 \%$.

Die Verwendung des Konstruktes 3SH3M führte ebenso zu einer deutlichen Abnahme der Zellen mit WAVE1-Vesikeln auf $45,68 \% \pm 8,91 \%$. Die Dextran-Vesikel ließen sich mit dem Konstrukt 3SH3M sogar auf $11,11 \% \pm 9,09 \%$ reduzieren.

Durch Transfektion der SH2M konnte die Anzahl der WAVE1-Vesikel auf $43,21 \% \pm 10,11 \%$ reduziert werden. Die Anzahl der Dextran-Vesikel wurde auf $51,11 \% \pm 20,00 \%$ reduziert.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse:

1. Transfektion verschiedener Mutanten von NCK-1 führt zu einer deutlichen Reduktion der Zellen mit WAVE1-Vesikeln.
2. Vor allem die SH3-Domänen von NCK-1 zeigen einen deutlichen Einfluss auf die Bildung der Dextran-Vesikel.

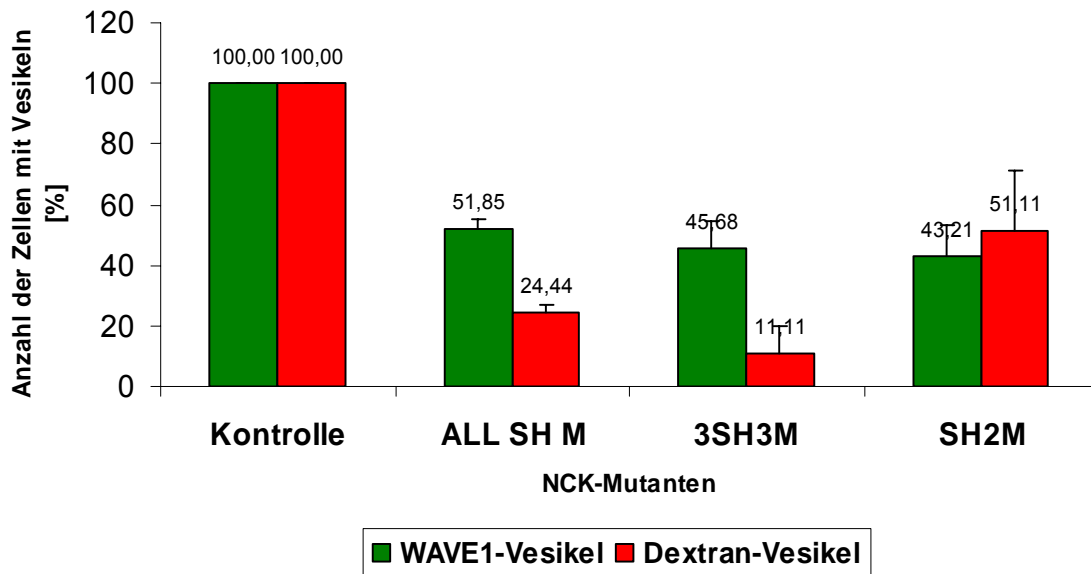


Abb. 22: Balkendiagrammdarstellung der Zellen mit WAVE1- bzw. Dextran-Vesikeln nach Transfektion der einzelnen Mutanten von NCK-1 in primäre humane Makrophagen. Die Makrophagen wurden nach Transfektion für 1 h mit Dextran zur Ausbildung von Vesikeln inkubiert. TRITC-Dextran konnte direkt nachgewiesen werden, WAVE1 wurde durch einen anti-WAVE1 Antikörper detektiert. Die Kontrolle repräsentiert 100 % für die Anzahl der Zellen mit Vesikeln in nicht transfizierten Proben. Für jeden Wert wurden je 30 injizierte Zellen in drei verschiedenen Experimenten gezählt (n=3). Jeder Balken stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung dar.

IV.6.3. PAK1

Unter Punkt IV.3.4. Kolokalisierung mit anderen Proteinen wurde bereits eine Kolokalisation von PAK1 und WAVE1 gezeigt. PAK1-wt besteht aus drei PolyProlin-Domänen, einer p21-bindenden, einer azidischen, einer autoinhibitorischen sowie einer Kinase-Domäne (siehe Abb. 23). Die Aktivierung von PAK1 wurde in der Einleitung beschrieben (siehe Punkt I.4. Interaktionspartner von WAVE1). Im Folgenden wurde eine Kinase-inaktive Mutante von PAK1 verwendet. Dieses Konstrukt trägt eine Mutation im Bereich der Kinase-Domäne und ist somit inaktiv. In Abbildung 23 ist das mutierte Konstrukt dargestellt.

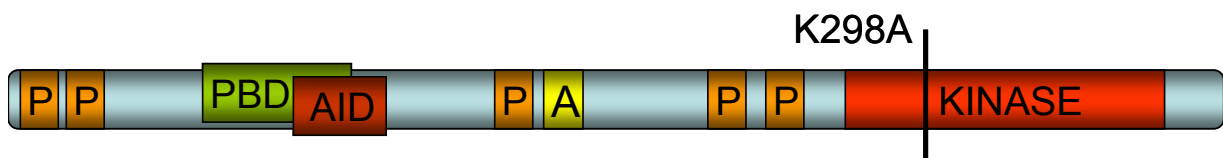


Abb. 23: Schematische Darstellung der Kinase-inaktiven Mutante für PAK1. **P:** Prolin-reiche Domäne. **PBD:** p21-bindende Domäne. **AID:** autoinhibitorische Domäne. **A:** azidische Domäne. **K298A:** Ort der Punktmutation. **Kinase:** Ort der Kinase-Domäne.

Nach Transfektion der PAK1 Mutante und einstündiger Stimulation mit TRITC-Dextran zeigte sich in der mikroskopischen Auswertung eine deutliche Reduktion der WAVE1-Vesikel auf 52,94 % \pm 1,80 %. Die Zellzahl mit Dextran-Vesikeln konnte auf 77,55 % \pm 3,82 % gemindert werden.

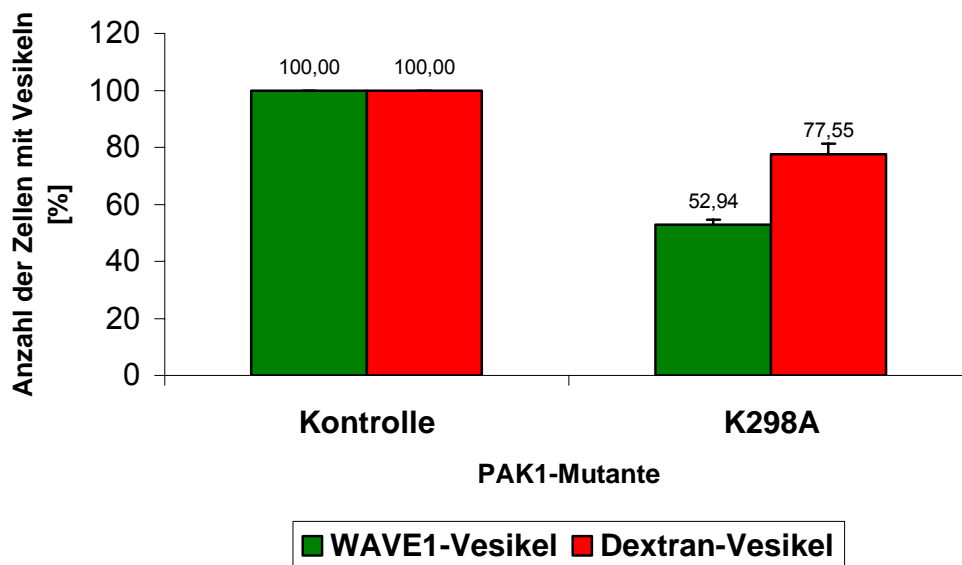


Abb. 24: Balkendiagrammdarstellung der Zellen mit WAVE1- bzw. Dextran-Vesikeln nach Transfektion der Kinase-inaktiven Mutante in primäre humane Makrophagen. Die Makrophagen wurden nach Transfektion für 1 h mit Dextran zur Ausbildung von Vesikeln inkubiert. TRITC-Dextran konnte direkt nachgewiesen werden, WAVE1 wurde durch einen anti-WAVE1 Antikörper detektiert. Die Kontrolle repräsentiert 100 % für die Anzahl der Zellen mit Vesikeln in nicht transfizierten Proben. Für jeden Wert wurden je 30 injizierte Zellen in drei verschiedenen Experimenten gezählt (n=3). Jeder Balken stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung dar.

IV.7. Modulation von WAVE1

IV.7.1. Einfluss der MAP Kinase auf WAVE1

Wie bereits unter Punkt I.4. Interaktionspartner von WAVE1 beschrieben wird die sog. *mitogen activated protein kinase* (MAPK) durch verschiedene externe Stimuli aktiviert. Die MAPK selbst wiederum reguliert zahlreiche zelluläre Prozesse durch die Modulation verschiedener Proteine. Als solches Effektorprotein fungiert WAVE1, das durch die MAPK phosphoryliert werden kann (Miki *et al.*, 1999).

Um eine mögliche Modulation von WAVE1 durch die MAPK zu zeigen, wurde zunächst versucht, die beschriebene Hyperphosphorylierung von WAVE1 nachzuweisen. Im *western blot*

wurde Zelllysate einmal mit und einmal ohne Serum als Kontrolle aufgetragen, da im Serum evtl. Faktoren enthalten sind, die zur Stimulation der MAPK führen können. Ein sog. *mobility shift* als Zeichen einer Phosphorylierung wurde nicht beobachtet. Aus diesem Grund ist auch kein Unterschied im Gegensatz zur Kontrolle bei den Banden zu sehen, bei denen Zelllysate aufgetragen wurde, deren Zellen zusätzlich mit dem MAPK-Inhibitor PD98059 behandelt wurden.

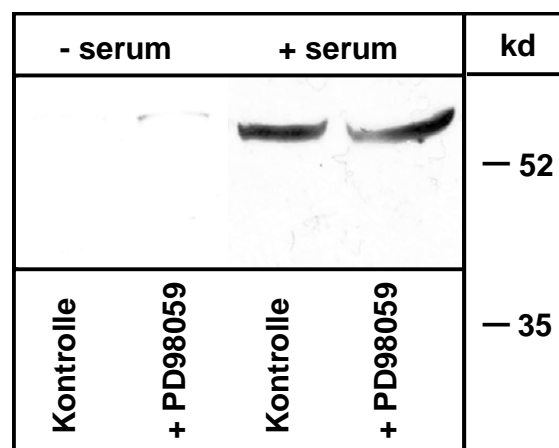


Abb. 25: Darstellung eines *Western Blots* zum Nachweis einer Phosphorylierung von WAVE1 durch die MAPK. Zelllysate wurde einmal mit und einmal ohne Serum als Kontrolle aufgetragen. Ein *mobility shift* als Zeichen einer Phosphorylierung wurde nicht beobachtet. Aus diesem Grund ist auch kein Unterschied im Gegensatz zur Kontrolle bei den Banden zu sehen, bei denen Zelllysate aufgetragen wurden, deren Zellen zusätzlich mit dem MAPK-Inhibitor PD98059 behandelt wurden.

IV.7.2. Inhibition der MAP Kinase führt zu Reduktion der Vesikel-Bildung

Die Aktivierung der MAPK erfolgt Rac-abhängig durch PAK1 (Frost *et al.*, 1996; Frost *et al.*, 1997; Übersicht bei Bokoch, 2003). Miki *et al.*, 1999, konnten zeigen, dass die MAPK wiederum WAVE1 phosphoryliert.

Die MAPK lässt sich durch spezifische Inhibitoren wie PD98059 inhibieren. Es wurde untersucht, ob die Blockierung der MAPK Funktion einen Einfluss auf die Bildung von WAVE1- und Dextran-Vesikeln hat.

Dazu wurden primäre humane Makrophagen mit PD98059 in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h inkubiert, 1h mit TRITC-Dextran stimuliert und gegen WAVE1 gefärbt.

In der mikroskopischen Auswertung ergab sich eine deutliche Konzentrations-Abhängigkeit. Die Anzahl der Zellen mit WAVE1-Vesikeln konnte auf 12,18 % \pm 2,14 %, die Zellzahl mit Dextran-Vesikeln auf 10,47 % \pm 7,54 % reduziert werden.

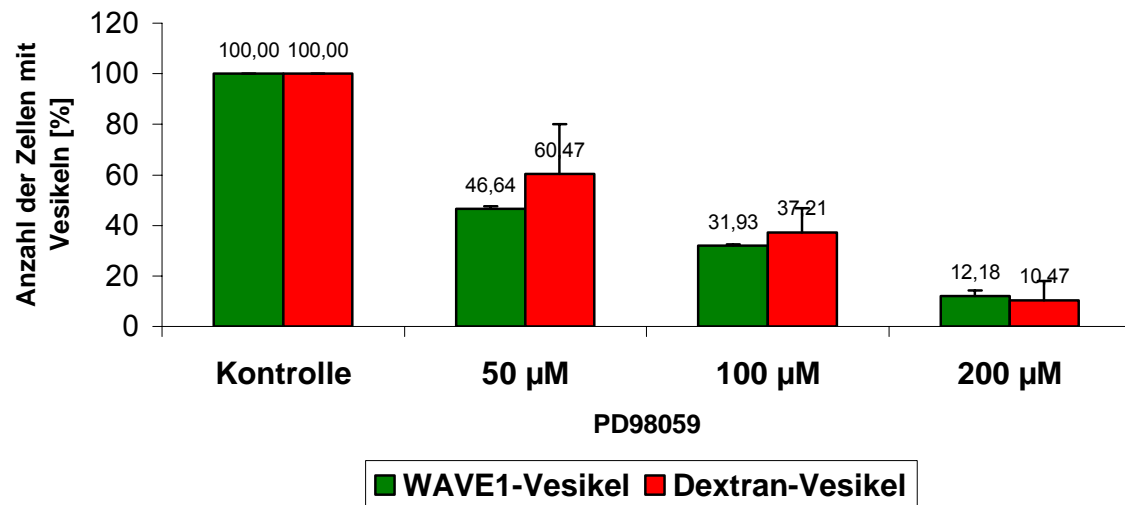


Abb. 26: Balkendiagrammdarstellung der Zellen mit WAVE1- bzw. Dextran-Vesikeln nach Behandlung mit dem MAPK-Inhibitor PD98059 in primären humanen Makrophagen. Die Makrophagen wurden 1 h in unterschiedlichen Konzentrationen mit PD98059 behandelt und anschließend für 1 h mit Dextran inkubiert. TRITC-Dextran konnte direkt nachgewiesen werden, WAVE1 wurde durch einen anti-WAVE1 Antikörper detektiert. Die Kontrolle repräsentiert 100 % für die Anzahl der Zellen mit Vesikeln in nicht behandelten Proben. Für jeden Wert wurden je 30 injizierte Zellen in drei verschiedenen Experimenten gezählt (n=3). Jeder Balken stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung dar.

Zusammengefasst sagen diese Ergebnisse folgendes aus:

1. Eine direkte Phosphorylierung von WAVE1 durch die MAPK konnte nicht gezeigt werden.
2. Auch wenn keine direkte Interaktion zwischen WAVE1 und der MAPK gezeigt wurde, hat die MAPK-Aktivität dennoch Einfluss auf die Bildung von WAVE1- und Dextran-Vesikeln.

V. DISKUSSION

V.1. Intrazelluläre Lokalisation von WAVE

Für die WAVE-Isoformen ist eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung beschrieben. WAVE1 findet sich entlang der Zellfront, an Lamellipodien und *membrane ruffles*. WAVE2 und WAVE3 lokalisieren an *microspikes* bzw. an den Spitzen elongierender Filopodien an der Zellfront (Nozumi *et al.*, 2002). In Abhängigkeit vom Aktivierungszustand können WAVE-Proteine auch in primären humanen Makrophagen unterschiedlich lokalisieren. Dieser Arbeit vorausgehend wurde erstmals eine vesikuläre Lokalisation von WAVE beobachtet (Dissertation Schell, 2003). Dabei wurde jedoch ein gegen alle drei WAVE-Proteine gerichteter Antikörper benutzt. Die vesikuläre Verteilung konnte daher keiner bestimmten WAVE-Isoform zugesprochen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die subzelluläre Verteilung der verschiedenen WAVE-Isoformen in fixierten primären humanen Makrophagen und J774-Makrophagen charakterisiert. Durch Immunfluoreszenzfärbungen konnte erstmals gezeigt werden, dass WAVE1 in Makrophagen an vesikulären Strukturen lokalisiert. Dies war besonders deutlich in spontan aktivierten Makrophagen, wie sie in jeder Zellpopulation vorkommen. Vesikuläre Akkumulationen von WAVE2 waren weniger stark ausgeprägt. Dies galt sowohl für ruhende Zellen als auch für aktivierte Makrophagen nach Stimulation, bei denen ein migratorischer Phänotyp induziert wurde.

WAVE3 konnte zum Zeitpunkt der Experimente nicht auf vesikuläre Akkumulation hin untersucht werden, da kein spezifischer, für die Immunfluoreszenz geeigneter Antikörper zur Verfügung stand.

Im Anschluss an die Färbungen wurden Expressionsversuche mit GFP-fusioniertem WAVE durchgeführt.

Mit WAVE1 als GFP-Fusionsprotein ließ sich subzelluläre Lokalisation an Vesikeln bestätigen. Sie war zudem deutlicher erkennbar als in der Färbung.

Eine Überexpression von WAVE2-GFP führte hingegen zu keiner gesteigerten Akkumulation von WAVE2 an vesikulären Strukturen.

Die Klonierung eines WAVE3-GFP Konstruktes war aufgrund technischer Probleme nicht möglich.

Die im Rahmen der Dissertation von B. Schell, 2003, gezeigte Lokalisation von WAVE an vesikulären Strukturen konnte somit der Isoform WAVE1 zugeordnet werden, wenn auch eine

mögliche Beteiligung von WAVE 3 nicht ausgeschlossen werden konnte. Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Experimente auf WAVE1 fokussiert.

V.2. Charakterisierung von WAVE1-Vesikeln

Die beschriebenen Vesikel wurden sowohl in ruhenden Zellen als auch in Makrophagen mit migratorischem Phänotyp beobachtet. Durch qualitative Beobachtung wurde festgestellt, dass die Vesikel in migratorischen Zellen deutlicher ausgeprägt sind. Daher wurde versucht, diesen Phänotyp durch die Behandlung mit chemotaktiven Stimuli zu induzieren. Durch Substanzen wie fMLP und LPS war es möglich den Prozentsatz von Zellen mit migratorischem Phänotyp deutlich zu steigern und die Bildung von WAVE1-Vesikeln um bis zu ca. 31% zu erhöhen. Durch diese Experimente konnte WAVE1 an vesikulären Strukturen lokalisiert werden. Die Funktion dieser Vesikel war allerdings ungeklärt. Neben der Induktion von Vesikeln durch chemoattraktive Substanzen entstehen Vesikel auch bei der Endozytose im Rahmen der Phagozytose und Pinozytose. Daher wurde im Folgenden eine mögliche Rolle von WAVE bei der Vesikel-Regulation im Rahmen von Endozytose-Vorgängen untersucht.

Im Rahmen der Endozytose werden Phagozytose und Pinozytose unterschieden. Um die Frage zu beantworten, welcher dieser beiden Vorgänge zu WAVE1-Akkumulation an Vesikeln führt sowie zur Identifizierung der Vesikel, wurden für die jeweiligen endozytotischen Prozesse spezifische Ansätze gewählt.

Bei der Phagozytose handelt es sich um die Aktin-abhängige Internalisierung von Partikeln $> 0,5 \mu\text{m}$. Zur Simulation dieses Vorgangs wurde ein Phagozytose-Assay für primäre humane Makrophagen gewählt, bei dem die Zellen durch Aufzentrifugieren von *latex beads* zur Phagozytose angeregt wurden. Bei diesem Prozess werden von der Zelle Aktin-reiche Strukturen, sog. *phagocytic cups*, um den aufzunehmenden Partikel erzeugt. Mit diesem Modell konnte in den durchgeführten Experimenten allerdings nur eine geringgradig gesteigerte Bildung von WAVE1-Vesikeln beobachtet werden. Desweiteren konnten keine deutlichen Assoziationen zwischen WAVE1 und den entstandenen *phagocytic cups* beobachtet werden. Die *phagocytic cups* entsprachen auch nicht den gesuchten vesikulären Strukturen. Aus diesem Grund standen Phagozytose und *phagocytic cups* nicht im Fokus der weiteren Arbeit.

Wie zuvor beschrieben gehört zur Endozytose neben der Phagozytose auch die Pinozytose. Bei der Makropinozytose handelt es sich um die Ausbildung von $> 0,5 - 5 \mu\text{m}$ großer Vesikel. Zur

Induktion der Makropinozytose wurden daher Substanzen wie fluoreszenzmarkierte Dextrane und LysoTracker verwendet. Beide Substanzen führten zu einer gesteigerten Ausbildung von Vesikeln. Durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Dextrane war es möglich, Kollokalisierung von WAVE1- und Dextran-Vesikeln zu zeigen. Durch die Verwendung von LysoTracker war es möglich, diese Vesikel dem endozytotischen Pathway zuzuordnen (B. Schell, 2003). Die Kollokalisierung von WAVE1- und Dextran-Vesikeln war ca. 30 - 60 min nach Zugabe des endozytotischen Markers sichtbar. Durch die Anfärbung saurer Kompartimente mittels LysoTracker konnten diese Vesikel dem späten endosomalen bzw. lysosomalen Weg zugeordnet werden. Es bleibt jedoch die Frage offen, ob die durch pinozytotische Stimuli induzierten WAVE1-Vesikel erst *de novo* entstehen oder WAVE1 an bereits existente Vesikel rekrutiert wird. Für die Möglichkeit bereits existierender Vesikel spricht, dass sich in unstimulierten Zellen WAVE1-Vesikel zu ca. 35 % feststellen lassen. Für die Möglichkeit einer *de novo* Bildung spricht, dass die WAVE1-Vesikel durch die Verwendung chemotaktiver Stimuli in 50 % und durch die Zugabe pinozytotischer Stimuli in ca. 71 % finden.

Zellteilung, Adhäsion, Polarisation, Motilität und Phagozytose erfordern eine stetige Änderung der Zellform. Dabei spielt das Aktin-Zytoskelett eine entscheidende Rolle (Übersicht bei Remedios *et al.*, 2002). Aus diesem Grund wurde der Einfluss des Aktin-Zytoskeletts auf die WAVE1-Vesikel näher untersucht. Durch das Pilzgift Cytochalasin D lässt sich das Aktin-Zytoskelett manipulieren und somit die Dynamik des gesamten Netzwerkes zerstören (Mousa *et al.*, 1978). Die Endozytose von extrazellulärem Dextran wurde wie erwartet durch Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts inhibiert. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung der WAVE1-Vesikel nicht an die Aufnahme eines Induktors wie Dextran gekoppelt ist. Dies ist ein sehr überraschendes Resultat, da die Entstehung endosomaler Kompartimente wie z.B. Endosomen oder Makropinosomen von Aktin abhängig ist (Swanson, 1989; Racoosin und Swanson, 1989). Die Bildung der WAVE1-Vesikel scheint demnach zwar durch endozytotische Stimuli induziert zu werden, jedoch nicht von deren Internalisierung abhängig zu sein.

Neben Aktin kommen in der Zelle v.a. Mikrotubuli eine wichtige Bedeutung zu. Mikrotubuli dienen als „Schienen“, an denen entlang Vesikel durch das Zytoplasma in anterograder ebenso wie in retrograder Weise transportiert werden können. Ebenso erfolgt der Transport von *early* zu *late endosomes* entlang von Mikrotubuli (Apodaca, 2001; Jordens *et al.*, 2001). In Experimenten mit Nocodazol, das zur Destruktion des Mikrotubuli-Netzwerkes führt, wurde in den Endozytoseweg eingegriffen. Dabei zeigte sich, dass WAVE1-Vesikel unabhängig von einem

intakten Mikrotubuli-Netzwerk gebildet werden. Im Gegensatz dazu wurde durch die Zerstörung der Mikrotubuli der Transport von WAVE1- und Dextran-Vesikeln wie erwartet inhibiert.

V.3. Rolle der verschiedenen WAVE1-Domänen

Zur Untersuchung der Frage, welche Rolle die einzelnen WAVE1-Domänen bezüglich der Bildung der WAVE1- als auch der Dextran-Vesikel spielen, wurden diverse Konstrukte einzelner Domänen als GST-Fusionsproteine hergestellt. Diese Konstrukte wurden in primäre humane Makrophagen mikroinjiziert. Diese Makrophagen wurden dann mit Dextran stimuliert. Dabei konnte Folgendes beobachtet werden:

Die A-Domäne von WAVE1 hatte weder Einfluss auf die Bildung der WAVE1-Vesikel noch auf die Bildung der Dextran-Vesikel.

Das längere WA-Konstrukt führte ebenfalls zu keiner Reduktion der WAVE1-Vesikelbildung. Allerdings ließ sich die Anzahl der Dextran-Vesikel durch Mikroinjektion mit WAVE-WA signifikant mindern. Dieses Ergebnis lässt sich folgendermaßen erklären. WAVE1-CA wurde bereits als die Arp2/3-Komplex bindende Domäne charakterisiert (Hüfner *et al.*, 2002). C steht für *Connecting*-Domäne und stellt einen kleinen C-terminalen Teil der W-Domäne. WAVE1-W alleine ist im Gegensatz zur entsprechenden Region im WASp-Protein nicht in der Lage, Arp2/3-Komplex zu aktivieren (Sasaki *et al.*, 2000). Die W- und A-Domäne von WAVE zusammen aber gelten als die minimal nötige Region, die über die Bindung von Arp2/3-Komplex zu Aktin-Nukleation führt (Übersicht bei Miki und Takenawa, 2003). Diese Erkenntnisse decken sich mit den in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnissen. Die Dextran-Aufnahme ist von der Dynamik des Aktin-Zytoskelettes abhängig. Diese wird durch die Arp2/3-abhängige Aktin-Nukleation reguliert. Eine Inhibition der Aktin-Nukleation wurde durch die Mikroinjektion der WA-Domäne von WAVE erreicht. Andererseits kann die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts durch pharmakologische Stimuli wie Cytochalasin D inhibiert werden. Diese Daten konnten bereits mit einem unabhängigen Versuch bestätigt werden, in dem durch die Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts die Dextran-Aufnahme inhibiert wurde (siehe Punkt V.2. Charakterisierung von WAVE1-Vesikeln).

Der Einfluss der Prolin-reichen Domäne auf die Bildung von WAVE1-Vesikeln konnte nicht untersucht werden. Die uns zur Verfügung stehenden WAVE1-Antikörper hatten einen Teil der Prolin-reichen Domäne von WAVE1 als Epitop. Daher war es nicht möglich gleichzeitig

WAVE1-Vesikel und injizierte Zellen darzustellen. Allerdings konnte durch Mikroinjektion der P-Domäne eine signifikante Reduktion der Dextran-Vesikel erreicht werden. Die Prolin-reiche Domäne von WAVE1 könnte dabei als Proteininteraktionsstelle fungieren. Wie bei den besser untersuchten Proteinen WASp und N-WASP könnte hier ebenfalls eine Interaktion mit dem SH2/SH3-Adapterprotein NCK-1 erfolgen (Rivero-Lezcano *et al.*, 1995). Dies könnte einen möglichen Schritt in einer Signalkaskade WAVE1-positiver Vesikel darstellen. (siehe Punkt V.4.).

V.4. Regulation von WAVE1

Proteine der WASp-Familie (WASp, N-WASP und WAVE1-3) werden durch GTPasen wie Cdc42 und Rac reguliert und haben dadurch Einfluss auf die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts. Interaktionen zwischen WASp / N-WASP und Cdc42 wurden bereits beschrieben (Symons *et al.*, 1996; Miki *et al.*, 1998; Aspenström *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurden Effektorproteine der GTPase Rac wie PAK1, NCK-1 und die MAPK bezüglich ihrer Interaktions-Effekte mit WAVE1 betrachtet (siehe I.5.).

NCK-1 ist ein Effektorprotein von Rac, das eine wichtige Verbindung zwischen extrazellulären Signalen und dem Zytoskelett darstellt, sowie ein Adapterprotein von PAK1 (siehe I.5.). In der Immunfluoreszenz konnte die Bildung von WAVE1-Vesikeln durch Stimulation mit fMLP um bis zu 44,21 % gesteigert werden. In diesen Zellpopulationen primärer humaner Makrophagen kolokalisierte NCK-1 mit WAVE1-Vesikeln zu 27 % und mit Dextran-Vesikeln zu 23 %. Aus diesem Grund wurde der mögliche Einfluss von NCK auf die Vesikelbildung genauer charakterisiert.

Mittels verschiedener funktional eingeschränkter NCK-1-Mutanten konnte die Kolokalisation von NCK-1 mit WAVE1-Vesikeln auf bis zu 43 % und mit Dextran-Vesikeln auf 11 % reduziert werden. Vor allem Transfektionen von Mutanten der drei SH3-Domänen zeigten eine sehr deutliche Reduktion der Dextran-Vesikel. Dies steht im Einklang mit Erkenntnissen, dass alle drei SH3-Domänen von NCK für die lokale Aktin-Polymerisierung *in vivo* erforderlich sind (Rivera *et al.*, 2004). Zusammengenommen weisen die Erkenntnisse aus den Immunfluoreszenz- und Transfektionsversuchen daher deutlich auf eine Verbindung zwischen NCK und WAVE1 hin.

PAK1 stellt ein weiteres Effektorprotein von Rac dar (siehe Punkt I.4. Interaktionspartner von WAVE1). Unter Punkt IV.6.3. PAK1 wurde die Kolokalisierung von PAK1 mit WAVE1-Vesikeln zu 23 % und mit Dextran-Vesikeln zu 16 % der in der Immunfluoreszenz untersuchten Zellen beschrieben. Zur näheren Charakterisierung des möglichen Einflusses von PAK1 bezüglich der Bildung von WAVE1-Vesikeln wurde eine Kinase-inaktive Mutante von PAK1 eingesetzt. Transfektionen der Kinase-inaktive Mutante von PAK1 führten zu einer Reduktion der Kolokalisation von PAK1 mit WAVE1-Vesikeln um 47 % und mit Dextran-Vesikeln um 22 %. Dies legt den Schluss nahe, dass PAK1 eine wichtige Rolle sowohl als Interaktionspartner als auch bei der Bildung von WAVE1-Vesikeln einnimmt.

Als weiteres Effektorprotein von WAVE1 und wichtiger Regulator zellulärer Prozesse gilt die MAPK (siehe I.5.; Miki *et al.*, 1999). Demnach erfolgt durch die MAPK eine Phosphorylierung von WAVE1 (Miki *et al.*, 1999). Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht belegt werden. Die Aktivität der MAPK lässt sich durch spezifische Inhibitoren wie PD98059 unterbinden. Durch die Verwendung dieses Inhibitors konnte die Bildung von WAVE1-Vesikeln auf 12 % und von Dextran-Vesikeln auf 10 % reduziert werden. Dies weist deutlich auf eine Beteiligung der MAPK an der Regulation der WAVE1-Vesikel hin.

Im Folgenden soll ein hypothetischer Signalweg dargestellt werden:

Rac reguliert die Aufnahme von Dextran in die Zelle. Aktiviertes Rac führt hierbei zur Rekrutierung und Aktivierung von Effektorproteinen wie PAK1 und NCK-1 (Zenke *et al.*, 1999). Aktiviertes NCK-1 kann WAVE1 binden und dieses seinerseits an die Plasmamembran rekrutieren. Dort könnten bspw. an der Zellfront WAVE1-abhängig *membrane ruffles* entstehen, was möglicherweise durch einen positiven *feedback loop* die Aufnahme von Dextran erleichtert. Aktiviertes PAK1 dagegen aktiviert die MAPK (Übersicht bei Bokoch, 2003) und beeinflusst WAVE1 (Stokoe *et al.*, 1992). Durch die Aktivierung von WAVE1 durch NCK-1, PAK1 und MAPK erfolgt die Bildung von WAVE1-Vesikeln. Diese WAVE1-Vesikel kolokalisieren im Laufe des endo-lysosomalen *Pathways* mit den internalisierten Dextran-Vesikeln und werden schließlich wahrscheinlich Lysosomen zur Degradierung zugeführt.

Ob nun NCK-1 direkt WAVE1 reguliert, bspw. durch eine Interaktion der SH3-Domänen mit der Prolin-reichen Domänen von WAVE1 (Li *et al.*, 2001; Buday *et al.*, 2002), ob NCK-1 mit seinen SH3-Domänen an die Prolin-reiche Domäne von PAK1 bindet (Li *et al.*, 2001; Buday *et al.*, 2002; Galisteo *et al.*, 1996; Bokoch *et al.*, 1996), ob die MAPK durch direkte oder indirekte

Phosphorylierung oder gar Phosphorylierungs-unabhängig WAVE1 aktiviert (Stokoe *et al.*, 1992), ob mögliche andere Interaktionspartner auf WAVE1 Einfluss nehmen, wird Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln konnte nicht unterschieden werden, ob die genannte Beeinflussung der WAVE1-Vesikel auf eine fehlerhafte Neubildung der Vesikel oder aber auf die unterbundene Rekrutierung von WAVE1 an bereits bestehende Vesikel zurückzuführen ist. Dies muss mit unabhängigen Vesikelmarkern (evtl. PAK-1) untersucht werden.

Modellhaft könnte das Zusammenwirken von Rac, NCK-1, PAK1, MAPK und WAVE1 folgendermaßen aussehen:

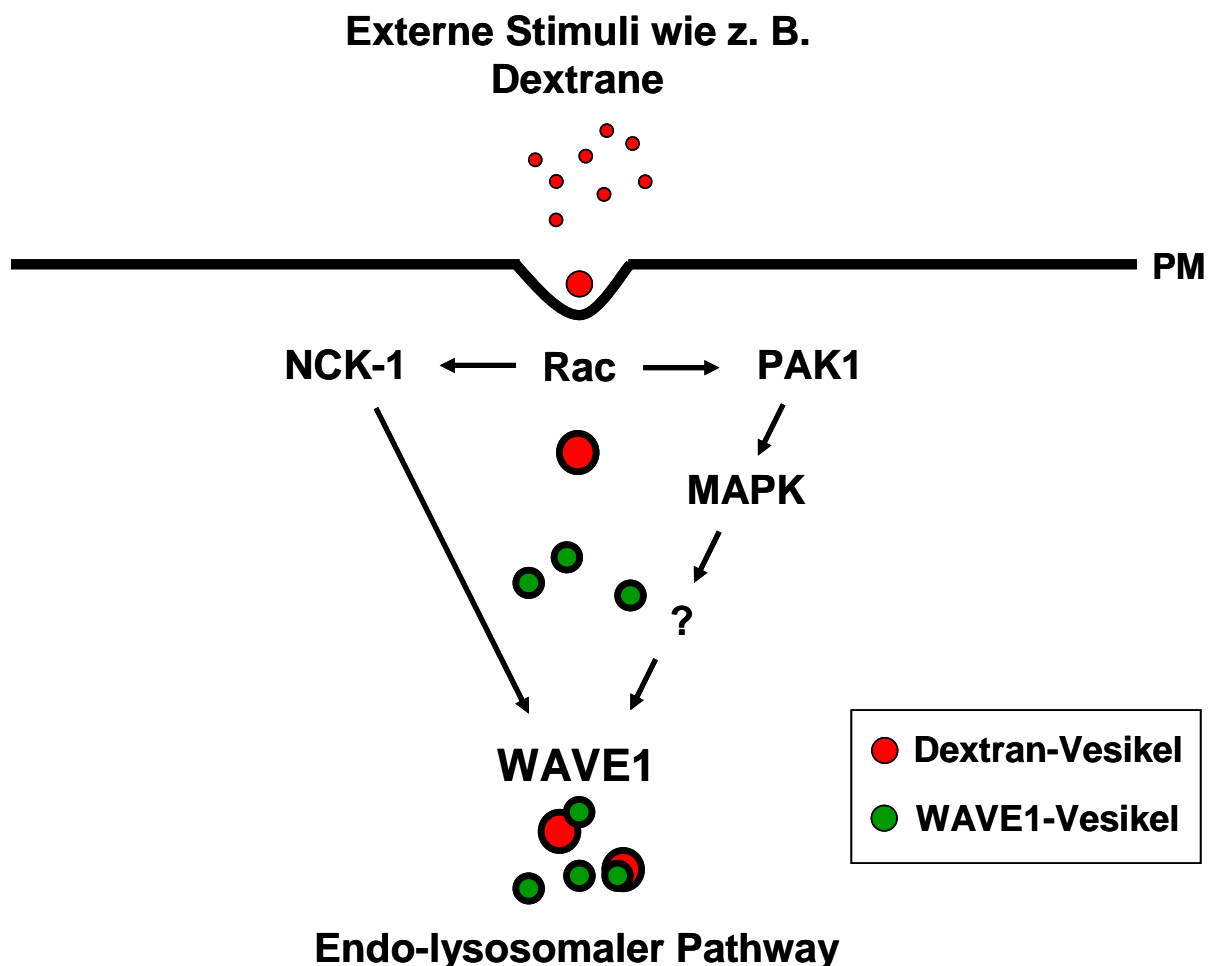


Abb. 27: Schematische Darstellung einer möglichen Aktivierung von WAVE1

Rac reguliert die Aufnahme von Dextran in die Zelle. Aktiviertes Rac führt anschließend zur Rekrutierung und Aktivierung von Effektorproteinen wie PAK1 und NCK-1. Aktiviertes NCK-1 kann WAVE1 binden und dieses seinerseits an die Plasmamembran rekrutieren. Dort könnten bspw. an der Zellfront WAVE1-

abhängig *membrane ruffles* entstehen, was möglicherweise durch einen positiven *feedback loop* die Aufnahme von Dextran erleichtert. Aktiviertes PAK1 dagegen aktiviert die MAPK und beeinflusst WAVE1. Durch die Aktivierung von WAVE1 sowohl durch NCK-1 als auch durch PAK1 erfolgt die Bildung von WAVE1-Vesikeln. Diese WAVE1-Vesikel kolokalisieren im Laufe des endo-lysosomalen *Pathway* mit den internalisierten Dextran-Vesikeln und werden wahrscheinlich Lysosomen zur Degradierung zugeführt. **Grün:** WAVE1-Vesikel; **Rot:** Dextran-Vesikel; **PM:** Plasmamembran

V.5. Ausblick

Ziel zukünftiger Untersuchungen an WAVE1-Vesikeln wird vor allem die Aufklärung ihrer Funktion als auch der genauen Regulation sein. Zell-Beobachtungen mittels *Live cell imaging* könnten dabei Hinweise liefern, zu welchem Zeitpunkt WAVE1 an Vesikel rekrutiert wird, ob dies bspw. bereits für die Internalisierung von endozytotischem Material nötig ist oder erst später nach Abschnürung des Vesikels von der Membran. Eine interessante Methode zur Untersuchung dieser Frage wäre RNAi zum gezielten *knock-down* von WAVE1.

Interessant ist auch die Frage, welche Bedeutung den einzelnen WAVE1-Domänen bezüglich der subzellulären Lokalisation zukommt und ob sie einen Einfluss auf die Lokalisation von WAVE1 an vesikulären Strukturen haben.

Wie bereits dargelegt, scheint die MAPK von Bedeutung in der WAVE1-Regulation zu sein. Ob die Aktivierung der MAPK zu einer direkten oder indirekten Phosphorylierung von WAVE1 führt und welche unmittelbaren Auswirkungen dies hat, wird Bestandteil weiterer Untersuchungen sein.

Zur Vervollständigung des vorgestellten Modells einer Signaltransduktionskaskade von WAVE1 gilt es eine Reihe weitere Interaktionen genauer zu verstehen. Gibt es direkte Aktivierungsmechanismen von WAVE1 über PAK1 und NCK-1? Sind weitere, bisher unbekannte Interaktionspartner dabei notwendig? Die Durchführung eines *Yeast-Two-Hybrid-Screen* wäre eine Methode, solche Interaktionspartner zu identifizieren. Möglicherweise spielt auch der WAVE1-Abi1-Nap-PIR121 Komplex in seiner Gesamtheit eine größere Rolle.

Ob WAVE1 an bereits bestehende Vesikel rekrutiert wird oder aber für die Neubildung von Vesikeln verantwortlich ist, bleibt weiter fraglich. Mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln konnte nicht differenziert werden, ob die Beeinflussung der WAVE1-Vesikel auf eine fehlerhafte Neubildung der Vesikel oder aber auf die unterbundene Rekrutierung von WAVE1 an bereits bestehende Vesikel zurückzuführen ist. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wird ein unabhängiger Marker benötigt (evtl. PAK1).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Makrophagen spielen innerhalb des zellulären unspezifischen Abwehrsystems eine wesentliche Rolle. Für die Ausübung ihrer Funktion sind dynamische Änderungen des Zytoskeletts sowie Aufnahmeprozesse wie Phago- und Pinozytose von entscheidender Bedeutung. Diese Prozesse werden u. a. von Rho-GTPasen und ihren Effektorproteinen reguliert. Zu diesen Effektorproteinen gehören die Proteine der WASp-Familie, die aus WASp, N-WASP und den drei WAVE-Isoformen besteht.

In unserer Arbeitsgruppe konnten mittels eines pan-WAVE-Antikörpers Akkumulationen von WAVE an vesikulären Strukturen gezeigt werden (Dissertation B. Schell, 2003). Über eine Beteiligung von WAVE an der Regulation von Vesikeln ist jedoch bisher nichts bekannt. Deshalb beschäftigt sich diese Arbeit mit der Rolle und Funktion von WAVE im Rahmen der Vesikelbildung in Makrophagen.

Mittels Färbungen gegen die verschiedenen WAVE-Isoformen konnte erstmals in J774- und primären Makrophagen gezeigt werden, dass WAVE1 an vesikulären Strukturen lokalisiert. Überexpressionen von WAVE1- und WAVE2-GFP bestätigten dieses Ergebnis. Darüber hinaus war es möglich, WAVE1 nach Stimulierung der Makrophagen durch chemoattraktive Stoffe wie fMLP und LPS an Vesikeln zu lokalisieren.

Im Rahmen ihrer Rolle als Fresszellen sind Makrophagen insbesondere zu Phagozytose und Pinozytose befähigt. Da Vesikel gerade bei derartigen Prozessen auftreten, wurde untersucht, ob im Rahmen endozytotischer Vorgänge auch WAVE1-Vesikel vorkommen. Da es sich bei der Phagozytose um die Aktin-abhängige Internalisierung von Partikeln $> 0,5 \mu\text{m}$ handelt, wurde ein Phagozytose-Assay mit *latex-beads* gewählt. Dabei werden von der Zelle Aktin-reiche Strukturen, sog. *phagocytic cups*, um den aufzunehmenden Partikel erzeugt. In den durchgeführten Experimenten wurde jedoch nur eine geringgradig gesteigerte Bildung von WAVE1-Vesikeln beobachtet. Eine Assoziation zwischen WAVE1 und den entstandenen *phagocytic cups* wurde dabei nicht festgestellt. Da die *phagocytic cups* auch nicht den gesuchten vesikulären Strukturen entsprachen, standen Phagozytose und *phagocytic cups* nicht im Fokus der weiteren Arbeit.

Zur Stimulation der Pinozytose wurden sog. *fluid phase marker* wie z. B. Dextrane und Lysotracker verwendet. Damit konnte gezeigt werden, dass WAVE1-haltige Vesikel mit

fluoreszenzmarkierten Dextranen in pinozytotischen Vesikeln kolokalisieren. Durch Verwendung von LysoTracker konnten die kolokalisierenden Vesikel sauren Kompartimenten im endosomal-lysosomalen *Pathway*, am ehesten Lysosomen entsprechend, zugeordnet werden.

Endozytotische Vorgänge sind hochregulierte Prozesse. Da sich Makropinozytose sowie der anschließende Vesikeltransport entlang von Filamenten u. a. durch Manipulationen des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts inhibieren lässt, wurde der Einfluss des Aktin- bzw. Mikrotubuli-Zytoskeletts auf die WAVE1-Vesikel Bildung durch die Verwendung von Cytochalasin D und Nocodazol untersucht. Die Bildung von WAVE1-Vesikeln zeigte sich dabei unabhängig von der Manipulation sowohl des Aktin-Zytoskeletts als auch des Mikrotubuli-Netzwerkes. Im Gegensatz dazu steht die Bildung von Dextran-Vesikeln: diese konnte durch Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts mittels Cytochalasin D reduziert werden. Damit konnte die in der Literatur beschriebene Aktin-Abhängigkeit von Dextran-Vesikeln bestätigt werden. Desweiteren scheint, wie erwartet, durch Zerstörung des Mikrotubuli-Netzwerkes mittels Nocodazol nicht die Aufnahme, sondern der intrazelluläre Transport der Dextran-Vesikel entlang von Filamenten inhibiert zu werden.

WAVE1 stellt ein Multidomänenprotein dar. Um die Rolle der einzelnen Domänen von WAVE1 in Bezug auf die Bildung von WAVE1- und Dextran-Vesikel zu analysieren, wurden verschiedene Mutanten von WAVE1 als GST-Fusionsproteine in Makrophagen mikroinjiziert. Einen Effekt bezüglich der Bildung von Dextran-Vesikeln konnte mit der WA-Domäne von WAVE1 gezeigt werden. Dieses Resultat stimmt mit der zuvor beschriebenen Aktin-Abhängigkeit der Dextran-Vesikel überein. Die Konstrukte WAVE1-P ebenso wie WAVE1-PWA führten zu einer signifikanten Reduktion der Bildung von Dextran-Vesikeln. Dies lässt den Schluss zu, dass die Prolin-reiche Region eine essentielle Rolle in der Regulation sowohl von WAVE1- als auch Dextran-Vesikeln spielt.

Zur Beschreibung eines möglichen Signalweges, der WAVE1- und Dextran-Vesikel beeinflusst, wurde nach Interaktionspartnern von WAVE1 gesucht. Mit NCK-1 und PAK-1 konnten in der Immunfluoreszenz zwei mit WAVE1 kolokalisierende Proteine gefunden werden. Transfektionsversuche lassen den Schluss zu, dass PAK1 die Bildung von WAVE1-Vesikeln beeinflusst. Weitere Experimente mit verschiedenen Mutanten von NCK-1 geben Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen NCK-1 und WAVE1. Dabei scheinen vor allem die drei SH3-Domänen von NCK-1 einen Einfluss auf die Bildung der Dextran-Vesikel zu besitzen.

WAVE1 wird durch die sog. *mitogen activated protein kinase* (MAPK) beeinflusst (Miki *et al.*, 1999). Eine Phosphorylierung von WAVE1 durch die MAPK konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Jedoch konnte durch Verwendung eines Inhibitors der MAPK ein deutlicher Einfluss sowohl auf die Bildung der WAVE1-Vesikel als auch auf die Bildung der Dextran-Vesikel gezeigt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die MAPK, ob direkt oder indirekt, eine wichtige Rolle im Rahmen der Bildung von WAVE1- und Dextran-Vesikeln spielt.

Es konnte ein hypothetisches Modell eines Signalweges von WAVE1 erstellt werden:

Phagozytotische Stimuli wie Dextrane aktivieren die GTPase Rac. Dies führt zur Rekrutierung und Aktivierung von Effektorproteinen wie PAK1 und NCK-1. Aktiviertes NCK-1 bindet WAVE1 und kann dieses seinerseits an die Plasmamembran rekrutieren. Dort könnten bspw. an der Zellfront WAVE1-abhängig *membrane ruffles* entstehen. Durch einen möglichen positiven *feedback loop* wird die Aufnahme von Dextran erleichtert. Aktiviertes PAK1 aktiviert die MAPK und beeinflusst WAVE1. Durch die Aktivierung von WAVE1, NCK-1 und PAK1 erfolgt die Bildung von WAVE1-Vesikeln. Diese WAVE1-Vesikel kolokalisieren im Laufe des endo-lysosomalen *Pathway* mit den internalisierten Dextran-Vesikeln und werden wahrscheinlich Lysosomen zur Degradierung zugeführt.

VII. LITERATUR

- Aderem, A. and Underhill, D. M.** (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu.Rev.Immunol.* **17**, 593-623.
- Aderem, A. and Ulevitch, R. J.** (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**, 782-787.
- Aderem, A. A., Wright, S. D., Silverstein, S. C., and Cohn, Z. A.** (1985). Ligated complement receptors do not activate the arachidonic acid cascade in resident peritoneal macrophages. *J.Exp.Med.* **161**, 617-622.
- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T.** (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.* **2**, 675-680.
- Akira, S. and Sato, S.** (2003). Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand.J.Infect.Dis.* **35**, 555-562.
- Allen, P. G.** (2003). Actin filament uncapping localizes to ruffling lamellae and rocketing vesicles. *Nat.Cell Biol.* **5**, 972-979.
- Alpuche-Aranda, C. M., Racoosin, E. L., Swanson, J. A., and Miller, S. I.** (1994). Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J.Exp.Med.* **179**, 601-608.
- Amyere, M., Mettlen, M., Van Der, S. P., Platek, A., Payraastre, B., Veithen, A., and Courtoy, P. J.** (2002). Origin, originality, functions, subversions and molecular signalling of macropinocytosis. *Int.J.Med.Microbiol.* **291**, 487-494.
- Andre, E., Lottspeich, F., Schleicher, M., and Noegel, A.** (1988). Severin, gelsolin, and villin share a homologous sequence in regions presumed to contain F-actin severing domains. *J.Biol.Chem.* **263**, 722-727.
- Apodaca, G.** (2001). Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic.* **2**, 149-159.
- Aqel, N. M., Ball, R. Y., Waldmann, H., and Mitchinson, M. J.** (1984). Monocytic origin of foam cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* **53**, 265-271.
- Arpin, M., Pringault, E., Finidori, J., Garcia, A., Jeltsch, J. M., Vandekerckhove, J., and Louvard, D.** (1988). Sequence of human villin: a large duplicated domain homologous with other actin-severing proteins and a unique small carboxy-terminal domain related to villin specificity. *J.Cell Biol.* **107**, 1759-1766.
- Aspenstrom, P., Lindberg, U., and Hall, A.** (1996). Two GTPases, Cdc42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr.Biol.* **6**, 70-75.

- Aspenstrom, P.** (1999). Effectors for the Rho GTPases. *Curr.Opin.Cell Biol.* **11**, 95-102.
- Aspenstrom, P.** (1999). The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton. *Exp.Cell Res.* **246**, 20-25.
- Ayscough, K. R.** (1998). In vivo functions of actin-binding proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* **10**, 102-111.
- Badolato R, Sozzani S, Malacarne F, Bresciani S, Fiorini M, Borsatti A, Albertini A, Mantovani A, Ugazio AG, Notarangelo LD.** (1998). Monocytes from Wiskott-Aldrich patients display reduced chemotaxis and lack of cell polarization in response to monocyte chemoattractant protein-1 and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J. Immunol.* **161(2)**:1026-33.
- Blagg, S. L., Stewart, M., Sambles, C., and Insall, R. H.** (2003). PIR121 regulates pseudopod dynamics and SCAR activity in Dictyostelium. *Curr.Biol.* **13**, 1480-1487.
- Blott, E. J. and Griffiths, G. M.** (2002). Secretory lysosomes. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **3**, 122-131.
- Blystone, S. D., Graham, I. L., Lindberg, F. P., and Brown, E. J.** (1994). Integrin alpha v beta 3 differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor alpha 5 beta 1. *J.Cell Biol.* **127**, 1129-1137.
- Boes, M., Cerny, J., Massol, R., Op, d. B., Kirchhausen, T., Chen, J., and Ploegh, H. L.** (2002). T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport. *Nature* **418**, 983-988.
- Bokoch, G. M.** (2003). Biology of the p21-activated kinases. *Annu.Rev.Biochem.* **72**, 743-781.
- Buday, L.** (1999). Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins. *Biochim.Biophys.Acta* **1422**, 187-204.
- Buday, L., Wunderlich, L., and Tamas, P.** (2002). The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal.* **14**, 723-731.
- Burtnick, L. D., Koepf, E. K., Grimes, J., Jones, E. Y., Stuart, D. I., McLaughlin, P. J., and Robinson, R. C.** (1997). The crystal structure of plasma gelsolin: implications for actin severing, capping, and nucleation. *Cell* **90**, 661-670.
- Caldwell, J. E., Heiss, S. G., Mermall, V., and Cooper, J. A.** (1989). Effects of CapZ, an actin capping protein of muscle, on the polymerization of actin. *Biochemistry* **28**, 8506-8514.
- Cardelli, J.** (2001). Phagocytosis and macropinocytosis in Dictyostelium: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. *Traffic.* **2**, 311-320.
- Carlier, M. F., Nioche, P., Broutin-L'Hermite, I., Boujemaa, R., Le Clainche, C., Egile, C., Garbay, C., Ducruix, A., Sansonetti, P., and Pantaloni, D.** (2000). GRB2 links signaling to actin assembly by enhancing interaction of neural Wiskott-Aldrich syndrome

- protein (N-WAS) with actin-related protein (ARP2/3) complex. *J.Biol.Chem.* **275**, 21946-21952.
- Carlsson, A. E., Wear, M. A., and Cooper, J. A.** (2004). End versus side branching by Arp2/3 complex. *Biophys.J.* **86**, 1074-1081.
- Caron, E. and Hall, A.** (1998). Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* **282**, 1717-1721.
- Carroll, M. C.** (1998). The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu.Rev.Immunol.* **16**, 545-568.
- Castellano, F., Le Clainche, C., Patin, D., Carlier, M. F., and Chavrier, P.** (2001). A -VASP complex regulates actin polymerization at the plasma membrane. *EMBO J.* **20**, 5603-5614.
- Chen, W. T., Olden, K., Bernard, B. A., and Chu, F. F.** (1984). Expression of transformation-associated protease(s) that degrade fibronectin at cell contact sites. *J.Cell Biol.* **98**, 1546-1555.
- Chimini, G. and Chavrier, P.** (2000). Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat.Cell Biol.* **2**, E191-E196.
- Chow, A., Toomre, D., Garrett, W., and Mellman, I.** (2002). Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature* **418**, 988-994.
- Conner, S. D. and Schmid, S. L.** (2003). Differential requirements for AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *J.Cell Biol.* **162**, 773-779.
- Cossart, P.** (2000). Actin-based motility of pathogens: the Arp2/3 complex is a central player. *Cell Microbiol.* **2**, 195-205.
- Cox, D., Chang, P., Zhang, Q., Reddy, P. G., Bokoch, G. M., and Greenberg, S.** (1997). Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J.Exp.Med.* **186**, 1487-1494.
- Danial, N. N., Gramm, C. F., Scorrano, L., Zhang, C. Y., Krauss, S., Ranger, A. M., Datta, S. R., Greenberg, M. E., Licklider, L. J., Lowell, B. B., Gygi, S. P., and Korsmeyer, S. J.** (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* **424**, 952-956.
- Desjardins, M., Huber, L. A., Parton, R. G., and Griffiths, G.** (1994). Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J.Cell Biol.* **124**, 677-688.
- Devitt, A., Moffatt, O. D., Raykundalia, C., Capra, J. D., Simmons, D. L., and Gregory, C. D.** (1998). Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* **392**, 505-509.

- Diakonova, M., Bokoch, G., and Swanson, J. A.** (2002). Dynamics of cytoskeletal proteins during Fc γ receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *Mol.Biol.Cell* **13**, 402-411.
- dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A., and Nosworthy, N. J.** (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* **83**, 433-473.
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., and Kirschner, M. W.** (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* **418**, 790-793.
- Engqvist-Goldstein, A. E., Kessels, M. M., Chopra, V. S., Hayden, M. R., and Drubin, D. G.** (1999). An actin-binding protein of the Sla2/Huntingtin interacting protein 1 family is a novel component of clathrin-coated pits and vesicles. *J.Cell Biol.* **147**, 1503-1518.
- Fabunmi, R. P., Sukhova, G. K., Sugiyama, S., and Libby, P.** (1998). Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in human atheroma and regulation in lesion-associated cells: a potential protective mechanism in plaque stability. *Circ.Res.* **83**, 270-278.
- Finan, P. M., Soames, C. J., Wilson, L., Nelson, D. L., Stewart, D. M., Truong, O., Hsuan, J. J., and Kellie, S.** (1996). Identification of regions of the Wiskott-Aldrich syndrome protein responsible for association with selected Src homology 3 domains. *J.Biol.Chem.* **271**, 26291-26295.
- Finan, P. M., Hall, A., and Kellie, S.** (1996). Sam68 from an immortalised B-cell line associates with a subset of SH3 domains. *FEBS Lett.* **389**, 141-144.
- Finlay, B. B. and Cossart, P.** (1997). Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* **276**, 718-725.
- Frischknecht, F., Cudmore, S., Moreau, V., Reckmann, I., Rottger, S., and Way, M.** (1999). Tyrosine phosphorylation is required for actin-based motility of vaccinia but not Listeria or Shigella. *Curr.Biol.* **9**, 89-92.
- Fukuoka, M., Suetsugu, S., Miki, H., Fukami, K., Endo, T., and Takenawa, T.** (2001). A novel neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) binding protein, WISH, induces Arp2/3 complex activation independent of Cdc42. *J.Cell Biol.* **152**, 471-482.
- Gerrity, R. G.** (1981). The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am.J.Pathol.* **103**, 191-200.
- Gertler, F. B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J., and Soriano, P.** (1996). Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* **87**, 227-239.
- Ghazizadeh, S., Bolen, J. B., and Fleit, H. B.** (1994). Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc γ RII in monocytic THP-1 cells. *J.Biol.Chem.* **269**, 8878-8884.

- Glenney, J. R., Jr., Kaulfus, P., and Weber, K.** (1981). F actin assembly modulated by villin: Ca⁺⁺-dependent nucleation and capping of the barbed end. *Cell* **24**, 471-480.
- Gu, Y., Xu, Y. C., Wu, R. F., Nwariaku, F. E., Souza, R. F., Flores, S. C., and Terada, L. S.** (2003). p47phox participates in activation of RelA in endothelial cells. *J.Biol.Chem.* **278**, 17210-17217.
- Hackam, D. J., Rotstein, O. D., Schreiber, A., Zhang, W., and Grinstein, S.** (1997). Rho is required for the initiation of calcium signaling and phagocytosis by Fcγ receptors in macrophages. *J.Exp.Med.* **186**, 955-966.
- Hahne, P., Sechi, A., Benesch, S., and Small, J. V.** (2001). Scar/WAVE is localised at the tips of protruding lamellipodia in living cells. *FEBS Lett.* **492**, 215-220.
- Harris, H. E. and Weeds, A. G.** (1984). Plasma gelsolin caps and severs actin filaments. *FEBS Lett.* **177**, 184-188.
- Hegy, L., Hardwick, S. J., Siow, R. C., and Skepper, J. N.** (2001). Macrophage death and the role of apoptosis in human atherosclerosis. *J.Hematother.Stem Cell Res.* **10**, 27-42.
- Henley JR, Cao H, McNiven MA.** (1999). Participation of dynamin in the biogenesis of cytoplasmic vesicles. *FASEB J.* **2**, 243-7.
- Higgs, H. N. and Pollard, T. D.** (1999). Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins. *J.Biol.Chem.* **274**, 32531-32534.
- Higgs, H. N., Blanchoin, L., and Pollard, T. D.** (1999). Influence of the C terminus of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) and the Arp2/3 complex on actin polymerization. *Biochemistry* **38**, 15212-15222.
- Higgs, H. N. and Pollard, T. D.** (2001). Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu.Rev.Biochem.* **70**, 649-676.
- Hinshaw, J. E. and Schmid, S. L.** (1995). Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* **374**, 190-192.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S.** (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J.Immunol.* **162**, 3749-3752.
- Hufner, K., Schell, B., Aepfelbacher, M., and Linder, S.** (2002). The acidic regions of WASp and N-WASP can synergize with CDC42Hs and Rac1 to induce filopodia and lamellipodia. *FEBS Lett.* **514**, 168-174.
- Ichetovkin, I., Grant, W., and Condeelis, J.** (2002). Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex. *Curr.Biol.* **12**, 79-84.

- Innocenti, M., Zucconi, A., Disanza, A., Frittoli, E., Areces, L. B., Steffen, A., Stradal, T. E., Di Fiore, P. P., Carlier, M. F., and Scita, G.** (2004). Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat. Cell Biol.* **6**, 319-327.
- Isakov, N.** (1997). Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades. *J. Leukoc. Biol.* **61**, 6-16.
- Janeway, C. A., Jr.** (1992). The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 645-674.
- Johnson-Leger, C., Aurrand-Lions, M., and Imhof, B. A.** (2000). The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair? *J. Cell Sci.* **113** (Pt 6), 921-933.
- Jones, B. W., Means, T. K., Heldwein, K. A., Keen, M. A., Hill, P. J., Belisle, J. T., and Fenton, M. J.** (2001). Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 1036-1044.
- Jones, G. E.** (2000). Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 593-602.
- Jordens, I., Fernandez-Borja, M., Marsman, M., Dusseljee, S., Janssen, L., Calafat, J., Janssen, H., Wubbolts, R., and Neefjes, J.** (2001). The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr. Biol.* **11**, 1680-1685.
- Kabsch, W. and Vandekerckhove, J.** (1992). Structure and function of actin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 49-76.
- Kaisho, T. and Akira, S.** (2003). Regulation of dendritic cell function through Toll-like receptors. *Curr. Mol. Med.* **3**, 373-385.
- Kanehisa, J., Yamanaka, T., Doi, S., Turksen, K., Heersche, J. N., Aubin, J. E., and Takeuchi, H.** (1990). A band of F-actin containing podosomes is involved in bone resorption by osteoclasts. *Bone* **11**, 287-293.
- Kaplan, G.** (1977). Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages. *Scand. J. Immunol.* **6**, 797-807.
- Kirchhausen, T.** (2000). Clathrin. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 699-727.
- Klemke, R. L., Cai, S., Giannini, A. L., Gallagher, P. J., de Lanerolle, P., and Cheresch, D. A.** (1997). Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Biol.* **137**, 481-492.
- Knaus, U. G. and Bokoch, G. M.** (1998). The p21Rac/Cdc42-activated kinases (PAKs). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 857-862.
- Knaus, U. G., Wang, Y., Reilly, A. M., Warnock, D., and Jackson, J. H.** (1998). Structural requirements for PAK activation by Rac GTPases. *J. Biol. Chem.* **273**, 21512-21518.

- Krause, M., Sechi, A. S., Konradt, M., Monner, D., Gertler, F. B., and Wehland, J.** (2000). Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J.Cell Biol.* **149**, 181-194.
- Kunda, P., Craig, G., Dominguez, V., and Baum, B.** (2003). Abi, Sra1, and Kette control the stability and localization of SCAR/WAVE to regulate the formation of actin-based protrusions. *Curr.Biol.* **13**, 1867-1875.
- Lehmann, J. M., Riethmuller, G., and Johnson, J. P.** (1990). Nck, a melanoma cDNA encoding a cytoplasmic protein consisting of the src homology units SH2 and SH3. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1048.
- Lehto, V. P., Hovi, T., Vartio, T., Badley, R. A., and Virtanen, I.** (1982). Reorganization of cytoskeletal and contractile elements during transition of human monocytes into adherent macrophages. *Lab Invest* **47**, 391-399.
- Li, W. and She, H.** (2000). The SH2 and SH3 adapter Nck: a two-gene family and a linker between tyrosine kinases and multiple signaling networks. *Histol.Histopathol.* **15**, 947-955.
- Li, W., Fan, J., and Woodley, D. T.** (2001). Nck/Dock: an adapter between cell surface receptors and the actin cytoskeleton. *Oncogene* **20**, 6403-6417.
- Linder S, Kopp P.** (2005). Podosomes at a glance. *J Cell Sci.* **118**, 2079-82.
- Linder, S., Nelson, D., Weiss, M., and Aepfelbacher, M.** (1999). Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 9648-9653.
- Linder, S., Higgs, H., Hufner, K., Schwarz, K., Pannicke, U., and Aepfelbacher, M.** (2000). The polarization defect of Wiskott-Aldrich syndrome macrophages is linked to dislocalization of the Arp2/3 complex. *J.Immunol.* **165**, 221-225.
- Linder, S. and Aepfelbacher, M.** (2003). Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* **13**, 376-385.
- Lorenz, M., DesMarais, V., Macaluso, F., Singer, R. H., and Condeelis, J.** (2004). Measurement of barbed ends, actin polymerization, and motility in live carcinoma cells after growth factor stimulation. *Cell Motil.Cytoskeleton* **57**, 207-217.
- Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., and Pollard, T. D.** (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J.Cell Biol.* **127**, 107-115.
- Machesky, L. M. and Insall, R. H.** (1998). Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr.Biol.* **8**, 1347-1356.

- Machesky, L. M. and Insall, R. H.** (1999). Signaling to actin dynamics. *J.Cell Biol.* **146**, 267-272.
- Maciver, S. K., Wachsstock, D. H., Schwarz, W. H., and Pollard, T. D.** (1991). The actin filament severing protein actophorin promotes the formation of rigid bundles of actin filaments crosslinked with alpha-actinin. *J.Cell Biol.* **115**, 1621-1628.
- Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z. S., and Lim, L.** (1994). A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* **367**, 40-46.
- Marchisio, P. C., Cirillo, D., Naldini, L., Primavera, M. V., Teti, A., and Zamboni-Zallone, A.** (1984). Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. *J.Cell Biol.* **99**, 1696-1705.
- Marchisio, P. C., Bergui, L., Corbascio, G. C., Cremona, O., D'Urso, N., Schena, M., Tesio, L., and Caligaris-Cappio, F.** (1988). Vinculin, talin, and integrins are localized at specific adhesion sites of malignant B lymphocytes. *Blood* **72**, 830-833.
- Massol, P., Montcourrier, P., Guillemot, J. C., and Chavrier, P.** (1998). Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *EMBO J.* **17**, 6219-6229.
- May, R. C., Caron, E., Hall, A., and Machesky, L. M.** (2000). Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcgammaR or CR3. *Nat.Cell Biol.* **2**, 246-248.
- May, R. C. and Machesky, L. M.** (2001). Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J.Cell Sci.* **114**, 1061-1077.
- McGrath, J. L., Osborn, E. A., Tardy, Y. S., Dewey, C. F., Jr., and Hartwig, J. H.** (2000). Regulation of the actin cycle in vivo by actin filament severing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 6532-6537.
- McLaughlin, P. J., Gooch, J. T., Mannherz, H. G., and Weeds, A. G.** (1993). Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* **364**, 685-692.
- McPherson, P. S., Garcia, E. P., Slepnev, V. I., David, C., Zhang, X., Grabs, D., Sossin, W. S., Bauerfeind, R., Nemoto, Y., and De Camilli, P.** (1996). A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature* **379**, 353-357.
- Merrifield, C. J., Moss, S. E., Ballestrem, C., Imhof, B. A., Giese, G., Wunderlich, I., and Almers, W.** (1999). Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. *Nat.Cell Biol.* **1**, 72-74.
- Miki, H., Miura, K., and Takenawa, T.** (1996). N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J.* **15**, 5326-5335.
- Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T.** (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.* **17**, 6932-6941.

- Miki, H., Fukuda, M., Nishida, E., and Takenawa, T.** (1999). Phosphorylation of WAVE downstream of mitogen-activated protein kinase signaling. *J.Biol.Chem.* **274**, 27605-27609.
- Miki, H. and Takenawa, T.** (2003). Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. *J.Biochem.(Tokyo)* **134**, 309-313.
- Mizutani, K., Miki, H., He, H., Maruta, H., and Takenawa, T.** (2002). Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Res.* **62**, 669-674.
- Mousa, G. Y., Trevithick, J. R., Bechberger, J., and Blair, D. G.** (1978). Cytochalasin D induces the capping of both leukaemia viral proteins and actin in infected cells. *Nature* **274**, 808-809.
- Mullins, R. D., Heuser, J. A., and Pollard, T. D.** (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 6181-6186.
- Mullins, R. D. and Pollard, T. D.** (1999). Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **9**, 244-249.
- Nichols, B. J., Ungermann, C., Pelham, H. R., Wickner, W. T., and Haas, A.** (1997). Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs. *Nature* **387**, 199-202.
- Niebuhr, K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., Domann, E., Carl, U. D., Walter, U., Gertler, F. B., Wehland, J., and Chakraborty, T.** (1997). A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO J.* **16**, 5433-5444.
- Niedergang, F. and Chavrier, P.** (2004). Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Curr.Opin.Cell Biol.* **16**, 422-428.
- Nielsen, E., Severin, F., Backer, J. M., Hyman, A. A., and Zerial, M.** (1999). Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat.Cell Biol.* **1**, 376-382.
- Ninomiya, N., Hazeki, K., Fukui, Y., Seya, T., Okada, T., Hazeki, O., and Ui, M.** (1994). Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. *J.Biol.Chem.* **269**, 22732-22737.
- Nonoyama, S. and Ochs, H. D.** (2001). Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr.Allergy Asthma Rep.* **1**, 430-437.
- Nozumi, M., Nakagawa, H., Miki, H., Takenawa, T., and Miyamoto, S.** (2003). Differential localization of WAVE isoforms in filopodia and lamellipodia of the neuronal growth cone. *J.Cell Sci.* **116**, 239-246.

- Olazabal, I. M., Caron, E., May, R. C., Schilling, K., Knecht, D. A., and Machesky, L. M.** (2002). Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcγR, phagocytosis. *Curr.Biol.* **12**, 1413-1418.
- Ono, S.** (2003). Regulation of actin filament dynamics by actin depolymerizing factor/cofilin and actin-interacting protein 1: new blades for twisted filaments. *Biochemistry* **42**, 13363-13370.
- Osiak AE, Zenner G, Linder S.** (2005). Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp Cell Res.* **307**, 342-53.
- Ono, S., Mohri, K., and Ono, K.** (2004). Microscopic evidence that actin-interacting protein 1 actively disassembles actin-depolymerizing factor/Cofilin-bound actin filaments. *J.Biol.Chem.* **279**, 14207-14212.
- Owen, D. J., Vallis, Y., Noble, M. E., Hunter, J. B., Dafforn, T. R., Evans, P. R., and McMahon, H. T.** (1999). A structural explanation for the binding of multiple ligands by the alpha-adaptin appendage domain. *Cell* **97**, 805-815.
- Pantaloni, D., Le Clainche, C., and Carlier, M. F.** (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science* **292**, 1502-1506.
- Pearse, B. M., Smith, C. J., and Owen, D. J.** (2000). Clathrin coat construction in endocytosis. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **10**, 220-228.
- Perret E, Lakkaraju A, Deborde S, Schreiner R, Rodriguez-Boulan E.** (2005). Evolving endosomes: how many varieties and why? *Curr Opin Cell Biol.* **17**, 423-34.
- Pitt, A., Mayorga, L. S., Stahl, P. D., and Schwartz, A. L.** (1992). Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J.Clin.Invest* **90**, 1978-1983.
- Platt, N. and Gordon, S.** (1998). Scavenger receptors: diverse activities and promiscuous binding of polyanionic ligands. *Chem.Biol.* **5**, R193-R203.
- Pollard, T. D. and Cooper, J. A.** (1984). Quantitative analysis of the effect of Acanthamoeba profilin on actin filament nucleation and elongation. *Biochemistry* **23**, 6631-6641.
- Pollard, T. D., Blanchoin, L., and Mullins, R. D.** (2001). Actin dynamics. *J.Cell Sci.* **114**, 3-4.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B.** (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088.
- Qualmann, B., Roos, J., DiGregorio, P. J., and Kelly, R. B.** (1999). Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Mol.Biol.Cell* **10**, 501-513.

- Qualmann, B. and Mellor, H.** (2003). Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases. *Biochem.J.* **371**, 233-241.
- Racoosin, E. L. and Swanson, J. A.** (1989). Macrophage colony-stimulating factor (rM-CSF) stimulates pinocytosis in bone marrow-derived macrophages. *J.Exp.Med.* **170**, 1635-1648.
- Racoosin, E. L. and Swanson, J. A.** (1993). Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *J.Cell Biol.* **121**, 1011-1020.
- Raetz, C. R.** (1993). Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction. *J.Bacteriol.* **175**, 5745-5753.
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., and Geuze, H. J.** (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J.Exp.Med.* **183**, 1161-1172.
- Ravetch, J. V.** (1997). Fc receptors. *Curr.Opin.Immunol.* **9**, 121-125.
- Ravetch, J. V. and Clynes, R. A.** (1998). Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annu.Rev.Immunol.* **16**, 421-432.
- Rivera, G. M., Briceno, C. A., Takeshima, F., Snapper, S. B., and Mayer, B. J.** (2004). Inducible clustering of membrane-targeted SH3 domains of the adaptor protein Nck triggers localized actin polymerization. *Curr.Biol.* **14**, 11-22.
- Rivero-Lezcano, O. M., Marcilla, A., Sameshima, J. H., and Robbins, K. C.** (1995). Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains. *Mol.Cell Biol.* **15**, 5725-5731.
- Robinson, R. C., Turbedsky, K., Kaiser, D. A., Marchand, J. B., Higgs, H. N., Choe, S., and Pollard, T. D.** (2001). Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* **294**, 1679-1684.
- Rodal, A. A., Tetreault, J. W., Lappalainen, P., Drubin, D. G., and Amberg, D. C.** (1999). Aip1p interacts with cofilin to disassemble actin filaments. *J.Cell Biol.* **145**, 1251-1264.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M. W.** (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**, 221-231.
- Rohatgi, R., Nollau, P., Ho, H. Y., Kirschner, M. W., and Mayer, B. J.** (2001). Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J.Biol.Chem.* **276**, 26448-26452.
- Rollins, B. J.** (1996). Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol.Med.Today* **2**, 198-204.
- Rozelle, A. L., Machesky, L. M., Yamamoto, M., Driessens, M. H., Insall, R. H., Roth, M. G., Luby-Phelps, K., Marriott, G., Hall, A., and Yin, H. L.** (2000).

- Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr.Biol.* **10**, 311-320.
- Samaj, J., Baluska, F., Voigt, B., Schlicht, M., Volkmann, D., and Menzel, D.** (2004). Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant Physiol* **135**, 1150-1161.
- Sasaki, N., Miki, H., and Takenawa, T.** (2000). Arp2/3 complex-independent actin regulatory function of WAVE. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* **272**, 386-390.
- Sastry, K. and Ezekowitz, R. A.** (1993). Collectins: pattern recognition molecules involved in first line host defense. *Curr.Opin.Immunol.* **5**, 59-66.
- Schell, B.** (2003). Subzelluläre Lokalisation und Funktion des RhoGTPase-Regulators Cdc42GAP in Makrophagen. *Dissertation*.
- Schuuring, E., Verhoeven, E., Litvinov, S., and Michalides, R. J.** (1993). The product of the EMS1 gene, amplified and overexpressed in human carcinomas, is homologous to a v-src substrate and is located in cell-substratum contact sites. *Mol.Cell Biol.* **13**, 2891-2898.
- Sengelov, H.** (1995). Complement receptors in neutrophils. *Crit Rev.Immunol.* **15**, 107-131.
- She, H. Y., Rockow, S., Tang, J., Nishimura, R., Skolnik, E. Y., Chen, M., Margolis, B., and Li, W.** (1997). Wiskott-Aldrich syndrome protein is associated with the adapter protein Grb2 and the epidermal growth factor receptor in living cells. *Mol.Biol.Cell* **8**, 1709-1721.
- Sheff, D. R., Daro, E. A., Hull, M., and Mellman, I.** (1999). The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *J.Cell Biol.* **145**, 123-139.
- Skehel, J. J. and Wiley, D. C.** (1998). Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell* **95**, 871-874.
- Snapper, S. B. and Rosen, F. S.** (1999). The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP): roles in signaling and cytoskeletal organization. *Annu.Rev.Immunol.* **17**, 905-929.
- Soderling, S. H., Binns, K. L., Wayman, G. A., Davee, S. M., Ong, S. H., Pawson, T., and Scott, J. D.** (2002). The WRP component of the WAVE-1 complex attenuates Rac-mediated signalling. *Nat.Cell Biol.* **4**, 970-975.
- Sossey-Alaoui, K., Head, K., Nowak, N., and Cowell, J. K.** (2003). Genomic organization and expression profile of the human and mouse WAVE gene family. *Mamm.Genome* **14**, 314-322.
- Stahl, P. D. and Ezekowitz, R. A.** (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr.Opin.Immunol.* **10**, 50-55.
- Steffen, A., Rottner, K., Ehinger, J., Innocenti, M., Scita, G., Wehland, J., and Stradal, T. E.** (2004). Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J.* **23**, 749-759.

- Stendahl, O. I., Hartwig, J. H., Brotschi, E. A., and Stossel, T. P.** (1980). Distribution of actin-binding protein and myosin in macrophages during spreading and phagocytosis. *J. Cell Biol.* **84**, 215-224.
- Stokoe, D., Campbell, D. G., Nakielny, S., Hidaka, H., Leever, S. J., Marshall, C., and Cohen, P.** (1992). MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase. *EMBO J.* **11**, 3985-3994.
- Stradal, T. E., Rottner, K., Disanza, A., Confalonieri, S., Innocenti, M., and Scita, G.** (2004). Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol.* **14**, 303-311.
- Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T.** (1998). The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *EMBO J.* **17**, 6516-6526.
- Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T.** (2002). Spatial and temporal regulation of actin polymerization for cytoskeleton formation through Arp2/3 complex and WASP/WAVE proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton* **51**, 113-122.
- Suetsugu, S., Yamazaki, D., Kurisu, S., and Takenawa, T.** (2003). Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. *Dev. Cell* **5**, 595-609.
- Swanson, J., Yirinec, B., Burke, E., Bushnell, A., and Silverstein, S. C.** (1986). Effect of alterations in the size of the vacuolar compartment on pinocytosis in J774.2 macrophages. *J. Cell Physiol* **128**, 195-201.
- Swanson, J., Burke, E., and Silverstein, S. C.** (1987). Tubular lysosomes accompany stimulated pinocytosis in macrophages. *J. Cell Biol.* **104**, 1217-1222.
- Swanson, J., Bushnell, A., and Silverstein, S. C.** (1987). Tubular lysosome morphology and distribution within macrophages depend on the integrity of cytoplasmic microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **84**, 1921-1925.
- Swanson, J. A. and Watts, C.** (1995). Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* **5**, 424-428.
- Swanson, J. A., Johnson, M. T., Beningo, K., Post, P., Mooseker, M., and Araki, N.** (1999). A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *J. Cell Sci.* **112** (Pt 3), 307-316.
- Symons, M., Derry, J. M., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U., and Abo, A.** (1996). Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* **84**, 723-734.
- Tarone, G., Cirillo, D., Giancotti, F. G., Comoglio, P. M., and Marchisio, P. C.** (1985). Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp. Cell Res.* **159**, 141-157.

- Taunton, J., Rowning, B. A., Coughlin, M. L., Wu, M., Moon, R. T., Mitchison, T. J., and Larabell, C. A.** (2000). Actin-dependent propulsion of endosomes and lysosomes by recruitment of N-WASP. *J.Cell Biol.* **148**, 519-530.
- Tilney, L. G., Bonder, E. M., and DeRosier, D. J.** (1981). Actin filaments elongate from their membrane-associated ends. *J.Cell Biol.* **90**, 485-494.
- Traub, L. M., Downs, M. A., Westrich, J. L., and Fremont, D. H.** (1999). Crystal structure of the alpha appendage of AP-2 reveals a recruitment platform for clathrin-coat assembly. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 8907-8912.
- Trifaro, J. M., Rose, S. D., and Marcu, M. G.** (2000). Scinderin, a Ca²⁺-dependent actin filament severing protein that controls cortical actin network dynamics during secretion. *Neurochem.Res.* **25**, 133-144.
- Ungewickell, E.** (1999). Wrapping the package. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 8809-8810.
- Ungewickell, E.** (1999). Clathrin: a good view of a shapely leg. *Curr.Biol.* **9**, R32-R35.
- Urbanik, E. and Ware, B. R.** (1989). Actin filament capping and cleaving activity of cytochalasins B, D, E, and H. *Arch.Biochem.Biophys.* **269**, 181-187.
- Vasquez, R. J., Howell, B., Yvon, A. M., Wadsworth, P., and Cassimeris, L.** (1997). Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Mol.Biol.Cell* **8**, 973-985.
- Welch, M. D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D. A., and Mitchison, T. J.** (1998). Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* **281**, 105-108.
- West, M. A., Prescott, A. R., Eskelinen, E. L., Ridley, A. J., and Watts, C.** (2000). Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr.Biol.* **10**, 839-848.
- Westphal, R. S., Soderling, S. H., Alto, N. M., Langeberg, L. K., and Scott, J. D.** (2000). Scar/WAVE-1, a Wiskott-Aldrich syndrome protein, assembles an actin-associated multi-kinase scaffold. *EMBO J.* **19**, 4589-4600.
- Wright, S. D. and Silverstein, S. C.** (1983). Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J.Exp.Med.* **158**, 2016-2023.
- Wu, Y., Dowbenko, D., and Lasky, L. A.** (1998). PSTPIP 2, a second tyrosine phosphorylated, cytoskeletal-associated protein that binds a PEST-type protein-tyrosine phosphatase. *J.Biol.Chem.* **273**, 30487-30496.
- Yamaguchi, H., Miki, H., and Takenawa, T.** (2002). Two verprolin homology domains increase the Arp2/3 complex-mediated actin polymerization activities of N-WASP and WAVE1 C-terminal regions. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **297**, 214-219.

- Yamashita, A., Maeda, K., and Maeda, Y.** (2003). Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping. *EMBO J.* **22**, 1529-1538.
- Yamazaki, D., Suetsugu, S., Miki, H., Kataoka, Y., Nishikawa, S., Fujiwara, T., Yoshida, N., and Takenawa, T.** (2003). WAVE2 is required for directed cell migration and cardiovascular development. *Nature* **424**, 452-456.
- Zenke, F. T., King, C. C., Bohl, B. P., and Bokoch, G. M.** (1999). Identification of a central phosphorylation site in p21-activated kinase regulating autoinhibition and kinase activity. *J.Biol.Chem.* **274**, 32565-32573.
- Zheleznyak, A. and Brown, E. J.** (1992). Immunoglobulin-mediated phagocytosis by human monocytes requires protein kinase C activation. Evidence for protein kinase C translocation to phagosomes. *J.Biol.Chem.* **267**, 12042-12048.

VIII. ANHANG

VIII.1. *Primer-Sequenzen*

VIII.1.1. Zur Sequenzierung verwendete *Primer*

Name	Sequenz 5' → 3'
Gex-5	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
Gex-3	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG
MAL-f	AAGCCCTGAAAGACGCGCAGAC
MAL-r	GGCGATTAAGTTGGGTAACGCC

Tab. 19: Übersicht über verwendete Sequenzierungs-Primer

VIII.2. Zur Klonierung verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' → 3'
SHDGFP-f	GAGAGAATTGAATTCCATGCCGCTAGT
SHDGFP-r	CCTTGGGCCAGGATCCGTCATTCTCGC
SHDMAL-f	GAGAGAATTCGAATTCATGCCGCTAGT
SHDMAL-r	GACCTTGGGCAAGCTTCTGTCATTCTC
WAVE-CA-1	GATCCGCTAAGCATGAACGCATTGAAAACGATGTTGCCA CCATCCTGTCTCGCCGTATTGCTGTTGAATATAGTGATTC GGAAGATGATTCAGAATTTGATGAAGTAGATTGGTTGGA GTAAG
WAVE-CA-2	AATTCTTACTCCAACCAATCTACTTCATCAAATTCTGAAT CATCTTCCGAATCACTATATTCAACAGCAATACGGCGAGA CAGGATGGTGGCAACATCGTTTTCAATGCGTTCATGCTTA GCG
WaveP-f	GTTCCGCGTGGATCCGAATGGCAG
WaveP-r	GAGCAAGAGCTGTCTCGAGTTAAGGTGATG

Tab. 20: Übersicht über die zur Klonierung verwendeten Oligonukleotide

VIII.3. Vektorenkarten

a) pGEX-2T und pGEX-4T-2

Die vollständigen Vektorsequenzen sind auf der NCBI-Homepage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) oder über die Homepage der Firma Amersham-Pharmacia (www.amershambiosciences.com) zu finden.

b) pEGFP-C1, pEGFP-C3 und pEGFP-N3

Diese Vektoren werden von der Firma Clontech vertrieben. Vektorkarten und -sequenzen sind zu finden auf der Clontech-Homepage (www.clontech.com) unter <http://www.clontech.com/techinfo/vectors/index.shtml>.

c) pDsRed1-N1

Dieser Vektor wird ebenfalls von der Firma Clontech vertrieben. Die Vektorkarte und -sequenz ist zu finden auf der Clontech-Homepage (www.clontech.com) unter <http://www.clontech.com/techinfo/vectors/index.shtml>.

VIII.4. DNA- und Proteinsequenz von WAVE1

VIII.4.1. DNA-Sequenz

```

1  atg ccgctag tgaaaagaaa catcgatcct aggcacttgt gccacacagc actgcctaga
61  ggcattaaga atgaactgga atgtgtaacc aatatttcct tggcaaatat aattagacaa
121 ctaagtagcc taagtaaata tgctgaagat atatttggag aattattcaa tgaagcacat
181 agtttttctc tcagagtcaa ctcattgcaa gaacgtgtgg accgtttatc tgttagtggt
241 acacagcttg atccaaagga agaagaattg tctttgcaag atataacaat gaggaaagct
301 ttccgaagtt ctacaattca agaccagcag cttttcgatc gcaagacttt gcctattcca
361 ttacaggaga cgtacgatgt ttgtgaacag cctccacctc tcaatatact cactccttat
421 agagatgatg gtaaagaagg tctgaagttt tataccaatc cttcgtattt ctttgatcta
481 tggaaagaaa aaatgttgca agatacagag gataagagga aggaaaagag gaagcagaag
541 cagaaaaatc tagatcgtcc tcatgaacca gaaaaagtgc caagagcacc tcatgacagg
601 cggcgcgagaat ggcagaagct ggcccaaggt ccagagctgg ctgaagatga tgctaattctc
661 ttacataagc atattgaagt tgctaattggc ccagcctctc attttgaaac aagacctcag
721 acatacgtgg atcatatgga tggatcttac tcactttctg ccttgccatt tagtcagatg
781 agtgagcttc tgactagagc tgaggaaagg gtattagtca gaccacatga accacctcca
841 cctccaccaa tgcatggagc aggagatgca aaaccgatac ccacctgtat cagttctgct
901 acagggttga tagaaaatcg ccctcagtc cagctacag gcagaacacc tgtgtttggtg
961 agccccactc cccacactcc tccaccacct cttccatctg cttgttcaac ttccctcatta
1021 agagcttcaa tgacttcaac tctctcccct ccagtaacct cccacactcc acctccagcc
1081 actgctttgc aagctccagc agtaccacca cctccagctc ctcttcagat tgcccctgga
1141 gttcttcacc cagctcctcc tccaattgca cctcctctag tacagccctc tccaccagta
1201 gctagagctg cccagtatg tgagactgta ccagttcatc cactcccaca aggtgaagtt
1261 caggggctgc ctccaccccc accaccgct cctctgctc cacctggcat tgcacatca
1321 tcacctgtca cagttacagc tcttgctcat cctccctctg ggctacatcc aactccatct
1381 actgccccag gtccccatgt tccattaatg cctccatctc ctccatcaca agttataact
1441 gcttctgagc caaagcgcca tccatcaacc ctacctgtaa tcagtgatgc caggagtgtg
1501 ctactggaag caatacgaaa aggtattcag ctacgcaaag tagaagagca gcgtgaacag
1561 gaagctaagc atgaacgcat tgaaaacgat gttgccacca tctgtctctg ccgtattgct
1621 gttgaatata gtgattcgga agatgattca gaatttgatg aagtagattg gttggag taa
1681 gaaaaatgca ttgataaata ttacaaaact gaatgcaaat gtcctttgtg gtgcttggtc
1741 cttgaaaatg tttggtca

```

Abb. 28: Kodierende Sequenz von WAVE1

Start- und Stopcodon sind **gelb** unterlegt, der kodierende Bereich für die WHD-Domäne ist **blau**, die für die AS der Poly-Prolin-Domäne kodierenden Basen **schwarz unterstrichen**, die kodierende Sequenz der W-Domäne **rot** und die der A-Domäne **grau** gedruckt.

VIII.4.2. Protein-Sequenz

**MPLVKRNIDPRHLCHTALPRGIKNELECVTNISLANIIRQLSSL SKYAEDIFGELFNE
AHSFSFRVNSLQERVDRLSVSVTQLDPKEEELSLQDITMRKAFRSSTIQDQQLFDRK
TLPIPLQETYDVCEQPPPLNILTPYRDDGKEGLKFYTNPSYFFDLWKEKMLQDTE
KRKEKRKQKQKNLDRPHEPEKVPRAPHDRRREWQKLAQGPPELAEDDANLLHKHI
EVANGPASHFETRPQTYVDHMDGSYSLSALPFSQMSSELLTRAERVLVRPHEPPPP
PMHGAGDAKPIPTCISSATGLIENRPQSPATGRTPVVFVSPTPPPPPPPLPSALSTSSLR**

ASMTSTPPPPVPPPPPPATALQAPAVPPPPAPLQIAPGVLHPAPPPIAPPLVQPSPPV
ARAAPVCETVPVHPLPQGEVQGLPPPPPPPLPPP
GIRPSSP**VTVTALAHPPSGLHPT**
PSTAPGPHVPLMPPSPPSQVIPASEPKRHPSTLPVISDARSVLLEAIRKGIQLRKVEEQ
REQEAKHERIENDVATILSRRIA VEYSDSEDDSEFDEVDWLE

Abb. 29: Proteinsequenz von AS 1 bis 559

Die Nukleotidsequenz der WHD-Domäne (AS 1 – 202) ist **blau**, die für der Prolin-reichen-Domäne (202 – 442) **schwarz**, die Sequenz der W-Domäne (442 – 522) **rot** und die der A-Domäne (522 – 559) **grau** gedruckt.

IX. ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
ARF	<i>ADP-ribosylation factor</i>
Arg	Arginin
BFA	Brefeldin A
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
°C	Grad Celcius
ca.	circa
Cm ^R	Chloramphenicol-resistent
CO ₂	Kohlendioxid
Cyt D	Cytochalasin D
konst.	konstant
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
Em ^R	Erythromycin-resistent
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Farad
FA	Formaldehyd
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLF	formyl-Met-Leu-Phe
FnBP	<i>fibronectin-binding protein</i>
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec)

GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HS	Humanserum
IPTG	Isopropyl- [®] -D-Thiogalactopyranosid
K	Kilo
Kan	Kanamycin
l	Liter
LB	<i>Luria Broth</i>
Leu	Leucin
Lsg.	Lösung
LYTr	LysoTracker
M	Molar
MBP	Maltose bindendes Protein
mM	millimolar
mA	Milliampere
max.	maximal
MCS	<i>multiple cloning site</i>
Met	Methionin
MetOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
Mio.	Millionen
MnTBAP	Mn(III)tetrakis(4-Benzoic acid)porphyrin Chloride
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid

NaOH	Natronlauge
NGS	<i>normal goat serum</i>
nm	Nanometer
nt	Nukleotid(e)
Ω	Ohm
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pen	Penicillin
Phe	Phenylalanin
Pi	anorganisches Phosphat
Pro	Prolin
rpm	<i>rotations per minute</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
sec	Sekunden
Strep	Streptavidin
Tab	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
Tcr	Tetracyclin-resistent
TD	TRITC-Dextran
TEMED	N, N, N', N' –Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U	<i>unit(s)</i>
UDP	Uridindiphosphat
ÜNK	über Nacht-Kultur
UZ	Ultrazentrifuge

V	Volt
Vol	Volumina
W	Watt
<i>wt</i>	<i>wildtype</i> (Wildtyp)

X. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn **Prof. Dr. P. C. Weber** für die freundliche Aufnahme in sein Institut und das Interesse an meiner Arbeit.

Dem Leiter des Max von Pettenkofer Instituts, Herrn **Prof. Dr. Dr. J. Heesemann**, danke ich für die Initiierung und Durchführung des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“, die freundliche Aufnahme in sein Institut und die wohlwollende Unterstützung.

Ich danke allen Kooperationspartnern, die mir ihre Konstrukte oder Antikörper zu Verfügung gestellt haben: H. Faix, J.V. Small und T. Takenawa.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Epidemiologie und Prophylaxe der Kreislaufkrankheiten sowie des Max von Pettenkofer Instituts danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Aepfelbacher / Linder für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und die vielen Erfahrungen, die ich sammeln durfte. Mein besonderer Dank gilt dem Doktorandenteam aus dem „Gartenpavillon“ – **Anna, Barbara, Daniel und Petra** – für die stetige kooperative Unterstützung und viele fröhliche Momente innerhalb und außerhalb des Labors.

Frau **Barbara Schell** danke ich ganz besonders für ihre fortwährende Unterstützung, ihre Geduld und unermüdlichen Einsatz sowie für viele Anregungen.

Ich danke unseren technischen Assistentinnen, Frau Barbara Böhlig und Frau Claudia Trasak, für die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Frau **Barbara Böhlig** danke ich ganz besonders für ihre Geduld, ihren unermüdlichen Einsatz und die stetige moralische Unterstützung.

Ich danke **Christian Johannes** für seinen administrativen Einsatz und Lösung Computer relevanter Probleme.

Mein größter Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Martin Aepfelbacher** und Herrn **PD Dr. Stefan Linder** durch deren tatkräftige Unterstützung diese Arbeit in der vorliegenden Form erst möglich wurde. Ganz besonders danke ich **Stefan** für die vielen Ideen und Anregungen, die ständige konstruktive Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt für das Vertrauen, das er mir entgegen gebracht hat.

XI. LEBENS LAUF**PERSÖNLICHE INFORMATIONEN**

- Familienstand ledig
- Nationalität deutsch
- Geburtsdatum 25. Juni 1978
- Geburtsort Würzburg

SCHULBILDUNG

- 1989-1998 **Abitur**
Gymnasium Starnberg
- 1987-89 Volksschule Percha
- 1986-87 Herrenschnle München
- 1985-86 Grundschule Schonungen

HOCHSCHULAUSBILDUNG

- 5 / 2006 **Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**
- 3 / 2005 **Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**
- 8 / 2004 **Famulatur Pädiatrie**
Praxis Dr. Spier / Lindau
- 2-3 / 2004 **Famulatur Gynäkologie**
Deutscher Famulantenaustausch
Hospital San Rafael in San Salvador / **El Salvador**
- 2-4 / 2003 **Famulatur Pädiatrie**
Komfo Anokye Teaching Hospital in Kumasi / **Ghana**
- 8 / 2002 **Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**
- 2-3 / 2002 **Famulatur Innere Medizin**
Kreiskrankenhaus Starnberg
- 8 / 2001 **Ärztliche Vorprüfung**
- Ab 11 / 1999 **Humanmedizin**
Ludwig-Maximilians-Universität München
- 9-10 / 1999 **Pflegepraktikum**
Agirov Klinik Kempfenhausen

PRAKTISCHES JAHR

- 12 / 2005 – 3 / 2006 *Chirurgie*
Erasmus Austauschprogramm
Hospital Real de la Universidad de Granada / Granada / Spanien
- 10-11 / 2005 *Pädiatrie*
Kinderklinik Dritter Orden / München
- 8-9 / 2005 *Pädiatrie*
Wellington School of Medicine and Health Sciences / Neuseeland
- 4-8 / 2005 *Innere Medizin*
Kantonsspital Glarus / Schweiz

PROMOTION

- **Promotionsstudium** "**Molekulare Medizin**" im Rahmen des Förderprogramms für
Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät der LMU-
München
- **Promotionsthema** "**Rho-GTPase Effektor WAVE1 im endosomal-lysosomalen**
Pathway in primären Makrophagen" unter Prof. Martin
Aepfelbacher und PD Dr. Stefan Linder in einer Kooperation von
Max-von-Pettenkofer-Institut und dem Institut für Prophylaxe und
Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten der LMU-München