

Institut für Prophylaxe
und Epidemiologie
der Kreislaufkrankheiten

Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und medizinische
Mikrobiologie

Ludwig-Maximilians-Universität München

**Subzelluläre Lokalisation und Funktion des
RhoGTPase-Regulators Cdc42GAP
in Makrophagen**

Barbara Schell

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
eingereicht am 11. September 2003

Subzelluläre Lokalisation und Funktion des RhoGTPase-Regulators Cdc42GAP in Makrophagen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
vorgelegt von
Dipl.-Biol. Barbara Schell
aus Neunkirchen

Gutachter:

Erstgutachter: Prof. Dr. T. Cremer

Zweitgutachter: Prof. Dr. H. Leonhardt

Sondergutachter: Prof. Dr. M. Aepfelbacher

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2004

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt.

11. September 2003

Barbara Schell

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2000 bis August 2003 am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten und am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. M. Aepfelbacher und PD Dr. S. Linder erstellt. Die Arbeit wurde betreut und vor der biologischen Fakultät vertreten durch Prof. Dr. T. Cremer (Institut für Anthropologie und Humangenetik, LMU, München). Die Arbeit wurde teilweise durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Teile dieser Arbeit und weitere vorbereitende Arbeiten wurden bereits veröffentlicht:

1. **Schell, B.**, Linder, S. (2001).
Magnetisierte Monozyten: Isolation, Mikroinjektion und Stimulation vom primären humanen Monozyten und Makrophagen. *Immun. Aktuell* 1:152-158
2. Hüfner, K., **Schell, B.**, Aepfelbacher, M., 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
3. Essler, M., Linder, S., **Schell, B.**, Hüfner, K., Wiedemann, A., Randhahn, K., Staddon, J.M., Aepfelbacher, M. (2003).
Cytotoxic necrotizing factor-1 of *E. coli* stimulates Rho/Rho-kinase dependent myosin light chain phosphorylation without inactivating myosin light chain phosphatase. *Infect. Immun.*, 71: 5188-5193

Trenne dich nie von deinen Illusionen und Träumen. Wenn sie verschwunden sind, wirst du weiter existieren, aber aufgehört haben, zu leben.

(Mark Twain, am. Schriftsteller, 1835-1903)

Gewidmet meinen Eltern für das Vertrauen, das sie mir geschenkt, und die Freiheit, die sie mir gewährt haben.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICNIS	I
ABKÜRZUNGEN	VI
I. EINLEITUNG	1
I.1. Makrophagen	1
I.1.1. Funktion von Makrophagen	1
I.1.2. Das Aktin-Zytoskelett von Makrophagen	2
I.2. Aufnahme von Partikeln in die Zelle	3
I.2.1. Clathrin-abhängige Aufnahme extrazellulären Materials	4
I.2.1.1. Bildung Clathrin-beschichteter Vesikel	4
I.2.1.2. Die Kompartimente des endo-lysosomalen <i>Pathway</i>	4
I.2.2. Clathrin-unabhängige Aufnahme: Phagozytose und Makropinozytose	7
I.2.2.1. Phagozytose	7
I.2.2.1.1. Fc-Rezeptor vermittelte Phagozytose	7
I.2.2.1.2. Komplementrezeptor- vermittelte Phagozytose	8
I.2.2.2. Makropinozytose	9
I.2.3. Endozytose und das Aktinzytoskelett	9
I.3. RhoGTPasen	10
I.3.1. Funktionen von RhoGTPasen	10
I.3.2. RhoGTPasen und <i>membrane traffic</i>	11
I.3.3. Regulatoren der RhoGTPasen	11
I.3.4. GTPase-inaktivierende Proteine: RhoGAPs	12
I.3.4.1. Allgemein	12
I.3.4.2. Cdc42GAP	14
I.4. Fragestellung	15
II. MATERIAL	16
II.1. Bakterienstämme	16
II.2. Chemikalien	16
II.3. Enzyme	16
II.4. Kit-Systeme	16
II.5. Transfektionsreagenzien	17
II.6. Laborausstattung	17

II.7. Antikörper	18
II.7.1. Primäre Antikörper	18
II.7.2. Sekundäre Antikörper	18
II.8. Plasmide	19
II.8.1. Kommerziell erworbene Plasmide	19
II.8.2. Konstrukte von Kooperationspartnern	19
II.9. Primer	19
II.9.1. Mutagenese- <i>Primer</i>	19
II.9.2. Sequenzierungs- <i>Primer</i>	20
II.10. Zur Klonierung verwendete Oligonukleotide	21
III. METHODEN	22
III.1. ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN	22
III.1.1. DNA-Präparation	22
III.1.1.1. Plasmidisolierung	22
III.1.1.2. Gelelektion	22
III.1.2. DNA-Restriktionsverdau	22
III.1.2.1. Analytischer Restriktionsverdau	22
III.1.2.2. Präparativer Restriktionsverdau	22
III.1.3. Ligation	22
III.1.3.1. Präparation der Vektoren	22
III.1.3.2. Präparation der DNA-Fragmente	23
III.1.3.2.1. Allgemeine Vorbemerkungen	23
III.1.3.2.2. Allgemeiner PCR-Ansatz	23
III.1.3.2.3. Aufreinigung von PCR-Produkten	25
III.1.3.2.4. Klonierung mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide	25
III.1.3.3. Ligation	26
III.1.4. Transformation in elektrokompente Zellen	26
III.1.4.1. Herstellung elektrokompenter <i>E.coli</i> DH5 α	26
? ? III.1.4.2. Transformation mittels Elektroporation	26
III.1.5. Bakterien-PCR (Kolonie-PCR)	27
III.1.6. RNA interference (RNAi)	27
III.1.6.1. Vorversuche in HeLa-Zellen zum Austesten der <i>Target</i> -Sequenz	28
III.1.6.2. Funktionsanalyse von Cdc42GAP in J774-Makrophagen auf Einzelzellebene	28

III.2. ARBEITEN MIT PROTEINEN	29
III.2.1. Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen mittels Affinitäts- chromatographie	29
III.2.1.1. GST-Fusionsproteine	29
III.2.1.2. MBP-Fusionsproteine	30
III.2.2. Proteinbestimmung	31
III.2.3. Western Blot	31
III.2.3.1. Puffer und Lösungen	31
III.2.3.1.1. Proben-Puffer (SDS-Probenpuffer)	31
III.2.3.1.2. Puffer für SDS-PAGE	31
III.2.3.2. Herstellung von SDS-Gelen	32
III.2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
III.2.3.4. <i>Western Blot</i>	33
III.2.3.4.1. Vorbereitung der PVDF-Membran und <i>Blotting</i>	33
III.2.3.4.2. Detektion	33
III.2.4. Auftrennung von Zellbestandteilen mittels Dichtegradientenzentrifugation	33
III.2.4.1. Ausbildung des Percoll-Gradienten	33
III.2.4.2. Enzymassays zum Nachweis von Markerproteinen	35
III.2.4.2.1. 5'-Nukleotidase als Plasmamembranmarker	35
III.2.4.2.2. N-acetyl-Glucosaminidase als Lysosomenmarker	35
III.2.4.3. Detektion von Cdc42GAP	36
III.3. ARBEITEN MIT ZELLEN	37
III.3.1. Zellkultur	37
III.3.2. Isolation primärer humaner Makrophagen aus menschlichem Blut	38
III.3.3. Isolierung menschlicher Endothelzellen aus der Nabelschnur	39
III.3.4. Mikroinjektion	40
III.3.4.1. Vorbereitung der Injektionslösung	40
III.3.4.2. Mikroinjektion	40
III.3.5. Transfektion von Zell-Linien	41
III.3.5.1. Transfektion muriner J774-Makrophagen	41
III.3.5.2. Transfektion humaner HeLa-Zellen	42
III.3.5.3. Transfektion humaner HUVEC-Zellen	42
III.3.6. Modulierende und inhibierende Substanzen	42
III.4. MIKROSKOPISCHE METHODEN	43
III.4.1. Indirekte Immunfluoreszenz	43

III.4.1.1. Fixierung und Lyse von Zellen	43
III.4.1.1.1. Formaldehyd/Aceton	43
III.4.1.1.2. Formaldehyd/Triton	43
III.4.1.1.3. Methanol	43
III.4.1.2. Färbung mittels spezifischer Antikörper	43
III.4.2. Fluoreszenzmikroskopie	44
III.4.3. <i>Live cell imaging</i>	44
IV. ERGEBNISSE	45
IV.1. Allgemeines	45
IV.2. Akkumulation von Cdc42GAP in Vesikeln	45
IV.2.1. Induktion der Cdc42GAP-haltigen Vesikel	45
IV.2.2. Auftreten von Cdc42GAP-haltigen Vesikeln in anderen Zelltypen	49
IV.3. Charakterisierung der Cdc42GAP-haltigen Vesikel	51
IV.3.1. Cdc42GAP-haltige Vesikel stellen ein nicht-klassisches endo-lysosomales Kompartiment dar	51
IV.3.1.1. Akkumulation von Cdc42GAP in sauren Kompartimenten nach Dextran-Stimulation	51
IV.3.1.2. Versuch der Zuordnung der Cdc42GAP-haltigen Vesikel zu einem der klassischen endo-lysosomalen Kompartimente	52
IV.3.2. PAK und WAVE lokalisieren an Cdc42GAP-positiven Vesikeln	54
IV.3.3. Cdc42GAP befindet sich in Kompartimenten mit hoher lysosomaler Aktivität	55
IV.4. Lokalisation und Dynamik der Cdc42GAP-haltigen Vesikel in lebenden Zellen	59
IV.4.1. Kolokalisation zwischen GFP-Cdc42GAP und TRITC-Dextran bzw. LysoTracker	59
IV.4.2. Akkumulation von GFP-Cdc42GAP um Bakterien oder Latex- <i>bead</i> enthaltende Phagosomen	61
IV.5. Regulation der Cdc42GAP-positiven Vesikel	64
IV.5.1. Modulation der Cdc42GAP-haltigen Vesikel durch Inhibition des endosomalen <i>Pathways</i>	64
IV.5.2. Modulation der Cdc42GAP-haltigen Vesikel durch die RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42	66
IV.6. Funktionsanalyse von Cdc42GAP	69
IV.6.1. Die Poly-Prolin-Domäne ist am Vesikel- <i>Targeting</i> beteiligt	69
IV.6.2. Einfluß von Cdc42GAP und seinen Mutanten auf die Bildung Dextran-haltiger und PAK-positiver Vesikel	71

IV.6.3. <i>Knockdown</i> von Cdc42GAP in J774-Makrophagen	74
V. DISKUSSION	77
V.1. Intrazelluläre Lokalisation von Cdc42GAP	77
V.2. Charakterisierung der Cdc42GAP-positiven Vesikel	78
V.3. Dynamik der Cdc42GAP-Vesikel	79
V.4. Rekrutierung von Cdc42GAP an saure Vesikel	79
V.4.1. Beteiligung unterschiedlicher Cdc42GAP-Domänen	79
V.4.2. Rolle der RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42	80
V.5. Funktion von Cdc42GAP	81
V.6. Ausblick	84
 VI. ZUSAMMENFASSUNG	 85
 VII. LITERATUR	 87
 VIII. ANHANG	 105
VIII.1. Primer-Sequenzen	105
VIII.1.1. <i>Mutagenese-Primer</i>	105
VIII.1.2. <i>Sequenzierungs-Primer</i>	105
VIII.2. Zur Klonierung verwendete Oligonukleotide	105
VIII.3. Vektorenkarten	106
VIII.4. DNA- und Proteinsequenz von Cdc42GAP	106
VIII.4.1. DNA-Sequenz	106
VIII.4.2. Protein-Sequenz	107
VIII.5. Inhalt der Video-CD	107
 IX. DANKSAGUNG	 109
 X. LEBENS LAUF	 110

ABKUERZUNGEN

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
konst.	konstant
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ΔPPro	Delta-Poly-Prolin-Region von Cdc42GAP
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)
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
HRP	<i>horseraddish peroxidase</i>
HS	Humanserum
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
K	Kilo
Kan	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria Broth
Leu	Leucin
Lsg.	Lösung
LYTr	LysoTracker
M	Molar
mM	milimolar
mA	Milliampère
max.	maximal
MCS	<i>multiple cloning site</i>
Met	Methionin
MetOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
Mio.	Millionen
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
Na	Natrium

ABKÜRZUNGEN

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	Poly-Prolin-Region von Cdc42GAP
rpm	<i>rotations per minute</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
RT	Raumtemperatur
R282/3A	GAP-inaktive Mutante von Cdc42GAP
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
sec	Sekunden
Strep	Streptavidin
TCA	Trichloressigsäure
Tc ^R	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
Upm	Umdrehungen pro minute
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
Vol	Volumina
W	Watt
<i>wt</i>	<i>wildtype</i> (Wildtyp)

I. EINLEITUNG

I.1. MAKROPHAGEN

I.1.1. Funktion von Makrophagen

Makrophagen entstehen aus Monozyten, die sich im Knochenmark aus Blutstammzellen entwickeln. Die Monozyten zirkulieren für einige Stunden im Blut und wandern anschließend in verschiedene Gewebe ein, wo sie zu Makrophagen ausdifferenzieren. Makrophagen werden je nach Gewebeständigkeit unterschiedlich bezeichnet und zusammen mit den im Blut kursierenden Monozyten zum sogenannten *mononukleären Phagozytensystem* zusammengefaßt (vgl. Tabelle 1).

Name	Vorkommen
Monozyten	Blut
Makrophagen	
Histiozyten	Bindegewebe
Mikroglia-Zellen	Gehirn
Alveolar-Makrophagen	Lunge
Kupffer'sche Zellen	Leber
Milz-Makrophagen	Milz
Hofbauer-Zellen	Plazenta
Mesangiale Zellen	Niere
Synoviale Zellen	Gelenkhöhlen

Tab.1: Übersicht über das mononukleäre Phagozytensystem.

Makrophagen besitzen die Fähigkeit, an aktivierte Endothelzellen zu adhären und durch diese und die gesamte Gefäßwand hindurch auf einen Entzündungsherd zuzuwandern. Die Signale dazu erhalten sie z.B. durch bakterielle Peptide oder Chemokine im Gewebe.

Genetische Defekte, die zu fehlerhaftem Migrationsverhalten der Makrophagen führen, haben diverse Krankheitsbilder wie Atherosklerose, Arthritis, Multiple Sklerose oder WAS (Wiskott-Aldrich Syndrom) zur Folge (Übersicht bei Rollins, 1996). Bereits in atherosklerotischen Frühläsionen findet man Makrophagen in Form von Schaumzellen (Gerrity *et al.*, 1981; Aqel *et al.*, 1984; Übersicht bei Hegyi *et al.*, 2001). Den in diesem Stadium von den Makrophagen produzierten Matrix-Metalloproteasen wird eine entscheidende Rolle bei der atherosklerotischen Plaqueruptur zugesprochen (Fabunmi *et al.*, 1998).

Im Rahmen der angeborenen und erworbenen Immunantwort nehmen Makrophagen als professionelle Phagozyten eine Schlüsselrolle ein. Sie können Mikroorganismen (opsoniert oder direkt) sowie befallene Zellen erkennen, aufnehmen und abbauen bzw. prozessieren. So bilden sie im Rahmen der angeborenen Immunität eine erste Verteidigungslinie gegen Krankheitserreger. Dazu befinden sich auf der Makrophagenoberfläche 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). Gleichzeitig leisten Makrophagen als antigen-präsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APCs) einen wichtigen Beitrag zur

adaptiven Immunantwort, indem sie Peptidfragmente phagozytierter Antigene an MHCII-Moleküle binden und auf ihrer Oberfläche den Lymphozyten präsentieren. Desweiteren tragen sie zur Aufrechterhaltung des Gewebeumsatzes bei, indem sie körpereigene Zellen (z.B. alte Erythrozyten aus der Milz), apoptotische Zellen oder Tumorzellen phagozytieren und vernichten, ohne dabei gesundes Gewebe zu schädigen. Bei allen genannten Mechanismen - Adhäsion, Migration und Phagozytose – ist eine fein regulierte Umorganisation des Zytoskeletts nötig.

I.1.2. Das Aktin-Zytoskelett von Makrophagen

Zellteilung, zelluläre Bewegungen, Adhäsion, Polarisierung und Phagozytose erfordern eine Veränderung der Zellform, die in höchstem Maße reguliert sein muß. Dabei spielt das Zytoskelett eine entscheidende Rolle.

Das Zytoskelett setzt sich aus drei unterschiedlichen Arten von Fasern zusammen, den Intermediärfilamenten, Mikrotubuli und Aktinfilamenten. Im Hinblick auf die oben beschriebenen Makrophagenfunktionen ist vor allem die Dynamik des Aktin- und Mikotubulizytoskeletts ein wichtiger Faktor.

Aktin stellt in eukaryotischen Zellen den größten Anteil an der Gesamtproteinmenge (Kabsch und Vandekerckhove, 1992). Es kann entweder in Form von globulären Monomeren (G-Aktin) oder filamentösen Netzwerken (F-Aktin) vorkommen. Das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Formen wird von einer Vielzahl regulatorischer Moleküle aufrechterhalten (Übersicht bei Ayscough, 1998). F-Aktin ist ein helikales Polymer, dessen Untereinheiten die gleiche Polarität besitzen, d.h. sie sind in eine Richtung angeordnet. Dabei wächst das sogenannte „stumpfe“ Ende (*barbed end*) deutlich schneller als das „spitze“ Ende (*pointed end*) eines Aktinfilaments. Polymerisierungs- und Wachstumsvorgänge der Aktinfilamente liegen der Ausbildung zellulärer Fortsätze wie Lamellipodien und Filopodien zugrunde (Tilney *et al.*, 1981). Die spontane Aktinnukleation ist jedoch aus energetischen Gründen ein sehr seltenes Ereignis (Übersicht bei Pollard und Cooper, 1984). Um diese Energiebarriere zu überwinden, bedarf es eines molekularen Katalysators, der als Keimzelle für Filamente dient und so Aktinpolymerisation auslösen kann. Der bisher am besten erforschte Aktivator wird als Arp2/3-Komplex bezeichnet und besteht aus sieben Untereinheiten, von denen die beiden namensgebenden sogenannte *actin-related proteins* (Arps) sind (Machesky *et al.*, 1994; Machesky und Insall, 1998). Vielfältige Untersuchungen zur Funktion und Regulation dieses Komplexes führten zum Modell der dendritischen Aktinnukleation (Mullins *et al.*, 1998; Pollard *et al.*, 2001). Dieses Modell besagt, daß der Arp2/3-Komplex die Nukleation neuer Aktinfilamente am vorderen Ende der Zelle (*leading edge*) reguliert.

Einige Pathogene, wie z.B. *Listeria monocytogenes*, machen sich die Aktinnukleationsmaschinerie der Zelle zunutze, indem sie den primär inaktiven Arp2/3-Komplex aktivieren und sich dann mit Hilfe von Aktinschweifern durch die Zelle hindurch bewegen (Übersicht bei Cossart; 2000, Pantaloni *et al.*, 2001). Tatsächlich stammt das erste Arp2/3-Komplex-aktivierende Protein, das identifiziert wurde, aus *Listeria monocytogenes* (Welch *et al.*, 1998). Stimulatoren des Arp2/3-Komplexes und damit zentrale Regulatoren der Aktinpolymerisation finden sich jedoch auch innerhalb der eukaryontischen Zelle. Zu diesen gehören u.a. die Proteine der sogenannten WASp (Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein)-Familie (Linder *et al.*, 1999; 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). Proteine der WASp-Familie werden ihrerseits durch kleine GTPasen der Rho-Familie, insbesondere Rac und Cdc42, reguliert (Aspenstöm *et al.*, 1996).

Adhärente humane Monozyten/Makrophagen weisen typischerweise Aktin-reiche, punktförmige Adhäsionen, sogenannte Podosomen auf (Lehto *et al.*, 1982; Amato *et al.*, 1983; Übersicht bei Linder und Aepfelbacher 2003), die in flachen, peripheren Zellbereichen auftreten. Podosomen wurden auch in anderen monozytären Zellen wie Osteoklasten oder dendritischen Zellen (Marchisio *et al.*, 1984; West *et al.*, 2000), sowie in einigen Krebszellen und in v-Src transformierten Fibroblasten (Tarone *et al.*, 1985; Schuurin *et al.*, 1993) nachgewiesen. Die Tatsache, daß Podosomen vorwiegend in motilen Zellen auftreten und sie die Aktivität von Matrix-Metalloproteasen kontrollieren, trägt dazu bei, daß Podosomen eine Rolle bei der Invasion von Zellen und der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix zugesprochen wurde (Chen *et al.*, 1984; Mizutani *et al.*, 2002). Desweiteren übernehmen sie wichtige Funktionen bei der Adhäsion und Migration von Zellen (Linder *et al.*, 1999; Burns *et al.*, 2001). Podosomen sind hochdynamische Strukturen mit einer Halbwertszeit von 2-12 Minuten (Kanehisa *et al.*, 1990). Sie bestehen aus einer Aktin-reichen Kernstruktur, die von einem Ring Aktin-assoziierter Proteine wie Vinkulin, Talin oder Paxillin umgeben ist (Gavazzi *et al.*, 1989). Über Integrine wird der Kontakt zur extrazellulären Matrix hergestellt (Marchisio *et al.*, 1988).

Wirksame Manipulationen des Aktinzytoskeletts lassen sich durch Substanzen erzielen, die die Dynamik des gesamten Netzwerkes zerstören. Dazu zählen vor allem Pilzgifte wie Cytochalasine (Cytochalasin B und D) oder Phalloidin. Die Wirkungsweise dieser Gifte ist dabei sehr unterschiedlich. Cytochalasine binden an das *barbed end* eines Aktinfilaments und verhindern so die weitere Anlagerung von Monomeren (Mousa *et al.*, 1978), wohingegen Phalloidin sich zwischen die einzelnen Untereinheiten des Filaments lagert und dadurch die Depolymerisation unterbindet (Lengsfeld *et al.*, 1974). Natürlich auftretende Defekte in der Aktinregulation primärer Makrophagen können zu Krankheitsbildern wie dem Wiskott-Aldrich-Syndrom oder seiner milderer Form XLT (*X-linked thrombocytopenia*) führen. Betroffene Patienten leiden unter Exzembildung, Thrombozytopenie und einer deutlichen Immunschwäche (Snapper *et al.*, 1999; Übersicht bei Ochs, 2001), die wahrscheinlich zumindest zum Teil auf Defekten in der Wanderung von Immunzellen beruht (Thrasher *et al.*, 2000).

I.2. AUFNAHME VON PARTIKELN IN DIE ZELLE

Um ihre Funktion als professionelle Phagozyten erfüllen zu können, benötigen Makrophagen auch ein effektives Endozytose/Phagozytosesystem.

Endozytotische Prozesse können im Allgemeinen in unterschiedliche Schritte unterteilt werden: Invagination der Plasmamembran, Abschnürung des neu gebildeten Vesikels, Eintritt in den endozytotischen *Pathway* und Abbau der aufgenommenen Partikel in den Lysosomen.

Die initialen Aufnahmemechanismen können dabei sehr unterschiedlich sein. Man unterscheidet in diesem Zusammenhang Clathrin-abhängige und -unabhängige Aufnahmeformen. Zu den Clathrin-abhängigen Mechanismen zählt die Rezeptor-vermittelte Endozytose (z.B. von LDL, Transferrin, Wachstumsfaktoren oder Insulin), wohingegen Phagozytose (Fc- oder Komplementrezeptor-vermittelt), Makropinozytose und Aufnahme über Caveolae Clathrin-unabhängige Aufnahmeformen sind. Wahrscheinlich existieren aber auch noch andere Clathrin-unabhängige Aufnahmeformen (Übersicht bei Conner und Schmid, 2003). 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. Bildung Clathrin-beschichteter Vesikel

Die Aufnahme von Proteinen über Rezeptor-vermittelte Endozytose ist der am besten untersuchte Clathrin-abhängige Aufnahmemechanismus. 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 Clathrin-Vesikel wird eine Vielzahl weiterer Proteine benötigt. So fördern Adapterkomplexe die Polymerisation der Clathrinmoleküle, was für die Bildung der für die CCV typischen Clathrin-Käfigstruktur essentiell ist. Es existieren unterschiedliche Arten von Adapterkomplexen, AP1-AP4, die aus verschiedenen, jedoch verwandten Untereinheiten zusammengesetzt sind (Übersicht bei Kirchhausen, 2000). An der Plasmamembran ist AP2 an der Bildung der CCV beteiligt. AP2 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 Rezeptoren an Stellen der sich bildenden Clathrin-Vesikel 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 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), sowie SNAREs (*soluble N-ethylmaleinimide sensitive factor adaptor protein receptor*) für spätere Fusionsereignisse (Nichols *et al.*, 1997; Skehel und Wiley, 1998), z.B. mit den frühen Endosomen (s.u.).

I.2.1.2. Die Kompartimente des endo-lysosomalen Pathway

Vor allem aus konzeptionellen Gründen lassen sich endozytotische Kompartimente in drei Gruppen einteilen: frühe Endosomen (*early endosomes*), späte Endosomen (*late endosomes*) und Lysosomen.

Nach Abschnürung eines Partikels von der Plasmamembran führt die Aktivierung von Auxillin und Hsc70 (Ungewickell, 1999) zum Verlust der Clathrin-Hülle. Das daraus resultierende Endosom wandert entlang von Mikrotubuli in Richtung Zellinneres (dieser Vorgang wird auch als Reifung des Endosoms bezeichnet) und verschmilzt letztlich mit Lysosomen, in denen das aufgenommene Material abgebaut werden.

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. Frühe Endosomen bilden bereits die erste „Sortieranlage“ innerhalb des endozytotischen *Pathway* und sorgen dafür, daß aufgenommene Proteine bzw. Rezeptoren gemäß ihrer Bestimmung weitergeleitet werden. Daher werden frühe Endosomen auch als *sorting endosomes* bezeichnet. Ultrastrukturelle Studien zeigen, daß frühe Endosomen äußerst pleiomorphe Kompartimente sind, 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).

Aufgenommenes Material, das degradiert werden soll, wird ausgehend von den Endosomen in sogenannte *endocytic carrier vesicles* überführt und anschließend späten Endosomen und dann Lysosomen zugeführt. **Späte Endosomen** und

Lysosomen unterscheiden sich von den frühen Endosomen vor allem durch ihren sauren pH-Wert. In hämatopoetischen Zellen zeigen späte endosomale Kompartimente sekretorisches Potential (Blott und Griffiths, 2002). Besonders im Hinblick auf die Antigenpräsentation ist dies von immenser 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. Lysosomale Enzyme sind aber auch in der Lage, Membranen und Organellen, die von der Zelle nicht mehr benötigt werden, zu zerstören. Diese Enzyme sind nur im sauren Milieu aktive Hydrolasen, zu denen Phosphatasen, lysosomale Nukleasen und Proteasen zählen. Um deren Aktivität zu gewährleisten, wird durch eine Protonenpumpe der pH-Wert im Inneren des Kompartiments konstant gehalten.

Den einzelnen endosomalen Kompartimenten können unterschiedliche **Markerproteine** zugeordnet werden, wobei insbesondere kleine GTPasen der Rab-Familie diesbezüglich gut charakterisiert sind. 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). Weiterhin ist Rab5 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).

Eine klare Trennung zwischen den einzelnen Kompartimenten ist oft nicht möglich, da es sehr viele Übergänge und Überlappungen zwischen den verschiedenen Stadien des endozytotischen *Pathways* gibt. In Abbildung 1 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. Deshalb 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 z.B. 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).

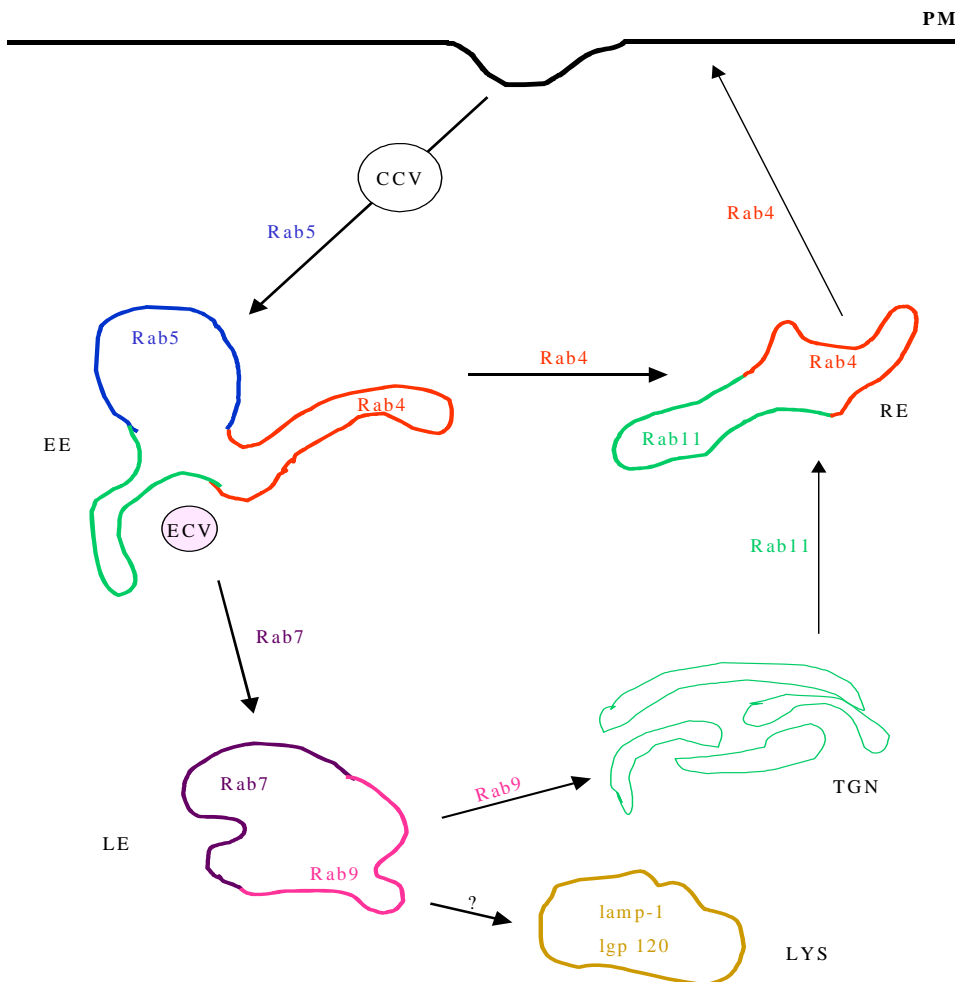


Abb.1: Koordinierte Regulation des endozytotischen Pathways durch Rab-Proteine. Moleküle, die über Clathrin-beschichtete Vesikel aufgenommen werden, gelangen in frühe Endosomen (*early endosomes*). Von dort können sie zu den späten Endosomen (*late endosomes*) und schließlich zu Lysosomen gelangen, in denen sie degradiert werden. Alternativ können diese Moleküle, z.B. Rezeptoren, auch über *recycling*-Endosomen 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

Phagozytose ist definiert als Aufnahme großer Partikel ($> 0,5 \mu\text{m}$) über einen Aktin-abhängigen (Kaplan, 1977), aber Clathrin-unabhängigen Mechanismus.

Die effizientesten Phagozytosemechanismen findet man in sogenannten professionellen Phagozyten, zu denen neben den Monozyten/Makrophagen auch die neutrophilen Granulozyten und B-Zellen zählen. In Monozyten/Makrophagen spielt Phagozytose v.a. hinsichtlich ihrer Aufgabe bei der Immunantwort eine wichtige Rolle.

Zur Unterscheidung zwischen „körperfremd“ und „körpereigen“ befinden sich auf der Oberfläche der Makrophagen eine Reihe von Rezeptoren. Zu diesen gehören sogenannte *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. *Toll-like receptor 4* (TLR4) ist essentiell für LPS-induzierte Immunantwort (Poltorak *et al.*, 1998; Hoshino *et al.*, 1999). In Makrophagen wird durch Bindung von LPS an diesen Rezeptor 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 diversen inflammatorischen Antworten.

Desweiteren exprimieren Makrophagen auf ihrer Oberfläche den Mannose-Rezeptor (Stahl und Ezekowitz, 1998), $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ Integrine (Blystone *et al.*, 1994), CD14 (Devitt *et al.*, 1998) und *scavenger*-Rezeptoren (Platt *et al.*, 1998).

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 ist C3bi, das als eigenständiges Opsonin wirkt. Über C3bi opsonierte Pathogene werden über den Komplementrezeptor 3 (CR3), der v.a. auf Monozyten/Makrophagen exprimiert wird, phagozytiert (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 zwischen Rezeptor und Ligand führt dabei zur Phosphorylierung spezifischer Tyr-Reste im Rezeptor (Isakov, 1997). Diese Reaktion wird von definierten Mitgliedern der src-Familie der Tyrosin-Kinasen vermittelt (Ghazizadeh und Fleit, 1994). Eine wichtige Rolle spielt dabei die Kinase Syk (Ghazizadeh *et al.*, 1995; Agarwal, 1993), deren genaue Funktion jedoch kontrovers diskutiert wird (Cox *et al.*, 1996; Greenberg *et al.*, 1996 versus Crowley *et al.*, 1997).

Die Aktivierung des Fc-Rezeptors hat die Rekrutierung der kleinen RhoGTPasen Rac1 und Cdc42 zur Folge (Caron und Hall, 1998), deren Zusammenspiel die Ausbildung von Zellausläufern um das Partikel sowie dessen Internalisierung bewirkt (Massol *et al.*, 1998). In diesen Prozeß sind auch Effektoren der genannten GTPasen, wie die Aktinregulatoren WASp und der Arp2/3-Komplex (May *et al.*, 2000) oder PAK-1 (Diakonova, 2002) involviert. Die Weiterleitung des Phagozytosesignals und die sogenannte Reifung des Phagosoms wird unter anderem von PI3-Kinase (Ninomiya *et al.*, 1994), Proteinkinase C (Zheleznyak und Brown, 1992) und Motorproteinen der Myosin-Familie (Stendahl *et al.*, 1980; Swanson *et al.*, 1999) moduliert.

FcR-vermittelte Phagozytose führt in den Makrophagen zur Freisetzung pro-inflammatorischer Moleküle wie reaktiver Sauerstoffspezies oder Arachidonsäurederivate (Aderem *et al.*, 1985; Wright und Silverstein, 1983), die in späten Stadien der Immunantwort zur Abtötung der Keime notwendig sind.

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

I.2.2.1.2. Komplementrezeptor- vermittelte Phagozytose

Während bei der FcR-vermittelten Phagozytose prominente Membranausstülpungen um das zu internalisierende Partikel gebildet werden, „sinken“ Komplementopsonisierte Pathogene in die Phagozyten ein (Caron und Hall, 1998; Kaplan, 1977). Der Komplementrezeptor 3 (CR3) ist ein $\alpha_m\beta_2$ -Integrin und wird nach Aktivierung, z.B. durch PKC-Aktivatoren (Buyon *et al.*, 1990), TNF α (*tumor necrosis factor α*) oder GM-CSF (*granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*; Wright und Griffin, 1985) an der α -Kette phosphoryliert.

RhoGTPasen, speziell RhoA, greifen auch bei dieser Art der Phagozytose in die Regulation mit ein. 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 des Rho-Effektors 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. Das Phagosom verschmilzt letztlich mit Lysosomen zum Phagolysosom und die aufgenommenen Partikel werden degradiert. Je nach Beschaffenheit 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).

Einigen Mikroorganismen gelingt es jedoch, dem lysosomalen Abbau zu entgehen. Dies geschieht z.B. durch Umstrukturierung des Phagosoms (Mycobakterien), Ausbruch aus dem Phagosom (*Listeria*) bzw. durch Strategien, die das Überleben im Lysosom ermöglichen (*Coxiella*, *Salmonella*, *Legionella*). Obligat extrazelluläre Parasiten dagegen sind in der Lage, bereits die initialen Aufnahmemechanismen zu umgehen (z.B. Yersinien oder Pseudomonaden; Übersicht bei Ernst, 2000). 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 Eigenschaften z.B. von Fusionsereignissen zwischen endosomalen Kompartimenten zu gewinnen.

I.2.2.2. Makropinozytose

Makropinozytose bezeichnet die Ausbildung großer (> 0,5 - 5 µm) Vesikel in einem Clathrin-unabhängigen Mechanismus. Über Makropinozytose werden alle Stoffe aufgenommen, die für die Internalisierung über Clathrin-abhängige Mechanismen zu groß sind und nicht an einen Rezeptor binden, der phagozytäre Aufnahmeprozesse aktiviert. Zur Bildung makropinozytotischer Vesikel ist auch ein intaktes Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett notwendig. Das aufgenommene Material wird entweder dem endozytotischen *Pathway* zugeführt oder wieder in den extrazellulären Raum transportiert (Amyere *et al.*, 2002). In höheren Eukaryonten findet man die sogenannte konstitutive Makropinozytose, die jedoch auf unreife dendritische Zellen (Steinman und Swanson, 1995) oder aktivierte Makrophagen beschränkt ist. In den meisten anderen Zelltypen können makropinozytotische 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 nutzen solche Prozesse, um in die Zelle zu gelangen und sich dort zu vermehren. Dazu gehören z.B. Pathogene der Spezies *Salmonella* oder *Shigella* (Alpuche-Aranda *et al.*, 1994; Finlay und Cossart, 1997).

Makropinozytotische 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 RhoGTPasen 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).

Regulatoren makropinozytotischer Prozesse sind die RhoGTPase 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 Regulationsmechanismen interagieren mit den vorher beschriebenen und bilden so das komplexe Signaltransduktionsnetzwerk, welches den Ablauf makropinozytotischer Vorgänge steuert (Übersicht bei Amyere *et al.*, 2002).

I.2.3. Endozytose und das Aktinzytoskelett

Die stärkste Akkumulation an Aktinfilamenten findet sich im Allgemeinen in der Region direkt unter der Plasmamembran, dem sogenannten Cortex. Die Einflüsse des kortikalen Aktins hinsichtlich der Endozytose/Phagozytose sind zwar noch nicht völlig aufgeklärt, jedoch könnte einem Modell zufolge die Beteiligung des Aktins folgendermaßen aussehen (adaptiert nach Qualmann *et al.*, 2000):

Cortikales Aktin reguliert die räumliche Anordnung der Endozytosemaschinerie an der Plasmamembran. Dabei fungiert das Aktin als physikalische Barriere, die die benötigten Komponenten an der lateralen Mobilität hindert.

Durch die Aktinorganisation 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 reguliert auch direkt Vesikelbewegungen im Zytoplasma durch eine vesikelständige Aktinpolymerisationsmaschinerie, die die Vesikel, ähnlich wie für das intrazelluläre Pathogen *Listeria monocytogenes* gezeigt, auf einem Aktinschweif vorantreibt. Vesikel müssen durch das visköse Zytoplasma hindurch transportiert werden, um zu ihren Bestimmungsorten zu gelangen. Die 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) und *in vitro* für Lysosomen (Taunton *et al.*, 2000).

Inzwischen sind einige Moleküle bekannt, die das Aktinzytoskelett 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 dienen Mikrotubuli 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*-Endosomen 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. RhoGTPasen

I.3.1. Funktionen von RhoGTPasen

GTPasen der Rho-Familie sind GTP-bindende Proteine von 20-30 kDa und zählen zur Ras-Superfamilie. Man kennt bis dato in Säugern über mehr als 10 verschiedene RhoGTPasen, wovon einige in unterschiedlichen Isoformen vorkommen (Bishop und Hall, 2000; Übersicht bei Etienne-Manneville und Hall, 2003).

RhoGTPasen sind zentrale Regulatoren vieler Signaltransduktionskaskaden und kontrollieren u.a. die Dynamik des Aktinzytoskeletts, Transkription, Zellzyklus, Adhäsion, Migration und den *membrane traffic* (Hall, 1998; Van Aelst und D'Souza-Shorey, 1997; Bishop und Hall, 2000).

Die am besten untersuchten GTPasen der Rho-Familie sind RhoA/B, Rac1 und Cdc42 (Ridley, 2001 [1]). Es existieren Mutanten der jeweiligen Proteine, die durch Inaktivierung der intrinsischen GTPase-Aktivität entweder konstitutiv aktiv (z.B. V14RhoA, V12Rac, V12Cdc42) oder durch reduzierte Affinität zu GTP konstitutiv inaktiv (z.B. N19RhoA, N17Rac1, N17Cdc42) sind (Feig, 1999; Übersicht bei Ridley, 2001 [1]). Unter anderem mit Hilfe dieser Mutanten wurde der Einfluß der genannten RhoGTPasen auf das Aktinzytoskelett intensiv untersucht (Hall, 1998; Übersicht bei Ridley, 2001 [2]). So konnte gezeigt werden, daß RhoA an der Regulation von Streßfasern und fokalen Adhäsionen beteiligt ist (Ridley und Hall, 1992), Rac1 *membrane ruffling* moduliert (Ridley *et al.*, 1992) und Cdc42 die Ausbildung von Filopodien reguliert (Kozma *et al.*, 1995; Nobes und Hall, 1995). Vergleichbare Effekte erhielt man durch eine Reihe bakterieller Toxine, die Mitglieder der Rho-Familie kovalent modifizieren und sie dadurch aktivieren oder inaktivieren (Übersicht bei Aktories, 1997; Lerm, 2000; Übersicht bei Boquet und Lemichez, 2003).

In den letzten Jahren häufen sich die Hinweise, daß RhoGTPasen auch eine große Rolle bei endozytotischen und phagozytotischen Vorgängen spielen (Übersicht bei Ridley, 2001 [1]; Übersicht bei Qualmann und Mellor, 2003; Symons und Rusk, 2003).

I.3.2. RhoGTPasen und *membrane traffic*

Mitglieder der Rho-Familie regulieren sowohl die initiale Aufnahme von Partikeln als auch eine Vielzahl von endozytotischen Schritten. In diesem Zusammenhang sind vor allem Effekte von RhoA, Rac1 und Cdc42 bekannt, wobei jedoch auch Untersuchungen „nicht-klassischer“ RhoGTPasen wie z.B. RhoB (Robertson *et al.*, 1995) oder TC10 (Murphy *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 2001) vorliegen.

Cdc42 konnte am Golgi-Apparat lokalisiert werden (Erickson *et al.*, 1996), wo es mit der γ -Untereinheit des sogenannten *Coatomer*-Komplexes interagiert (Wu *et al.*, 2000). Desweiteren reguliert Cdc42 die polarisierte Endo- und Exozytose an der basolateralen Membran von Epithelzellen (Kroschewski *et al.*, 1999) und ist für die Exozytose in Mastzellen verantwortlich (Brown *et al.*, 1998; Hong-Geller und Cerione, 2000).

Im Zusammenspiel mit Rac1 reguliert Cdc42 die Fc-Rezeptor-vermittelte Endozytose (Massol *et al.*, 1998; Bagrodia und Cerione, 1999; Botelho *et al.*, 2000; May und Machesky, 2001; Diakonova *et al.*, 2002), Makropinozytose in dendritischen Zellen aus dem Knochenmark (Garrett *et al.*, 2000) und die Phagozytose apoptotischer Zellen (Albert *et al.*, 2000; Leverrier und Ridley 2001).

Rac1 ist für makropinozytotische Vorgänge in aus dem Blut stammenden dendritischen Zellen verantwortlich (Nobes und Marsh, 2000). Man findet dieses Protein assoziiert mit synaptischen Vesikeln, wo es vermutlich die Freisetzung der Neurotransmitter reguliert (Dousseau, 2000). Zusammen mit RhoA ist Rac1 in die Aufnahme von Transferrin in die Zelle involviert (Lamaze *et al.*, 1996) und lokalisiert mit RhoA an Caveolae, deren Entstehung durch diese beiden GTPasen gesteuert wird (Senda *et al.*, 1997; Michaely *et al.*, 1999).

RhoA wiederum reguliert durch Interaktionen mit dem Aktinzytoskelett die Komplementrezeptor-vermittelte Phagozytose (Allen und Aderem, 1996; Caron und Hall, 1998; May *et al.*, 2000).

RhoB findet man lokalisiert an späten Endosomen (Adamson *et al.*, 1992) und an dem sogenannten *multivesicular body*, einem prälysosomalen Kompartiment (Robertson *et al.*, 1995). Ebenso konnte RhoB an perinuklären Golgi-Vesikeln nachgewiesen werden (Michaelson *et al.*, 2001).

Tc10, eine Cdc42-ähnliche GTPase, reguliert die Glucose-Aufnahme über GLUT4-Transporter (Chiang *et al.*, 2001). Desweiteren wurde dieses Protein an der Plasmamembran und an lamp-1-positiven späten Endosomen gefunden (Michaelson *et al.*, 2001).

I.3.3. Regulatoren der RhoGTPasen

Um ihre Funktionen erfüllen zu können, fungieren RhoGTPasen als molekulare Schalter, die von einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand in einen aktiven, GTP-gebundenen Zustand übergehen können. Dieser Zyklus wird von drei Gruppen regulatorischer Proteine moduliert (Boguski und McCormick, 1993). In Abbildung 2 ist eine Übersicht über die beteiligten Proteine dargestellt.

Die meisten RhoGTPasen lokalisieren bevorzugt im Zytosol. Durch eine posttranslationale Modifikation, die zur Prenylierung eines Cystein-Restes am C-Terminus führt, sind sie jedoch in der Lage, auch mit Membranen zu interagieren (Casey *et al.*, 1989). Dieser Membrankontakt ist wichtig für die Aktivität der RhoGTPasen (Willumsen *et al.*, 1984; Casey *et al.*, 1991; Bokoch *et al.*, 1994).

Im inaktiven Zustand sind Rho-Proteine im Zytosol in einem löslichen Komplex mit GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*) zu finden (Olofsson, 1999). Die Interaktion mit den GDIs wird durch den Austausch von GDP zu GTP und die intrazelluläre Lokalisation gelöst. Die Wechselwirkung mit GDIs wird u.a. auch durch

die Prenylierung ermöglicht (Hancock und Hall, 1993). GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) katalysieren den Austausch von GDP zu GTP und damit die Aktivierung der GTPase (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997; Kjoller und Hall, 1999; Zheng, 2001). Da GEFs größtenteils an Membranen lokalisiert sind, wird vermutet, daß die GTPase als Antwort auf einen extrazellulären Stimulus von dem GDI dissoziiert oder zusammen mit diesem an die Membran rekrutiert wird, wo sie mit den GEFs in Kontakt treten kann. In der aktiven Form interagieren die GTPasen mit einer Vielzahl von Effektorproteinen (Übersicht bei Kaibuchi *et al.*, 1999) und regulieren dabei bevorzugt deren Aktivität (Aspenström, 1999). GAPs (*GTPase-activating proteins*) interagieren mit der GTP-gebundenen Form der GTPase. Sie bewirken deren Inaktivierung, indem sie die intrinsische GTPase-Aktivität beschleunigen (Lamarche und Hall, 1994).

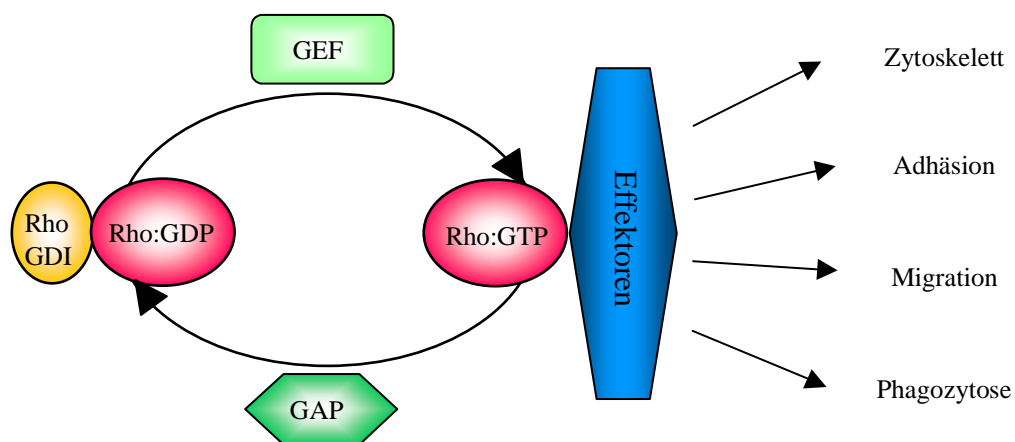


Abb.2: Der Aktivierungszyklus der RhoGTPasen. RhoGTPasen können von einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand in einen aktiven, GTP-gebundenen Zustand übergehen. Moduliert wird dieses Umschalten von GEFs, die den GDP/GTP-Austausch katalysieren und GAPs, die die GTP-Hydrolyse bewirken. GDIs halten die GTPase im Zytosol im GDP-gebundenen oder möglicherweise auch GTP-gebundenen Zustand fest. In ihrer aktiven Form interagieren GTPasen der Rho-Familie mit Effektorproteinen und steuern so eine Vielzahl zellulärer Prozesse. GDI: *guanine nucleotide dissociation inhibitor*, GEF: *guanine nucleotide exchange factor*, GAP: *GTPase-activating protein*.

I.3.4. GTPase-inaktivierende Proteine: RhoGAPs

I.3.4.1. Allgemein

Neuere Untersuchungen zeigen unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen und Funktionen von RhoGAP-Proteinen (Übersicht bei Moon und Zheng, 2003). So ist p190RhoGAP (eines der am besten untersuchten Mitglieder dieser Proteinfamilie) involviert in die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Stabilität von Axonen (Brouns *et al.*, 2000; Brouns *et al.*, 2001). Nadrin, ein Neuronen-spezifisches GAP, ist mit dem kortikalen Aktinnetzwerk am Ende von Neuriten assoziiert und moduliert die Ca^{2+} -abhängige Exozytose an der präsynaptischen Membran (Harada *et al.*, 2000).

Die Regulation der GAP-Proteine kann über Phosphorylierung (z.B. p190RhoGAP; Hu und Settleman, 1997; Roof *et al.*, 1998; Brouns *et al.*, 2000), Lipidbindung (z.B. Chimaerine; Caloca, 1997; Caloca, 1999; Caloca, 2001) oder Protein-Protein-Interaktionen (z.B. CdGAP; Jenna, 2002) erfolgen.

Allen RhoGAP-Proteinen ist eine konservierte GAP-Domäne von ca. 150 AS Länge gemein, die sich von den katalytischen Domänen der GAP-Proteine anderer Klassen von GTPasen (z.B. Ras oder ARF) deutlich unterscheidet. Die GAP-Domäne ist für die Bindung an die aktivierte GTPase und anschließende GTP-Hydrolyse völlig ausreichend. Bisher sind 53 unterschiedliche Proteine identifiziert, die eine RhoGAP-Domäne enthalten (Übersicht bei Peck *et al.*, 2002; Bernards, 2003). Die GAP-Domäne besteht aus neun α -Helices mit einem konservierten Arg-Rest in einer *loop*-Struktur (Arg 282; Gamblin und Smerdon, 1998). Dieser Arg-Rest tritt mit einem Gln-Rest der GTPase in Wechselwirkung, welcher für die Positionierung eines für die Hydrolyse benötigten H₂O-Moleküls wichtig ist. Die Stabilisierung dieses Gln-Restes durch das Arg beeinträchtigt die freie Beweglichkeit des H₂O-Moleküls und reduziert so die Energiebarriere für die GTP-Hydrolyse (Nassar *et al.*, 1998).

Viele Mitglieder der RhoGAP-Familie weisen neben der katalytischen GAP-Domäne noch weitere funktionelle Motive auf. Dazu zählen u.a. katalytische Domänen wie RhoGEF-Domänen oder Protein-Kinase Domänen (z.B. Bcr) ebenso wie Protein-Protein- und Protein-Lipid-Adapterdomänen wie SH2- (z.B. α 2-Chimärin), SH3- (z.B. PSGAP) oder PH-Domänen (z.B. ARAP1). Deshalb können RhoGAP-Proteine auch Funktionen unabhängig von ihrer GAP-Funktion erfüllen (Übersicht bei Moon und Zheng, 2003).

Bcr z.B. ist potentiell in der Lage, über seine GEF-Domäne auch als Aktivator von Rac und Cdc42 zu wirken, auch wenn diese Funktion in Zellen noch nicht nachgewiesen wurde (Chuang *et al.*, 1995). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch ein Protein aus *Dictyostelium discoideum* namens DRG (*Dictyostelium discoideum* RacGAP), das ebenfalls sowohl eine GEF- als auch eine GAP-Domäne aufweist (Ludbrook *et al.*, 1997; Knetsch *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, daß die GEF-Region vornehmlich mit Rac1, die GAP-Region dagegen bevorzugt mit RhoE und RabGTPasen interagiert (Knetsch *et al.*, 2001). Dadurch kann DRG über die genannten Domänen unterschiedliche Signalwege über verschiedene GTPasen regulieren.

Proteine, die eine GAP-Domäne enthalten, können aber auch als Effektoren von RhoGTPasen wirken. So interagiert z.B. die regulatorische p85-Untereinheit der PI3-Kinase, die ebenfalls eine GAP-Domäne aufweist, mit Rac und Cdc42, ohne deren intrinsische GTPase-Aktivität zu beeinflussen (Zheng *et al.*, 1994). Vielmehr stimuliert die Interaktion zwischen Rac bzw. Cdc42 und der p85-Untereinheit die PI3-Kinase-Aktivität *in vitro*, so daß hier die p85-Untereinheit trotz ihrer GAP-Domäne als Effektor und nicht als negativer Regulator der genannten RhoGTPasen wirkt (Zheng *et al.*, 1994; Tolia *et al.*, 1995; Bokoch *et al.*, 1996).

RhoGAP-Proteine mit einer GAP-unabhängigen Funktion findet man auch in Bakterien. Zu den bakteriellen RhoGAP-Proteinen zählen u.a. ExoS aus *Pseudomonas aeruginosa* oder YopE aus *Yersinia enterocolitica*. ExoS aus *Pseudomonas aeruginosa* ist ein bifunktionelles Zytotoxin, das am N-Terminus eine GAP-Domäne und am C-Terminus eine ADP-Ribosyltransferasefunktion aufweist (Barbieri *et al.*, 2001). Durch die GAP-Domäne wirkt dieses Protein als negativer Regulator von Rac, Cdc42 und Rho *in vitro* und *in vivo* (Goehring *et al.*, 1999; Krall *et al.*, 2002). Dagegen inhibiert ExoS durch ADP-Ribosylierung von Rab5 frühe Stadien des endolysosomalen *Pathways* und verhindert so die Interaktion von Rab5 mit EEA-1 und damit die Endosomenfusion (Barbieri *et al.*, 2001), was für das Überleben des

Bakteriums eine wichtige Rolle spielt. Im Gegensatz dazu ist *Yersinia enterocolitica* ein obligat extrazelluläres Bakterium, das verhindern muß, von Phagozyten aufgenommen zu werden. Diese anti-phagozytäre Wirkung wird durch YopE vermittelt, welches durch ein sogenanntes Typ III-Sekretionssystem in die Zelle gelangt (Cornelis und Wolf-Watz, 1997; Cornelis *et al.*, 1998; Hueck, 1998). In HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, daß die anti-phagozytäre Wirkung von YopE durch konstitutiv aktives Rac1 unterbunden werden kann. Das bedeutet, daß YopE in diesen Zellen GTPase-Aktivität v.a. gegenüber Rac1 hat und durch die Inhibition von Rac1 und die Aufnahme von *Yersinia* in die Zelle verhindert (Black und Bliska, 2000).

Die GAP-Aktivität der genannten bakteriellen GAPs wird, wie auch schon für nicht-bakterielle GAPs gezeigt (s.o.), über ein konserviertes Arg-Finger-Motiv vermittelt. Die Mutation des essentiellen Arg-Restes in ExoS oder YopE führt zur Inhibition der GAP-Funktion (Fu und Galán, 1999; Goehring *et al.*, 1999; Black und Bliska, 2000).

I.3.4.2. Cdc42GAP

Das erste und mit 499 Aminosäuren gleichzeitig kleinste RhoGAP Protein, das identifiziert wurde, ist Cdc42GAP, auch p50RhoGAP genannt (Barfod *et al.*, 1993; Lancaster *et al.*, 1994). Dieses Protein zeigt *in vitro* GTPase-Aktivität v.a. gegenüber Cdc42 und ist etwas weniger aktiv gegenüber anderen RhoGTPasen wie Rac1 und RhoA (Barfod *et al.*, 1993; Ridley *et al.*, 1993; Lancaster *et al.*, 1994). Cdc42GAP ist ein Multidomänenprotein, das neben der konservierten GAP-Domäne noch zwei Protein-Protein-Interaktionsdomänen (PolyPro und BCH/Sec14) aufweist.

In Abbildung 3 ist die Domänenstruktur von Cdc42GAP schematisch dargestellt.



Abb.3: Domänenstruktur von Cdc42GAP. BCH: *BNIP-2 and Cdc42GAP homology domain*, PPro: PolyProlin-Domäne; GAP: *GTPase activating domain*. Die Zahlen geben die Position des jeweiligen Aminosäurerestes an.

Die BCH-Domäne (*BNIP-2 and Cdc42 homology domain*) wurde im Jahre 2000 charakterisiert, als ein neues GAP für Cdc42 namens BNIP-2 entdeckt wurde (Low *et al.* 2000 [1]; Low *et al.*, 2000 [2]). Es stellte sich heraus, daß der Carboxyterminus von BNIP-2 große Homologie zum N-terminalen, nicht-katalytischen Bereich von Cdc42GAP aufweist. Es konnte nachgewiesen werden, daß über diese BCH-Domäne Homo- und Heterodimere zwischen BNIP-2 und Cdc42GAP gebildet werden können. Allerdings ist die BCH-Domäne von Cdc42GAP katalytisch inaktiv, wohingegen die von BNIP-2 die GTPase-Aktivität von Cdc42 steigert (Low *et al.*, 2000 [1]).

Über die PolyPro-Region ist Cdc42GAP in der Lage, mit SH3-Domänen von z.B. c-Src oder der p85-Untereinheit der PI3-Kinase *in vitro* zu interagieren (Barfod, 1993). Das läßt darauf schließen, daß Cdc42GAP auch Funktionen ausüben kann, die

von der GAP-Aktivität unabhängig sind. Bis dato ist jedoch für Cdc42GAP nichts über solche GAP-unabhängigen Funktionen bekannt.

I.4. FRAGESTELLUNG

Obwohl biochemische sowie strukturelle Daten zu Cdc42GAP vorliegen, ist bis zum heutigen Zeitpunkt nichts über seine subzelluläre Lokalisation oder zellbiologische Funktion bekannt. Initiale Ergebnisse zu Beginn meiner Dissertation zeigten, daß Cdc42GAP in Makrophagen spezifisch an vesikuläre Strukturen lokalisiert.

Daran schlossen sich folgende weitergehende Fragen an:

- (1) Ist es möglich, die subzelluläre Verteilung von Cdc42GAP durch physiologische Stimuli zu modulieren?**
- (2) Was ist die Identität der Cdc42GAP-positiven Strukturen?**
- (3) Kann die Dynamik der Cdc42GAP-positiven vesikulären Strukturen dargestellt werden?**
- (4) Basiert die Lokalisation von Cdc42GAP auf seiner Funktion als negativer Regulator von kleinen GTPasen der Rho-Familie und/oder kolokalisiert es mit einer seiner Ziel-GTPasen, z.B. Rac oder Cdc42?**
- (5) Können bestimmte Bereiche im Cdc42GAP-Molekül identifiziert werden, die für die Lokalisation verantwortlich sind, z.B. Protein-Protein-Interaktionsdomänen wie die Poly-Prolin-Domäne?**
- (6) Ist die Lokalisation mit einer Makrophagen-spezifischen Funktion, wie z.B. Degradation von Pathogenen oder Antigenpräsentation zu verknüpfen?**

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden in primären humanen Makrophagen, in einem Makrophagen-Modellsystem und vereinzelt in anderen Zelltypen zellbiologische und biochemische Untersuchungen durchgeführt. Die *in vitro*-Experimente wurden dabei in manchen Fällen durch videomikroskopische Aufnahmen lebender Zellen ergänzt.

II. MATERIAL

II. 1. Bakterienstämme

- *Escherichia coli* DH5 α : F⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_K⁻,m_K⁺) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1* (GibcoBRL)
- *Staphylococcus aureus* DU5883 (pFnBA4): generiert aus *S. aureus* DU5883 (FnBPA⁻, FnBPB⁻, rekomplementiert mit dem Plasmid pFNBA4), produziert dadurch Voll-Längen FnBPA; Tc^R, Cm^R und Em^R

II.2. Chemikalien

Alle aufgeführten Chemikalien hatten p.a. Qualität und wurden von folgenden Firmen geliefert:

- Amersham Pharmacia (Deutschland)
- BioWhittaker Molecular Applications (Dänemark)
- Biozym (Deutschland)
- Dianova (Deutschland)
- Difco (Deutschland)
- Merck (Deutschland)
- Roche Diagnostics GmbH (Deutschland)
- Sigma-Aldrich (Deutschland)

II.3. Enzyme

- | | |
|----------------------------|--------------------------------------|
| ▪ <i>Bam</i> HI | New England Biolabs (Deutschland) |
| ▪ <i>Bgl</i> II | New England Biolabs (Deutschland) |
| ▪ <i>Eco</i> RI | New England Biolabs (Deutschland) |
| ▪ <i>Hind</i> III | New England Biolabs (Deutschland) |
| ▪ <i>Sal</i> I | New England Biolabs (Deutschland) |
| ▪ <i>Xho</i> 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.4. Kit-Systeme

- | | |
|---|--|
| ▪ QIAquick TM PCR-Purification Kit | Qiagen GmbH (Deutschland) |
| ▪ QIAquick TM Gel-Extraction Kit | Qiagen GmbH (Deutschland) |
| ▪ QIA [®] Spin Miniprep Kit | Qiagen GmbH (Deutschland) |
| ▪ Endofree [®] Plasmid Maxi Kit | Qiagen GmbH (Deutschland) |
| ▪ Nucleobond AX100 Midipräp Kit | Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Deutschland) |
| ▪ <i>Taq</i> PCR Core Kit | Qiagen GmbH (Deutschland) |
| ▪ MiniMACS CD14 Microbeads | Miltenyi Biotech GmbH (Deutschland) |

II.5. Transfektionsreagenzien

- Exgen 500 (MBI Fermentas, Deutschland)
- Metafectene (Biontexas, 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 und 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 und 1000 µl), Gilson International B.V. (Den Haag, Niederlande)
Schüttelinkubatoren	GFL-3031, Gesellschaft f. Labortechnik mbH (Burgwedel, Deutschland)
Spektrophotometer	Kontron Instruments (Watford, UK)
Speedvac	UniVapo 150 H, UniEquip Laborgerätebau und Vertriebs GmbH (Martinsried, Deutschland)
Tischzentrifugen	Biofuge <i>fresco</i> , Heraeus Sepatech (Osterode, Deutschland) Biofuge A, Heraeus Sepatech (Osterode, Deutschland)
Thermocycler	Uno-Thermoblock, Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland) Mastercycler gradient, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Ultrazentrifuge	Optima™ TK'LX Ultrazentrifuge, Beckman Coulter (Fullerton, USA) L7-55 Ultrazentrifuge, Beckman Coulter (Fullerton, USA)
Zentrifugen	Centricon H-401, Kontron Instruments (Watford, UK) Omnifuge 2.0RS, Heraeus Sepatech (Osterode, Deutschland) MR 1812, Jouan (Winchester, USA)

II.7. Antikörper

II.7.1. Primäre Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten, kommerziell erworbenen primären Antikörper sind in nachfolgender Tabelle alphabetisch aufgeführt

Antikörper gegen	aus Spezies	bezogen von
Aktin	Maus	Chemicon
BiP/GRP78	Maus	BD Transduction Labs.
Caveolin 2	Maus	BD Transduction Labs.
Cdc42GAP	Maus	BD Transduction Labs.
EEA-1	Maus	BD Transduction Labs.
Mannose-Rezeptor	Maus	BD Pharmingen
PAK (C19)	Kaninchen	Santa Cruz
Rab 4	Maus	BD Transduction Labs.
Rab 5	Maus	BD Transduction Labs.
Rab 11	Maus	BD Transduction Labs.
TGN 38	Maus	BD Transduction Labs.

Außerdem wurden die folgenden Antikörper von nachfolgend genannten Personen freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

- anti-lamp-1 (Maus) von Dr. O. Radmark, Karolinska Institut, Stockholm (Schweden)
- anti-COP II (Name: E5A3; Maus) von Prof. Dr. M. Schleicher, Adolf-Butenandt-Institut, Zellbiologie, LMU München (Deutschland)
- 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)

II.7.2. Sekundäre Antikörper

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten sekundären Antikörper für Immunfluoreszenz und *Western Blot* sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Antikörperbezeichnung	bezogen von
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
Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-linked F(ab') ₂ fragment (from donkey)	Amersham

II.8. Plasmide

II.8.1. Kommerziell erworbene Plasmide

a) Bakterielle Expressionsplasmide

- pGEX-2T/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: Expressionsvektor für GFP-Fusionsproteine (Clontech, vertrieben über BD Biosciences, Deutschland)

II.8.2. Konstrukte von Kooperationspartnern

a) Bakterielle Expressionsvektoren

- GTPase-Konstrukte (V12Cdc42, N17Cdc42Hs, V12Rac1, N17Rac1 und V14RhoA) von Dr. A. Hall, Institute of Cancer Research, London (England)
- C3-Transferase von Dr. L. Feig, Department of Microbiology and Molecular Biology, Tufts University School of Medicine, Boston (USA)

b) Eukaryontische Expressionsvektoren

- RhoA-GFP, Rac1-GFP und Cdc42-GFP von P. Gierschik und K. Giehl, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm (Deutschland)
- Rab5*wt*-GFP (pCR24) und Rab7*wt*-GFP (pCR22) von C. Roy, Yale University, New Haven (USA)
- WAVE1-GFP von J. V. Small, Institut für Molekularbiologie, Salzburg (Österreich)
- WAVE2-GFP von Clemens Rottner, GBF, Braunschweig (Deutschland)

II.9. Primer

II.9.1. Mutagenese-Primer

Mutante	Primer forward	Primer revers	Template	Zielvektor
Cdc42GAP _{wt}	GAP-Gex-f	GAP-Xho-r	Cdc42GAP _{wt} in pGEX-2T	pGEX-4T-2
Cdc42GAP _{wt}	GAP-Xho-f	GAP-Gex-r	Cdc42GAP _{wt} in pGEX-2T	pEGFP-C1
Cdc42GAP-R282/3A	GAP-R282/3A-f	GAP-Xho-r	Cdc42GAP _{wt} in pGEX-2T	pGEX-4T-2
Cdc42GAP-R282/3A	GAP-Gex-f	GAP-R282/3A-r	Cdc42GAP _{wt} in pGEX-2T	pGEX-4T-2

MATERIAL

Mutante	Primer forward	Primer revers	Template	Zielvektor
Cdc42GAP-R282/3A	GAP-R282/3A-f	GAP-Gex-r	Cdc42GAP _{wt} in pGEX-2T	pEGFP-C1
Cdc42GAP-R282/3A	GAP-Xho-f	GAP-R282/3A-r	Cdc42GAP _{wt} in pGEX-2T	pEGFP-C1
Cdc42GAP-ΔPPro	GAP-dP-f	GAP-Xho-r	Cdc42GAP _{wt} in pGEX-2T	pGEX-4T-2
Cdc42GAP-ΔPPro	GAP-Gex-f	GAP-dP-r	Cdc42GAP _{wt} in pGEX-2T	pGEX-4T-2
Cdc42GAP-ΔPPro	GAP-dP-f	GAP-Gex-r	Cdc42GAP _{wt} in pGEX-2T	pEGFP-C1
Cdc42GAP-ΔPPro	GAP-Xho-f	GAP-dP-r	Cdc42GAP _{wt} in pGEX-2T	pEGFP-C1
Cdc42GAP-BCH	BCH-f2	BCH-r2	Cdc42GAP _{wt} in pGEX-2T	pEGFP-C1
murines Cdc42GAP _{wt}	mGAP-fl-f	mGAP-fl-r	mmGAP in pCMV-SPORT6	pEGFP-C1
Cdc42GAP-R282/3	MG-f	MG-r	Cdc42GAP-R305/6A in pEGFP-C1	pMAL-p2X

II.9.2. Sequenzierungs-Primer

Name	bindet	entspricht den nt	Vektor
GAP-int	kodierende Sequenz des humanen Cdc42GAP	648-655	interner Primer
GFP-f	<i>upstream</i> der MCS	1300-1317	pEGFP-C1
GFP-r	<i>downstream</i> der MCS	1424-1472	pEGFP-C1
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
mmG-f	<i>upstream</i> der kodierenden Sequenz des murinen Cdc42GAP	89-98	pCMV-SPORT 6
mmG-r	<i>downstream</i> der kodierenden Sequenz des murinen Cdc42GAP	1479-1488	pCMV-SPORT 6
mmG-int	kodierende Sequenz des murinen Cdc42GAP	590-608	interner Primer

MATERIAL

mGAP-int	kodierende Sequenz des murinen Cdc42GAP	428-455	interner Primer
MAL-f	<i>upstream</i> der MCS	2681-2702	pMAL-p2X
MAL-r	<i>downstream</i> der MCS	2851-2871	pMAL-p2X

II.10. Zur Klonierung verwendete Oligonukleotide

Forward	Revers	Zielvektor	Domäne
PPro-f	PPro-r	pGEX-2T	Poly-Prolin
PPro5-f	PPro5-r	pGEX-2T	Poly-Prolin plus zusätzlich 5 AS N-terminal
PPro-GFP-f	PPro-GFP-r	pEGFP-C1	Poly-Prolin
PPro5-GFP-f	PPro5-GFP-r	pEGFP-C1	Poly-Prolin plus zusätzlich 5 AS N-terminal
T _V -f	T _V -r	pSUPER	<i>Targetsequenz</i> gegen die nt 160-178 der mRNA des murinen Cdc42GAP
T _M -f	T _M -r	pSUPER	<i>Targetsequenz</i> gegen die nt 402-420 der mRNA des murinen Cdc42GAP
T _H -f	T _H -r	pSUPER	<i>Targetsequenz</i> gegen die nt 1167-1185 der mRNA des murinen Cdc42GAP

Die Sequenzen der aufgeführten Primer und Oligonukleotide finden sich im Anhang.

III. METHODEN

III.1. Arbeiten mit Nukleinsäuren

III.1.1. DNA-Präparation

III.1.1.1. Plasmidisolierung

Plasmidisolierungen im kleinen Maßstab (Mini-Präp) wurden mit dem „QIA[®] Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen, Plasmidisolierungen im mittleren Maßstab (Midi-Präp) mit dem „Nucleobond AX100 Midiprep Kit“ der Firma Macherey-Nagel jeweils nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Endotoxin-freie DNA-Präparationen wurden für alle zur Transfektion verwendeten Plasmide benutzt, um aus der Bakterienmembran stammende Endotoxine zu entfernen. Diese Präparation erfolgte mit dem „Endofree[®] Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers.

III.1.1.2. Gelelution

DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen mit Hilfe des „QIAquick[™] Gel-Extraction Kit“ der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers isoliert.

III.1.2. DNA-Restriktionsverdau

III.1.2.1. Analytischer Restriktionsverdau

Ein analytischer Restriktionsverdau wurde zur Kontrolle von Vektoren oder zur Kontrolle eines DNA-Fragments in einen bestimmten Vektor eingesetzt.

Die benötigte DNA-Menge betrug ca. 100-200 ng und das Gesamtvolumen wurde nicht größer als 20 µl gewählt. Das notwendige Ionen- und pH-Milieu für das (die) verwendete(n) Enzym(e) wurde durch einen für das (die) Enzym(e) optimierten Restriktionspuffer gewährleistet. Um das Endvolumen von 20 µl zu erreichen, wurde der entsprechende Ansatz mit H₂O_{dd} aufgefüllt.

III.1.2.2. Präparativer Restriktionsverdau

Sollte ein geschnittenes DNA-Stück per Gelelution aufgereinigt werden, war es notwendig, größere DNA-Mengen zum Verdau einzusetzen. Dementsprechend erhöhte sich das Gesamtvolumen im Vergleich zum analytischen Verdau auf 40-100 µl.

III.1.3. Ligation

III.1.3.1. Präparation der Vektoren

Zum Ligieren eines DNA-Fragmentes in einen bestimmten Vektor wurde der Zielvektor mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten wie das zu ligierende Fragment.

Da die verschiedenen Vektoren mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen verdaut wurden, sind diese im nachfolgenden getrennt aufgeführt.

a) pGEX-4T-2

In diesen Vektor wurden alle Cdc42GAP-Konstrukte als GST-Fusionsprotein kloniert. Der Vektor wurde in der MCS mit *Eco* RI und *Xho* I geschnitten und mittels Gelelektion (vgl. Punkt III.1.1.2.) aufgereinigt.

b) pEGFP-C1

In pEGFP-C1 wurden alle Cdc42GAP-Konstrukte als GFP-Fusionsprotein kloniert. Dazu wurde der Vektor in der MCS mit *Xho* I und *Eco* RI geschnitten und mittels Gelelektion (vgl. III.1.1.2.) aufgereinigt.

c) pMAL-p2X

In pMAL-p2X wurde die GAP-inaktive Mutante von Cdc42GAP (Cdc42GAP - R282/3A) als MBP (*Maltose-binding protein*)-Fusionsprotein kloniert, da aus technischen Gründen die Expression als GST-Fusionsprotein nicht möglich war. Dazu wurde der Vektor in der MCS mit *Eco* RI und *Sal* I geschnitten und mittels Gelelektion (vgl. III.1.1.2.) aufgereinigt.

III.1.3.2. Präparation der DNA-Fragmente

III.1.3.2.1. Allgemeine Vorbemerkungen

Es wurden zwei mutierte Formen des Cdc42GAP-Proteins erzeugt: eine Punktmutante, die keine GTPase-aktivierende Funktion mehr hatte und eine PolyProlin-Deletionsmutante, der dadurch eine wichtige Protein-Protein-Interaktionsdomäne fehlte.

Im folgenden wird die Punktmutante als Cdc42GAP-R282/3A (oder nur R282/3A-Mutante), die Deletionsmutante als Cdc42GAP- Δ PolyPro (oder nur Δ PolyPro-Mutante) geführt.

Aufgrund der Position der einzuführenden Mutation (Mutation der Nukleotide 844-849 der Cdc42GAP-wt-Sequenz für die Arg-Doppelmutante und Deletion der Nukleotide 682-714 der Cdc42GAP-wt-Sequenz im Falle der Δ PolyPro-Mutante) mußte die PCR in zwei Schritten durchgeführt werden:

1. Erzeugung zweier Fragmente mit überlappenden Enden, die die gewünschte Mutation trugen („Fragment“-PCR)
2. Zusammensetzen der beiden Fragmente zur Gesamtsequenz („Ligations“-PCR)

In Abbildung 4, Seite 24 sind „Fragment“- und „Ligations“-PCR schematisch dargestellt.

III.1.3.2.2. Allgemeiner PCR-Ansatz

Im Allgemeinen benötigt man zur PCR einen DNA-Strang als Matrize, eine DNA-Polymerase, die in der Lage ist, diese Matrize abzulesen und die notwendigen Nukleotide einzufügen, einen Mix aller vier Nukleotide und den für die Polymerase optimalen Puffer.

Ein Standard-PCR-Lauf erfolgte wie nachfolgend (Seite 24) beschrieben, je nach *Primer*-Paar und Länge der zu amplifizierenden DNA konnten die *Annealing*-Temperaturen von 50°C bis 65°C und die *Extension*-Zeit von 30 sec bis 1,5 min variieren.

Die Reaktion wurde mit dem Deep Vent PCR-Kit von New England Biolabs durchgeführt.

Reaktionsansatz

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

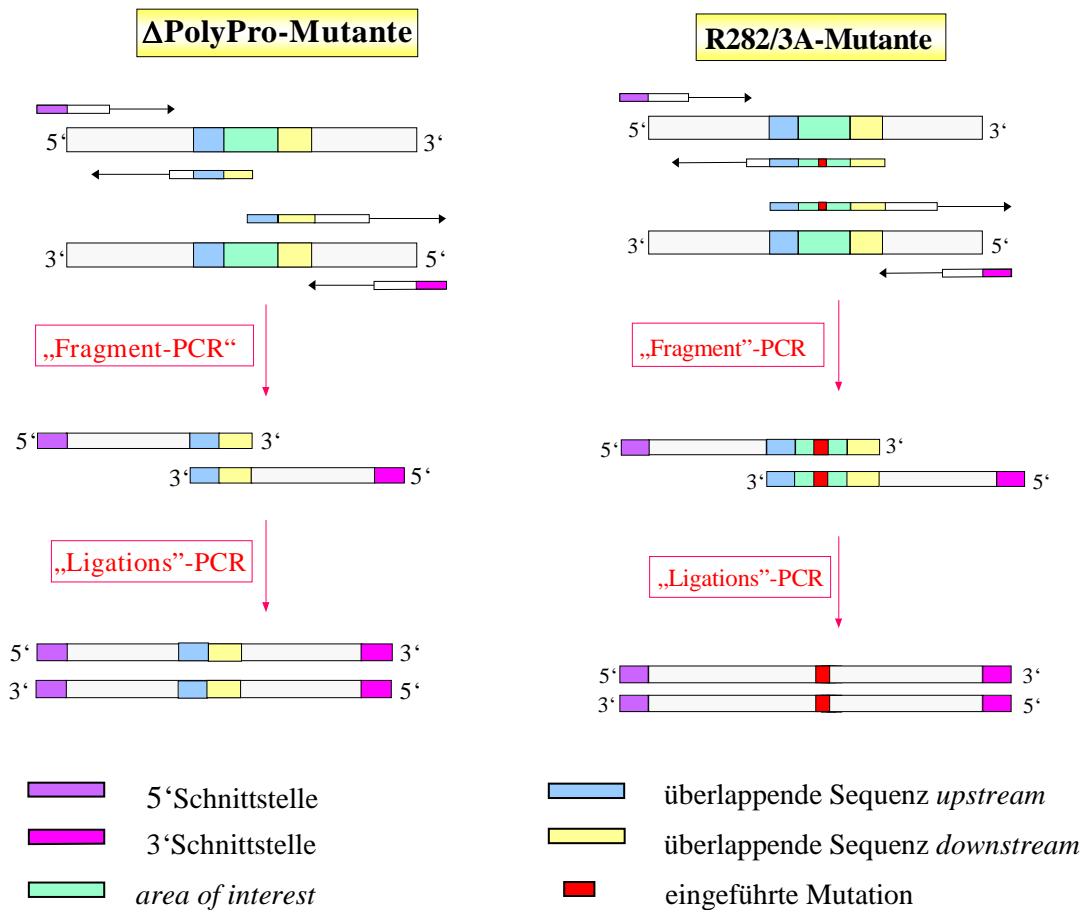


Abb.4.: Schematische Darstellung der „Fragment“- und „Ligations“-PCR der Cdc42GAP-Mutanten Cdc42GAP-ΔPro und Cdc42GAP-R282/3A wie unter Punkt III.1.3.2.1. beschrieben.

III.1.3.2.3. Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit dem „QIAquick™ PCR-Purification Kit“ oder per Gelelektion mit dem „QIAquick™ Gel-Extraction Kit“ der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

III.1.3.2.4. Klonierung mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide

a) Annealing-Reaktion

Die Oligonukleotide (s. Materialteil) wurden von der Firma MWG synthetisiert und die gelieferten Produkte mit H₂O_{dd} auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt. Anschließend wurden die einzelsträngigen Oligonukleotide zu einem Doppelstrang hybridisiert. Dazu wurden je 500 pmol jedes Einzelstrang-Nukleotids (*forward* und *revers*) in 50 μl Endvolumen bei 95°C für 5 min inkubiert, danach sofort in ein 60°C warmes Wasserbad gegeben und langsam auf 30°C abgekühlt.

Die Reaktion ergab 10 pmol/μl hybridisiertes, doppelsträngiges Produkt. Davon wurden 10 μl in die Phosphorylierungsreaktion (Punkt III.1.3.2.4b) eingesetzt.

b) Phosphorylierung von Oligonukleotiden mit Polynukleotidkinase

T4-DNA-Ligase benötigt zur Ligation DNA-Stränge, die am 5'-Ende eine Phosphatgruppe tragen. Da diese bei synthetischen Oligonukleotiden nicht vorhanden ist, muß der Ligation eine Phosphorylierungsreaktion vorgeschaltet werden. Dazu wurde T4-Polynukleotidkinase (PNK) verwendet.

Reaktionsansatz

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

Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und die DNA im Anschluß daran durch Fällung aufgereinigt.

Dazu 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, danach mit 13000 rpm (Biofuge *fresco*) bei 4°C für 20 min abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das entstandene Pellet wurde getrocknet, anschließend in 50 μl H₂O_{dd} aufgenommen und für die Ligation (s. Punkt III.1.3.3.) eingesetzt.

III.1.3.3. Ligation

Für einen Ligationsansatz wurden 50 ng geschnittener Vektor und 50 bzw. 500 ng des präparierten DNA-Fragments eingesetzt. Die Ansätze wurden bei 16°C über Nacht im Wasserbad inkubiert. 2-5 µl der aufgereinigten Ligation wurden in elektrokompente *E.coli* transformiert, auf selektive LB-Agarplatten ausgestrichen und positive Klone mittels Bakterien-PCR (s. Punkt III.1.5.) identifiziert.

a) Reaktionsansatz

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

b) Reinigung des Ligationsansatzes

Um die ligierten Plasmide für die Transformation in elektrokompente Bakterien verwenden zu können, wurde die Ionenstärke des Ansatzes durch Umfällen (oder besser Umpuffern) reduziert.

Dazu wurde der unter Punkt III.1.3.3.a aufgeführte Reaktionsansatz mit H₂O_{dd} auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt, 1/10 Vol. 5 M NaCl und 2,5 Vol. abs. EtOH gegeben und wie unter Punkt III.1.3.2.4. b beschrieben zentrifugiert.

III.1.4. Transformation in elektrokompente Zellen

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

1 ml einer ÜNK von *E.coli* DH5α wurde in 1 l LB-Medium gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 schüttelnd inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend durch zehnmütige Zentrifugation bei 6000 rpm (Centricon H-401) geerntet.

Die pelletierten Zellen wurden in 1 l eiskaltem Wasser resuspendiert und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 0,5 l kaltem Wasser aufgenommen, die Zentrifugation wiederholt, das verbleibende Pellet in ca. 20 ml 10% Glycerol resuspendiert und wie beschrieben zentrifugiert. Die so behandelten Zellen wurden schließlich in 2 ml 10% Glycerol aufgenommen, in 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

Vor der Transformation wurden die Elektroporationsküvetten bei -20°C vorgekühlt. Währenddessen wurden die elektrokompenten Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. 2-5 µl der zu transformierenden DNA-Lösung wurden mit den aufgetauten Bakterien vermischt und die Suspension in die gekühlten Küvetten pipettiert. Die Transformation erfolgte bei 200 Ω, 25 µF und 2,5 kV.

Danach wurden die Zellen in 1 ml kaltem LB-Medium mit 20% Glucose (Endkonzentration) aufgenommen und 30 min bei 37°C schüttelnd inkubiert.

Unterschiedliche Mengen der Bakteriensuspension wurden auf LB-Agarplatten mit selektivem Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

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

Diese Methode erlaubt es, positive Klone direkt mittels PCR zu identifizieren, ohne die Plasmid-DNA isolieren zu müssen.

Dazu wurden pro Platte ca. 10 Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 15 µl H₂O_{dd} resuspendiert. Danach wurden 5 µl dieser Suspension in 5 ml LB-Medium mit selektivem Antibiotikum bei 37°C schüttelnd inkubiert, der Rest zum Aufschluß der Bakterien für 5 min bei 95°C gekocht. Dadurch wurde die Plasmid-DNA freigesetzt und konnte direkt in die PCR eingesetzt werden.

Allgemeiner Ansatz für die Bakterien-PCR

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

Die für die Bakterien-PCR eingesetzten *Primer* mußten je nach Konstrukt individuell gewählt werden. Dabei unterschieden sich die *Annealing*-Temperaturen je nach *Primer*-Paar von 55°C bis 63°C. Die Bakterien-PCR wurde mit dem *Taq* PCR Core Kit der Firma Qiagen durchgeführt.

III.1.6. RNA interference (RNAi)

RNAi steht für *RNA interference* und dient dem *knockdown* von Genen auf RNA-Ebene. RNAi ist ein posttranskriptioneller *Silencing*-Mechanismus, der bei vielen Organismen von Pflanzen über Pilze (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*) bis hin zu Säugern zu finden ist. Die Abbau der mRNA eines Zielproteins und die damit verbundene Reduktion der Proteinmenge wird durch sogenannte „*small interfering RNAs*“, kurz siRNAs, von 21 nt Länge vermittelt.

Als siRNA können chemisch synthetisierte, 21 nt lange RNA-Stücke oder siRNA-kodierende Plasmide benutzt werden. Ein solches Plasmid namens pSUPER wurde von Brummelkamp und Mitarbeitern beschrieben (Brummelkamp *et al.*, 2002). In diesen Vektor können die *Target*-Sequenzen in der Form „*Target-loop-Target complement revers*“ als DNA kloniert werden. Die transkribierte RNA hat die Form einer *hairpin*-Struktur auf, die ebenfalls in 21 nt lange siRNA prozessiert wird. Diese Methode hat den Vorteil, nicht mit instabiler, schwierig zu handhabender RNA hantieren zu müssen, sondern die Zellen mit einem Plasmid mittels etablierter Methoden transfizieren zu können.

III.1.6.1. Vorversuche in HeLa-Zellen zum Austesten der *Target*-Sequenz

a) Allgemeines

Üblicherweise wird die *Target*-Sequenz, die das *Silencing* des gewünschten Proteins verursacht, direkt in den zu untersuchenden Zellen getestet. Dazu werden die Zellen mit der entsprechenden siRNA behandelt (durch Transformation oder Injektion) und die Expression des gesuchten Proteins mittels *Western Blot* untersucht. Da die Transfektionsrate in J774 für *Western Blot*-Analysen zu gering war, um einen *knockdown* von Cdc42GAP detektieren zu können, war es notwendig, die passende *Target*-Sequenz über einen alternativen Weg zu ermitteln. Dazu wurden gut transfizierbare Zellen, wie z.B. HeLa-Zellen, benötigt. Da es sich bei HeLa-Zellen um menschliche Zellen handelt, bei J774 aber um Maus-Zellen, mußte zusammen mit dem Plasmid, welches die zu untersuchende *Target*-Sequenz gegen Maus-Cdc42GAP enthielt, ein für Maus-Cdc42GAP kodierendes Plasmid kotransformiert werden. Um das transfizierte murine Cdc42GAP von dem endogenen humanen Protein unterscheiden zu können, wurde das murine Protein als GFP-Fusionsprotein exprimiert und die Expression über die Detektion des GFP-Anteils nachgewiesen.

b) Austesten der *Target*-Sequenz

Um das geeignete *Target* zum *knockdown* des murinen Cdc42GAP zu finden, wurden die im Material-Teil unter Punkt II.10 beschriebenen Oligonukleotide für T_V, T_M und T_H als Doppelstrang in den Vektor pSUPER inkloniert und zusammen mit murinem pEGFP-Cdc42GAP in HeLa-Zellen kotransfiziert. Als Kontrolle dienten Transfektionen nur mit Maus-GFP-Cdc42GAP, mit dem T_V-, T_M- und T_H-Plasmid, unbehandelte Zellen und mit pEGFP-Leervektor transfizierte Zellen. Die Expression des murinen Cdc42GAP wurde mittels *Western Blot* untersucht. Das Protein wurde über die Detektion des GFP-Anteils nachgewiesen, um das transformierte murine vom endogenen humanen Cdc42GAP unterscheiden zu können (s.o.).

Als optimales *Target*-Plasmid stellte sich T_H heraus, welches zu einer deutlichen Reduktion der Expression des murinen GFP-Cdc42GAP führte. Dieses Plasmid (T_H) wurde dann in J774 auf Einzelzellebene auf seine Effekte hinsichtlich der Expression von Cdc42GAP untersucht.

III.1.6.2. Funktionsanalyse von Cdc42GAP in J774-Makrophagen auf Einzelzellebene

Wie bereits unter Punkt III.1.6.1a beschrieben, war die Transfektionseffizienz der J774-Makrophagen zu gering, um den *knockdown* von Cdc42GAP über *Western Blot* nachzuweisen. Deshalb konnte in diesen Zellen der RNAi-Effekt nur auf Einzelzellebene beobachtet werden.

Dazu wurden J774-Makrophagen wie unter Punkt III.3.5.1.b beschrieben auf *Coverslips* ausgesät und transfiziert. Als DNA wurde das vorher in HeLa ausgetestete Plasmid T_H (1 µg) zusammen mit pEGFP-C1 (0,5 µg) als Marker kotransfiziert. So konnten die transfizierten Zellen eindeutig identifiziert werden. Als Kontrolle wurden die J774-Makrophagen nur mit pEGFP-C1 (1 µg) transfiziert, um ausschließen zu können, daß zu beobachtende Effekte auf der Wirkung des kotransfizierten GFP-Vektors beruhen.

Knockdown-Effekte wurden in einem Zeitraum von 4-7 Tagen nach Transfektion beobachtet. Dazu wurden die Zellen zum einen für 1 h mit *Cascade Blue*-Dextran behandelt (vgl. Punkt III.3.6.) und Cdc42GAP-Vesikel anschließend mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen (vgl. Punkt III.4.1.2.).

III.2. Arbeiten mit Proteinen

III.2.1. Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie

III.2.1.1. GST-Fusionsproteine

Zur Expression eines Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteins wurde eine 37°C ÜNK Bakterien, die das zu exprimierende Plasmid enthielten, in 100 ml LB-Medium mit selektivem Antibiotikum angeimpft. 1 ml der ÜNK wurde am nächsten Tag zu 11 LB-Medium mit selektivem Antibiotikum gegeben und bis zu einer $OD_{600} = 0,4$ bei 37°C schüttelnd inkubiert.

War die gewünschte OD erreicht, wurde 1 mM IPTG (Endkonzentration) zugesetzt und weitere 2,5 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation (5min, 6000 rpm; Centricon H-401) sedimentiert, die Sedimente in vorgekühltem PBS gelöst und in einem 50 ml Falcontube vereinigt. Die Suspension wurde mit kaltem PBS auf 50 ml aufgefüllt und erneut für 20 min mit 5000 rpm bei 4°C zentrifugiert (MR 1812). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 10-20 ml Lysepuffer resuspendiert.

Die Bakteriensuspension wurde mit 65 W insgesamt sechsmal für 10 sec mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Zellreste wurden für 30 min bei 35000 rpm (Optima™) 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). Der Proteinüberstand nach der Ultrazentrifugation wurde auf die *Beads* gegeben und 1h bei 4°C inkubiert. Die *Beads* wurden anschließend fünfmal mit Lysepuffer ohne DTT und einmal mit Resuspensionspuffer gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert und das Protein von den *Beads* eluiert.

a) Elution mit Glutathion

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

Die Dialyse war notwendig, da die Proteine für Mikroinjektionsexperimente verwendet werden sollten und dafür der für die Injektion passende Puffer benötigt wurde (vgl. Punkt III.3.4.2.). Nach der Dialyse wurde die Proteinmenge wie unter Punkt III.2.2. beschrieben bestimmt.

b) Thrombinspaltung

Um den GST-Anteil des Fusionsproteins abzuspalten, wurden pro ml GST-*Beads*, die nach dem letzten Waschschritt übrig waren (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. Um das Thrombin zu entfernen, wurden zu dem gewaschenen Überstand 100 µl p-Aminobenzamidin-*Beads* pipettiert und für 1h bei 4°C schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wurden die p-Aminobenzamidin-*Beads* (mit dem anhaftenden Thrombin) abzentrifugiert (MR 1812) und der Überstand gegen Dialysepuffer

dialysiert (s. Punkt III.2.1.1a). 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

III.2.1.2. MBP-Fusionsproteine

Zur Expression eines MBP (*maltose-binding protein*) -Fusionsproteins wurde eine 37°C ÜNK Bakterien, die das zu exprimierende Plasmid enthielten, in 100 ml LB-Medium mit selektivem Antibiotikum angeimpft. 1 ml der ÜNK wurde am nächsten Tag zu 1 l LB-Medium mit selektivem Antibiotikum gegeben, mit 2 g Glucose versetzt und für 2,5 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Danach wurde IPTG mit einer Endkonzentration von 0,5 M zur Bakteriensuspension gegeben und erneut bei 37°C 2,5 h schüttelnd inkubiert.

Anschließend wurden die Bakterien durch fünfminütige Zentrifugation bei 6000 rpm, 4°C (Centricon H-401) geerntet und danach mittels Sonifikation aufgeschlossen. Die Zellreste wurden in der UZ (Optima™) für 10 min bei 50000 rpm abzentrifugiert.

Währenddessen wurden 2 ml *Resin* in Säulenpuffer für 1h bei 4°C äquilibriert, anschließend bei 1000 rpm, 4°C (MR 1812) zentrifugiert. Das Pellet nach der Ultrazentrifugation wurde verworfen, der Überstand zum äquilibrierten *Resin* gegeben und für 1h bei 4°C inkubiert. Nicht gebundenes Protein wurde durch sechsmaliges Waschen mit Säulenpuffer entfernt und das MBP-Fusionsprotein anschließend fünfmal mit 1 ml Maltose -Lösung (3,6 g/ml in Säulenpuffer) eluiert.

Das Eluat wurde über Nacht bei 4°C gegen Dialysepuffer dialysiert, anschließend aufkonzentriert und erneut über Nacht bei 4°C dialysiert, diesmal gegen Mikroinjektionspuffer (vgl. Punkt III.3.4.2.). Anschließend wurde die Proteinmenge wie unter Punkt III.2.2. beschrieben bestimmt.

Puffer	Substanz
Säulenpuffer	20 mM Tris pH 7,4 200 mM NaCl 1 mM EDTA
Dialysepuffer	20 mM Tris pH 8 25 mM NaCl

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 Bestimmung der Proteinmenge wurde für alle Proben wie folgt durchgeführt:

Zu 800 µl Probe (Proteinstandard in der oben angegebenen Konzentration bzw. verdünnte Proteinlösung) wurden 200 µl *Dye Reagent Concentrate* gegeben. Als „Nullwert“ wurde 800 µl Puffer als Probe eingesetzt. Die so entstandenen Lösungen wurden durch kurzes Vortexen gemischt. Nach 5 min bis 1 h Inkubationszeit wurde für alle Proben die Absorption 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 Proteinkonzentrationen der Proben abgelesen.

III.2.3. Western Blot

III.2.3.1. Puffer und Lösungen

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

5x Probenpuffer nach Lämmli

5 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8
2 ml Glycerol
0,8 g SDS
1 ml 0,5 % Bromphenolblau
2 ml H₂O_{dd}

Die gelösten Bestandteile wurden steril filtriert und 1:5 auf das gewünschte Endvolumen, zusammen mit 5 % β-Mercaptoethanol (Endkonzentration) verdünnt.

III.2.3.1.2. Puffer für SDS-PAGE

Puffer	Substanz
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

METHODEN

<i>Running</i> -Puffer	25 mM Tris 0,1 % SDS 192 mM Glycin
<i>Blotting</i> -Puffer	25 mM Tris 96 mM Glycin
TBS	20 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl
TBST	TBS mit 0,3 % Tween

III.2.3.2. Herstellung von SDS-Gelen

MINIGEL	Substanz	Trenngel	
		10 %	12,5 %
	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	Substanz	Trenngel	
		10 %	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		

III.2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diese Gele dienen, wie bereits erwähnt, zur Auftrennung von Proteinen aufgrund des Reibungskoeffizienten und damit letztlich nach ihrer Größe.

Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C schüttelnd inkubiert. Von den so behandelten Proben wurden 30 µl pro Spur auf ein kleines Gel bzw. 60 µl pro Spur auf ein großes Gel geladen. Um die Größe der aufgetrennten Proteine abschätzen zu können, wurde auf jedes Gel zusätzlich eine Spur Proteinmarker aufgetragen. Als Marker diente der sogenannte *low range*

prestained Proteinmarker (Biorad), von dem auf ein kleines Gel 5 µl und auf ein großes Gel 15 µl pro Spur geladen wurden.

Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 100 V (kleines Gel) oder bei konstant 45 mA (großes Gel). Anschließend wurde das Sammelgel 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*

Während der Elektrophorese des Gels wurden die zum *Blotten* benötigte PVDF-Membran und das Whatman-Papier vorbereitet. Dazu wurde sowohl die Membran als auch das Whatman-Papier passend zum jeweiligen Gel zurechtgeschnitten. Im Folgenden sind die Größen für ein Minigel angegeben, die entsprechenden Maße für ein großes Gel stehen in Klammern. Die PVDF-Membran wurde in Rechtecke von 9 x 5 cm (18 x 14 cm) geschnitten, das Whatman-Papier in Rechtecke von 10 x 6 cm (19 x 15 cm).

Zum Äquilibrieren wurde die Membran kurz in 100 % Methanol gelegt, anschließend für 10 min bei RT in *Blotting*-Puffer mit 20 % Methanol inkubiert und bis zum Gebrauch in *Blotting*-Puffer feucht gehalten. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 4°C mit 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

Nach Beendigung des Proteintransfers auf die PVDF-Membran wurde diese in TBST mit 5 % Milchpulver und 2 % BSA für 1 h bei RT (oder über Nacht bei 4°C) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurde die Membran dreimal je 5 min in TBST gewaschen und anschließend mit einem gegen das Zielprotein gerichteten primären Antikörper für 1h bei RT (oder über Nacht bei 4°C) inkubiert. Nach der Inkubation wurde nicht gebundener Antikörper durch dreimal fünfminütiges Waschen in TBST entfernt. Zur Detektion der ersten Antikörper wurde die Membran dann für 45 min mit einem gegen den ersten Antikörper gerichteten sekundären HRP-gekoppelten Antikörper versehen. Nach erneutem Waschen, wurde die Membran mit *Super Signal® West Pico Luminol Enhancer* und *Super Signal® Stable Peroxide Solution* - gemischt im Verhältnis 1:1 - für 15 min bei RT versetzt, anschließend in Folie eingewickelt, zur Markierung mit Streifen von *GLOCOS™ II Autorad Markers* versehen, ein Kodak-Film für unterschiedliche Zeiten (je nach Stärke des Signals) aufgelegt, entwickelt und fixiert.

III.2.4. Auftrennung von Zellbestandteilen mittels Dichtegradientenzentrifugation

III.2.4.1. Ausbildung des Percoll-Gradienten

Percoll ist ein gelartiges, nicht-toxisches kolloidales Silikat, welches mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) beschichtet ist. Der Gradient ist ein sogenannter *self-forming gradient*“, der sich, ähnlich wie ein Saccharosegradient, beim Zentrifugieren ausbildet und Zell-Bestandteile nach ihrer Dichte auftrennt.

Murine J774-Makrophagen wurden in Petrischalen ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für einen Standardlauf wurden 20 Petrischalen mit J774-Makrophagen verwendet. Diese wurden entweder unbehandelt oder nach einstündiger Inkubation mit FITC-Dextran (2 mg/ml) als Makropinozytose-

Induktor eingesetzt. Um die einzelnen Kompartimente nach ihrer Dichte auftrennen zu können, mußten die J774-Makrophagen zunächst aufgeschlossen werden. Dazu wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen, dann in jede Schale 1 ml PBS gegeben und die Makrophagen abgekratzt. Die Suspension wurde mit 1500 rpm sieben min lang bei 4°C zentrifugiert (Omnifuge 2.0RS). Das Pellet wurde in 1 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml Homogenisierungspuffer aufgenommen und anschließend 40 - 50 mal durch eine 5 ml-Spritze (Kanüle 0,6 x 30 mm) gezogen. Dadurch wurden die Zellen so aufgeschlossen, daß die Kerne freigesetzt wurden, die restlichen Kompartimente aber intakt blieben. Nach dem Aufschluß wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen gegeben, mit Homogenisierungspuffer auf 10 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und die Kerne durch siebenminütige Zentrifugation bei 4°C und 1500 rpm entfernt (Omnifuge 2.0RS). Die verbleibenden Überstände wurden auf den vorbereiteten Gradienten geladen (s.u.). Zusätzlich wurde ein Röhrchen vorbereitet mit Marker-*Beads* (Amersham Bisciences) statt Zell-Lysat. Die Marker-*Beads* dienen als Kontrolle für die korrekte Ausbildung des Gradienten, da sie sich im Gradienten auf charakteristische Art und Weise verteilen. Der Gradient wurde in der Ultrazentrifuge (L7-55) bei 25000 rpm, 4°C für 90 Minuten zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationslauf wurden die einzelnen Fraktionen vom Boden des Röhrchens beginnend in 1,5 ml-Schritten mit Hilfe eines Fraktionsammlers (Biorad) abgenommen. Diese Fraktionen wurden dann für die unter Punkt III.2.4.2. aufgeführten Enzym-Assays und *Western Blot*-Analyse (vgl. Punkt III.2.4.3.) verwendet.

Homogenisierungspuffer: 500 mM EDTA pH 7,3
250 mM Sucrose
3 mM Imidazol

Zusammensetzung der Gradienten

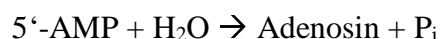
Marker- <i>Beads</i> :	10,3 ml 90% Percoll 22,7 ml Homogenisierungspuffer je 20 µl Marker- <i>Beads</i>	} unterschichtet mit 1 ml 2,5 M Sucrose
Zell-Homogenat:	10,3 ml 90% Percoll 12,7 ml Homogenisierungspuffer 10 ml Zell-Homogenat	

III.2.4.2. Enzymassays zum Nachweis von Markerproteinen

III.2.4.2.1. 5'-Nukleotidase als Plasmamembranmarker

a) Enzymassay

5'-Nukleotidase ist ein Enzym der Zellmembran, welches Ribonukleosid-5'-Monophosphate dephosphoryliert. Im genannten *Assay* wird als Substrat 5'-AMP eingesetzt, das dann nach folgender Gleichung gespalten wird:



Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden zunächst drei Puffer hergestellt (Puffer 1-3), die anschließend zusammen mit der "Probe" (im vorliegenden Fall waren das die einzelnen Fraktionen des Percoll-Gradienten) zur sogenannten Inkubationslösung zusammenpipettiert wurden.

Das Gesamtvolumen der Inkubationslösung betrug 500 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

50 µl Puffer 1 + 50 µl Puffer 2 + 50 µl Puffer 3 + 100 µl Probe + 250 µl H₂O

Dieser Ansatz wurde bei 37°C für 1 h inkubiert, die Reaktion mit 500 µl 25% TCA abgestoppt und das präzipitierte Protein für 30 min bei 4°C und 13000 rpm pelletiert (Biofuge *fresco*). Das Sediment wurde verworfen und der Überstand zur Phosphatbestimmung nach Ames aufbewahrt (s.Punkt III.2.4.2.1b).

Puffer: Puffer 1: 500 mM Tris-HCl pH 8,5
 Puffer 2: 100 mM MgCl₂
 Puffer 3: 50 mM 5'-AMP in Tris-HCl pH 8,5

b) Phosphatbestimmung nach Ames

Zur Phosphatbestimmung nach Ames (Ames, 1966) wurden zunächst zwei unterschiedliche Lösungen hergestellt, die im Verhältnis 1:6 gemischt wurden. Der Reaktionsansatz bestand aus 700 µl Mix und 300 µl Probe, die dem unter Punkt 2.4.2.1.a gewonnenen Überstand entsprach. Der Reaktionsansatz wurde für 20 min bei 45°C inkubiert und anschließend die Absorption bei 820 nm gegen den Leerwert gemessen.

Als Leerwert diente ein Gemisch aus 700 µl Mix (s.o.) und 300 µl H₂O.

Die Absorption bei 820 nm für 1 mmol P_i entsprach 0,260.

Lösungen: Lsg.1: 10 % Ascorbinsäure-Lösung
 Lsg.2: 0,42 % Ammonium-Molybdat in 1N H₂SO₄

III.2.4.2.2. N-acetyl-Glucosaminidase als Lysosomenmarker

N-acetyl-Glucosaminidase ist ein Markerenzym für Lysosomen und katalysiert die Hydrolyse von Glycolipiden des N-acetyl-lactosamin und des Oligmannosid-Typs (Lisman *et al.*, 1985). Das nachfolgende *Assay* wurde erstmals bei Kurt von Figura im Jahre 1977 beschrieben. Dabei wird das aus p-Nitrophenyl 2-acetamido-2-deoxy-β-D-Glucopyranosid freigesetzte p-Nitrophenol anhand der Absorption bei 405 nm gemessen. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt zusammenpipettiert:

In einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurde 50 µl Probe mit 50 µl Zitratpuffer versetzt. Die Katalyse wurde durch Zugabe von 100 µl Substrat (s.u.) gestartet und bei

37 °C für 10 min inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 800 µl Glycin/NaOH pH 10,4 gestoppt und die Absorption bei 405 nm gemessen.

Die Enzymaktivität berechnete sich nach der Gleichung:

Änderung der Absorption/0,184

Da die Probe oft eine signifikante Eigenextinktion bei 405 nm besitzt, war eine Negativkontrolle unabdingbar. Bei der Negativkontrolle wurden zunächst alle Proben ohne Substrat inkubiert, der Ansatz wie beschrieben inkubiert und abgestoppt. Nach Abstoppen der Reaktion wurde das Substrat zugegeben und die Extinktion bei 405 nm gemessen. Da in jeder Gradienten-Fraktion eine andere Percoll-Konzentration vorlag, mußte jede Fraktion mit einer eigenen Negativkontrolle verglichen werden. Als Leer-Wert diente der im *Assay* eingesetzte Zitratpuffer, gegen den alle Proben und Negativkontrollen gemessen wurden. Die Änderung der Absorption ergab sich aus der Differenz der Absorption der Probe minus der der entsprechenden Negativkontrolle.

Lösungen: Zitratpuffer: 0,2 M Zitronensäure
0,2 M Na-Zitrat pH 4,5
0,8 % Na-Azid

Substrat: 10mM p-Nitrophenyl 2-acetamido-2-deoxy-B-D-Glucopyranosid

Stop-Lösung: 0,4 M Glycin/NaOH pH 10,4

III.2.4.3. Detektion von Cdc42GAP

400 µl Probe wurden mit 1,6 ml eiskaltem Aceton (vorgekühlt bei -20°C) versetzt und durch Vortexen gründlich gemischt. Dem Gemisch wurden nach Zusatz von 45,3 µl Präzipitationspuffer erneut gemischt, der Ansatz bei -20°C für 30 min inkubiert und anschließend für 30 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert (Biofuge *fresco*). Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet getrocknet und in 200 µl Probenpuffer resuspendiert. Die Proben wurden 10 min bei 95°C gekocht und pro Spur je 30 µl auf ein 12,5% SDS-PAGE aufgetragen.

Präzipitationspuffer: 475,5 mM Tris-HCl
24 mM Tris-Base
50 mM MgCl₂

Die *Western Blot*-Analyse wurde wie unter Punkt III.2.3.4. beschrieben durchgeführt.

Primäre Antikörper: a) α-Cdc42GAP (*mouse*) 1:250

Sekundäre Antikörper: a) HRP-α-*mouse* 1:5000

III.3. Arbeiten mit Zellen

III.3.1. Zellkultur

Primäre humane Makrophagen sind aufgrund äußerst geringer Transfektionseffizienzen (< 0,1 %) für Transfektionen nicht geeignet. Deshalb wurde nach einem für primäre humane Makrophagen äquivalenten Modellsystem gesucht. Die Anforderungen, denen die „passende“ Zell-Linie entsprechen mußte, waren Ausbildung von Cdc42GAP-Vesikeln nach Stimulation mit Dextranen, die Kolokalisation von Cdc42GAP mit gelabelten Dextranen (unabhängig vom Fluorophor) und möglichst hohe Transfektionseffizienz. Dazu wurden unterschiedliche Makrophagen-Zell-Linien getestet und auf die entsprechenden Anforderungen hin untersucht.

Ebenso sollte festgestellt werden, ob die in Makrophagen beobachteten Phänomene Allgemeingültigkeit besitzen. Dazu wurden HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) und HeLa-Zellen als nicht-monozytäre Zellen sowohl auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Cdc42GAP-Vesikel auszubilden, als auch festgestellt, ob diese Zellen zur Phagozytose und Makropinozytose befähigt sind.

Die verwendeten primären Zellen und die getesteten Zell-Linien sowie ihre Kultivierung sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt.

Name	Organismus	Ursprung	Status	Medium
J774	Maus	Makrophagen	adhärent	RPMI 1640 10%FCS 2 mM L-Glutamin 100 µg/ml Gentamycin
RAW 264.1	Maus	Makrophagen	adhärent	RPMI 1640 10%FCS 2 mM L-Glutamin 100 µg/ml Pen/Strep
P388-D1	Maus	Makrophagen	adhärent	RPMI 1640 20%FCS 2 mM L-Glutamin 3,5 g Glucose/500 ml 100 µg/ml Pen/Strep
THP-1	Mensch	Monozytäre Leukämie-Zelllinie	Suspensionszellen; adhärent durch PMA	RPMI 1640 10%FCS 2 mM L-Glutamin 100 µg/ml Gentamycin
HeLa	Mensch	Negroides Cervix Karzinom	adhärent	RPMI 1640 10%FCS 2 mM L-Glutamin 100 µg/ml Pen/Strep
HUVEC	Mensch	Endothelzellen aus der Nabelschnur	adhärent auf Gelatine	Endotheliales Wachstumsmedium mit Supplement

Tab.3: Übersicht über die im Laufe der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen, ihre Herkunft und Kultivierung.

III.3.2. Isolation primärer humaner Makrophagen aus menschlichem Blut

Primäre humane Monozyten/Makrophagen wurden wöchentlich frisch aus peripherem humanem Blut isoliert. Die Blutabnahme wurde mit 50 ml-Spritzen vorgenommen, in die zuvor je 500 µl Heparin vorgelegt wurden, um die Blutgerinnung zu verhindern.

Zur Isolation wurde zunächst ein Falconröhrchen mit 15 ml Ficoll-Lösung vorbereitet und dieses vorsichtig mit 12,5 ml Blut überschichtet, nicht gemischt. Anschließend wurde die überschichtete Lösung zur Ausbildung des gewünschten Ficollgradienten bei 460 g und RT für 30 min zentrifugiert. Die mononukleären Zellen (s. Abb.5) wurden abpipettiert, jeweils 2 Proben vereinigt und auf 50 ml mit kaltem RPMI aufgefüllt. Danach folgte erneut ein Zentrifugationsschritt von 10 min bei 460 g und 4°C. Nach dieser Zentrifugation wurden die Zellen in kaltem RPMI gewaschen, erneut zwei Proben vereinigt, mit kaltem RPMI auf 50 ml aufgefüllt und wie beschrieben zentrifugiert. Der Waschschrift wurde wiederholt, allerdings ab hier mit RPMI* (RPMI mit 100 µg/µl Penicillin/Streptavidin).

Die Zellen wurden in je 1 ml kaltem RPMI* aufgenommen, die Zellsuspension in Eppendorfgefäße transferiert und 2 min bei 4°C und 400 g zentrifugiert. Die Sedimente wurden in je 400 µl Monopuffer (PBS + 5 mM EDTA pH 7,4 + 0,5% humanes Serumalbumin) resuspendiert, 100 µl anti-CD14-Antikörper-*Beads* zugegeben, vorsichtig gemischt, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden, und 15 min auf Eis inkubiert.

Die Säulen wurden in der Zwischenzeit mit 500 µl kaltem Monopuffer äquilibriert und ein 50 ml-Röhrchen mit 15-20 ml kaltem RPMI* vorbereitet. Die oben genannte Suspension wurde nach der Inkubation auf die Säule gegeben, diese nach dem Durchlauf mit 500 µl Monopuffer gewaschen, die isolierten Monozyten anschließend mit 1 ml Monopuffer schnell in das vorbereitete 50 ml-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. Anschließend wurden die Zellen auf *Coverslips* ausgesät (auf *Cellocate Coverslips* mit einer Dichte von 5×10^4 /Coverslip; auf eckige *Coverslips* (13,8 x 13,8 mm) die doppelte Menge. Nach 1,5 bis 2 h wurde 1,5 ml Kulturmedium (RPMI* mit 20% autologem Serum) hinzugefügt und die Zellen bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt.

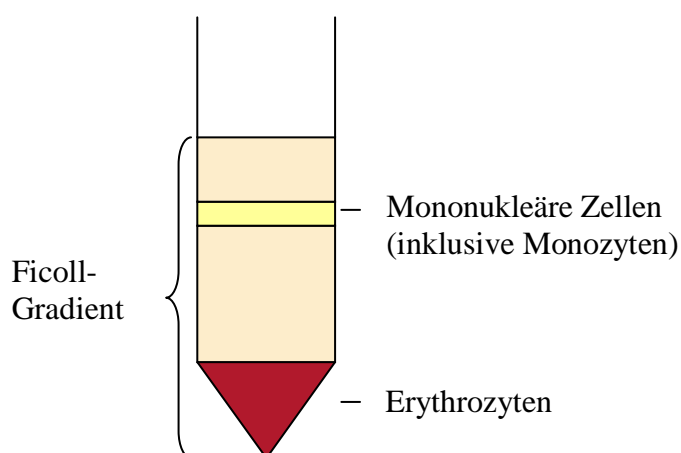


Abb.5: Auftrennung von primären humanen Makrophagen im Ficoll-Gradienten.

Erythrozyten sind schwerer als mononukleäre Zellen und können deshalb leicht von diesen getrennt werden.

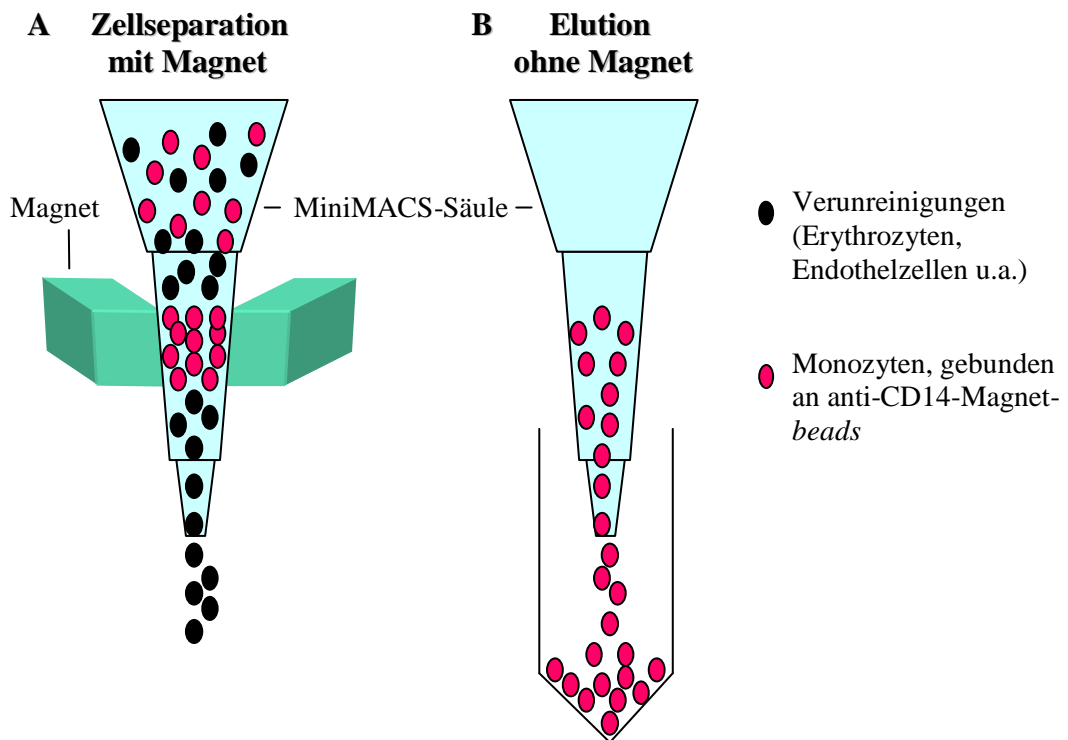


Abb.6: Abtrennung von Monozyten durch anti-CD14-Magnetbeads. Monozyten binden an diese *Beads* über das CD14-Molekül auf ihrer Oberfläche, während alle anderen mononukleären Zellen sowie Verunreinigungen durchfließen (A). Nach Entfernung des Magneteten werden die an die *Beads* gekoppelten Monozyten eluiert (B).

III.3.3. Isolierung menschlicher Endothelzellen aus der Nabelschnur

Humane Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) wurden direkt aus einer Nabelschnur isoliert. Die Nabelschnur wurde in einer sterilen Standapparatur befestigt und desinfiziert, um Blutreste zu entfernen. In die Vene der Nabelschnur wurde eine Kopfkanüle eingeführt, mit Arterienklemmen abgedichtet und fixiert. Anschließend wurde das gesamte Blut mit 37°C warmem, Gentamycin-haltigem PBS aus der Vene ausgewaschen. Danach wurde die Vene mit einer Chymotrypsin-Lösung gespült, um das restliche PBS/Gentamycin zu entfernen. Das untere Ende der Nabelschnur wurde mit zwei Arterienklemmen abgedichtet, die Nabelschnur vollständig mit der Chymotrypsin-Lösung gefüllt (leichtes Aufblähen) und anschließend bei 37°C für 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die abgelösten Endothelzellen in ein 50 ml-Röhrchen mit FCS eluiert. Das Eluat wurde für 10 min mit 1200 rpm zentrifugiert (Omnifuge 2.0RS), die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt.

Chymotrypsin-Lösung: 100 mg/ml α -Chymotrypsin in PBS

Gentamycin-Lösung: 50 μ g/ml Gentamycin in PBS

Kulturmedium: ECGM (PromoCell)

III.3.4. Mikroinjektion

III.3.4.1. Vorbereitung der Injektionslösung

Die zu injizierende Proteinlösung wurde mit Mikroinjektionspuffer verdünnt, wobei darauf geachtet wurde, die Maximalkonzentration von 10 µg/µl nicht zu überschreiten, da die Lösung sonst zu viskos wurde. Oft genügte eine Proteinkonzentration von 0,2-0,5 µg/µl.

Mit der Proteinlösung wurde eine Markersubstanz koinjiziert, die das Auffinden der injizierten Zellen ermöglichte. 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. Der Zentrifugationsschritt war zur Entfernung von Aggregaten notwendig, um das Verstopfen der Injektionskanüle zu verhindern. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert.

III.3.4.2. Mikroinjektion

Die Mikroinjektionsanlage setzt sich aus einem Mikroskop mit angebautem Mikroinjektionsarm und einem Transjektor zur Druckerzeugung zusammen. Die Mikroinjektion *per se* wird 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 Druckpuls, der vom Transjektor über einen Schlauch an die Kanüle weitergegeben wird. Zunächst muß jedoch ein bestimmter Kompensationsdruck gewährleistet sein, um den durch die Kapillarkräfte hervorgerufenen Einstrom von Flüssigkeit aus dem Medium in die Kanüle zu verhindern. Der Kompensationsdruck 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. Der Heizring gewährleistete, daß die Zellen konstant bei 37°C gehalten wurden. Dies war besonders für Makrophagen wichtig, da sich diese Zellen bei tieferen Temperaturen verkrampfen und vom Untergrund ablösen. Zum Injizieren der 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.

Injizierte Zellen wurden in Kulturmedium 1 h bei 37°C nachinkubiert, um zum einen Schockeffekte, die durch zu heftiges Injizieren hervorgerufen werden können, zu umgehen, und zum anderen möglichen Effekten Zeit zu geben, sich zu manifestieren. Anschließend wurden die Zellen fixiert und fluoreszenzgefärbt, um eventuelle Auswirkungen der injizierten Substanz auf die Zellen zu begutachten. Injizierte Zellen waren durch den koinjizierten Marker zu erkennen: FITC-Dextran war direkt detektierbar, wohingegen Ratten-IgG mit FITC-gekoppeltem anti-Ratten-Antikörper gefärbt werden mußte.

<u>Mikroinjektionspuffer</u>	150 mM NaCl
	50 mM Tris pH 7,4
	5 mM MgCl ₂

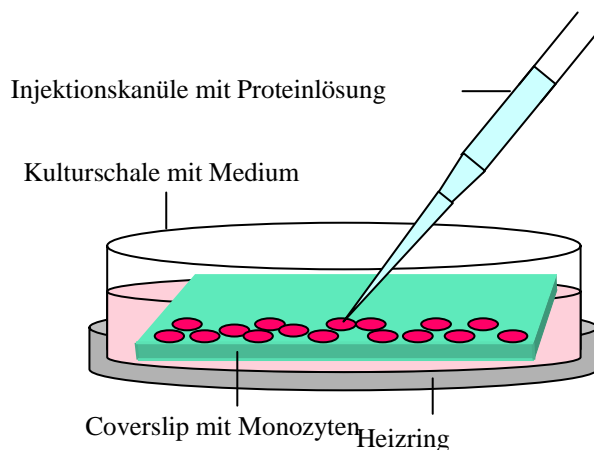


Abb.7: Mikroinjektion einer Protein-Lösung in primäre humane bzw. murine J774-Makrophagen.

III.3.5. Transfektion von Zellen

III.3.5.1. Transfektion muriner J774-Makrophagen

a) Transfektion mit Exgen 500

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen auf *Coverslips* mit einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen pro *Coverslip* in 24-*well* Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen pro *well* mit 0,5 ml frischem Kulturmedium versorgt. Die Transfektionslösung wurde zunächst in zwei getrennten Ansätzen pipettiert. Im ersten Ansatz wurde je 1 μg DNA mit 50 μl 150 mM NaCl vermischt, in einem zweiten Ansatz je 4 μl Exgen 500 in 50 μl 150 mM NaCl gegeben. Beide Ansätze wurden anschließend vereinigt und sofort 10 sec gevortext. Danach wurde das Gemisch zur Ausbildung der DNA/Exgen 500-Komplexe für 10 min bei RT inkubiert. Dieser Reaktionsansatz wurde auf die Zellen gegeben und die Platte mit 1500 rpm für 3-5 min bei RT zentrifugiert (Omnifuge 2.0RS). Nach zweieinhalbstündiger Inkubation bei 37°C wurde die Transfektionslösung entfernt und durch 1 ml Kulturmedium ersetzt. Nach 24-72 h wurde die Expression der transfizierten DNA kontrolliert.

b) Transfektion mit Metafectene

Am Tag vor der Transfektion wurden die 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 folgenden Tag wurde das Kulturmedium gegen RPMI-Medium ohne Antibiotika und Serum ausgetauscht. Die Transfektionslösung wurde zunächst in zwei getrennten Ansätzen pipettiert. Die Angaben in Klammern beziehen sich auf das 6-*well*-Format.

Im ersten Ansatz wurde je 1 μg (2 μg) DNA mit 50 μl (100 μl) RPMI-Medium vermischt, in einem zweiten Ansatz je 3 μl (6 μl) Metafectene in 50 μl (100 μl) RPMI-Medium gegeben. Beide Lösungen wurden anschließend vereinigt und für 10 min bei RT inkubiert, damit sich die DNA-Lipid-Komplexe bilden konnten. Dieser Reaktionsansatz 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. Auch hier waren die Zeiten je nach Protein unterschiedlich.

III.3.5.2. Transfektion von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden mit Metafectene wie für J774-Makrophagen unter Punkt III.3.5.1b beschrieben transfiziert.

III.3.5.3. Transfektion von HUVEC-Zellen

HUVEC wurden mit Metafectene mit einem DNA:Lipid-Verhältnis von 1:2,5 transfiziert. Anstelle von RPMI-Medium wurde OptiMEM der Firma Gibco-BRL benutzt (beide Serum- und Antibiotika-frei).

III.3.6. Modulierende und inhibierende Substanzen

Art der Modulation	Substanz	Beschreibung	Endkonzentration	Inkubation
Stimulation	fMLF	chemoattraktives Peptid	100 µg/ml (≈ 2,3 µM)	5 min – 4 h
	LPS	bakterielles Lipopolysaccharid	100 µg/ml	1-3 h
	CNF-1	Aktivator der RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42	5 µg/ml	1,5-3 h
Manipulation des Zytoskeletts	Nocodazol	Mikrotubuli-depolymerisierendes Agens	300 ng/ml- 300 µg/ml	1-1,5 h
	Latrunculin A	inhibiert Aktinpolymerisation	1 µM	1-3 h
	Cytochalasin D	induziert Aktindepolymerisierung	1 mg/ml (≈ 2 mM)	1-3 h
Makropinozytose	fluoreszenzmarkierte Dextrane	<i>fluid phase marker</i>	2 mg/ml	30 min - 1 h
	<i>Lucifer yellow</i>	<i>fluid phase marker</i>	2 mg/ml	30 min - 1 h
Rezeptorvermittelte Endozytose	Transferrin	Aufnahme über Clathrin-Vesikel	25 µg/ml	15-30 min
	Mannan	Aufnahme über Clathrin-Vesikel	2-20 mg/ml	30 min – 1 h
	LDL	Aufnahme über Clathrin-Vesikel	10 µg/ml	30 min – 1 h
	Anti-Mannoserez.-Antikörper	blockiert Mannan-Aufnahme	2-20 µg/ml	1 h
Markierung saurer Endosomen	LysoTracker	Markierung saurer Endosomen	75 nM	45 min
ER→Golgi-Transport	Brefeldin A	inhibiert ER→ Golgi-Transport	5 µg/ml	1-15 min
Inhibition der PI3-Kinase	Wortmannin	irreversibler Inhibitor der PI3-Kinase	100 nM	1-2 h
	LY294002	reversibler Inhibitor der PI3-Kinase	20 µM	1-2 h

Tab.3: Übersicht der im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Substanzen. Aufgeführt sind die jeweiligen Funktionen, benötigten Endkonzentrationen und Inkubationszeiten.

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 auf *Coverslips* ausgesäten Zellen wurden in 3,7 % Formaldehyd in PBS für 5-10 min bei RT fixiert. Die Permeabilisierung erfolgte anschließend in eiskaltem Aceton bei -20°C für 5 min. Danach wurden die *Coverslips* in PBS + 0,5 % BSA gewaschen, um das restliche Aceton zu entfernen.

III.4.1.1.2. Formaldehyd/Triton

Die auf *Coverslips* ausgesäten Zellen wurden in 3,7 % Formaldehyd plus 0,18 % Triton X-100 in PBS für 10 min bei RT fixiert und gleichzeitig permeabilisiert. In Abhängigkeit vom eingesetzten Antikörper war es für die Färbung von Vorteil, das Präparat zusätzlich mit Aceton zu permeabilisieren, um eine Optimierung des Signals zu erwirken.

III.4.1.1.3. Methanol

Die auf *Coverslips* ausgesäten Zellen wurden in eiskaltem Methanol bei -20°C für 30-60 sec fixiert und gleichzeitig permeabilisiert. Anschließend wurden die *Coverslips* sofort in PBS mit 0,5 % BSA gewaschen, um das restliche Methanol zu entfernen. Fixierung und Lyse wie unter Punkt III.4.1.1.1. und III.4.1.1.2. beschrieben, erlauben es, die *Coverslips* in PBS 1-3 Tage bei 4°C zu lagern, bevor sie gefärbt werden.

III.4.1.2. Färbung mittels spezifischer Antikörper

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung erfolgte in einer feuchten Kammer. Auf ein feuchtes Tuch in der Kammer wurde Parafilm gelegt, auf den die Färbelösung pipettiert wurde. Die *Coverslips* wurden stets mit der Zellseite nach unten, d.h. auf die vorpipettierte Lösung gelegt.

Die Färbung *per se* erfolgte in drei durch Waschschriffe voneinander getrennten Stufen. Zunächst wurden unspezifische Bindungen mittels PBS plus 0,5% BSA, 5% NGS und 5% HS abgesättigt. Nach einem Waschschriff in PBS + 0,5% BSA wurden die Zellen mit dem ersten Antikörper für 45 min bei RT inkubiert. Wurden mehrere Zielproteine durch Färbung detektiert, mußten die primären Antikörper sukzessive auf die Zellen gegeben werden, um Akkumulationen zu verhindern. Zur Entfernung der nicht-gebundenen primären 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. Darauf folgten zwei Waschschriffe 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* benötigte man 3 µl Mowiol pro *Coverslip*, für eckige 4 µl. Die *Coverslips* wurden auch hier mit der Zellseite nach unten auf den Mowioltropfen gelegt und mit Nagellack versiegelt.

III.4.2. Fluoreszenzmikroskopie

Die Analyse Fluoreszenz-markierter Präparate erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Leica), welches mit einer digitalen „Spot“-Kamera (Leica) verbunden war, oder mittels eines konfokalen *laser scanning* Mikroskops (Leica DM IRB).

Die Bildverarbeitung erfolgte mit den Programmen „Imaging“ (Microsoft), „Photoshop“ (Adobe) und „Corel Draw“ (Corel).

III.4.3. *Live cell imaging*

In vivo-Aufnahmen wurden mit Hilfe des UltraView Confocal LCI der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Als Mikroskop diente das Umkehrmikroskop Eclipse TE 300 Invers der Firma Nikon.

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf *Glass Bottom Dishes* der Firma MatTek (Ashland, USA) mit einer Dichte von $4-8 \times 10^5$ pro Schälchen ausgesät und mit dem gewünschten GFP-Konstrukt wie unter Punkt III.3.5.1b beschrieben transformiert. Die *in vivo*-Aufnahmen wurden je nach Experiment in einem Zeitrahmen von 20 min bis 1,5 h gemacht.

IV. ERGEBNISSE

IV.1. Allgemeines

Aufnahmeprozesse wie Endozytose, Phagozytose und Pinozytose sind wichtige Vorgänge, damit Makrophagen ihre Aufgaben im Rahmen der Immunabwehr, Gewebeumorganisation und -homöostase erfüllen können. Zentrale Regulatoren dynamischer Aufnahme- und Bewegungsprozesse sind RhoGTPasen und deren Effektorproteine (vgl. Einleitung), sowie indirekt RhoGTPase-Regulatoren wie GAPs, GEFs und GDIs. Es ist jedoch bisher völlig unklar, wie die GTPasen im Zusammenhang mit phagozytotischen Vorgängen im Detail reguliert werden. Zum Beispiel liegen bis dato keine Erkenntnisse darüber vor, wie von den RhoGTPasen vermittelte Signale wieder abgeschaltet werden und wie dies räumlich und zeitlich koordiniert innerhalb der Zelle abläuft. Es ist zu vermuten, daß in diesem Zusammenhang GAPs als multifunktionelle, spezifisch lokalisierte und regulierte negative Regulatoren eine wichtige Rolle spielen. Dabei könnten GAPs auch als RhoGTPase-bindende Proteine mit Effektorfunktion agieren. Es ist allerdings nicht bekannt, ob die subzelluläre Lokalisation von RhoGAPs auch einen Einfluß auf deren Spezifität und Funktion hat und wie das Zusammenspiel zwischen Lokalisation und Funktion reguliert wird. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem RhoGAP-Protein, namentlich Cdc42GAP (oder auch p50RhoGAP genannt) und seiner Rolle in der Regulation endozytotischer und phagozytotischer Prozesse in menschlichen Makrophagen.

IV.2. Akkumulation von Cdc42GAP in Vesikeln

IV.2.1. Induktion der Cdc42GAP-haltigen Vesikel

Die wissenschaftlichen Daten, die bisher über Cdc42GAP vorliegen sind ausschließlich biochemischer oder struktureller Natur. So konnte z.B. die Aktivierung der intrinsischen GTPase-Aktivität von Cdc42 durch Cdc42GAP *in vitro* (Barfod *et al.*, 1993) nachgewiesen und die Struktur des Komplexes aus den beiden genannten Komponenten aufgeklärt werden (Nassar *et al.*, 1998; Cavalli und Carloni, 2002). Bisher liegen jedoch über die subzelluläre Lokalisation und Funktion von Cdc42GAP keine Erkenntnisse vor. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Verteilung und Funktion von Cdc42GAP auf zellulärer Ebene untersucht. Die meisten Experimente wurden – sofern technisch möglich - in primären humanen Makrophagen durchgeführt. Waren die primären Zellen bestimmten Applikationen, wie z.B. Transfektionen, nicht zugänglich, wurden für die experimentellen Arbeiten murine J774-Makrophagen als Modellsystem herangezogen. Vereinzelt wurde auch auf HeLa- und Endothelzellen zurückgegriffen.

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbung und mikroskopischer Auswertung wurde zunächst die Lokalisation von Cdc42GAP in ruhenden primären humanen Makrophagen untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß dieses Protein diffus in der Zelle verteilt ist (vgl. Abb.8A). Deutlich zu sehen war, daß Cdc42GAP nicht am Aktinzytoskelett lokalisiert. So konnte z.B. keine Koloakalisation mit den Aktinreichen, punktförmigen Adhäsionsstrukturen, den Podosomen, festgestellt werden (Abb.8B-C). In primären Makrophagen weist ein geringer Prozentsatz von Zellen einen migratorischen Phänotyp auf. Dieser ist gekennzeichnet durch die Umverteilung der Podosomen an das sogenannte *leading edge* (Migrationsfront), wohingegen am *trailing edge* die Bildung von Retraktionsfasern zu beobachten ist. Besonders gut zu

erkennen ist die Verteilung der Podosomen einer migrierenden Zelle in der F-Aktin-Färbung (Abb.8E).

Hinsichtlich der Verteilung von Cdc42GAP im migratorischen Phänotyp der Makrophagen war besonders auffällig, daß das Protein an/in vesikulären Strukturen im Bereich des *trailing edge* akkumuliert (Abb.8D und 8F).

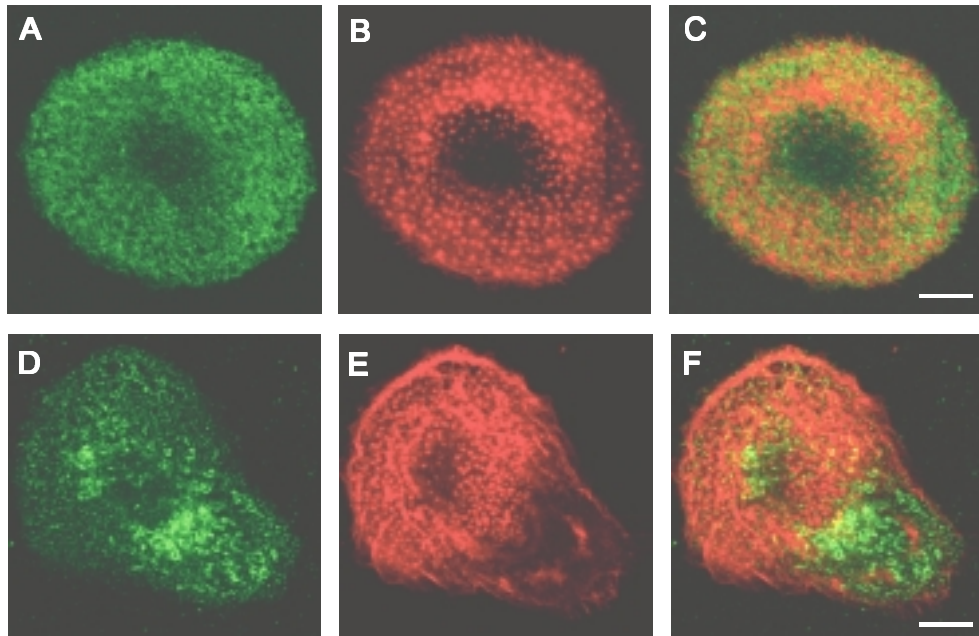


Abb.8: Cdc42GAP lokalisiert an vesikulären Strukturen in aktivierten Makrophagen. Konfokalmikroskopische Aufnahmen zur Lokalisation von Cdc42GAP in ruhenden (A-C) und spontan aktivierten (D-F) primären humanen Makrophagen. In ruhenden Makrophagen ist Cdc42GAP (Grün) diffus in der Zelle verteilt (A) und nicht in den prominenten Aktinstrukturen, den Podosomen, (Rot) zu finden (B). Zellen mit migratorischem Phänotyp akkumulieren Cdc42GAP an vesikulären Strukturen (D) am *trailing edge* (E, F). C bzw. F zeigen die Überlagerung von A und B bzw. D und E. Cdc42GAP wurde mit einem anti-Cdc42GAP Antikörper und FITC-markiertem sekundären Antikörper detektiert, F-Aktin wurde durch Rhodamin-Phalloidin gefärbt. Weißer Balken in (C) und (F): 10 µm.

Die Aufnahmen zeigen zum ersten Mal eine spezifische intrazelluläre Lokalisation von Cdc42GAP. Die Ergebnisse liefern auch den ersten Hinweis, daß die Verteilung von Cdc42GAP vom physiologischen Zustand der Zellen abhängig ist. Es scheint überraschend, daß Cdc42GAP als Regulatorprotein der RhoGTPase Cdc42 (zumindest *in vitro*) nicht mit F-Aktin im Kernbereich der Podosomen lokalisiert, wohingegen für Cdc42 selbst eine solche Lokalisation nachgewiesen wurde (Linder *et al.*, 1999).

Desweiteren konnte sowohl in primären humanen Makrophagen als auch in unserem Modellsystem, den J774-Makrophagen, keine Kolokalisation zwischen Cdc42GAP und Rac1 oder RhoA detektiert werden.

Die Migration von Makrophagen ist durch chemoattraktive Stoffe induzierbar. Im Folgenden wurde versucht, den Anteil an Zellen mit migratorischem Phänotyp in einer Population durch Zugabe solcher Substanzen zu erhöhen und die Frage zu klären, ob Cdc42GAP dadurch vermehrt an Vesikeln lokalisiert.

Als Aktivatoren wurden fMLF (formyl-Methionyl-Leucin-Phenylalanin), ein chemoattraktives bakterielles Peptid sowie Lipopolysaccharid (LPS) aus der gram-negativen Bakterienzellwand eingesetzt. Behandlung der Zellen mit fMLF und LPS führten zu einem erhöhten Prozentsatz von Zellen mit migratorischem Phänotyp und zur Akkumulation von Cdc42GAP an Vesikeln wie in Abb.8D-F gezeigt.

Da Makrophagen als professionelle Phagozyten in besonderem Maße zu Aufnahmeprozessen befähigt sind, wurde untersucht, ob auch Endozytoseinduktoren Cdc42GAP-positive Vesikel hervorrufen können. Als Induktoren wurden sogenannte *fluid phase marker* wie Dextrane oder *Lucifer Yellow* eingesetzt.

Die Dextrane waren zur besseren Sichtbarmachung 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, Cdc42GAP-haltige Vesikel in den primären humanen Makrophagen zu induzieren (Abb.9). Die Cdc42GAP-positiven Vesikel waren 45-60 min nach Dextranzugabe 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).

Darüber hinaus konnte nicht nur die Induktion von Cdc42GAP-haltigen Vesikeln, sondern auch eine deutliche Kolokalisation mit den eingesetzten Pinozytosemarkern - FITC-, TRITC-, *Cascade blue*-Dextran bzw. *Lucifer Yellow* - nachgewiesen werden. In Abb.9C ist die Akkumulation von Cdc42GAP an pinozytotischen Vesikeln exemplarisch für die Kolokalisation von Cdc42GAP mit TRITC-Dextran dargestellt. Die bisher aufgeführten Ergebnisse ließen sich auch im Modellsystem, den murinen J774-Makrophagen, bestätigen (Abb.10).

Um die Lokalisation von Cdc42GAP mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, wurden J774-Makrophagen mit einem eukaryontischen Expressionsvektor für GFP-Cdc42GAP (pEGFP-Cdc42GAP) transfiziert. Wie in Abb.11C gezeigt, lokalisierte GFP-Cdc42GAP in den TRITC-Dextran-stimulierten J774-Makrophagen an den bereits beschriebenen, durch Kolokalisation mit TRITC-Dextran gekennzeichneten, Vesikeln.

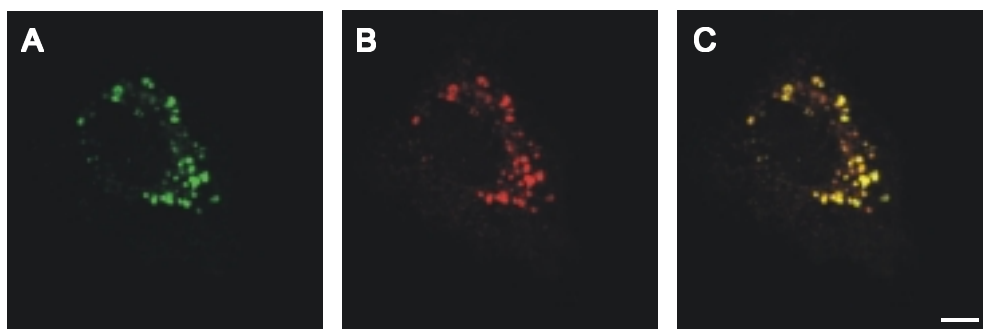


Abb.9: Cdc42GAP kolokalisiert mit fluoreszenzmarkiertem Dextran in pinozytotischen Vesikeln. Konfokalmikroskopische Aufnahmen primärer humaner Makrophagen nach einstündiger Inkubation mit TRITC-Dextran und Immunfluoreszenzfärbung für Cdc42GAP (A-C). (A) zeigt die Lokalisation von Cdc42GAP (Grün) an pinozytotischen Vesikeln, die durch das fluoreszenzmarkierte Dextran (Rot) gekennzeichnet sind (B). (C): Überlagerung zwischen (A) und (B); die gelbe Farbe zeigt die Kolokalisation an. Cdc42GAP wurde mit einem anti-Cdc42GAP Antikörper und FITC-markiertem sekundären Antikörper detektiert. Weißer Balken in (C): 10 μ m.

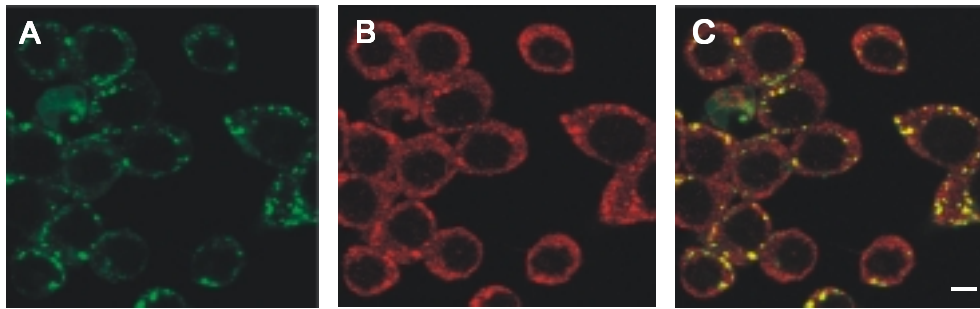


Abb.10: Cdc42GAP kolokalisiert mit fluoreszenzmarkiertem Dextran in J774-Makrophagen. Konfokalmikroskopische Aufnahmen muriner J774-Makrophagen nach einstündiger Inkubation mit FITC-Dextran (A-C). (A) zeigt die durch FITC-Dextran gekennzeichneten pinozytotischen Vesikel (Grün), (B) die Verteilung von Cdc42GAP (Rot). (C): Überlagerung zwischen (A) und (B); die gelbe Farbe zeigt die Kolokalisation an. Cdc42GAP wurde mit einem anti-Cdc42GAP Antikörper und TRITC-markiertem sekundären Antikörper detektiert. Weißer Balken in (C): 10 μ m.

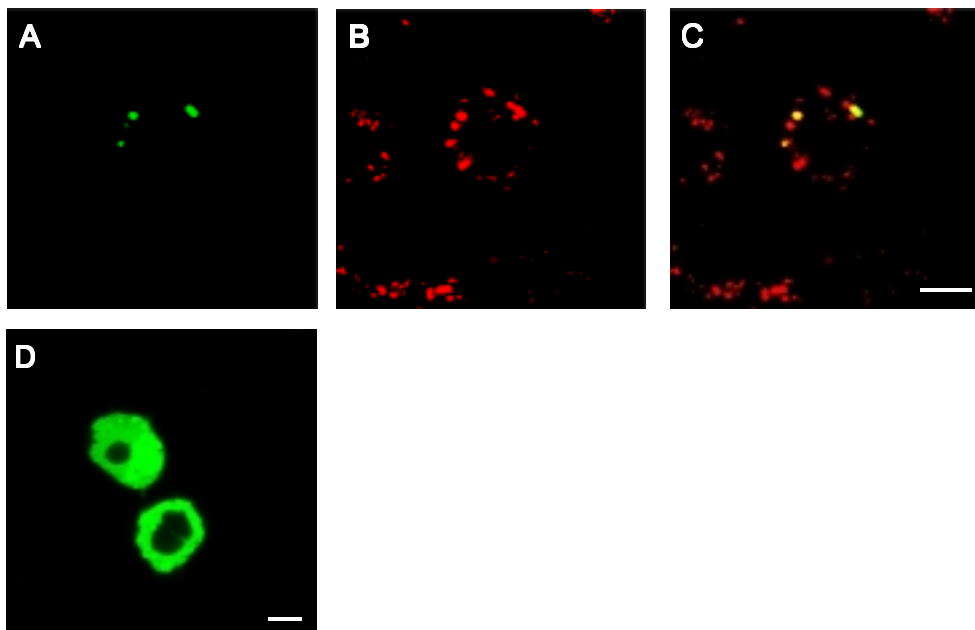


Abb.11: GFP-Cdc42GAP wird nach Dextran-Induktion an vesikuläre Strukturen rekrutiert und kolokalisiert mit TRITC-Dextran in diesen Strukturen. (A-C) Konfokalmikroskopische Aufnahmen GFP-Cdc42GAP exprimierender J774-Makrophagen nach einstündiger Behandlung mit TRITC-Dextran und (D) als Kontrolle im unbehandelten Zustand. (A) zeigt die induzierten GFP-Cdc42GAP-haltigen Vesikel (Grün), (B) die durch TRITC-Dextran markierten Pinozytosevesikel (Rot). (C) zeigt in gelber Farbe die Kolokalisation zwischen (A) und (B). Weißer Balken in (C) und (D): 10 μ m.

Makropinozytotisches Material, insbesondere, wenn es an FITC- oder TRITC-Fluorophore gekoppelt ist, kann über den Mannose-Rezeptor aufgenommen werden (Gröger *et al.*, 2000). Es sollte deshalb nachgeprüft werden, ob dies im vorliegenden Fall auch zutrifft. Dazu wurde der Mannose-Rezeptor in primären humanen Makrophagen durch zwei unterschiedliche Substanzen abgesättigt:

1. mit einem blockierenden Antikörper wie bei Gröger *et al.* beschrieben (Gröger *et al.*, 2000)
2. durch Zugabe von Mannan, einem Liganden dieses Rezeptors

Anschließend wurde die Makropinozytose durch Zugabe von Dextran in kontinuierlicher Anwesenheit der jeweiligen Substanzen induziert. Es zeigte sich, daß unter den genannten Bedingungen weder die Dextran-Aufnahme noch die Ausbildung der Cdc42GAP-haltigen Vesikel inhibiert wurde. Dies war auch nicht der Fall, wenn Mannan oder der blockierende Antikörper in 20-fach höheren Konzentrationen als in der Literatur angegeben, eingesetzt wurden (Schell *et al.*, Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse machen es sehr unwahrscheinlich, daß es sich hier um einen Mannose-Rezeptor vermittelten Prozess handelt.

IV.2.2. Auftreten von Cdc42GAP-haltigen Vesikeln in anderen Zelltypen

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich Cdc42GAP-haltige Vesikel auch in nicht-professionellen Phagozyten nachweisen lassen. Außerdem wurde analysiert, ob diese Vesikel nicht nur durch Endozytose/Pinozytose-Vorgänge ausgebildet werden, sondern auch eine mögliche Bedeutung bei der Phagozytose haben. Um diesen Fragen nachzugehen, wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt:

- a) HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*), humane Endothelzellen aus der Nabelschnur, wurden mit pEGFP-Cdc42GAP transfiziert und anschließend mit dem gram-positiven Bakterium *Staphylococcus aureus* (DU5883(pFnBA4)) inkubiert. Dieses System wurde gewählt, da dieser Stamm des Bakteriums über *Fibronectin-binding* Protein A an HUVEC adhärirt, anschließend invadiert und dann in den endosomalen Weg eintritt. Dabei erfolgt die initiale Aufnahme in einem typischen Aktin-abhängigen Phagozytose-Mechanismus, der sich u.a. durch Ausbildung eines Aktin-reichen *phagocytic cup* um die Bakterien herum auszeichnet (Sinha *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 2000; A. Schröder *et al.*, unveröffentlicht).
- b) HeLa-Zellen wurden mit pEGFP-Cdc42GAP transfiziert und anschließend mit *Yersinia enterocolitica* Invasin-beschichteten *beads* inkubiert, welche als Modellsystem für β 1-Integrin-vermittelte Phagozytose herangezogen werden können (Wiedemann *et al.*, 2001).

Es konnten sowohl in HeLa-Zellen als auch in HUVEC Cdc42GAP-haltige Vesikel nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Makrophagen, traten die Cdc42GAP-positiven Vesikel in diesen beiden Zelltypen schon im unstimulierten Zustand auf. In Abb.12 ist die Verteilung von Cdc42GAP exemplarisch für HeLa-Zellen dargestellt. Die hier unter Punkt IV.2.2. beschriebenen Experimente wurden vornehmlich in lebenden Zellen mit Hilfe des *live cell imaging* durchgeführt. Dadurch war es insbesondere möglich, die Dynamik der Cdc42GAP-positiven Vesikel zu analysieren. Weitere Resultate – Interaktion der Cdc42GAP-haltigen Vesikel mit dem Phagosom und Bewegung der Vesikel innerhalb der Zelle - sind in dem Kapitel „Lokalisation

und Dynamik der Cdc42GAP-haltigen Vesikel in lebenden Zellen“ unter Punkt IV.4. im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit zusammengefaßt.
 Der Nachweis Cdc42GAP-positiver Vesikel auch in menschlichen Epithel- (HeLa) und Endothelzellen (HUVEC) bedeutet, daß diese eine weit verbreitete endo-lysosomale Substruktur darstellen.

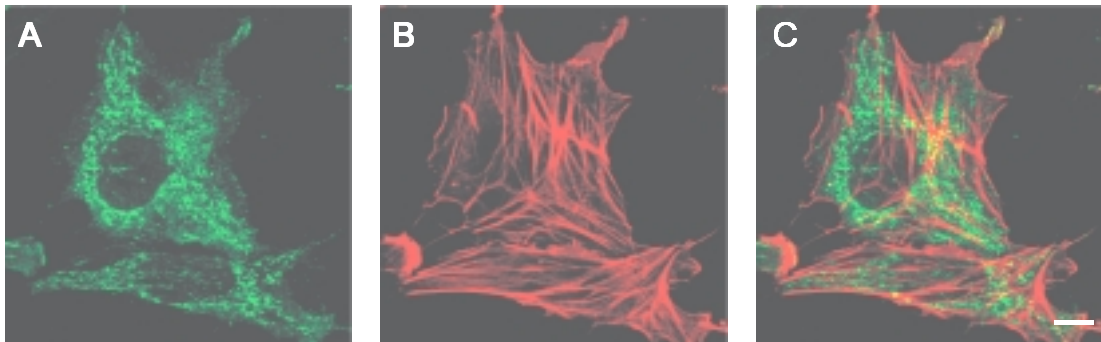


Abb.12: Cdc42GAP-Vesikel sind auch in nicht-monozytären Zellen nachweisbar. Konfokalmikroskopische Aufnahme zur Lokalisation von Cdc42GAP in unstimulierten HeLa-Zellen. (A-C): Cdc42GAP (Grün, detektiert über anti-Cdc42GAP Antikörper und FITC-markiertem sekundären Antikörper) ist auch in diesem Zelltyp an vesikulären Strukturen zu finden. Zur besseren Sichtbarmachung der Zellgrenzen wurde das Aktinzytoskelett (Rot, detektiert über eine F-Aktin-Färbung mittels Rhodamin-Phalloidin) angefärbt. Deutlich sichtbar sind dabei die Streifasern innerhalb des Zytoplasmas. Weißer Balken in (C): 10 µm.

Zusammengenommen sagen die bisherigen Resultate Folgendes aus:

- (1) Cdc42GAP lokalisiert in verschiedenen Zelltypen an vesikulären Strukturen.
- (2) In Makrophagen entstehen Cdc42GAP-haltige Vesikel nach Stimulation mit chemotaktischen oder pinozytotischen Stimuli.
- (3) Cdc42GAP-haltige Vesikel kolokalisieren mit fluoreszenzmarkiertem Dextran ca. 45-60 min nach Zugabe des Stimulus.

IV.3. Charakterisierung der Cdc42GAP-haltigen Vesikel

IV.3.1. Cdc42GAP-haltige Vesikel stellen ein nicht-klassisches endo-lysosomales Kompartiment dar

IV.3.1.1. Akkumulation von Cdc42GAP in sauren Kompartimenten nach Dextran-Stimulation

Aufgrund der Tatsache, daß Cdc42GAP mit Dextran etwa 45-60 min nach dessen Aufnahme kolokalisiert, kann vermutet werden, daß es sich bei den Cdc42GAP-haltigen Vesikeln eventuell um späte, endo-lysosomale Kompartimente handelt. Diese sind u.a. durch einen sauren pH-Wert (pH 4-5) gekennzeichnet. Deshalb wurde zunächst untersucht, ob die Cdc42GAP-positiven Vesikel einen sauren pH-Wert aufweisen. Dazu wurden J774-Makrophagen mit pEGFP-Cdc42GAP transfiziert und vor der Stimulation mit Dextran mit LysoTracker vorinkubiert. Diese Substanz markiert in lebenden Zellen spezifisch saure Kompartimente und wird u.a. zum Studium der Biogenese von Lysosomen verwendet (aus dem Datenblatt der Firma Molecular Probes).

In einem Kontrollexperiment wurde zunächst untersucht, ob das fluoreszenzmarkierte Dextran in LysoTracker-positiven Vesikeln zu finden ist. Wie in Abb.13C zu sehen ist, konnte dieser Nachweis erbracht werden. Gleichsam wurde gezeigt, daß GFP-Cdc42GAP nach Induktion mit Dextran mit LysoTracker-markierten Vesikeln kolokalisiert (Abb.13F). Diese Kolokalisation ist ohne Induktion mit Dextran nicht gegeben. Mit Hilfe dieser Experimente wurde belegt, daß die Cdc42GAP-positiven Vesikel saure Kompartimente darstellen.

Aufgrund der Tatsache, daß LysoTracker saure Kompartimente mit einem nicht näher definierten pH-Bereich anfärbt, ist festzuhalten, daß mit dieser Substanz eine ganze Reihe unterschiedlicher Vesikel gefärbt werden. Deren Gesamtheit wird allgemein als Lysosom bezeichnet. Es stellt sich aber immer mehr heraus, daß insbesondere in Makrophagen eine Vielzahl saurer Kompartimente existiert, die sich mehr oder weniger deutlich voneinander unterscheiden (Claus *et al.*, 1998; Dell'Angelica *et al.*, 2000; Übersicht bei Raposo *et al.*, 2002). Deshalb ist es sinnvoller, von lysosomalen Kompartimenten als von dem Lysosom zu sprechen.

Da nun nachgewiesen werden konnte, daß Cdc42GAP-positive Vesikel saure Kompartimente darstellen, wurde untersucht, ob diese Vesikel dem „klassischen“, lamp-1-positiven, Lysosom entsprechen. Dazu wurden J774-Makrophagen mit pEGFP-Cdc42GAP transfiziert, die Cdc42GAP-haltigen Vesikel durch Inkubation der Zellen mit *Cascade Blue*-Dextran induziert und lamp-1 mit anti-lamp-1 Antikörper in der Immunfluoreszenz detektiert. Abb.14F zeigt, daß GFP-Cdc42GAP-positive Vesikel nicht mit lamp-1-Vesikeln kolokalisieren.

Diese Ergebnisse deuten an, daß Cdc42GAP-haltige Vesikel nicht mit dem „klassischen“ Lysosom gleichgesetzt werden können, sondern vermutlich ein bis dato nicht beschriebenes, endo-lysosomales Kompartiment darstellen.

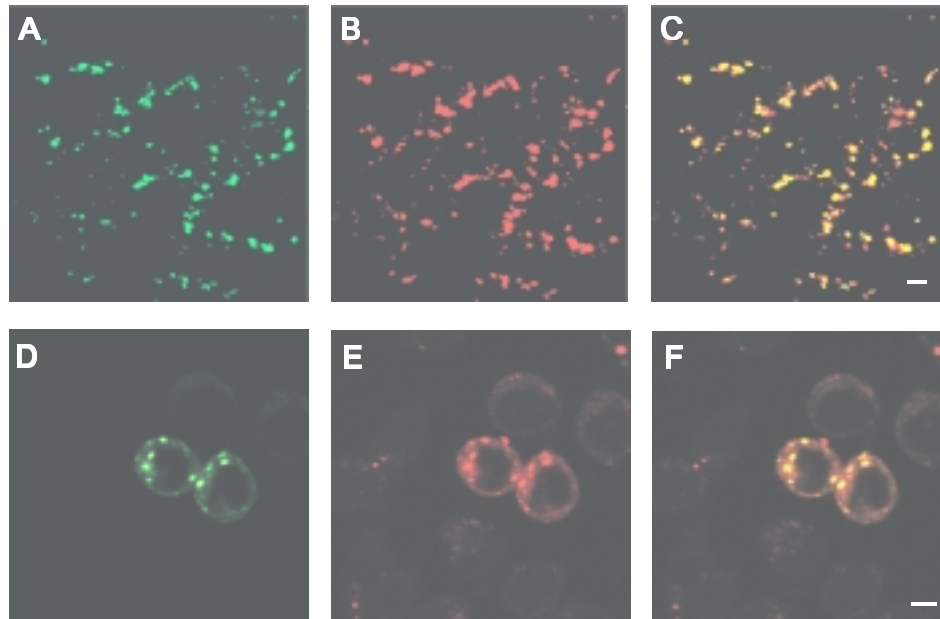


Abb.13: FITC-Dextran und Cdc42GAP lokalisieren in sauren, LysoTracker-positiven Kompartimenten. (A-F): Konfokalmikroskopische Aufnahmen von J774-Makrophagen. (A-C): Die Zellen wurden mit LysoTracker vorbehandelt und anschließend mit FITC-Dextran inkubiert. (D-F): Alternativ wurden sie mit pEGFP-Cdc42GAP transfiziert, nach der Transfektion mit LysoTracker inkubiert und anschließend mit Dextran stimuliert. (A) zeigt die Verteilung von FITC-Dextran (Grün), (B) die durch LysoTracker markierten sauren Kompartimente (Rot) und (C) in Gelb die Kolokalisation zwischen (A) und (B). (D) zeigt die Akkumulation von GFP-Cdc42GAP in Vesikeln (Grün), (E) die LysoTracker-positiven Vesikel (Rot) und (F) in Gelb die Kolokalisation zwischen GFP-Cdc42GAP und LysoTracker. Weißer Balken in (C) und (F): 10 µm.

IV.3.1.2. Versuch der Zuordnung der Cdc42GAP-haltigen Vesikel zu einem der klassischen endo-lysosomalen Kompartimente

Nachdem bisher nachgewiesen wurde, daß Cdc42GAP-positive Vesikel endo-lysosomaler Natur sind und wahrscheinlich Kontakt zum endozytotischen *Pathway* von Dextran haben (vgl. Punkt IV.2.1 und Punkt IV.3.1.1.), sollte analysiert werden, ob Cdc42GAP auch Kontakt mit anderen endosomalen Strukturen hat.

Dazu wurden J774-Makrophagen mit pEGFP-Cdc42GAP transfiziert, mit Dextran stimuliert und anschließend Markerproteine „klassischer“ endosomaler Kompartimente mittels Immunfluoreszenz detektiert. Alternativ wurden die Zellen wie im Methodenteil unter Punkt III.3.6 beschrieben mit fluoreszenzmarkiertem Transferrin oder LDL als Indikatoren für Rezeptor-vermittelte Endozytose inkubiert und Cdc42GAP durch indirekte Immunfluoreszenz mittels eines anti-Cdc42GAP Antikörpers detektiert.

Eine Zusammenfassung in Tabelle 4 zeigt, daß Cdc42GAP an keinem der untersuchten spezifischen Kompartimente des endozytotischen *Pathways* lokalisiert.

Exemplarisch ist dies in Abb.14 an der fehlenden Kolokalisation zwischen Cdc42GAP und Alexa568-Transferrin bzw. lamp-1 gezeigt. Da Cdc42GAP nicht

an Kompartimenten des „klassischen“ endosomalen Weges lokalisiert, wurde der Frage nachgegangen, ob Cdc42GAP in Strukturen, die dem Endoplasmatischem Retikulum (ER) oder Golgi-Apparat angehören, nachgewiesen werden kann. Die Resultate zeigen, daß Cdc42GAP nicht an Strukturen des ER oder Golgi-Apparates lokalisiert (vgl. Tab.4).

In diesem Zusammenhang wurde auch untersucht, ob Cdc42GAP-positive Vesikel in Transportprozesse zwischen ER und Golgi-Apparat involviert sind. Brefeldin A (BFA), ein Toxin aus *Eupenicillium brefeldianum* blockiert diesen Transportweg (Misumi *et al.*, 1986). In Säugerzellen geht der Effekt häufig mit morphologischen Veränderungen, wie z.B. Kollabierung des Golgi-Komplexes und Anschwellen des ER einher. Kontrollexperimente zeigen, daß BFA-Behandlung in Makrophagen zur Kollabierung des Golgi-Apparates führen. Im Hinblick auf die Ausbildung, Morphologie oder Dynamik der Cdc42GAP-haltigen Vesikel konnte weder in der Immunfluoreszenz noch im *live cell imaging* ein Effekt von BFA beobachtet werden. Auch dann nicht, wenn eine 10-fach höhere Konzentration als die in der Literatur beschriebene eingesetzt wurde. Diese Experimente machen es sehr unwahrscheinlich, daß Cdc42GAP-haltige Vesikel in den ER→Golgi-Transport involviert sind.

Tabelle 4 am Ende des Kapitels IV faßt die Ergebnisse der Kollokalisationsexperimente von Cdc42GAP und den angegebenen Marker-proteinen zusammen.

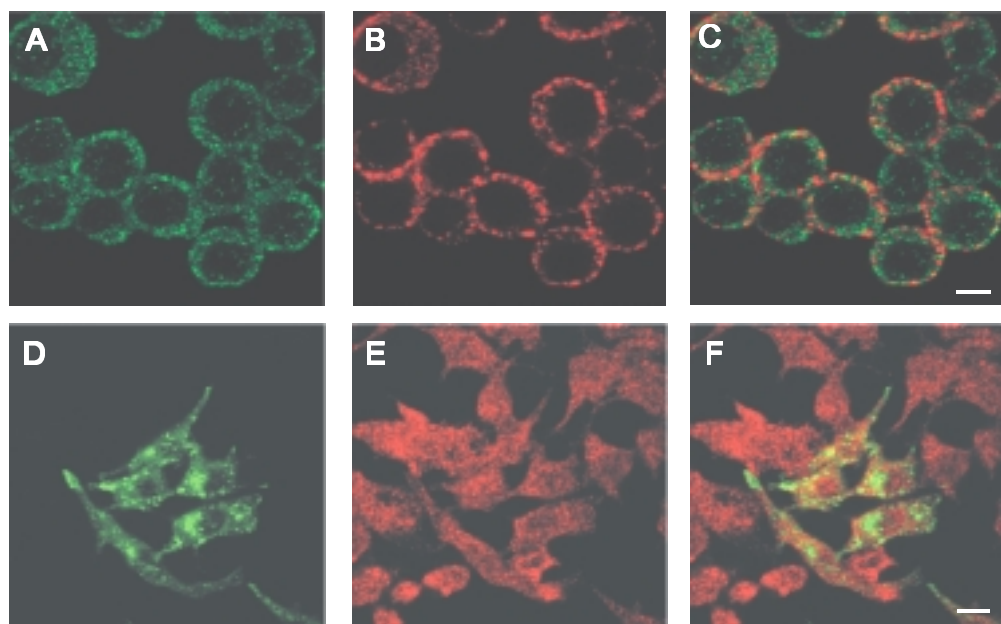


Abb.14: Cdc42GAP kolokalisiert nicht mit Alexa 568-Transferrin oder lamp-1. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von J774-Makrophagen, die in (A-C) mit Alexa 568-Transferrin und in (D-F) mit Dextran behandelt wurden. Nach Internalisierung des Transferrins (B, Rot) wurde Cdc42GAP (A, Grün) mit anti-Cdc42GAP Antikörper und FITC-markiertem sekundären Antikörper detektiert. In (D-F) wurden die Makrophagen mit pEGFP-Cdc42GAP transfiziert und zur Induktion der Cdc42GAP-haltigen Vesikel mit Dextran inkubiert (1h). Anschließend wurde lamp-1 mit anti-lamp-1 Antikörper und TRITC-markiertem sekundären Antikörper nachgewiesen. (C) zeigt die Überlagerung von (A) und (B), (F) die Überlagerung von (D) und (E). Weißer Balken in (C) und (F): 10 µm.

IV.3.2. PAK und WAVE lokalisieren an Cdc42GAP-positiven Vesikeln

Außer den genannten Vesikelmarkern wurden zwei weitere Proteine gefunden, die mit Cdc42GAP an den Dextran-markierten Vesikeln kolokalisieren. Erstens der Rac-Effektor PAK (*p21 activated kinase*), der in makropinozytische Prozesse involviert ist (Dharmawardhane *et al.*, 2000). Zweitens WAVE (*WASP family Verprolin-homologous protein*), ein Protein, das zu den Arp2/3-Komplex-Aktivatoren zählt und damit die Aktinpolymerisation kontrolliert (Miki *et al.*, 1998).

Abb.15G zeigt eine deutliche Kolokalisation zwischen Cdc42GAP, PAK und dem internalisierten Dextran. Die Kolokalisation zwischen Cdc42GAP und WAVE ist in Abb.16C dargestellt.

Für Immunfluoreszenzfärbungen von PAK und WAVE wurden jeweils polyklonale Antikörper verwendet, die alle bekannten Isoformen der entsprechenden Proteine erkennen.

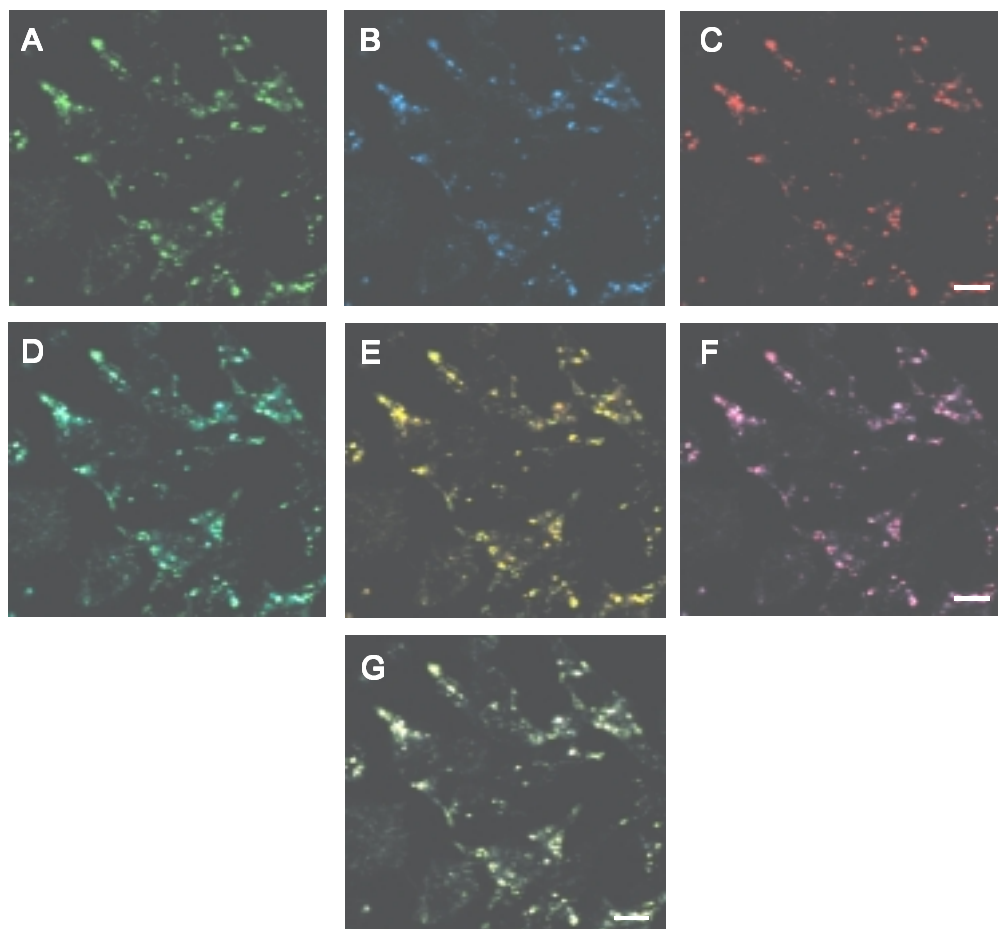


Abb.15: Cdc42GAP kolokalisiert mit PAK an endozytotischen Vesikeln. Konfokalmikroskopische Aufnahmen FITC-Dextran-behandelter J774-Makrophagen (A-G). Die pinozytotischen Kompartimente sind durch FITC-Dextran grün markiert (A), Cdc42GAP-positive Vesikel in Blau (B) und PAK-positive Vesikel in Rot dargestellt (C). (D) zeigt in Türkis die Kolokalisation von FITC-Dextran und Cdc42GAP, (E) in Gelb die Kolokalisation von FITC-Dextran und PAK und (F) in Pink die Kolokalisation von Cdc42GAP und PAK. Die Kolokalisation aller Komponenten ist durch die weiße Farbe in (G) sichtbar. Cdc42GAP wurde mit einem anti-Cdc42GAP Antikörper und Cy5-markiertem sekundären Antikörper detektiert, PAK mit einem anti-PAK Antikörper und TRITC-markiertem sekundären Antikörper. Der anti-PAK Antikörper erkennt alle PAK-Isoformen. Weißer Balken in (C), (F), (G) : 10 µm.

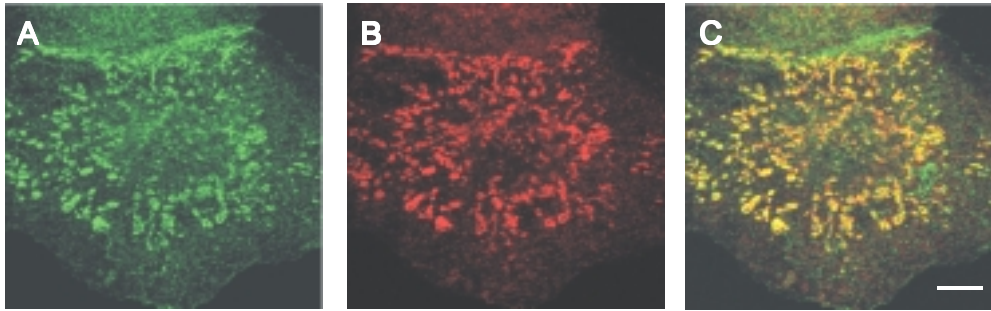


Abb.16: Cdc42GAP kolokalisiert mit WAVE in vesikulären Strukturen. Konfokalmikroskopische Aufnahmen zur Kolokalisation von Cdc42GAP und WAVE in primären humanen Makrophagen nach LPS-Stimulation. (A) zeigt die Verteilung von WAVE in Grün, (B) die von Cdc42GAP in Rot. (C) zeigt die Überlagerung von (A) und (B), die gelbe Farbe in (C) gibt die Kolokalisation beider Komponenten an. Cdc42GAP wurde mit einem anti-Cdc42GAP Antikörper und TRITC-markiertem sekundären Antikörper detektiert, WAVE mit einem pan-WAVE Antikörper und FITC-markiertem sekundären Antikörper. Der anti-WAVE Antikörper erkennt alle WAVE-Isoformen. Weißer Balken in (C): 10 µm.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde PAK als alternativer Marker für das Vorhandensein Cdc42GAP-haltiger Vesikel eingesetzt. Ob eine direkte Interaktion zwischen diesen beiden Komponenten vorliegt und wie diese die Ausbildung der beschriebenen Vesikel moduliert, wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Der Nachweis, ob WAVE im aufgeführten Kontext den Bezug zum Aktinzytoskelett herstellt oder ob es sich hier um eine neue, Aktin-unabhängige Funktion von WAVE handelt, ist ebenso wie die Frage, um welche Isoform des WAVE-Proteins es sich handelt, Gegenstand eines eigenständigen Projektes.

IV.3.3. Cdc42GAP befindet sich in Kompartimenten mit hoher lysosomaler Aktivität

Zellfraktionierungsexperimente sollten weitere Anhaltspunkte liefern, ob es sich bei den Cdc42GAP-haltigen Vesikeln um lysosomale Strukturen handelt. Dazu wurden Membranen von unbehandelten und Dextran-stimulierten J774 Makrophagen mittels Percoll-Gradienten einer Dichtegradienten-Fraktionierung unterzogen. Als Markerenzyme wurden N-acetyl-Glucosaminidase für Lysosomen und 5'-Nukleotidase für die Plasmamembran herangezogen (vgl. Punkt III.2.4.2). Die Fraktionen wurden vom Boden des Röhrchens entnommen, d.h. die „schweren“ Membrane sind in frühen, die „leichten“ in späten Fraktionen zu finden (vgl. Punkt III.2.4.1.). Die Aktivitäten dieser Enzyme wurden in jeder Fraktion bestimmt und in Abhängigkeit von der Fraktionsnummer in Abb.17 graphisch dargestellt. Dabei wurde in der Fraktion mit dem höchsten enzymatischen Umsatz die relative Aktivität des jeweiligen Enzyms gleich 100% gesetzt und die Enzymaktivitäten in den anderen Fraktionen darauf bezogen. Mittels *Western Blot* wurde das Vorhandensein von Cdc42GAP in den untersuchten Fraktionen geprüft.

Sowohl in den behandelten wie in den unbehandelten J774-Makrophagen erscheinen die Lysosomen in den schweren Membranfraktionen, wohingegen der Großteil der Plasmamembran in den leichteren Percollfraktionen auftritt.

Die *Western Blot*-Analyse der untersuchten Percollfraktionen mit anti-Cdc42GAP Antikörper zeigt, daß Cdc42GAP bereits in den nicht-stimulierten Zellen in der Lysosomenfraktion vorhanden ist (Abb.18). Diese Verteilung ändert sich nach FITC-Dextran-Stimulation nicht.

Dieses Ergebnis bestätigt, daß Cdc42GAP in ruhenden Zellen bereits an Membranen lokalisiert, auch wenn das in der Immunfluoreszenz nicht ersichtlich ist. Zusammengenommen bestätigen diese Ergebnisse, daß Cdc4GAP-positive Vesikel ein lysosomales Kompartiment darstellen.

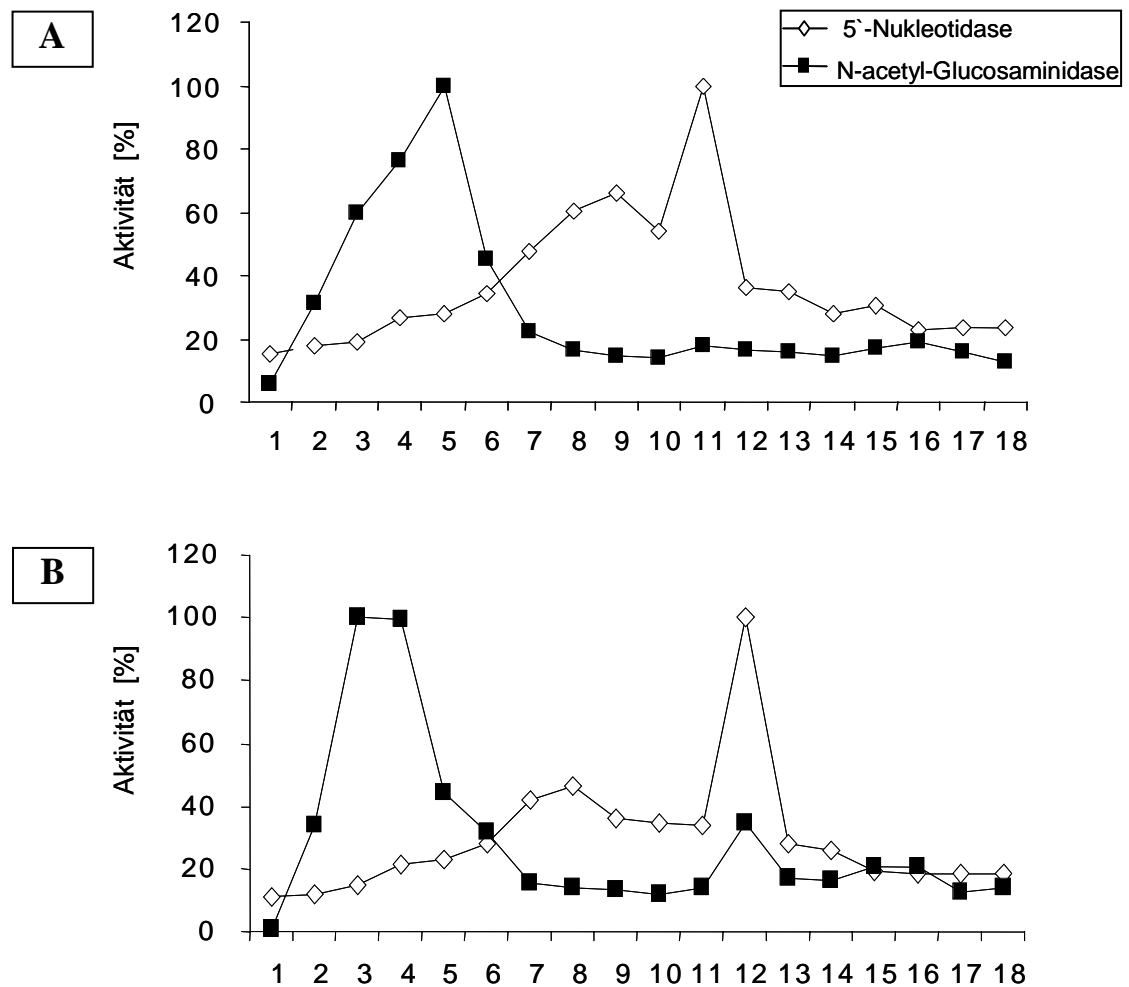


Abb.17: Membranfraktionierung in J774-Makrophagen und Zuordnung von Cdc42GAP zur lysosomalen Membranfraktion. Percoll-Dichtegradientenzentrifugation unbehandelter (A) und FITC-Dextran-stimulierter (B) J774-Makrophagen. Die Ordinate zeigt die Aktivität eines Markerenzym der Lysosomen (N-acetyl-Glucosaminidase) und die Aktivität eines Markerenzym der Plasmamembran (5'-Nucleotidase). Die prozentuale Darstellung ergibt sich, indem in der Fraktion mit dem höchsten enzymatischen Umsatz die Aktivität des jeweiligen Enzyms gleich 100% gesetzt wurde und die Enzymaktivitäten in den anderen Fraktionen darauf bezogen wurden. Auf der Abszisse ist die Anzahl der untersuchten Percollfraktion aufgetragen. Es ist deutlich erkennbar, daß die Lysosomen in den schweren Percollfraktionen auftreten, während die Plasmemembran in einer Fraktion mit geringerer Dichte erscheint.

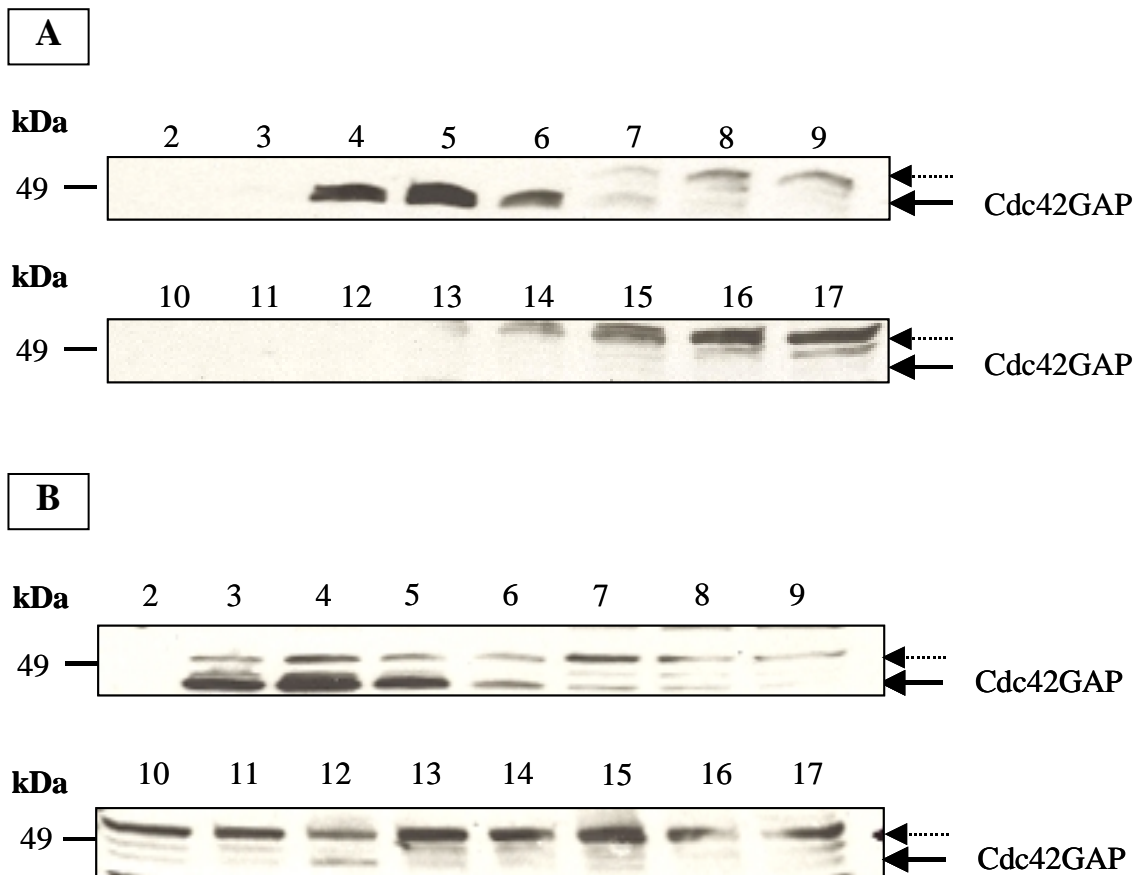


Abb.18: Cdc42GAP kolokalisiert in J774-Makrophagen mit Fraktionen hoher lysosomaler Aktivität. *Western Blot* Analyse zur Verteilung von Cdc42GAP in unbehandelten (A) und FITC-Dextran-stimulierten (B) J774-Makrophagen in den Fraktionen des Percoll-Gradienten. Die Detektion von Cdc42GAP mittels anti-Cdc42GAP Antikörper zeigt, daß sich die Verteilung von Cdc42GAP nach Stimulation der Zellen nicht ändert. Der gestrichelte Pfeil gibt die Lokalisation eines mit dem anti-Cdc42GAP-Antikörper kreuzreagierenden Protein an.

Kompartiment	Markerprotein	Kolokalisation mit Cdc42GAP
pinozytotische Vesikel	fluoreszenzmarkierte Dextrane	+
pinozytotische Vesikel	<i>Lucifer Yellow</i>	+
saure Kompartimente	LysoTracker	+
Cdc42GAP-positive Vesikel	PAK	+
Cdc42GAP-positive Vesikel	WAVE	+
Clathrin-beschichtete Vesikel	Transferrin	-
Clathrin-beschichtete Vesikel	LDL	-
Caveolae	Caveolin-2	-
frühe Endosomen	Rab5	-
frühe Endosomen	EEA-1	-
späte Endosomen	Rab7	-
<i>recycling endosomes</i>	Rab11	-
Lysosomen	lamp-1	-
Golgi-Apparat	COPII (E5A3)	-
<i>trans</i> Golgi-Netzwerk	TGN38	-
ER	BiP	-

Tab.4: Kolokalisation von Cdc42GAP mit den angegebenen Markerproteinen. Die aufgeführten Markerproteine einzelner endosomaler Kompartimente, des *trans*-Golgi-Netzwerks und des Endoplasmatischen Retikulums (ER), sowie zwei RhoGTPase-Effektoren wurden durch indirekte Immunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern in pEGFP-Cdc42GAP transfizierten und Dextran stimulierten J774-Makrophagen nachgewiesen. Dextrane, *Lucifer Yellow*, Transferrin und LDL konnten aufgrund ihrer Fluoreszenzmarkierung direkt detektiert werden. „-“ steht für die fehlende Kolokalisation, „+“ für die positive Kolokalisation von Cdc42GAP mit dem jeweiligen Markerprotein.

IV.4. Lokalisation und Dynamik der Cdc42GAP-haltigen Vesikel in lebenden Zellen

IV.4.1. Kolokalisation zwischen GFP-Cdc42GAP und TRITC-Dextran bzw. LysoTracker

Im nachfolgenden sollte die Dynamik der Kolokalisation zwischen Cdc42GAP und Dextran bzw. LysoTracker in lebenden Zellen dokumentiert werden. Dazu wurden HeLa-Zellen mit pEGFP-Cdc42GAP transfiziert und mit TRITC-Dextran oder LysoTracker (LYTr) für mindestens 1 h behandelt.

Diese Experimente bestätigten die durch Immunfluoreszenzfärbungen detektierte Kolokalisation zwischen Cdc42GAP und Dextran- bzw. LYTr-positiven Vesikeln. Die Lebendzell-Aufnahmen lieferten jedoch ein sehr viel komplexeres Bild der Wechselwirkung von Cdc42GAP und Dextran bzw. LYTr. Im Gegensatz zu einer oftmals vollkommenen Überlagerung der genannten Komponenten in der Immunfluoreszenz, zeigt sich dieser Aspekt *in vivo* als transienter Kontakt. Hier wurde deutlich, daß Cdc42GAP-haltige Vesikel und Dextran- bzw. LYTr-positiv Vesikel in sehr großer räumlicher Nähe sind, sich aber nur kurzzeitig überlagern, um sofort wieder auseinander zu wandern. Dieser einem „kiss and run“-Mechanismus ähnelnde Vorgang ist einem permanenten Zyklus unterworfen, der mit unseren Methoden zum ersten Mal erkennbar wurde. Es zeigte sich außerdem, daß sich die Cdc42GAP-haltigen Vesikel mit hoher Geschwindigkeit durch die Zelle bewegen. Das Auftreten Cdc42GAP-positiver tubulärer Strukturen im *live cell imaging* auch bei kurzen Belichtungszeiten ist vermutlich häufig ein technisch bedingtes Artefakt als Folge dieser hohen Motilität. Die nachfolgenden Abbildungen (Abb.19 und 20) zeigen in unterschiedlichen Einzelbildern die beobachteten Phänomene. Dazu wurden interessante Bereiche (sogenannte *regions of interest*) innerhalb einer Zelle aus dem Gesamtbild heraus vergrößert, um die partielle Kolokalisation zu verdeutlichen.

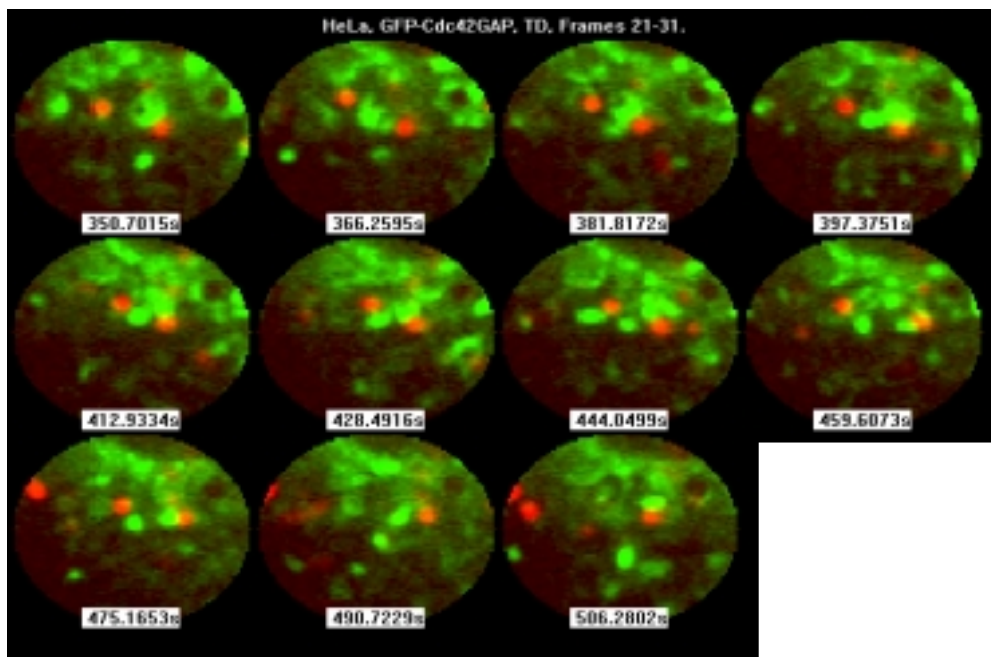


Abb.19: Legende siehe nächste Seite (Seite 60)

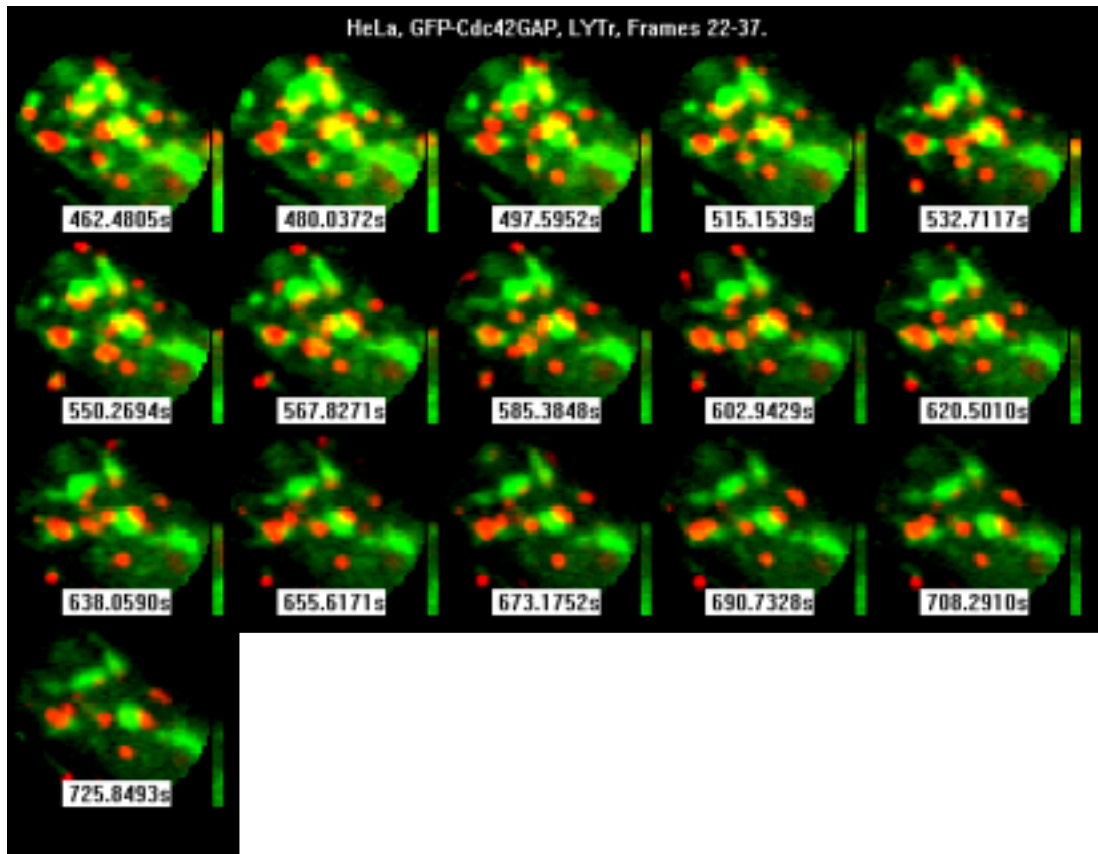


Abb.20: Dynamik der Interaktion von Cdc42GAP-positiven Vesikeln und LysoTracker (LYTr). HeLa-Zellen wurden mit pEGFP-Cdc42GAP (Grün) transfiziert, präinkubiert mit LYTr (Rot) und anschließend zur Induktion der Cdc42GAP-positiven Vesikel mit Dextran stimuliert. Gezeigt ist die Ausschnittsvergrößerung eines bestimmten Zellbereiches. Erkennbar in Gelb sind die kurzen Kontaktmomente zwischen GFP-Cdc42GAP-positiven Vesikeln und den durch LYTr-markierten sauren Kompartimenten.

← **Abb.19: Dynamik der Interaktion von Cdc42GAP-positiven Vesikeln und TRITC-Dextran.** HeLa-Zellen wurden mit pEGFP-Cdc42GAP (Grün) transfiziert und anschließend für 1 h mit TRITC-Dextran (Rot) inkubiert. Gezeigt ist die Ausschnittsvergrößerung eines bestimmten Zellbereiches. Hier wird deutlich, daß die Cdc42GAP-haltigen Vesikel sich meist in der Nähe der TRITC-Dextran-Vesikel befinden, mit diesen kurzzeitig in Kontakt treten und partiell überlappen (Gelb zeigt die Kolo-kalisation). Dies spricht für eine transiente Interaktion von GFP-Cdc42GAP und TRITC-Dextran in Form des sogenannten „kiss and run“-Mechanismus.

IV.4.2. Akkumulation von GFP-Cdc42GAP um Bakterien oder Latex-bead enthaltende Phagosomen

Die Experimente wurden in HUVEC und HeLa-Zellen wie unter Punkt IV.2.2. beschrieben durchgeführt. Beide Zelltypen wurden mit pEGFP-Cdc42GAP transfiziert und dann mit einem Phagozytosestimulus (*S. aureus* im Fall von HUVEC und Invasin-beads im Fall von HeLa-Zellen) behandelt. Mittels *live cell imaging* wurde die Dynamik der Cdc42GAP-positiven Vesikel und die Interaktion dieser Vesikel mit dem jeweiligen Phagosom analysiert.

Wie in Abb.21 und Abb.22 zu sehen ist, interagieren Cdc42GAP-positive Vesikel sowohl in HUVEC als auch in HeLa-Zellen mit Phagosomen, in dem sich das internalisierte Material befindet. Die Cdc42GAP-positiven Vesikel bewegen sich auf das internalisierte Partikel zu, treten kurzzeitig mit diesem in Kontakt und lösen sich dann sehr schnell wieder ab, um in andere Zellbereiche transportiert zu werden (vgl. Video-CD, Film 3A und 3B). Dabei scheint sich auch das GFP-Cdc42GAP kurzzeitig am Phagosom anzureichern (Abb.21A und Abb.22B). Dieses Phänomen gleicht einem in der Literatur als „*kiss-and-run*“-Mechanismus beschriebenen Vorgang der Phago-Lysosomen-Reifung (Übersicht bei Schneider, 2001; Verstreken *et al.*, 2002).

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse können die Cdc42GAP-positiven Vesikel wie folgt charakterisiert werden:

- (1) Cdc42GAP-haltige Vesikel repräsentieren ein lysosomales Kompartiment.
- (2) Die durch Cdc42GAP definierten Vesikel interagieren mit Phagosomen und Lysosomen, die v.a. bakterielles Material enthalten. Die Interaktion der Cdc42GAP-positiven Vesikel mit dem Phagosom ist dynamisch, transient und führt zur zeitweiligen Dekoration der Phagosomen mit Cdc42GAP.

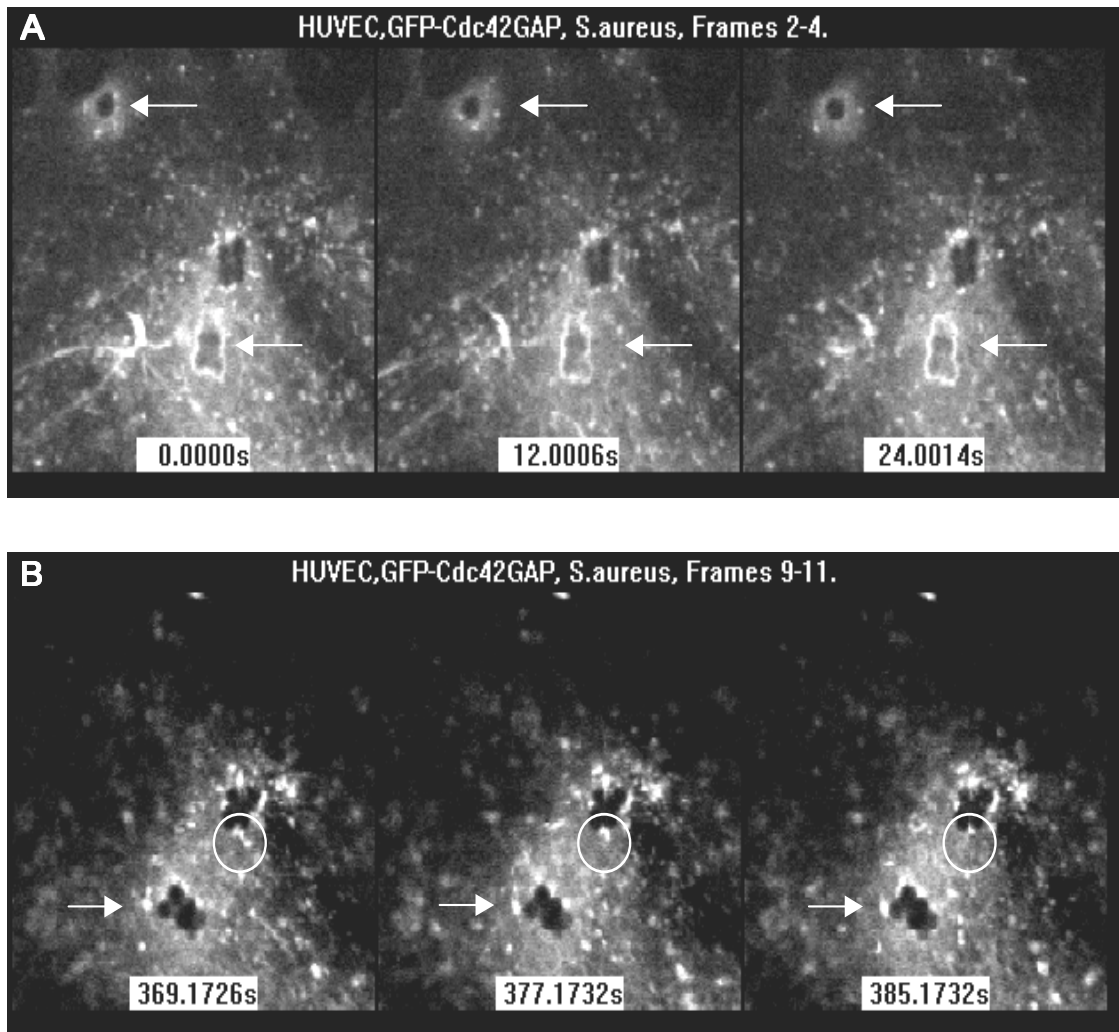


Abb.21: Kurzzeitige Anreicherung von GFP-Cdc42GAP am *S. aureus* enthaltenden Phagosom. Konfokalmikroskopische Aufnahmen GFP-Cdc42GAP exprimierender HUVEC (A-B), die mit *S. aureus* inkubiert wurden. (A) zeigt in einer Abfolge von drei Einzelbildern aus dem entsprechenden Filmmaterial (vgl. Video-CD, Film 3A) die Akkumulation von GFP-Cdc42GAP in einer phagosomalen Ringstruktur um die *S. aureus*-Aggregate (Pfeile). (B) verdeutlicht in drei weiteren Aufnahmen die Anlagerung einzelner Cdc42GAP-haltiger Vesikel um ein *S. aureus* enthaltendes Phagosom (Pfeile). GFP-Cdc42GAP-positive Vesikel können auch mit GFP-Cdc42GAP-haltigen Vesikeln, die sich bereits am Phagosom befinden, in Kontakt treten und mit diesen verschmelzen (Kreise).

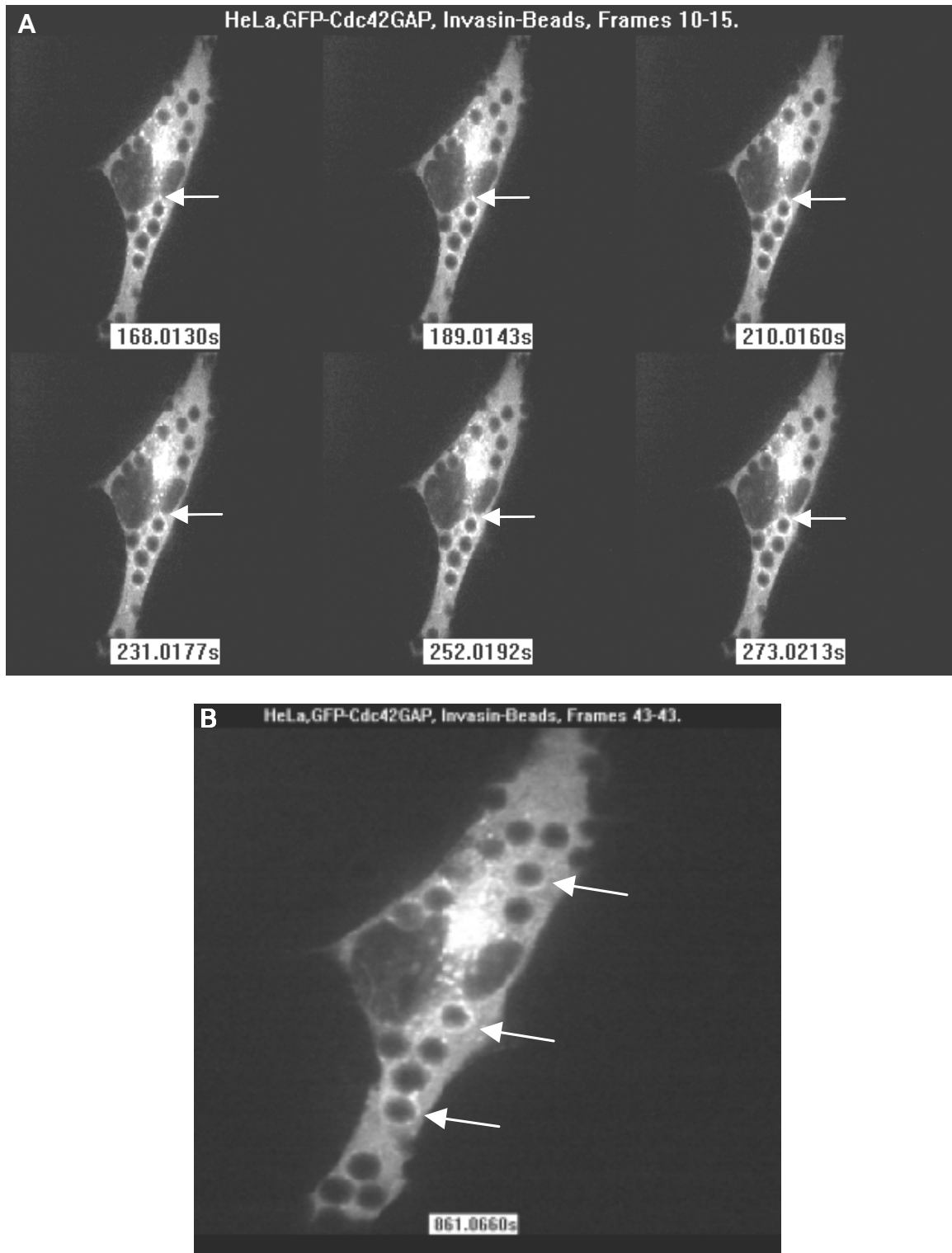


Abb.22: Transiente Anreicherung von GFP-Cdc42GAP um ein Latex-bead enthaltendes Phagosom. Konfokalmikroskopische Aufnahmen GFP-Cdc42GAP exprimierender HeLa-Zellen (A-B), die mit *Y. enterocolitica* Invasin-beschichteten beads inkubiert wurden. (A) umfaßt 6 Einzelbilder des entsprechenden Filmmaterials (vgl. Video-CD, Film 3B), die die Wanderung von GFP-Cdc42GAP-haltigen Vesikeln zu den Invasin-beads (Pfeile) und die Anlagerung einzelner Vesikel um die beads herum verdeutlichen. (B) zeigt in einer weiteren Aufnahme die Anreicherung von Cdc42GAP-positiven Vesikeln als Ring (Pfeile) um die beads.

IV.5. Regulation der Cdc42GAP-positiven Vesikel

IV.5.1. Modulation der Cdc42GAP-haltige Vesikel durch Inhibition des endosomalen Pathways

Wie eingangs beschrieben, sind endozytotische Prozesse hoch regulierte Vorgänge. Makropinozytose läßt sich u.a. durch Inhibition der PI3-Kinase (Araki *et al.*, 1996) oder durch Manipulation des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts hemmen. Auch Phagozytose kann z.B. durch Blockierung der Aktindynamik unterbunden werden (vgl. Einleitung).

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich durch Modulation von Endozytose oder Phagozytose auch die Ausbildung der Cdc42GAP-haltigen Vesikel beeinflussen läßt. Dazu wurden primäre humane Makrophagen ebenso wie J774 Makrophagen folgenden Behandlungen unterzogen:

1) PI3-Kinase wurde entweder irreversibel durch Wortmannin (Arcaro und Wymann, 1993) oder reversibel mittels LY294002 (Vlahos *et al.*, 1994) blockiert. Die inhibitorische Wirkung von Wortmannin, einem Pilzgift aus *Penicillium wortmannii*, resultiert aus der spezifischen Interaktion mit der katalytischen p110 α -Untereinheit des Proteins. In der hier verwendeten Konzentration (100 nM) inhibiert Wortmannin spezifisch Klasse I, II, β und γ und Klasse III Kinasen (aus Datenblatt der Firma Sigma).

Im Gegensatz zu Wortmannin wirkt LY294002, ein synthetischer Hemmstoff, als kompetitiver Inhibitor der ATP-Bindungsstelle der PI3-Kinase. Welche Enzymklasse(n) genau von LY294002 beeinflußt werden, ist aus der Originalarbeit von Vlahos *et al.* (Vlahos *et al.*, 1994) nicht ersichtlich. Es wird jedoch erwähnt, daß z.B. PI4-Kinase durch LY294002 nicht inhibiert wird.

2) Die Dynamik des Aktinzytoskeletts wurde ebenfalls auf zwei unterschiedliche Arten unterbunden. Latrunculin A, ein membrangängiges Toxin aus *Latrunclia magnifica*, interagiert mit G-Aktin und verhindert so die Aktinpolymerisation (Spector *et al.*, 1989). Dagegen induziert Cytochalasin D, ein membrangängiges Toxin aus *Zygosporium mansonii*, 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).

3) Alle Mikrotubuli-abhängigen Transportprozesse wurden durch Nocodazol, einem Mikrotubuli-depolymerisierenden Agens, blockiert (Vasquez *et al.*, 1997).

Nach Zugabe der genannten Inhibitoren in das jeweilige Kulturmedium wurde untersucht, ob sich noch Cdc42GAP-haltige Vesikel bilden und ob diese im Vergleich zu denen in den Kontrollzellen morphologische Unterschiede aufweisen. Unterschiede in der Vesikeldynamik zwischen unbehandelten und Inhibitor-behandelten Zellen wurden in pEGFP-Cdc42GAP transfizierten HeLa-Zellen mit Hilfe des *live cell imaging* untersucht.

Abb.23 zeigt am Beispiel der Zerstörung des Mikrotubuli-Zytoskeletts mit Nocodazol, daß die Induktion der Cdc42GAP-positiven Vesikel nicht beeinträchtigt wird. Gleichzeitig wird aber die Dextranaufnahme vollständig gehemmt, was die Effektivität der Maßnahme anzeigt: Makropinozytose ist Mikrotubuli-abhängig (vgl. Einleitung). Entsprechende Resultate wurden durch Unterbindung der Aktindynamik und durch Inhibition der PI3-Kinase erhalten.

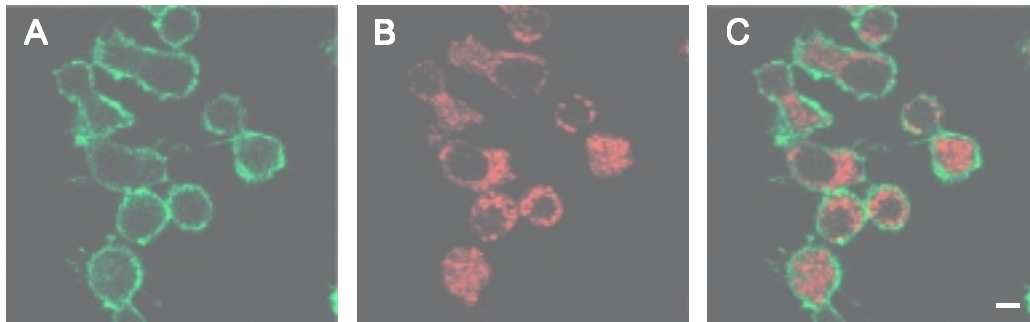


Abb.23: Die Ausbildung der Cdc42GAP-positiven Vesikel ist Mikrotubuli-unabhängig und kann von der Dextran-Aufnahme getrennt werden. Konfokalmikroskopische Aufnahmen Dextran-stimulierter J774-Makrophagen nach Nocodazol-Behandlung (A-C). Die Zellen wurden für 1 h mit Nocodazol inkubiert und anschließend mit FITC-Dextran in Gegenwart des Inhibitors stimuliert. (A) zeigt die Verteilung von FITC-Dextran (Grün), (B) die Cdc42GAP-positiven Vesikel (Rot) und (C) die Überlagerung von (A) und (B). Cdc42GAP wurde mit einem anti-Cdc42GAP Antikörper und TRITC-makiertem sekundären Antikörper detektiert. Weißer Balken in (C): 10 μ m.

Diese Ergebnisse belegen, daß die Bildung der Cdc42GAP-haltigen Vesikel unabhängig von der Aufnahme des Induktors (in diesem Fall FITC-Dextran) ist und ergo von dieser getrennt werden kann. *In vivo*-Untersuchungen mittels *live cell imaging* (aus genannten Gründen in HeLa-Zellen durchgeführt) bestätigen dies, lassen allerdings im Hinblick auf die Dynamik der Cdc42GAP-positiven Vesikel ein differenzierteres Bild entstehen. Die Behandlung der Zellen mit Nocodazol stört die Dynamik der Cdc42GAP-haltigen Vesikel (vgl. Video-CD, Film 1), was zu dem Schluß führt, daß der Transport der Cdc42GAP-positiven Vesikel Mikrotubuli-abhängig vonstatten geht. Inhibition der Aktindynamik oder der PI3-Kinase haben keinen Einfluß auf die Dynamik der Vesikel. Auch Brefeldin A, selbst in vierfach höheren Dosen und zehnfach längeren Inkubationszeiten als in der Literatur angeben, vermag weder die Beweglichkeit noch die Morphologie der Cdc42GAP-haltigen Vesikel zu beeinflussen, wodurch in lebenden Zellen bestätigt wurde, daß die Cdc42GAP-positiven Vesikel mit großer Wahrscheinlichkeit nicht in Transportprozesse vom ER zum Golgi-Apparat involviert sind.

Zusammenfassend ergaben die unter Punkt IV.5.1. aufgeführten Ergebnisse Folgendes:

- (1) Das Entstehen der Cdc42GAP-positiven Vesikel kann von der Aufnahme des zu internalisierenden Materials getrennt werden.
- (2) Der Transport der Cdc42GAP-positiven Vesikel innerhalb der Zelle erfolgt Mikrotubuli-abhängig.

IV.5.2. Modulation der Cdc42GAP-haltigen Vesikel durch die RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42

Da es sich bei dem untersuchten Protein um einen Regulator von RhoGTPasen handelt, wurde im Folgenden untersucht, ob auch die von ihm u.U. regulierten GTPasen in den Prozeß der Vesikelinduktion involviert sein.

Um den Einfluß der drei „klassischen“ RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 auf die Ausbildung der Cdc42GAP-positiven Vesikel zu untersuchen, wurde zunächst festgestellt, ob die Aktivierung der genannten Rho-Proteine ausreicht, um Cdc42GAP-haltige Vesikel zu induzieren. Dazu wurden konstitutiv aktive Mutanten von RhoA (V14RhoA), Rac1 (V12Rac1) und Cdc42 (V12Cdc42) in J774-Makrophagen mikroinjiziert und die Zahl der injizierten Zellen mit Cdc42GAP-haltigen Vesikeln bestimmt.

Alternativ wurden die Makrophagen mit SopE, einem bakteriellen GEF-Protein für Rac1 und Cdc42 aus *Salmonella typhimurium* (Friebel *et al.*, 2001) oder CNF-1 (*cytotoxic necrotizing factor 1*), einem bakteriellen Stimulus der genannten GTPasen aus *E. coli* (Übersicht bei Aktories *et al.*, 2000) behandelt. Die Wirkungsweise von CNF-1 beruht auf der Deamidierung des Aminosäure-Restes Gln63 bei RhoA bzw. Gln 61 bei Rac und Cdc42. Diese Modifikation inhibiert die intrinsische GTPase-Aktivität und führt so zu einer permanenten Aktivierung des jeweiligen Proteins. Die Aktivität der verwendeten Mutanten und Stimuli wurde aufgrund ihrer bekannten Effekte auf das Aktinzytoskelett mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen.

In keinem der genannten Fälle konnte die Bildung von Cdc42GAP-positiven Vesikeln beobachtet werden. Das bedeutet, daß die Aktivierung von RhoA, Rac1 und Cdc42 für die Ausbildung der Cdc42GAP-haltigen Vesikel nicht ausreichend ist.

Es ist bekannt daß konstitutiv inaktive Mutanten von Rac1 und Cdc42 die Aufnahme von Makropinozytosemarkern wie Dextranen hemmen, die Inhibition von RhoA aber keinen Einfluß auf diese Prozesse hat (Garrett *et al.*, 2000). Deshalb wurde in einem Kontrollexperiment untersucht, ob konstitutiv inaktive GTPase-Mutanten in Makrophagen solche Effekte aufweisen. In Tabelle 5 ist zu sehen, daß die Rac1- und Cdc42-Effekte auch im Makrophagensystem bestätigt werden konnten, obwohl unter den gewählten Bedingungen auch RhoA einen Einfluß auf die Makropinozytose hatte. Weiterführend wurden J774-Makrophagen mit GST-Fusionsproteinen konstitutiv inaktiver Mutanten von Rac1 (N17Rac1) oder Cdc42 (N17Cdc42) beziehungsweise C3-Transferase aus *Clostridium botulinum*, einem spezifischen Inhibitor von RhoA, mikroinjiziert. Die inaktivierende Wirkung von C3-Transferase beruht auf der ADP-Ribosylierung von RhoA (Aktories *et al.*, 1992). Nach der Injektion wurden die Zellen mit Dextran stimuliert und der Prozentsatz der injizierten Zellen mit Cdc42GAP-haltigen Vesikeln bestimmt. Durch diesen Ansatz erhält man eine differenzierte Sichtweise über die Rolle der genannten RhoGTPasen hinsichtlich der Ausbildung der Cdc42GAP-haltigen Vesikel.

Tabelle 5 zeigt, daß die Inhibition von Rac1 und Cdc42, nicht aber von RhoA, die Zahl der injizierten Zellen, die nach Dextran-Stimulation Cdc42GAP-haltige Vesikel aufweisen, um bis zu 80% sinkt. Das bedeutet, daß Rac-1 und Cdc42 in die Ausbildung der Cdc42GAP-positiven Vesikel involviert sind.

Dieses Ergebnis warf jedoch die Frage auf, auf welche Weise die beiden GTPasen an der Ausbildung der Cdc42GAP-positiven Vesikel beteiligt sind. Zwei mögliche Funktionen wurden in Betracht gezogen und untersucht. Erstens, Rac1 und Cdc42 sind für die Neubildung Cdc42GAP-haltiger Vesikel verantwortlich oder, zweitens, Rac1 und Cdc42 steuern die Rekrutierung von Cdc42GAP an bereits bestehende Vesikel.

Um diese beiden Möglichkeiten gegeneinander abzugrenzen, wurden die oben genannten Experimente wiederholt und nun mit Hilfe des alternativen Vesikelmarkers

PAK (vgl. Punk IV.3.2.) untersucht, ob und wie sich der Prozentsatz der injizierten Zellen mit PAK-positiven Vesikeln nach Injektion der RhoGTPase-Mutanten ändert. In Tabelle 5 ist deutlich zu sehen, daß wiederum die Inhibition von Rac1 und Cdc42 die Zahl der injizierten Zellen mit PAK-positiven Vesikeln um bis zu 35% reduziert. Dabei ist der Einfluß von Rac-1 auf die Ausbildung der PAK-positiven Vesikel geringer als der von Cdc42. Dies ist überraschend, da PAK als Rac-1-Effektor identifiziert wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, daß konstitutiv inaktives Cdc42 nicht nur Cdc42-vermittelte Effekte, sondern auch durch Eingreifen in der *crosstalk* zwischen den einzelnen GTPasen (Hall, 1998; Matozaki *et al.*, 2000) die Funktion von Rac-1 zumindest teilweise unterbinden kann.

Insgesamt ist jedoch nach Mikroinjektion konstitutiv inaktiver GTPase-Mutanten die Zahl der Zellen mit PAK-haltigen Vesikeln im Vergleich zur Zahl der Zellen mit Cdc42GAP-haltigen Vesikel ungefähr doppelt so groß (Tab.5 und Abb.24). Das könnte ein Hinweis darauf sein, daß Cdc42GAP durch Rac1 und/oder Cdc42 an bereits bestehende Vesikel rekrutiert wird und dieser Effekt auch partiell für die Ausbildung der Vesikel notwendig ist .

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluß, daß Rac1 und Cdc42 für die Bildung von Cdc42GAP-Vesikeln und/oder die Rekrutierung von Cdc42GAP an bereits bestehende Vesikel verantwortlich sind. Mit den uns gegebenen technischen Mitteln ist es jedoch nicht möglich, diese beiden Varianten genauer gegeneinander abzugrenzen.

Die Zahlenwerte der Zellen mit Cdc42GAP- bzw. PAK-positiven Vesikeln sind zur besseren Übersicht in Abb.24 noch einmal als Säulendiagramm dargestellt.

Die Beteiligung von RhoGTPasen an der Regulation Cdc42GAP-positiver Vesikel stellt sich wie folgt dar:

- (1) Rac-1 und Cdc42 sind für die Bildung von Cdc42GAP-positiven Vesikeln und/oder die Rekrutierung des Proteins an Vesikel notwendig, aber nicht hinreichend.
- (2) RhoA hat keinen Einfluß auf die Entstehung der Cdc42GAP-haltigen Vesikel.

Injiziertes Protein	Zellen mit Cdc42GAP-Vesikeln	Zellen mit PAK-Vesikeln	Zellen mit Dextran-Vesikeln
GST-Kontrolle	100 % ± 7 %	100 % ± 6 %	100% ± 2 %
GST-N17Cdc42	24 % ± 5 %	65 % ± 13 %	36 % ± 2 %
GST-N17Rac1	41 % ± 7 %	79 % ± 12 %	39 % ± 0,5 %
GST-C3-Transferase	95 % ± 20 %	100 % ± 3 %	30 % ± 12 %

Tab. 5: Effekte der dominant hemmenden GTPasen bzw. des RhoA-Inhibitors C3-Transferase auf die Ausbildung der durch die angezeigten Marker definierten Vesikel. Für jeden Wert wurden je 30 injizierte Zellen aus drei verschiedenen Experimenten ausgezählt (n=3). Der Mittelwert ± Standardabweichung ist angegeben.

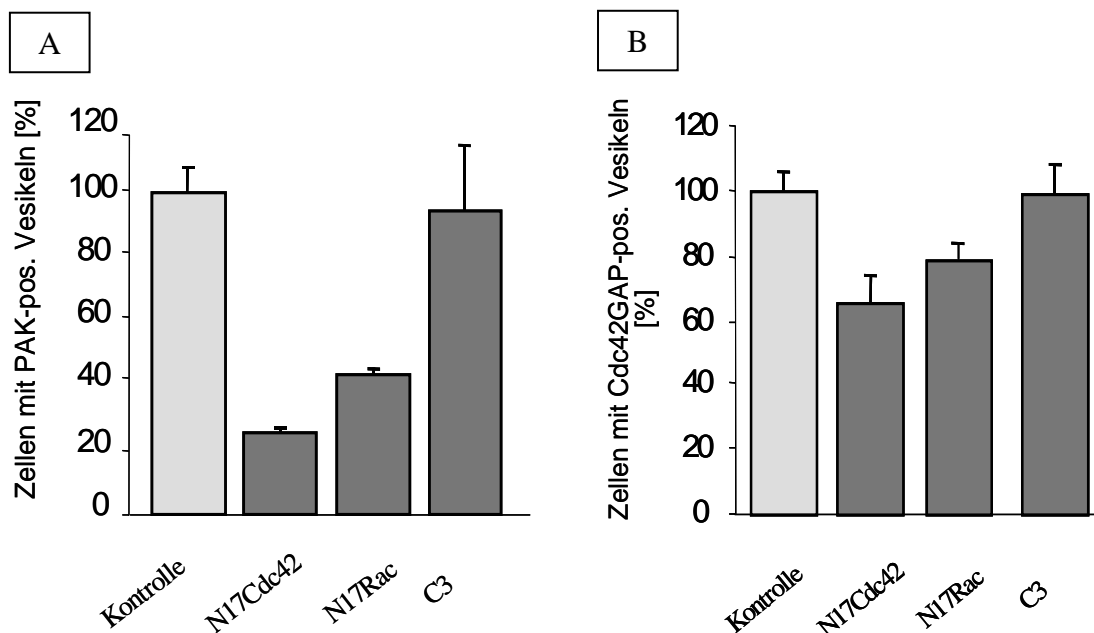


Abb.24: Schematische Darstellung der Zahlenwerte in Tab.5. Gezeigt ist eine Übersicht über die Effekte der Mikroinjektion dominant hemmender Mutanten von Rac1 und Cdc42 bzw. des RhoA-Inhibitors C3-Transferase auf die Ausbildung Cdc42GAP-haltiger Vesikel (A) und PAK-positiver Vesikel (B) in J774-Makrophagen. Auf der Abszisse sind die injizierten Proteine aufgetragen, die Ordinate beschreibt die Anzahl der injizierten Zellen mit Cdc42GAP- bzw. PAK-positiven Vesikeln. Für jeden Wert wurden je 30 injizierte Zellen in drei verschiedenen Experimenten gezählt (n=3). Jeder Balken stellt den Mittelwert ± Standardabweichung dar.

IV.6.Funktionsanalyse von Cdc42GAP

IV.6.1. Die Poly-Prolin-Domäne ist am Vesikel-Targeting beteiligt

Cdc42GAP ist ein Multidomänenprotein, das zwei bekannte Protein-Protein-Interaktionsdomänen aufweist: eine zur Sec14-Domäne homologe Region namens BCH (*BNIP2 and Cdc42GAP homology domain*) und eine PolyProlin-Domäne. Für die Inaktivierung einer möglichen Ziel-GTPase spielt die katalytische GAP-Domäne eine entscheidende Rolle. Essentiell für die Funktionsfähigkeit dieser Domäne ist vor allem ein konservierter Arg-Rest an Position 282 der Aminosäure-Sequenz (zusammen mit dem Arg-Rest an Position 283).

Um die mögliche *Targeting*-Domäne ausfindig zu machen und um zu analysieren, ob die GAP-Aktivität *per se* für das Vesikel-Targeting notwendig ist, wurden unterschiedliche Mutanten von Cdc42GAP als GFP-Fusionsproteine konstruiert. Abb.25 zeigt eine Übersicht über die einzelnen Konstrukte, Abb.26 die Lokalisation der jeweiligen GFP-Fusionsproteine.

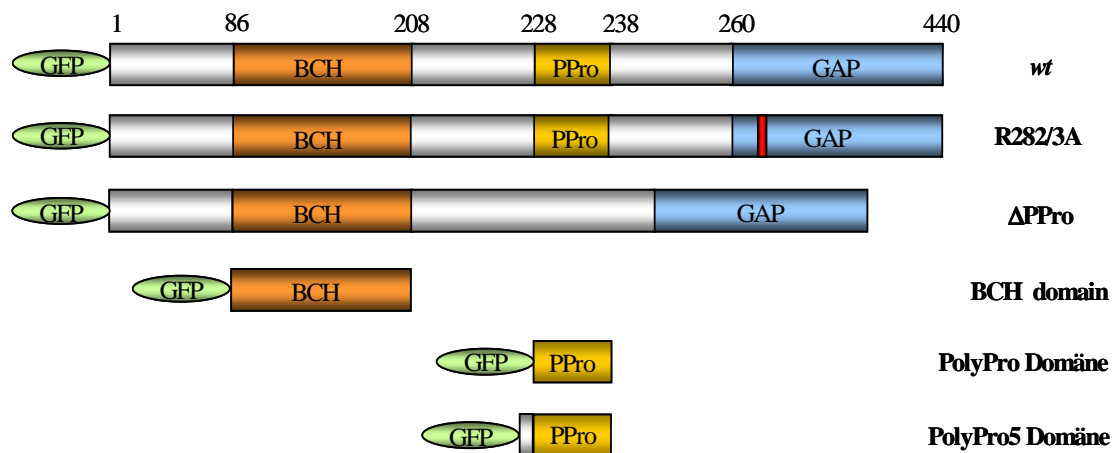


Abb.25: Schematische Darstellung der intrazellulär exprimierten GFP-Fusionsproteine von Cdc42GAP. GFP: *green fluorescent protein*, GAP: GTPase-aktivierende Domäne (katalytische Domäne), R282/3A: Austausch von Arg an den Positionen 282 und 283 zu Ala, ΔPPro: Poly-Prolin-Deletionsmutante, BCH: *BNIP-2 and Cdc42GAP homology domain*, PPro: Poly-Prolin-Domäne, PolyPro5: Poly-Prolin-Domäne plus fünf N-terminal davon gelegene Aminosäuren, *wt*: *wildtype* (Wildtyp).

Das Konstrukt PPro5-GFP beinhaltet zusätzlich zu der isolierten Poly-Prolin-Domäne noch fünf N-terminal liegende Aminosäuren. Dadurch sollte vermieden werden, daß die Nähe zum GFP eine korrekte Faltung der isolierten Domäne verhindert. Die GFP-Konstrukte wurden in J774-Makrophagen transfiziert und auf ihre Fähigkeit hin untersucht, mit Dextran Vesikel auszubilden zu kolokalisieren. Als Kontrolle diente pEGFP-Cdc42GAP_{wt} (vgl. Abb.11).

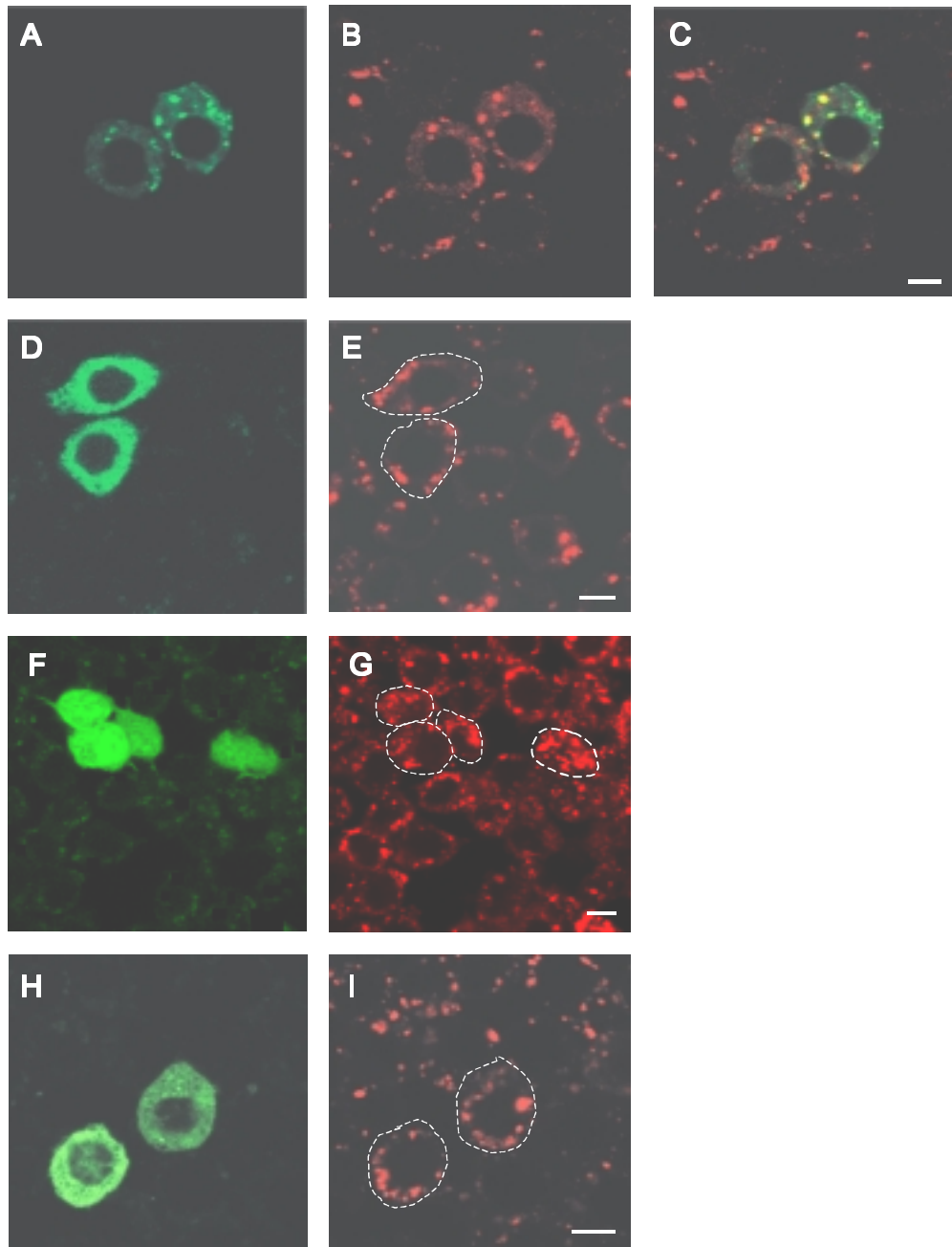


Abb.26: Die Poly-Prolin-Region aber nicht die GAP-Aktivität von Cdc42GAP ist für die Lokalisation an Vesikel notwendig. Konfokalmikroskopische Aufnahmen verschiedener GFP-Cdc42GAP-Mutanten exprimierender J774-Makrophagen (A-I). Die Zellen wurden mit pEGFP-R282/3A (A-C), pEGFP- Δ PPro (D, E), pEGFP-PPro (F, G) und pEGFP-BCH (H, I) transfiziert. Die Verteilung der jeweiligen Konstrukte ist in Grün (A, D, F, H), die durch TRITC-Dextran gefärbten pinozytotischen Vesikel in Rot (B, E, G, I) dargestellt. Die gelbe Farbe in (C) zeigt die Kolo-kalisation von GFP-R282/3A (A) und TRITC-Dextran (B). Die in (D, F, H) grün dargestellten transfizierten Zellen sind in der TRITC-Dextran-Darstellung in (E, G, I) weiß umrandet. Weißer Balken in (C, E, G, I): 10 μ m.

Die Ergebnisse in Abb.26 zeigen Folgendes:

1. Die GAP-Aktivität *per se* ist für die Lokalisation von Cdc42GAP an Vesikel nicht notwendig.
2. Die Poly-Prolin-Region ist für die Lokalisation von Cdc42GAP an Vesikel notwendig.
3. Weder die BCH- noch die Poly-Prolin-Domäne allein kann an Vesikel lokalisieren.

Da hinsichtlich der Lokalisation kein Unterschied zwischen GFP-PPro und GFP-PPro5 zu erkennen war, ist die Verteilung von GFP-PPro5 in Abb.26 nicht aufgeführt. Identisch wie für TRITC-Dextran gezeigt, verhält sich Verteilung von Cdc42GAP_{wt} und der einzelnen Mutanten im Hinblick auf die Kolokalisation mit LYTr-positiven Vesikeln. Auch hier zeigt sich die Kolokalisation nur zwischen dem *wt*-Protein bzw. der R282/3A-Mutante und den LYTr-positiven Vesikeln. Alle anderen Proteine (Δ PPro-GFP, PPro-GFP, PPro5-GFP und BCH-GFP) sind nicht in der Lage, an Vesikel zu lokalisieren.

Hinzuzufügen ist, daß die Inkubation der Zellen mit LYTr zur Markierung saurer Kompartimente nicht zur Ausbildung Cdc42GAP_{wt}- bzw. Cdc42GAP-R282/3A-positiver Vesikel führt. Diese Vesikel entstehen erst nach Stimulation der Zellen mit Dextran, was für alle oben beschriebenen Experimente geschehen ist.

IV.6.2. Einfluß von Cdc42GAP und seinen Mutanten auf die Bildung Dextran-haltiger und PAK-positiver Vesikel

Um die Rolle von Cdc42GAP für die Ausbildung der in dieser Arbeit beschriebenen, v.a. durch die Anwesenheit von Cdc42GAP definierten Vesikel zu untersuchen, wurden die in Abb. 27 dargestellten Cdc42GAP-Konstrukte in J774-Makrophagen injiziert und ihr Einfluß auf die Bildung TRITC-Dextran-enthaltender Vesikel und (als alternativen Vesikelmarker) PAK-positiven Vesikel bestimmt.

Cdc42GAP-R282/3A konnte die Bildung der Dextran-positiven Vesikel deutlich reduzieren. Ähnliche und teilweise noch stärkere Hemmeffekte wurden durch Mikroinjektion der BCH-, PPro- und Δ PPro-Domänen erreicht. Die Ausbildung PAK-positiver Vesikel wurde überraschenderweise weder durch Cdc42GAP_{wt} noch durch Cdc42GAP-R282/3A gehemmt, wohingegen leichte Hemmeffekte durch die PPro- und Δ PPro-Domäne erkennbar waren.

Diese Ergebnisse sind mit einer Hemmung der lysosomalen, Cdc42GAP-positiven Vesikel durch Cdc42GAP-Überexpression vereinbar. Die sehr starke Unterdrückung der Dextran-positiven Vesikel ist aber wahrscheinlich mitverursacht durch die Inaktivierung der für die Dextranaufnahme verantwortlichen RhoGTPasen Rac1 und Cdc42, wie unter Punkt IV.5.2. gezeigt.

Die Darstellung der Ergebnisse aus Tab.6 als Balkendiagramm in Abb.28 zeigt übersichtlich, daß die Dextran-Aufnahme nach Injektion mit Cdc42GAP-*wt* deutlich gehemmt wird, wohingegen die GAP-inaktive Mutante keinen signifikanten Einfluß hat.

Die Injektion der BCH-Domäne hat im Vergleich zur Poly-Prolin-Domäne nur einen leicht hemmenden Effekt hinsichtlich der Dextran-Aufnahme.

ERGEBNISSE

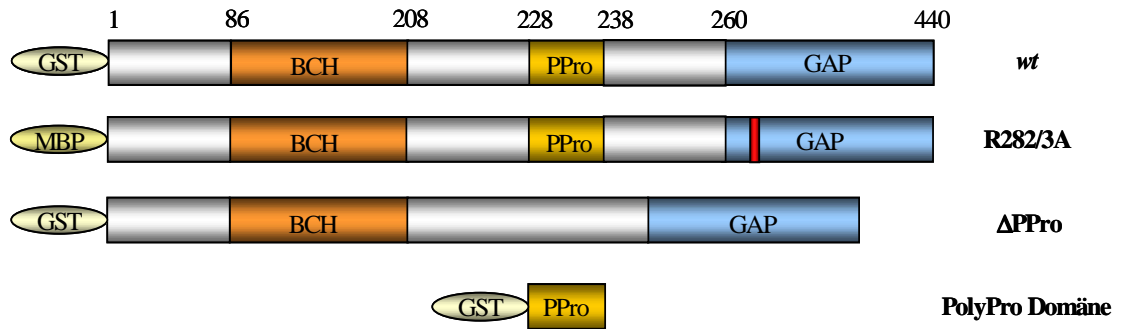


Abb.27: Schematische Darstellung der verwendeten GST- bzw. MBP-Fusionsproteine von Cdc42GAP. GST: Glutathion-S-Transferase, MBP: Maltose-binding protein, GAP: GTPase-aktivierende Domäne (katalytische Domäne), R282/3A: Austausch von Arg an den Positionen 282 und 283 zu Ala, ΔPPro: Poly-Prolin-Deletionsmutante, BCH: *BNIP-2 and Cdc42GAP homology domain*, PPro: Poly-Prolin-Domäne, PolyPro5: Poly-Prolin-Domäne plus fünf N-terminal davon gelegene Aminosäuren, *wt*: *wildtype* (Wildtyp).

Injiziertes Protein	Zellen mit Dextran-Vesikeln	Zellen mit PAK-Vesikeln
GST-Kontrolle	100 % ± 2 %	100 % ± 6 %
GST-Cdc42GAP _{wt}	57 % ± 4 %	100 % ± 4 %
GST-BCH	75 % ± 8 %	n.b.
GST-PPro	34 % ± 2 %	76 % ± 20 %
GST-ΔPPro	43 % ± 8 %	81 % ± 4 %
MBP-Kontrolle	100 % ± 9 %	100 % ± 6 %
MBP-R282/3A	91 % ± 7 %	111 % ± 11 %

Tab.6: Effekte der Injektion verschiedener GST- bzw. MBP-Cdc42GAP-Mutanten auf die Ausbildung von Dextran-, PAK- und LysoTracker-positiven Vesikeln in J774-Makrophagen. Für jeden Wert wurden je 30 injizierte Zellen in drei unterschiedlichen Experimenten gezählt (n=3). Der Mittelwert ± Standardabweichung ist angegeben. „n.b.“: nicht bestimmt.

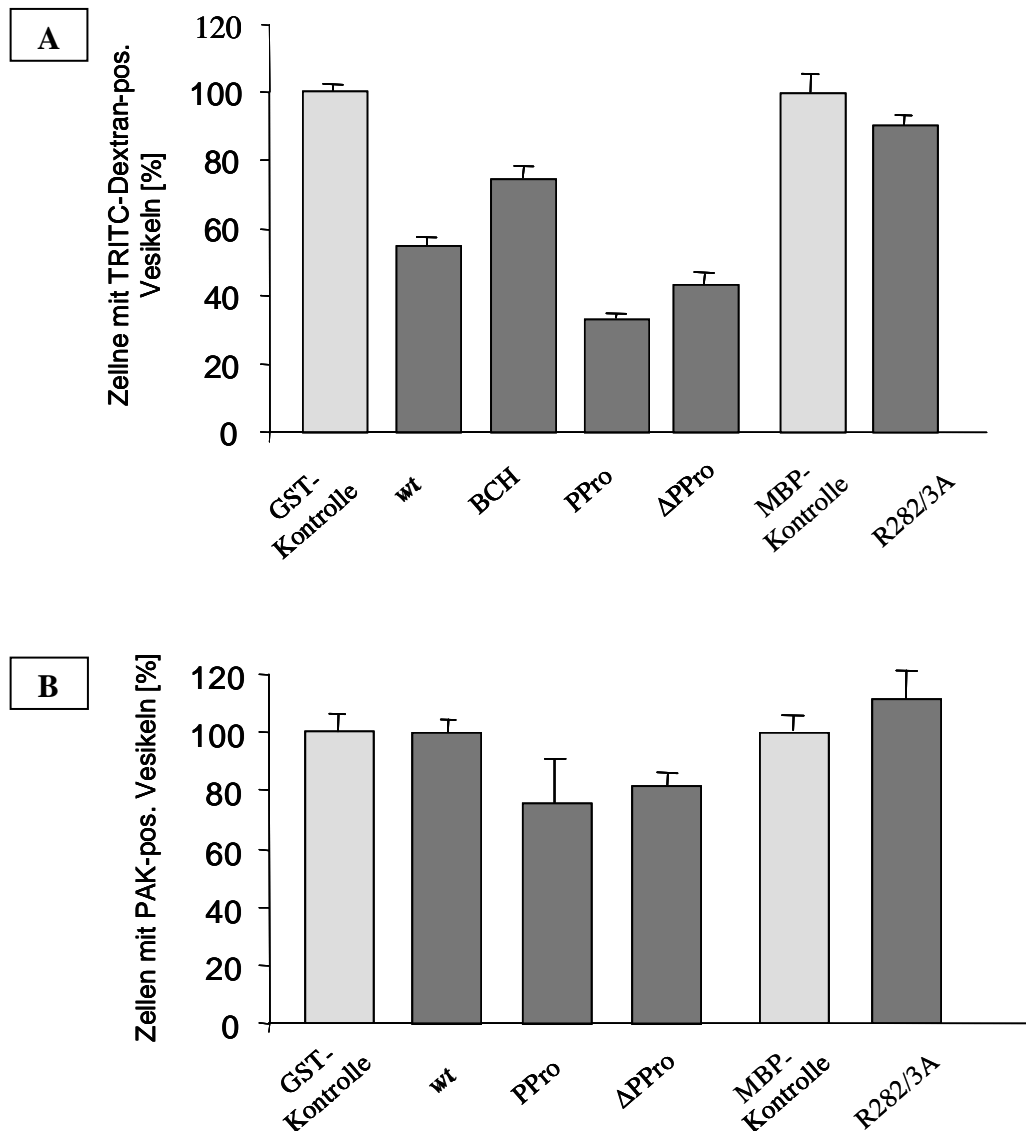


Abb.28: Balkendiagrammdarstellung der Werte in Tab.6. Gezeigt sind die Effekte der Mikroinjektion unterschiedlicher GST- bzw. MBP-Cdc42GAP-Mutanten und des *wt*-Proteins auf die Ausbildung **(A)** TRITC-Dextran-markierter, pinozytotischer Vesikel bzw. **(B)** PAK-positiver Vesikel nach Dextran-Stimulation in J774-Makrophagen. Die Makrophagen wurden nach der Injektion entweder für 1 h mit TRITC-Dextran oder zur Induktion der PAK-Vesikel mit *Cascade Blue*-Dextran inkubiert. TRITC-Dextran konnte direkt nachgewiesen werden, PAK wurde durch einen anti-PAK-Antikörper und TRITC-markiertem sekundären 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.

IV.6.3. *Knockdown* von Cdc42GAP in J774-Makrophagen

Eine Alternative zur Ermittlung der Funktion eines Proteins stellt der *knockout* bzw. *knockdown* der entsprechenden DNA bzw. mRNA dar. Als eine elegante Methode erweist sich dabei das sogenannte *RNA interference* (RNAi, Übersicht bei Hammond *et al.*, 2001). RNAi beruht darauf, daß mittels kurzer RNA-Moleküle (*small interfering RNAs*, siRNAs) die Expression eines Zielproteins durch induzierte Degradation der entsprechenden mRNA minimiert werden kann (Übersicht bei Tuschl, 2001; Hannon, 2002; Tijsterman *et al.*, 2002). Dies kommt einer vollständigen Ausschaltung des jeweiligen Proteins sehr nahe und man spricht in diesem Zusammenhang von *knockdown* statt von *knockout*. Das Einbringen der kurzen RNA-Moleküle kann u.a. durch Transfektion eines Vektors geschehen, dessen Primärtranskript die Aufgabe eines siRNA-Moleküls übernehmen kann. Ein solcher Vektor wurde von Brummelkamp *et al.* entwickelt (Brummelkamp *et al.*, 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieser Vektor benutzt, um drei unterschiedliche *Target*-Plasmide (T_V, T_M und T_H) zu konstruieren. Diese wurden dann auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Expression von Cdc42GAP zu unterdrücken.

Wie bereits unter Punkt III.1.6. erläutert, mußten die Plasmide T_V, T_M und T_H, die für die RNAi-Experimente in J774-Maus-Makrophagen konstruiert wurden, in HeLa-Zellen analysiert werden, da die Transfektionseffizienz von J774-Makrophagen für *Western Blot*-Analysen zu gering ist. Ein Vektor für murines pEGFP-Cdc42GAP wurde mit den *Target*-Plasmiden kotransfiziert, um das murine vom endogenen Cdc42GAP der HeLa-Zellen unterscheiden zu können. mmGAP steht dabei als Abkürzung für *mus musculus* Cdc42GAP.

Abb.29 zeigt, daß 24 h nach Transfektion die Expression des murinen Cdc42GAP, detektiert über den GFP-Anteil des Fusionsproteins, bei allen drei *Target*-Plasmiden im Vergleich zur Kontrolle ohne transfiziertes *Target*-Plasmid deutlich abnimmt. Dabei war die Expressionsreduktion am deutlichsten bei T_H. Das bedeutete, daß T_H als effektives *Target*-Plasmid gegen murines Cdc42GAP eingesetzt werden kann.

Auf Einzelzellebene wurde in einem ersten Ansatz die Effektivität des eingesetzten *Target*-Plasmids in den Zielzellen (J774-Makrophagen) untersucht. Dazu wurden die Zellen mit T_H und pEGFP-C1 als Transfektionsmarker kotransfiziert und die Bildung von Cdc42GAP-positiven Vesikeln mittels anti-Cdc42GAP Antikörper in fixierten Zellen untersucht. In Abb.30 ist zu sehen, daß die transfizierten Zellen nach Induktion keine Cdc42GAP-positiven Vesikel mehr aufwiesen, wohingegen alle nicht-transfizierten Zellen deutliche Cdc42GAP-haltige Vesikel zeigten. In Zellen, die nur mit Leervektor transfiziert waren, konnte keine Reduktion der Cdc42GAP-haltigen Vesikel nach Stimulation mit Dextran festgestellt werden (vgl. Tab.7).

Das bedeutet, daß die Reduktion der Cdc42GAP-positiven Vesikeln alleine auf das Vorhandensein von T_H in den transfizierten Zellen zurückzuführen ist. Zu erwähnen ist hier, daß die Zeitspanne zwischen Transfektion und zu beobachtendem Effekt sehr viel größer ist als in den HeLa-Zellen (4 Tage versus 24 Stunden in HeLa). Dies ist möglicherweise auf einen geringeren *turnover* des Cdc42GAP-Proteins in J774-Makrophagen zurückzuführen.

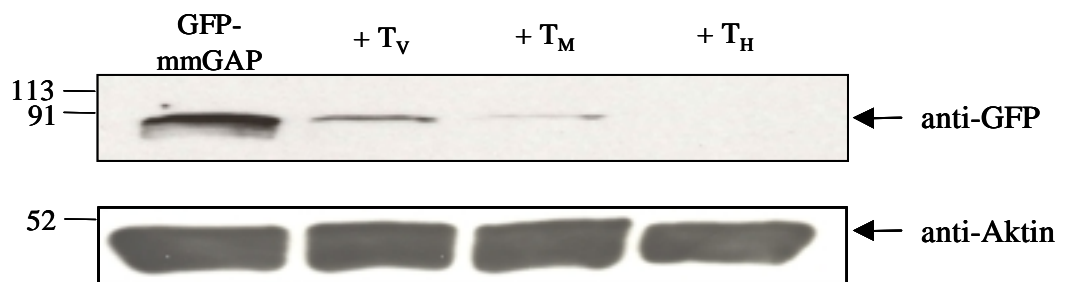


Abb.29: Reduktion von in HeLa-Zellen exprimiertem murinem GFP-Cdc42GAP mittels RNAi-Technik. HeLa-Zellen wurden mit pEGFP-mmGAP (Spur 1) oder pEGFP-mmGAP plus eines der angegebenen *Target*-Plasmide (T_V, T_M oder T_H; Spur 2-4) transfiziert und nach 24 h lysiert. In allen vier Spuren wurden gleiche Proteinmengen auf ein 12,5 % SDS-Gel geladen. Die Expression von GFP-mmGAP wurde mit anti-GFP-Antikörper nachgewiesen. Der obere Teil der Abbildung zeigt die durch die unterschiedlichen *Target*-Plasmide hervorgerufene Reduktion der Expression des GFP-Fusionsproteins des murinen Cdc42GAP. GFP-mmGAP dient dabei als Kontrolle ohne transfiziertes *Target*-Plasmid. Der untere Teil der Abbildung zeigt anhand der Detektion von Aktin mittels anti-Aktin-Antikörper, daß in allen Spuren gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden. Dies untermauert, daß die Reduktion der Expression des murinen GFP-Cdc42GAP durch die kotransfizierten *Target*-Plasmide hervorgerufen wurde. mmGAP steht als Abkürzung für *mus musculus* Cdc42GAP.

Zeit nach Transfektion	Zellen mit CDC42GAP-haltigen Vesikeln	
	Kontrolle	mit Target-Plasmid
4 Tage	71 %	76 %
5 Tage	91 %	29 %

Tab.7: Effekte des *knockdown* von Cdc42GAP in J774 Makrophagen mittels RNAi-Technik. Als Kontrolle diente die Transfektion mit pEGFP-C1-Leervektor. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen auf das Auftreten Cdc42GAP-haltiger Vesikeln nach Dextran-Stimulation untersucht.

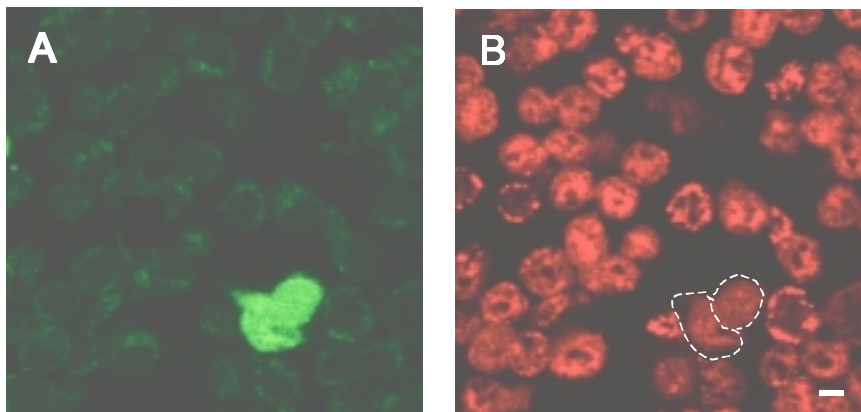


Abb.30: Der *knockdown* von Cdc42GAP führt zum Verlust der Cdc42GAP-positiven Vesikel in J774-Makrophagen. Konfokalmikroskopische Aufnahmen transfizierter J774 Makrophagen (A-B). Die Zellen wurden mit T_H und pEGFP-C1 (A, Grün) als Transfektionsmarker kontransfiziert. Nach 5 Tagen wurde die Cdc42GAP (B, Rot) mit anti-Cdc42GAP Antikörper und TRITC-markiertem sekundären Antikörper in Dextran-stimulierten Zellen nachgewiesen. Die in (A) grün dargestellten, transfizierten Zellen sind in der Cdc42GAP-Färbung (B) weiß umrandet. Weißer Balken in (B): 10 µm.

Durch diese Resultate war der Nachweis erbracht, daß die Methode des RNAi auch auf Einzelzellebene in Makrophagen zum Ausschalten von Cdc42GAP funktioniert. Diese Methode soll zukünftig angewandt werden, um die Funktion von Cdc42GAP auf Einzelzellebene weiter zu untersuchen.

V. DISKUSSION

V.1. Intrazelluläre Lokalisation von Cdc42GAP

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die subzelluläre Verteilung des GTPase-aktivierenden Proteins Cdc42GAP in fixierten und in lebenden Zellen charakterisiert. Es stellte sich heraus, daß dieses Protein in Makrophagen in Abhängigkeit von deren Aktivierungszustand seine Lokalisation ändert. Immunfluoreszenzfärbungen gaben Aufschluß darüber, daß Cdc42GAP in ruhenden Makrophagen diffus in der Zelle verteilt ist, während es in Zellen mit migratorischem Phänotyp in oder an vesikuläre Strukturen rekrutiert wird.

In Makrophagen muß die Akkumulation des Cdc42GAP-Proteins an vesikuläre Strukturen durch Stimuli induziert werden. Die Induktion erfolgt dabei v.a. durch migratorische Stimuli, die im zellulären Kontext das Signal zum Einwandern der Makrophagen ins Gewebe oder zur Phagozytose bedeuten. Dazu zählen bakterielle Komponenten wie fMLF oder LPS, ebenso wie makropinozytisches Material, z.B. Dextrane. Sofern Induktoren verwendet wurden, anhand derer der endozytotische Weg verfolgt werden konnte (wie z.B. fluoreszenzmarkierte Dextrane), war eine deutliche Kolo-kalisation von Cdc42GAP und dem internalisierten Material in endo-lysosomalen Vesikeln zu beobachten.

Um zu analysieren, ob Cdc42GAP-positive Vesikel auch in anderen Zellsystemen zu finden sind, wurden HeLa und HUVEC untersucht. Im Gegensatz zu den Makrophagen konnten Cdc42GAP-Vesikel in beiden Zelltypen bereits im unbehandelten Zustand nachgewiesen werden. Diese Vesikel sind von der Morphologie deutlich kleiner als die bei Makrophagen gefundenen. Nach Phagozytose von *Staphylococcus aureus* bzw. *Yersinia enterocolitica* Invasin-beschichteten *Beads* war eine deutliche Akkumulation von Cdc42GAP um das internalisierte Material zu beobachten. Diese Untersuchungen zeigten, daß Cdc42GAP-positive Vesikel nicht auf Monozyten/Makrophagen beschränkt sind, sondern auch in anderen Zellsystemen auftreten können. Die Primärverteilung von Cdc42GAP könnte von Zelltyp zu Zelltyp verschieden sein und in dieser Hinsicht sind professionelle Phagozyten (wie z.B. Makrophagen) deutlich von anderen Zellen unterscheidbar.

Pharmakologische Eingriffe in den Endozytoseweg belegten, daß die Ausbildung Cdc42GAP-positiver Vesikel von der Aufnahme des Induktors in die Zelle getrennt werden kann. Während durch Zerstörung des Aktin- bzw. Mikrotubulizytoskeletts oder Inhibition der PI3-Kinase die Phagozytose/Endozytose des extrazellulären Materials unterbunden wurde, blieb die Bildung der Cdc42GAP-haltigen Vesikel davon unbeeinflusst (vgl. Abb.23). Dies war ein sehr überraschendes Resultat, da die Entstehung „klassischer“ endosomaler Kompartimente wie z.B. Endosomen oder Makropinosomen von Aktin (Swanson, 1989; Racoosin und Swanson, 1989) bzw. PI3-Kinase (Amyere *et al.*, 2000) abhängig ist.

Obwohl in ruhenden Makrophagen mit Hilfe der Immunfluoreszenz keine spezifische Cdc42GAP-Struktur erkennbar war, zeigten Fraktionierungsexperimente, daß Cdc42GAP dort vorwiegend in Membranfraktionen mit hoher lysosomaler Aktivität zu finden ist. Eine Erklärung für dieses Resultat ist möglicherweise im limitierten optischen Auflösungsvermögen der Fluoreszenzmikroskope oder dem Verlust von Strukturen durch Fixierung und Permeabilisierung zu sehen. Die bereits in unstimulierten Zellen vorhandenen Cdc42GAP-positiven Membranstrukturen sind zu klein, um mit den zu Verfügung stehenden optischen Hilfsmitteln detektiert zu werden.

V.2. Charakterisierung der Cdc42GAP-positiven Vesikel

Die hier beschriebenen Vesikel repräsentieren zwar ein in vielen Zellsystemen vorkommendes Kompartiment des endozytotischen Weges, lokalisieren aber nicht mit „klassischen“ Endosomenmarkern.

So konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung gezeigt werden, daß Cdc42GAP-positive Vesikel nicht mit Markern für frühe oder späte Endosomen, *recycling*-Endosomen, Lysosomen, dem Golgi-Apparat oder dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) überlagern. Desweiteren konnte keine Kolo-kalisation der Cdc42GAP-positiven Vesikel mit Clathrin-beschichteten Vesikeln oder Caveolae nachgewiesen werden.

Da Cdc42GAP-positive Vesikel erst 40-60 min nach Zugabe von endozytotischen Markern wie z.B. fluoreszenzmarkierte Dextrane mit diesen kolo-kalisiert, wurde die These aufgestellt, daß es sich bei den vorliegenden Vesikeln um späte endosomale bzw. lysosomale Kompartimente handelt. Mit Hilfe von LysoTracker, einem basischen Amin, welches in lebenden Zellen spezifisch saure Kompartimente färbt, und durch Zellfraktionierungsexperimente (Percoll-Dichtegradient) war es möglich, die Cdc42GAP-haltigen Vesikel näher zu charakterisieren. Es kristallisierte sich dabei heraus, daß Cdc42GAP-positive Vesikel wahrscheinlich ein Lysosomen-ähnliches Kompartiment darstellen, welches mit dem „typischen“, lamp-1-positiven Lysosom nicht identisch ist. Demzufolge stellen Cdc42GAP-positive Vesikel nach dem bisherigen Kenntnisstand ein bisher nicht beschriebenes endo-lysosomales Kompartiment dar, welches mit anderen Endosomen, z.B. Makropinosomen, in Kontakt treten kann.

Spricht man von lysosomaler Verteilung eines bestimmten Proteins, ist zu bedenken, daß ein Lysosom mit definierter Zusammensetzung und Funktion insbesondere in Phagozyten nicht existiert, sondern aus vielen verschiedenen lysosomalen Strukturen unterschiedlicher Zusammensetzung besteht (Claus *et al.*, 1998). Deshalb ist es nicht verwunderlich, daß Cdc42GAP-haltige Vesikel auch eine Unterart der Lysosomen sind.

Eine kürzlich erschienene Übersichtsarbeit zur Antigenpräsentation in dendritischen Zellen zeigt, daß in diesen Zellen Peptid-beladene MHC II-Moleküle in ein saures, sogenanntes „tubulär-vesikuläres“ Membran-Netzwerk mit hoher Protease-Aktivität gelangen, welches dafür sorgt, daß die beladenen MHC II-Moleküle zur Oberfläche der Zelle transportiert werden. Ob dieser letzte Transportschritt direkt durch Fusion des angesprochenen Kompartiments mit der Plasmamembran bewerkstelligt wird oder ob noch ein zusätzlicher, durch sogenannte Klasse II-Vesikel-vermittelter Schritt notwendig ist, ist noch unklar (Gatti und Pierre, 2003). Klasse II-Vesikel wurden erstmals in B-Zellen gefunden (Amigorena *et al.*, 1994) und tragen keine typischen lysosomalen Marker. Sie entstammen aber einem sauren Kompartiment, das möglicherweise dem angesprochenen „tubulär-vesikulären“-Netzwerk entspricht (Pierre *et al.*, 1997). Man könnte nun spekulieren, daß Cdc42GAP-positive Vesikel die Rolle dieser Klasse II-Vesikel und damit eine Funktion im Rahmen der Antigenpräsentation übernehmen, da sie wie beschrieben ebenfalls einen sauren pH-Wert besitzen, aber keine typischen Lysosomenmarker tragen. Ob dieser Zusammenhang wirklich existiert, bleibt Gegenstand zukünftiger Forschungen.

V.3. Dynamik der Cdc42GAP-positiven Vesikel

Konfokalmikroskopische Analysen lebender Zellen zeigten, daß Cdc42GAP-positiven Vesikel sehr motile Strukturen sind, die sich mit hoher Geschwindigkeit durch die Zelle bewegen.

Es stellte sich nun die Frage, ob sich die Vesikel mit Hilfe von Aktinschweiften durch die Zelle bewegen, wie dies auch bei einigen Pathogenen (z.B. *Listeria monocytogenes* oder *Shigella flexneri*) der Fall ist oder ob der Transport entlang von Mikrotubuli erfolgt.

Die Bildung von Aktinschweiften an den Cdc42GAP-Vesikeln konnte zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden (Schell *et al.*, Daten nicht gezeigt). Desweiteren hatte die Unterbindung der Aktindynamik durch Latrunculin A keinen Einfluß auf die Bewegung der Cdc42GAP-haltigen Vesikel.

Nachdem die Aktin-abhängige Bewegung der Cdc42GAP-positiven Vesikel ausgeschlossen werden konnte, wurde der Einfluß des Mikrotubulizytoskeletts auf die Beweglichkeit der Cdc42GAP-Vesikel untersucht. Die Zerstörung der Mikrotubuli durch Nocodazol führte dazu, daß die Dynamik der Cdc42GAP-haltigen Vesikel in den behandelten Zellen vollständig unterbunden wurde. Dies zeigt, daß der Transport von Cdc42GAP-positiven Vesikeln entlang von Mikrotubuli erfolgt.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob PI3-Kinase einen Einfluß auf die Motilität der Cdc42GAP-Vesikel hat oder ob Cdc42GAP-Vesikel in den ER→Golgi-Transport involviert sind. Die Aktivität der PI3-Kinase wurde durch Wortmannin inhibiert, der ER→Golgi-Transport durch Brefeldin A (BFA). In beiden Fällen konnte kein Einfluß auf die Motilität der Cdc42GAP-Vesikel festgestellt werden.

Mit Hilfe des *live cell imaging* war es möglich, einige *in vitro*-Resultate zu präzisieren. So wurde nachgewiesen, daß die beobachtete Kolo-kalisation zwischen Cdc42GAP und den durch das internalisierte Dextran markierten pinozytotischen Vesikeln bzw. den LysoTracker-positiven sauren Kompartimenten nicht permanent, sondern nur kurzzeitig gegeben ist. Die Experimente in lebenden Zellen deuten an, daß der Kontakt zwischen den Cdc42GAP-haltigen Vesikeln und den Dextran- bzw. LysoTracker-positiven Vesikeln durch einen sogenannten „*kiss-and-run*“-Mechanismus (Übersicht bei Schneider, 2001) zustande kommt. Die Diskrepanz zwischen den *in vitro*- und den in lebenden Zellen gewonnenen Daten kann darin begründet sein, daß durch die für die Immunfluoreszenz notwendigen Fixierungs- und Permeabilisierungsschritte die kurzzeitigen Kontakte zwischen Cdc42GAP und den angesprochenen Vesikeln nicht mehr in dieser Form aufrechterhalten werden können. Stattdessen kollabieren Cdc42GAP-haltige Vesikel und Dextran- bzw. LysoTracker-positive Vesikel in einem Kompartiment, so daß aus der partiellen eine vollständige Überlagerung wird.

V.4. Rekrutierung von Cdc42GAP an saure Vesikel

V.4.1. Beteiligung unterschiedlicher Cdc42GAP-Domänen

Die Transfektion des Wildtyp-Proteins und einiger Mutanten von Cdc42GAP in J774-Makrophagen gaben erste Hinweise auf die zur Rekrutierung an saure Vesikel benötigten Domänen.

Die GAP-inaktive Mutante lokalisierte nach Dextranstimulation noch an (saure) vesikuläre Strukturen. Das bedeutet, daß die katalytische GAP-Funktion für die Rekrutierung (das *Targeting*) an saure Vesikel nicht notwendig ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die GAP-Domäne (auch ohne katalytische Funktion) möglicherweise für das *Targeting* benötigt wird.

Die beiden Protein-Protein-Interaktionsdomänen, die BCH- und Poly-Prolin (PPro)-Region waren alleine nicht ausreichend, um die Lokalisation von Cdc42GAP an Vesikel zu vermitteln. Dennoch ist Anwesenheit der PPro-Domäne nötig, da eine PPro-Deletionsmutante nicht mehr in der Lage ist, an bestehende Vesikel zu lokalisieren. Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Rolle der PPro-Region zu interpretieren:

1. Die PPro-Region bildet zusammen mit anderen (noch nicht identifizierten) Bereichen im Cdc42GAP-Molekül die *Targeting*-Domäne. Das bedeutet, daß die PPro-Region für das *Targeting* von Cdc42GAP an bestehende Vesikel notwendig, aber nicht hinreichend ist.
2. Durch das Fehlen der PPro-Region wird Cdc42GAP möglicherweise nicht mehr korrekt gefaltet. Sollte der beobachtete Effekt auf einem Faltungsproblem beruhen, bleibt die Rolle der PPro-Domäne hinsichtlich des Vesikel-*Targeting* unklar.

Welche Variante korrekt ist, bleibt zu überprüfen. Hilfreich werden in diesem Zusammenhang Cdc42GAP-Mutanten sein, die unterschiedliche Domänen des Moleküls miteinander kombinieren. So könnten u.a. folgende Cdc42GAP-Konstrukte Aufschluß über die mögliche *Targeting*-Domäne geben:

- a) die Kombination aus BCH und PPro-Domäne,
- b) die Kombination zwischen PPro- und GAP-Domäne oder
- c) eine Deletionsmutante, der die GAP-Domäne fehlt.

Hinsichtlich der Lokalisation am Zielvesikel wäre auch vorstellbar, daß Cdc42GAP nicht direkt mit der Zielmembran interagiert, sondern daß dieser Kontakt über weitere Proteine, wie z.B. dem an den Cdc42GAP-positiven Vesikeln nachgewiesenen PAK oder WAVE, vermittelt wird. Die Lösung dieser Frage wird sicherlich einen großen Beitrag zur Aufklärung des Rekrutierungsmechanismus und auch der Funktion von Cdc42GAP bei der Regulation des Vesikeltransports leisten.

V.4.2. Rolle der RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42

Da Cdc42GAP ein Regulator von RhoGTPasen ist, kann man annehmen, daß es durch Kontrolle von RhoGTPase-Funktionen an der Ausbildung der Cdc42GAP-positiven Vesikel beteiligt ist. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob konstitutiv inaktive Mutanten oder Rac1 und Cdc42 (N17Rac1 oder N17Cdc42) bzw. die Inhibition von RhoA durch C3-Transferase einen Einfluß auf die Bildung der Cdc42GAP-haltigen Vesikel haben. Mikroinjektionsexperimente zeigten, daß N17Rac1 und N17Cdc42, nicht aber die Inhibition von RhoA die Zahl der Cdc42GAP-positiven Vesikel nach Dextranstimulation deutlich reduzierten. Das bedeutet, daß Rac1 und Cdc42 für die Ausbildung der Cdc42GAP-positiven Vesikel oder für die Rekrutierung von Cdc42GAP an Vesikel notwendig sind.

Umgekehrt wurde analysiert, ob eine Aktivierung von RhoA, Rac1 oder Cdc42 - einzeln oder in Kombination (SopE, CNF-1, s.u.) - Cdc42GAP-Vesikel induzieren kann. Die Mikroinjektion konstitutiv aktiver Mutanten (V14RhoA, V12Rac1 bzw. V12Cdc42), sowie von SopE, einem bakteriellen GEF für Rac1 und Cdc42 (Friebel *et al.*, 2001) führten nicht zur Ausbildung Cdc42GAP-positiver Vesikel. Auch die Inkubation der Makrophagen mit CNF-1, einem bakteriellen Aktivator der drei genannten RhoGTPasen (Übersicht bei Aktories *et al.*, 2000) führte nicht zur Ausbildung von Cdc42GAP-haltigen Vesikeln.

Zusammen zeigen diese Resultate, daß Rac1 und Cdc42 für die Entstehung der Cdc42GAP-Vesikel wahrscheinlich notwendig, aber nicht hinreichend sind.

Um die Frage zu beantworten, ob Rac1 und/oder Cdc42 die Neubildung von Cdc42GAP-Vesikeln beeinflussen oder ob sie die Rekrutierung von Cdc42GAP an bereits bestehende Vesikel vermitteln, wurde der Einfluß dominant hemmender versus konstitutiv aktiver Mutanten von Rac1 und Cdc42 auf den alternativen Vesikelmarker PAK untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Zahl der PAK-positiven Vesikel durch die Injektion von N17Rac1 und N17Cdc42 reduziert wird, allerdings etwas geringer als die Reduktion der Vesikel nach Cdc42GAP-Färbung vermuten ließ. Das bedeutet, daß einerseits Rac1 und Cdc42 die Rekrutierung von Cdc42GAP an bereits bestehende (saure) Vesikel zumindest teilweise regulieren können, aber auch an der Entstehung der Vesikel beteiligt sind.

Eine mögliche Erklärung, wie ein Rekrutierungsmechanismus ablaufen könnte, wäre, daß Rac1 und Cdc42 die Interaktion von Cdc42GAP mit der Membran des Zielvesikels über andere Proteine, z.B. Effektoren der genannten GTPasen, vermitteln.

Hierbei könnte PAK die Rolle eines solchen „Adapters“ übernehmen. Dies scheint allerdings eher unwahrscheinlich, da die Ausbildung der PAK-Vesikel nicht sehr effizient durch Rac1 oder Cdc42 beeinflusst wird (s.o). Wäre PAK in diesem Kontext ein direkter Interaktionspartner der untersuchten GTPasen, müßte aufgrund des Wirkungsmechanismus der konstitutiv inaktiven Mutanten (Feig, 1999) postuliert werden, daß die Zahl der PAK-positiven Vesikel nach Mikroinjektion in ähnlichem Maße reduziert wird, wie das für Cdc42GAP gezeigt wurde.

Ein anderes in diesem Kontext weitaus vielversprechenderes Protein ist PI3-Kinase, die sowohl *in vitro* und *in vivo* mit Rac1 und Cdc42 (Tolias *et al.*, 1995; Bokoch *et al.*, 1996) interagiert als auch mit der Poly-Prolin-Domäne von Cdc42GAP über die p85-Untereinheit in Kontakt treten kann (Barfod, 1997). Weiterhin spricht für PI3-Kinase als Interaktionspartner, daß dieses Enzym für die Fusion von Vesikeln von Bedeutung ist (Jones und Clague, 1995; Amyere *et al.*, 2000) und die Reifung von Lysosomen regulieren kann (Mousavi *et al.*, 2003). Ob der genannte Zusammenhang in Wirklichkeit besteht, wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

V.5. Funktion von Cdc42GAP

Um einen Hinweis auf die Funktion von Cdc42GAP im Rahmen endozytischer Prozesse zu erhalten, wurde der Einfluß des Proteins auf Dextran-enthaltende Vesikel untersucht.

Dazu wurde in J774-Makrophagen zunächst die Expression von Cdc42GAP mittels RNAi-Technik unterdrückt (*knockdown* von Cdc42GAP). Auf Einzelzellebene konnte nachgewiesen werden, daß 5 Tage nach Transfektion nur noch in 29% der transfizierten Zellen Cdc42GAP-positive Vesikel nachweisbar waren. Das bedeutet, daß die RNAi-Technik auch auf Einzelzellebene funktioniert. So können zukünftig mit Hilfe dieser Methode Studien zur Funktion von Cdc42GAP in J774- (und primären humanen) Makrophagen durchgeführt werden. Es gibt bereits erste Hinweise darauf, daß der *knockdown* von Cdc42GAP in J774-Makrophagen zu einer Reduktion der Dextran-haltigen Vesikel führt. Diese Resultate müssen jedoch zukünftig in weiteren Experimenten bestätigt werden.

Desweiteren wurde der Einfluß von Cdc42GAP auf die Verteilung des alternativen Vesikelmarkers PAK mittels Mikroinjektion analysiert. Dazu wurden wiederum das Cdc42GAP*wt*-Protein und einige Mutanten in J774-Makrophagen injiziert und untersucht, wie viele der injizierten Zellen nach Dextranstimulation noch PAK-positive Vesikel aufweisen. Es stellte sich heraus, daß durch Mikroinjektion des Cdc42GAP*wt*-Proteins bzw. der GAP-inaktiven Mutante die Zahl der injizierten Zellen mit PAK-haltigen Vesikeln nicht signifikant reduziert wurde. Allerdings hatten einige

Cdc42GAP-Domänen einen deutlichen Effekt auf die Entstehung PAK-positiver Vesikel.

Es konnte weiterhin beobachtet werden, daß die Injektion der verschiedenen Cdc42GAP-Domänen und des *wt*-Proteins, nicht aber der GAP-inaktiven Mutante zu einer starken Unterdrückung der Dextran-positiven Vesikel führten. Im Falle des *wt*-Proteins wurde dies vermutlich durch die Hemmung der Dextranaufnahme durch Inaktivierung der dafür verantwortlichen RhoGTPasen Rac1 und Cdc42 mit verursacht. Die Effekte der injizierten Protein-Protein-Interaktionsdomänen, BCH und Poly-Prolin (PPro) sowie der PPro-Deletionsmutante (Δ PPro) sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die injizierten Proteine einige für die Internalisierung wichtige Bestandteile der Endozytosemaschinerie komplexieren, so daß diese für endozytotische Prozesse nicht mehr zur Verfügung stehen. So kann z.B. die PPro-Domäne wie bereits erwähnt mit PI3-Kinase interagieren, das Molekül dadurch dem Fließgleichgewicht entziehen und somit endozytotische Prozesse unterbinden. Das bedeutet aber auch, daß die PPro-Domäne von Cdc42GAP als Inhibitor der PI3-Kinase eingesetzt werden kann. Somit konnte zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt werden, ob Cdc42GAP in späten endozytotischen Prozesse eine Funktion übernimmt. Vorstellbar wäre, daß das hier erstmals beschriebene Cdc42GAP-positive Kompartiment ein alternativer Weg zur lysosomalen Degradation von internalisiertem Material ist, der durch einen von der GAP-Funktion unabhängigen Mechanismus reguliert wird. Wäre dies der Fall, müßte der Frage nachgegangen werden, wodurch die Spezifität dieses Kompartiments bestimmt wird. Alternativ wäre denkbar, daß die Cdc42GAP-positiven Vesikel eine Funktion im Rahmen der Antigenpräsentation übernehmen. In diesem Falle könnte ein Zusammenhang zwischen den Cdc42GAP-Vesikeln und den bereits erwähnten Klasse II-Vesikeln (Punkt V.2.) bestehen. Cdc42GAP könnte an diese Vesikel rekrutieren, um nachfolgend den Kontakt zwischen den Klasse II-Vesikeln und dem lysosomalen Kompartiment, in dem die Beladung der zur Antigenpräsentation wichtigen MHC II-Moleküle vonstatten geht, zu vermitteln. Dieser Vorgang erfolgt in Form eines sogenannten „*kiss-and-run*“-Mechanismus. Das Vorhandensein von Cdc42GAP wäre deshalb sinnvoll, da es unterschiedliche Dinge in sich vereinigt: (a) die für den „*kiss-and-run*“-Mechanismus notwendigen Protein-Protein-Interaktionsdomänen und (b) die in späteren Stadien erforderliche GAP-Funktion. Vorstellbar wäre, daß im Anschluß an die Aufnahme der beladenen MHC II-Moleküle in die Klasse II-Vesikel deren Exozytose und damit die Präsentation der Antigen-beladenen MHC II-Moleküle durch die Rho-GTPase Cdc42 reguliert wird. Für eine Cdc42-regulierte Exozytose spräche z.B., daß in Epithelzellen eine regulatorische Funktion von Cdc42 im Rahmen sekretorischer Transportprozesse zur basolateralen Membran beschrieben ist (Kroschewski *et al.*, 1999). Ebenso wurde die direkte Interaktion von Cdc42 mit dem Sec3-Protein, einer Untereinheit des sogenannten Exozysten, in Hefe nachgewiesen (Zhang *et al.*, 2001). Ob der Zusammenhang zwischen Cdc42GAP- und Klasse II-Vesikeln wirklich besteht, ist Gegenstand derzeitiger und zukünftiger Untersuchungen.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der Verteilung und Funktion von Cdc42GAP sind in Abb.31 schematisch zusammengefaßt.

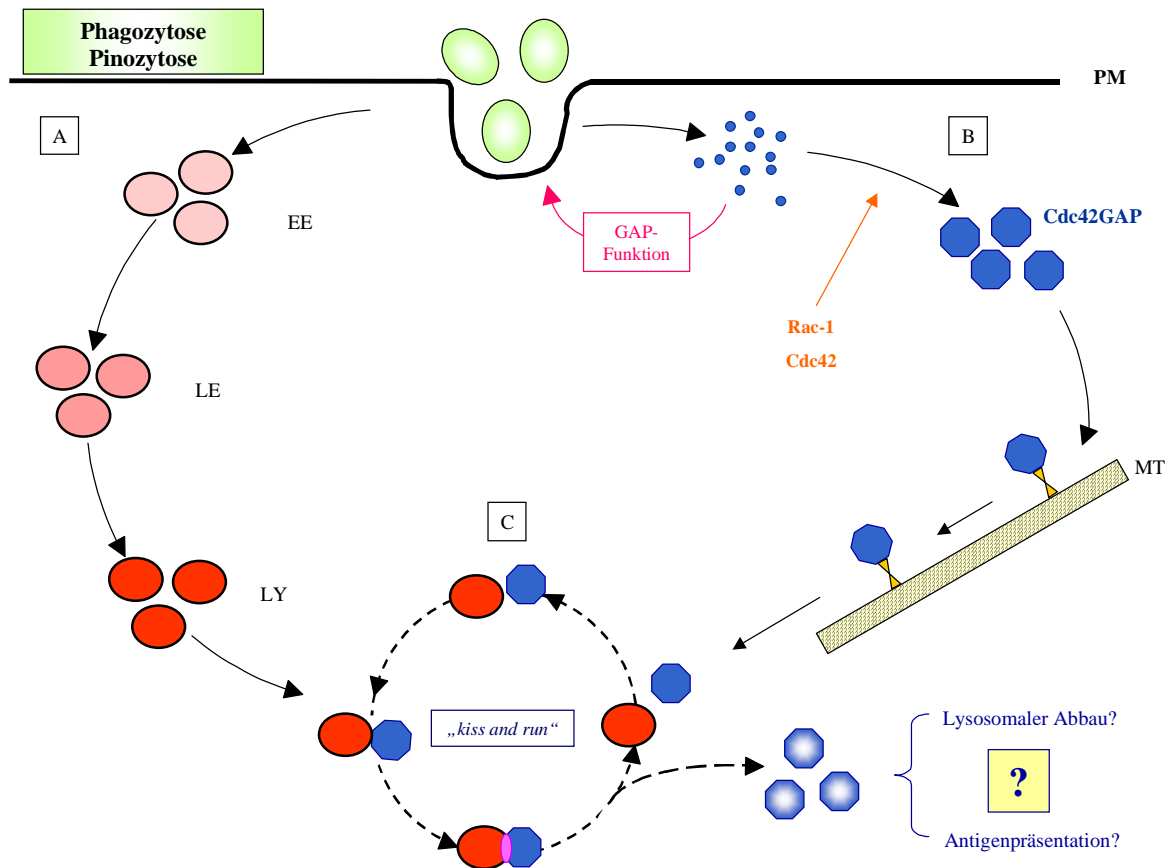


Abb.31 Schematische Darstellung der ermittelten Verteilung und (teils hypothetischen) Funktion von Cdc42GAP in Makrophagen. Cdc42GAP ist in endozytotische Prozesse involviert. Nach Induktion lokalisiert es an Vesikel, die ein weit verbreitetes endosomales Kompartiment darstellen. Allerdings läßt sich dieses Kompartiment von den bekannten, klassischen endosomalen Strukturen (A) deutlich abgrenzen. Eine Besonderheit von Cdc42GAP ist seine doppelte Rolle bezüglich der Aufnahme extrazellulären Materials (B). Im Rahmen der initialen Aufnahme könnte das Protein als GTPase-aktivierendes Protein fungieren. Dabei ist es möglicherweise bereits an/in vesikulären Strukturen lokalisiert, deren Größe jedoch unter dem optischen Auflösungsvermögen liegt. Ausgehend vom initialen Kontakt des zu internalisierenden Materials mit der Plasmamembran erfolgt ein noch unbekanntes Signal zu einem Rac1 und Cdc42-abhängigen Fusionsereignis, infolge dessen mikroskopisch sichtbare Cdc42GAP-Vesikel entstehen. Diese repräsentieren ein bisher nicht bekanntes endo-lysosomales Kompartiment, das entlang von Mikrotubuli in der Zelle transportiert wird. Cdc42GAP-Vesikel sind hochdynamisch und treten in Form des „kiss and run“-Mechanismus mit Komponenten des „klassischen“ lysosomalen Weges, z.B. lamp-1-positiven Lysosomen in Kontakt (C). Dieser alternative „Cdc42GAP-Weg“ kann von der Aufnahme des extrazellulären Materials entkoppelt werden (B). Welche Funktion die Cdc42GAP-Vesikel in diesem Kontext übernehmen, wird Gegenstand nachfolgender Untersuchungen sein. EE: *early endosomes* (frühe Endosomen), LE: *late endosomes* (späte Endosomen), LY: Lysosomen, MT: Mikrotubuli, PM: Plasmamembran.

V.6. Ausblick

Zukünftige Untersuchungen der Cdc42GAP-positiven Vesikel werden vor allem darauf zielen, die Funktion von Cdc42GAP an den beschriebenen sauren Vesikeln aufzuklären. Dabei könnte die Kombination aus einem durch RNAi-Technik hervorgerufenen Cdc42GAP-*knockdown* und *in vivo*-Beobachtungen mittels *Live cell imaging* erste Hinweise auf die Cdc42GAP-Funktion liefern. Diese Experimente sind zukünftig auch in primären humanen Makrophagen durchführbar, da mittels neuer Transfektionstechniken nun auch diese Zellen transfiziert werden können. Das schafft den Vorteil, nicht mehr auf Modellsysteme zurückgreifen zu müssen, sondern direkt in primären Zellen arbeiten zu können, was den Gegebenheiten im lebenden Organismus sehr viel näher kommt als das Maus-Modell.

Desweiteren kann auch die Aufklärung der am Transport der Cdc42GAP-haltigen Vesikel beteiligten Motoren einen Hinweis liefern, ob Cdc42GAP-Vesikel exozytotischer Natur sind. Die Aufnahmen mittels des *live cell imaging* zeigen, daß sich Cdc42GAP-positiv Vesikel in der Zelle in alle Richtungen bewegen können (vgl. Video-CD). Da der Transport entlang von Mikrotubuli erfolgt, sollte es möglich sein, durch die gezielte Hemmung von Plus- bzw. Minus-End-Motoren aufzuklären, in welche Richtung Cdc42GAP-Vesikel vornehmlich transportiert werden.

Die Identifizierung weiterer Interaktionspartner ist für die Analyse der Cdc42GAP-Funktion sicher ebenfalls von Vorteil. Findet man darunter im Hinblick auf ihre Funktion gut charakterisierte Proteine, so könnten diese neue Hinweise auf die Rolle von Cdc42GAP liefern. Die Durchführung eines *Yeast-Two-Hybrid-Screen* wäre z.B. eine Möglichkeit, solche Interaktionspartner zu finden.

Ein für die Signaltransduktion interessanter Aspekt ist die Frage nach der Rolle und/oder dem Zusammenspiel von Cdc42GAP und PAK. Augenscheinlich ist die Rekrutierung von PAK nicht auf das Wirken von Rac1 zurückzuführen, das bedeutet, daß PAK in diesem Kontext nicht als Rac-Effektor fungiert. Welche Aufgaben übernimmt dieses Protein also an sauren Vesikeln? Können PAK und Cdc42GAP in irgendeiner Form zusammenwirken, womöglich sogar direkt interagieren? Diese Fragen bleiben zu beantworten.

Biochemisch gilt es, die für das *Targeting* verantwortliche Domäne im Cdc42GAP-Molekül zu identifizieren. Aufschluß darüber können weitere Konstrukte von Cdc42GAP geben. Zum Beispiel ein Konstrukt, das die BCH- und PPro-Region umfaßt; dazu zwei Konstrukte des von Cdc42GAP, bei denen der N-Terminus unterschiedlich stark verkürzt wurde: ein längeres, das den gesamten Bereich von der BCH-Domäne bis zur GAP-Domäne vereint und ein kürzeres, welches nur den Bereich von der PPro- bis zur GAP-Region enthält.

Die aus den genannten Konstrukten resultierenden GFP-Fusionsproteine können Auskunft darüber geben, ob nicht in diesem Bereich die gesuchte *Targeting*-Domäne liegt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

GTP-bindende Proteine der Rho-Familie (RhoGTPasen) regulieren verschiedenste Zellfunktionen, darunter Zytoskelettorganisation, Zellzyklusregulation, Zelldifferenzierung und -wachstum sowie Vesikeltransport. Dies gilt für menschliche Zellen ebenso wie für Schleimpilze und sogar Pflanzenzellen. Während die molekularen Wirkungen der RhoGTPasen durch sog. Effektorproteine vermittelt werden, wird ihre Aktivierung und Deaktivierung durch Regulatorproteine gesteuert. Etwa 10 verschiedenen RhoGTPasen stehen mehr als 30 RhoGTPase-Aktivatoren (sog. GEF's) und nach neueren Analysen des menschlichen Genoms mehr als 60 RhoGTPase-Inaktivatoren (sog. GAP's) gegenüber. Diese Tatsachen sowie die kompartimentalisiert ablaufenden RhoGTPase-Aktivitäten sind nur durch eine Zelltyp-spezifische sowie intrazellulär zeitlich und räumlich koordinierte Kontrolle der RhoGTPase-Regulatoren möglich. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der subzellulären Lokalisation, Dynamik und Funktion eines ubiquitären RhoGAP's in humanen Makrophagen und vereinzelt in anderen Zelltypen.

Cdc42GAP (p50RhoGAP) ist ein Multidomänenprotein und zeigt *in vitro* GTPase-stimulierende Aktivität vor allem gegenüber der RhoGTPase Cdc42. In ruhenden Makrophagen ist Cdc42GAP diffus in der Zelle verteilt, wohingegen es nach Stimulation mit chemotaktischen oder endozytotischen Stimuli an vesikuläre Strukturen lokalisiert. Zur genaueren Charakterisierung wurden Cdc42GAP-positive Vesikel auf das Vorhandensein „klassischer“ endosomaler Markerproteine mittels Immunfluoreszenz untersucht. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, daß Cdc42GAP-Vesikel keinem der „klassischen“ endosomalen Kompartimente wie Clathrin-beschichtete Vesikel, Caveolae, frühe bzw. späte Endosomen, *recycling*-Endosomen, Lysosomen, Endoplasmatisches Retikulum (ER) oder dem Golgi-Apparat entsprechen. Ebenso konnte ausgeschlossen werden, daß Cdc42GAP-Vesikel in den ER→Golgi-Transport involviert sind. Mit Hilfe alternativer Methoden wie Behandlung der Makrophagen mit LysoTracker (LYTr), einer Substanz, die in lebenden Zellen spezifisch saure Kompartimente anfärbt, und Percoll-Dichtegradientenzentrifugation konnte jedoch nachgewiesen werden, daß Cdc42GAP-Vesikel vermutlich ein bisher nicht beschriebenes, Lysosomen-ähnliches Kompartiment darstellen.

Konfokalmikroskopische Analysen mit Hilfe des *live cell imaging* zeigten, daß die Cdc42GAP-positiven Vesikel hohe Motilität besitzen. Es stellte sich auch heraus, daß diese Vesikel mit anderen Endomembranstrukturen, z.B. späten pinozytotischen Vesikeln und mit Bakterien gefüllten Phagosomen in Kontakt treten können. Dies geschieht transient und scheint einem sogenannten „*kiss-and-run*“-Mechanismus zu ähneln.

Experimente, in denen die Dynamik der Aktin- bzw. Mikrotubulipolymerisation unterbunden wurde, belegen, daß der Transport dieser Vesikel innerhalb der Zelle ein intaktes Mikrotubuli-Zytoskelett benötigt, während Aktin in diesem Kontext keine Rolle spielt.

Da die RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 zumindest *in vitro* Ziele von Cdc42GAP sind, wurde deren Einfluß auf die von uns entdeckten Vesikel analysiert. Mikroinjektionsexperimente gaben Aufschluß darüber, daß Rac1 und Cdc42, nicht aber RhoA sowohl für die Rekrutierung von Cdc42GAP an die Vesikel als auch für deren Entstehung notwendig sind.

Cdc42GAP besteht aus zwei Protein-Protein-Interaktions-domänen (BCH/Sec 14 und Poly-Prolin) und einer katalytischen GAP-Domäne. Innerhalb dieser GAP-Domäne ist ein konservierter Arg-Rest essentiell für die Funktion. Um zu analysieren, welche Domäne die

Rekrutierung (das *Targeting*) an Vesikel vermittelt, wurden unterschiedliche Mutanten von Cdc42GAP konstruiert, u.a. eine GAP-defektive Mutante und eine Poly-Prolin-Deletionsmutante. Es stellte sich heraus, daß die GAP-defektive Mutante noch an Vesikel lokalisieren kann, wohingegen die Poly-Prolin-Deletionsmutante dazu nicht mehr in der Lage ist. Dies führte zu dem Schluß, daß die GAP-Funktion *per se* für das Vesikel-*Targeting* nicht notwendig ist, die Poly-Prolin-Region jedoch in diesen Prozeß involviert ist. Die minimal notwendige exakte *Targeting*-Domäne konnte jedoch noch nicht identifiziert werden.

Zur weiteren Aufklärung der Funktion von Cdc42GAP wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Zum einen wurde ein *knockdown* von Cdc42GAP mittels RNAi-Technik in J774-Makrophagen erzeugt. Es konnte nachgewiesen werden, daß mit Hilfe dieser Technik die Reduktion der Cdc42GAP-Expression auf Einzelzellebene erfolgreich durchführbar ist. Erste, noch zu bestätigende Resultate deuten darauf hin, daß der *knockdown* von Cdc42GAP in diesen Zellen die Bildung der von uns beschriebenen Vesikel reduziert.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurden Cdc42GAP und mutierte Formen des Proteins in diese Zellen injiziert und der Effekt der injizierten Proteine analysiert. Es konnte wiederum nachgewiesen werden, daß die Injektion von Cdc42GAP und bestimmter Mutanten die Ausbildung der beschriebenen Vesikel hemmt. Daneben zeigten sowohl die RNAi-Technik als auch die Mikroinjektion der Mutanten, daß Cdc42GAP die Aufnahme von Makropinozytosemarkern inhibiert. Die GAP-inaktive Mutante (s.o) zeigte dagegen keinen inhibitorischen Effekt. Das läßt den Schluß zu, daß Cdc42GAP auch in frühen Stadien der Endozytose als negativer Regulator von RhoGTPasen, vermutlich Cdc42 und Rac1, wirken kann.

Welche genauen Aufgaben Cdc24GAP in späteren Stadien der Phagozytose/Endozytose erfüllen kann, ob es essentiell für die Generierung der beschriebenen Vesikel ist, deren Motilität oder Fusion mit anderen Kompartimenten kontrolliert oder eine bisher nicht identifizierte Ziel-GTPase reguliert, wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

VII. LITERATUR

- Adamson, P., Paterson, H. F., and Hall, A.** (1992). Intracellular localization of the P21rho proteins. *J Cell Biol* **119**, 617-627.
- 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.
- Agarwal, A., Salem, P., and Robbins, K. C.** (1993). Involvement of p72syk, a protein-tyrosine kinase, in Fc gamma receptor signaling. *J Biol Chem* **268**,
- 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.** (2003). Mammalian Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol* **15**, 238.
- Aktories, K., Mohr, C. and Koch, G.** (1992). Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyl-transferase. *Curr Top Microbiol Immunol* **175**, 115-131.
- Aktories, K.** (1997). Bacterial toxins that target Rho proteins. *J Clin. Invest* **99**, 827-829.
- Aktories, K., Schmidt, G., and Just, I.** (2000). Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol Chem* **381**, 421-426.
- Albert, M. L., Kim, J. I., and Birge, R. B.** (2000). alphavbeta5 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat.Cell Biol* **2**, 899-905.
- Allen, L. A. and Aderem, A.** (1996). Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Exp Med* **184**, 627-637.
- 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.
- Amato, P. A., Unanue, E. R., and Taylor, D. L.** (1983). Distribution of actin in spreading macrophages: a comparative study on living and fixed cells. *J Cell Biol* **96**, 750-761.
- Ames, B.N.** (1966). Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol* **8**, 115-118.
- Amigorena, S., Drake, J. R., Webster, P., and Mellman, I.** (1994). Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* **369**, 113-120.

- Amyere, M., Payraastre, B., Krause, U., Van Der, S. P., Veithen, A., and Courtoy, P. J.** (2000). Constitutive macropinocytosis in oncogene-transformed fibroblasts depends on sequential permanent activation of phosphoinositide 3-kinase and phospholipase C. *Mol Biol Cell* **11**, 3453-3467.
- 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.
- 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.
- Araki, N., Johnson, M. T., and Swanson, J. A.** (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol* **135**, 1249-1260.
- Arcaro, A. and Wymann, M. P.** (1993). Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem. J* **296 (Pt 2)**, 297-301.
- 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.
- Ayscough, K. R.** (1998). In vivo functions of actin-binding proteins. *Curr.Opin.Cell Biol* **10**, 102-111.
- Bagrodia, S. and Cerione, R. A.** (1999). Pak to the future. *Trends Cell Biol* **9**, 350-355.
- Barbieri, A. M., Sha, Q., Bette-Bobillo, P., Stahl, P. D., and Vidal, M.** (2001). ADP-ribosylation of Rab5 by ExoS of *Pseudomonas aeruginosa* affects endocytosis. *Infect.Immun.* **69**, 5329-5334.
- Barfod, E. T., Zheng, Y., Kuang, W. J., Hart, M. J., Evans, T., Cerione, R. A., and Ashkenazi, A.** (1993). Cloning and expression of a human CDC42 GTPase-activating protein reveals a functional SH3-binding domain. *J Biol.Chem.* **268**, 26059-26062.
- Bernards, A.** (2003). GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochim.Biophys.Acta* **1603**, 47-82.
- Bishop, A. L. and Hall, A.** (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J* **348 Pt 2**, 241-255.
- Black, D. S. and Bliska, J. B.** (2000). The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol.Microbiol.* **37**, 515-527.

- 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.
- Boguski, M. S. and McCormick, F.** (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**, 643-654.
- Bokoch, G. M., Bohl, B. P., and Chuang, T. H.** (1994). Guanine nucleotide exchange regulates membrane translocation of Rac/Rho GTP-binding proteins. *J Biol Chem* **269**, 31674-31679.
- Bokoch, G. M., Vlahos, C. J., Wang, Y., Knaus, U. G., and Traynor-Kaplan, A. E.** (1996). Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem.J* **315** (Pt 3), 775-779.
- Boquet, P. and Lemichez, E.** (2003). Bacterial virulence factors targeting Rho GTPases: parasitism or symbiosis? *Trends Cell Biol* **13**, 238-246.
- Botelho, R. J., Teruel, M., Dierckman, R., Anderson, R., Wells, A., York, J. D., Meyer, T., and Grinstein, S.** (2000). Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Bradford, M.M.** (1976). A sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *J Cell Biol* **151**, 1353-1368.
- Brouns, M. R., Matheson, S. F., Hu, K. Q., Delalle, I., Caviness, V. S., Silver, J., Bronson, R. T., and Settleman, J.** (2000). The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development* **127**, 4891-4903.
- Brouns, M. R., Matheson, S. F., and Settleman, J.** (2001). p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat.Cell Biol.* **3**, 361-367.
- Brown, A. M., O'Sullivan, A. J., and Gomperts, B. D.** (1998). Induction of exocytosis from permeabilized mast cells by the guanosine triphosphatases Rac and Cdc42. *Mol Biol Cell* **9**, 1053-1063.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R.** (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-553.
- Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., and Zerial, M.** (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**, 715-728.

- Burns, S., Thrasher, A. J., Blundell, M. P., Machesky, L., and Jones, G. E.** (2001). Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* **98**, 1142-1149.
- Buyon, J. P., Slade, S. G., Reibman, J., Abramson, S. B., Philips, M. R., Weissmann, G., and Winchester, R.** (1990). Constitutive and induced phosphorylation of the alpha- and beta-chains of the CD11/CD18 leukocyte integrin family. Relationship to adhesion-dependent functions. *J Immunol* **144**, 191-197.
- Calhoun, B. C., Lapierre, L. A., Chew, C. S., and Goldenring, J. R.** (1998). Rab11a redistributes to apical secretory canaliculus during stimulation of gastric parietal cells. *Am J Physiol* **275**, C163-C170.
- Caloca, M. J., Fernandez, N., Lewin, N. E., Ching, D., Modali, R., Blumberg, P. M., and Kazanietz, M. G.** (1997). Beta2-chimaerin is a high affinity receptor for the phorbol ester tumor promoters. *J Biol Chem* **272**, 26488-26496.
- Caloca, M. J., Garcia-Bermejo, M. L., Blumberg, P. M., Lewin, N. E., Kremmer, E., Mischak, H., Wang, S., Nacro, K., Bienfait, B., Marquez, V. E., and Kazanietz, M. G.** (1999). beta2-chimaerin is a novel target for diacylglycerol: binding properties and changes in subcellular localization mediated by ligand binding to its C1 domain. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **96**, 11854-11859.
- Caloca, M. J., Wang, H., Delemos, A., Wang, S., and Kazanietz, M. G.** (2001). Phorbol esters and related analogs regulate the subcellular localization of beta 2-chimaerin, a non-protein kinase C phorbol ester receptor. *J Biol Chem* **276**, 18303-18312.
- Carvalli, A. and Carloni, P.** (2002). Enzymatic GTP hydrolysis: insights from an ab initio molecular dynamics study. *J Am Chem. Soc.* **124**, 3763-3768.
- 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.
- Casey, P. J., Solski, P. A., Der, C. J., and Buss, J. E.** (1989). p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **86**, 8323-8327.
- Casey, P. J., Thissen, J. A., and Moomaw, J. F.** (1991). Enzymatic Modification of Proteins with a Geranylgeranyl Isoprenoid. *PNAS* **88**, 8631-8635.
- Chavrier, P., van der, S. P., Mishal, Z., Nagelkerken, B., and Gorvel, J. P.** (1997). Early endosome membrane dynamics characterized by flow cytometry. *Cytometry* **29**, 41-49.
- 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.

Chen, W., Feng, Y., Chen, D., and Wandinger-Ness, A. (1998). Rab11 Is Required for Trans-Golgi Network-to-Plasma Membrane Transport and a Preferential Target for GDP Dissociation Inhibitor. *Mol.Biol.Cell* **9**, 3241-3257.

Chiang, S. H., Baumann, C. A., Kanzaki, M., Thurmond, D. C., Watson, R. T., Neudauer, C. L., Macara, I. G., Pessin, J. E., and Saltiel, A. R. (2001). Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* **410**, 944-948.

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.

Chuang, T. H., Xu, X., Kaartinen, V., Heisterkamp, N., Groffen, J., and Bokoch, G. M. (1995). Abr and Bcr are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **92**, 10282-10286.

Claus, V., Jahraus, A., Tjelle, T., Berg, T., Kirschke, H., Faulstich, H. and Griffiths, G. (1998). Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. *J Biol Chem* **273**, 9842-9851.

Conner, S.D. and Schmid, S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**, 37-44.

Cornelis, G. R. and Wolf-Watz, H. (1997). The Yersinia Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol.* **23**, 861-867.

Cornelis, G. R., Boland, A., Boyd, A. P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M. P., and Stainier, I. (1998). The virulence plasmid of Yersinia, an antihost genome. *Microbiol.Mol Biol Rev.* **62**, 1315-1352.

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., Kurosaki, T., and Greenberg, S. (1996). Syk tyrosine kinase is required for immunoreceptor tyrosine activation motif-dependent actin assembly. *J Biol Chem* **271**, 16597-16602.

Crowley, M. T., Costello, P. S., Fitzer-Attas, C. J., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tybulewicz, V. L., and DeFranco, A. L. (1997). A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcγ receptors on macrophages. *J Exp Med* **186**, 1027-1039.

Daro, E., van der, S. P., Galli, T., and Mellman, I. (1996). Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **93**, 9559-9564.

Dell'Angelica, E. C., Mullens, C., Caplan, S. and Bonifacino, J. S. (2000). Lysosome-related organelles. *FASEB J.* **14**, 1265-1278.

- 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.
- Dharmawardhane, S., Schurmann, A., Sells, M. A., Chernoff, J., Schmid, S. L., and Bokoch, G. M.** (2000). Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1. *Mol Biol Cell* **11**, 3341-3352.
- Diakonova, M., Bokoch, G., and Swanson, J. A.** (2002). Dynamics of cytoskeletal proteins during Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *Mol Biol Cell* **13**, 402-411.
- Doussau, F., Gasman, S., Humeau, Y., Vitiello, F., Popoff, M., Boquet, P., Bader, M. F., and Poulain, B.** (2000). A Rho-related GTPase is involved in Ca²⁺-dependent neurotransmitter exocytosis. *J Biol Chem* **275**, 7764-7770.
- Duman, J. G., Tyagarajan, K., Kolsi, M. S., Moore, H. P., and Forte, J. G.** (1999). Expression of rab11a N124I in gastric parietal cells inhibits stimulatory recruitment of the H⁺-K⁺-ATPase. *Am J Physiol* **277**, C361-C372.
- 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.
- Erickson, J. W., Zhang, C., Kahn, R. A., Evans, T., and Cerione, R. A.** (1996). Mammalian Cdc42 is a brefeldin A-sensitive component of the Golgi apparatus. *J Biol. Chem.* **271**, 26850-26854.
- Ernst, J. D.** (2000). Bacterial inhibition of phagocytosis. *Cell Microbiol.* **2**, 379-386.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A.** (2003). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635.
- 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.
- Feng, Y., Press, B., and Wandinger-Ness, A.** (1995). Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J. Cell Biol.* **131**, 1435-1452.
- Finlay, B. B. and Cossart, P.** (1997). Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* **276**, 718-725.
- Friebel, A., Ilchmann, H., Aepfelbacher, M., Ehrbar, K., Machleidt, W., and Hardt, W. D.** (2001). SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* activate different sets of RhoGTPases of the host cell. *J Biol Chem* **276**, 34035-34040.

- 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.
- Fu, Y. and Galan, J. E.** (1999). A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* **401**, 293-297.
- Galan, J. E. and Zhou, D.** (2000). Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by Salmonella. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **97**, 8754-8761.
- Garrett, W. S., Chen, L. M., Kroschewski, R., Ebersold, M., Turley, S., Trombetta, S., Galan, J. E., and Mellman, I.** (2000). Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* **102**, 325-334.
- Gatti, E. and Pierre, P.** (2003). Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution. *Curr.Opin.Cell Biol* **15**, 468-473.
- Gavazzi, I., Nermut, M. V., and Marchisio, P. C.** (1989). Ultrastructure and gold-immunolabelling of cell-substratum adhesions (podosomes) in RSV-transformed BHK cells. *J Cell Sci* **94 (Pt 1)**, 85-99.
- Gerrity, R. G.** (1981). The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* **103**, 181-190.
- Ghazizadeh, S. and Fleit, H. B.** (1994). Tyrosine phosphorylation provides an obligatory early signal for Fc gamma RII-mediated endocytosis in the monocytic cell line THP-1. *J Immunol* **152**, 30-41.
- Ghazizadeh, S., Bolen, J. B., and Fleit, H. B.** (1995). Tyrosine phosphorylation and association of Syk with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells. *Biochem. J* **305 (Pt 2)**, 669-674.
- Goehring, U. M., Schmidt, G., Pederson, K. J., Aktories, K., and Barbieri, J. T.** (1999). The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J Biol Chem* **274**, 36369-36372.
- Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M., and Gruenberg, J.** (1991). rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**, 915-925.
- Greenberg, S., Chang, P., Wang, D. C., Xavier, R., and Seed, B.** (1996). Clustered syk tyrosine kinase domains trigger phagocytosis. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **93**, 1103-1107.
- Groger, M., Holnthoner, W., Maurer, D., Lechleitner, S., Wolff, K., Mayr, B. B., Lubitz, W., and Petzelbauer, P.** (2000). Dermal microvascular endothelial cells express the 180-kDa macrophage mannose receptor in situ and in vitro. *J Immunol.* **165**, 5428-5434.
- Hall, A.** (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514.
- Hammond, S. M., Caudy, A. A., and Hannon, G. J.** (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat.Rev.Genet.* **2**, 110-119.

- Hancock, J. F. and Hall, A.** (1993). A novel role for RhoGDI as an inhibitor of GAP proteins. *EMBO J* **12**, 1915-1921.
- Hannon, G. J.** (2002). RNA interference. *Nature* **418**, 244-251.
- Harada, A., Furuta, B., Takeuchi, K., Itakura, M., Takahashi, M., and Umeda, M.** (2000). Nadrin, a novel neuron-specific GTPase-activating protein involved in regulated exocytosis. *J Biol Chem* **275**, 36885-36891.
- 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.
- 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.
- Hong-Geller, E. and Cerione, R. A.** (2000). Cdc42 and Rac stimulate exocytosis of secretory granules by activating the IP(3)/calcium pathway in RBL-2H3 mast cells. *J Cell Biol* **148**, 481-494.
- 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.
- Hu, K. Q. and Settleman, J.** (1997). Tandem SH2 binding sites mediate the RasGAP-RhoGAP interaction: a conformational mechanism for SH3 domain regulation. *EMBO J* **16**, 473-483.
- Hueck, C. J.** (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol.Mol Biol Rev.* **62**, 379-433.
- Isakov, N.** (1997). ITIMs and ITAMs. The Yin and Yang of antigen and Fc receptor-linked signaling machinery. *Immunol Res* **16**, 85-100.
- Janeway, C. A., Jr.** (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* **13**, 11-16.
- Jenna, S., Hussain, N. K., Danek, E. I., Triki, I., Wasiak, S., McPherson, P. S., and Lamarche-Vane, N.** (2002). The activity of the GTPase-activating protein CdGAP is regulated by the endocytic protein intersectin. *J Biol.Chem.* **277**, 6366-6373.
- Jones, A. T. and Clague, M. J.** (1995). Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for early endosome fusion. *Biochem.J* **311** (Pt 1), 31-34.
- 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.

- 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.
- Kaibuchi, K., Kuroda, S., and Amano, M.** (1999). Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu.Rev.Biochem.* **68**, 459-486.
- 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.
- Kjoller, L. and Hall, A.** (1999). Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res* **253**, 166-179.
- Knetsch, M. L., Schafers, N., Horstmann, H., and Manstein, D. J.** (2001). The Dictyostelium Bcr/Abr-related protein DRG regulates both Rac- and Rab-dependent pathways. *EMBO J* **20**, 1620-1629.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L.** (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* **15**, 1942-1952.
- Krall, R., Sun, J., Pederson, K. J., and Barbieri, J. T.** (2002). In vivo rho GTPase-activating protein activity of Pseudomonas aeruginosa cytotoxin ExoS. *Infect.Immun.* **70**, 360-367.
- Kroschewski, R., Hall, A., and Mellman, I.** (1999). Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane of MDCK cells. *Nat.Cell Biol.* **1**, 8-13.
- Lamarche, N. and Hall, A.** (1994). GAPs for rho-related GTPases. *Trends Genet.* **10**, 436-440.
- Lamaze, C., Chuang, T. H., Terlecky, L. J., Bokoch, G. M., and Schmid, S. L.** (1996). Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature* **382**, 177-179.
- Lancaster, C. A., Taylor-Harris, P. M., Self, A. J., Brill, S., van Erp, H. E., and Hall, A.** (1994). Characterization of rhoGAP. A GTPase-activating protein for rho-related small GTPases. *J Biol.Chem.* **269**, 1137-1142.
- 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.

- Lengsfeld, A. M., Low, I., Wieland, T., Dancker, P., and Hasselbach, W.** (1974). Interaction of phalloidin with actin. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **71**, 2803-2807.
- Lerm, M., Schmidt, G., and Aktories, K.** (2000). Bacterial protein toxins targeting rho GTPases. *FEMS Microbiol.Lett.* **188**, 1-6.
- Leverrier, Y. and Ridley, A. J.** (2001). Requirement for Rho GTPases and PI 3-kinases during apoptotic cell phagocytosis by macrophages. *Curr.Biol* **11**, 195-199.
- 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. and Aepfelbacher, M.** (2003). Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol* **13**, 376-385.
- Liman, J. J., van der Wal, C. J. and Overdijk, B.** (1985). Endo-N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in rat liver. Studies on substrate specificity, enzyme inhibition, subcellular localization and partial purification. *Biochem J* **229**, 379-385.
- Lombardi, D., Soldati, T., Riederer, M. A., Goda, Y., Zerial, M., and Pfeffer, S. R.** (1993). Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *EMBO J.* **12**, 677-682.
- Low, B. C., Seow, K. T., and Guy, G. R.** (2000, [1]). The BNIP-2 and Cdc42GAP homology domain of BNIP-2 mediates its homophilic association and heterophilic interaction with Cdc42GAP. *J Biol.Chem.* **275**, 37742-37751.
- Low, B. C., Seow, K. T., and Guy, G. R.** (2000, [2]). Evidence for a novel Cdc42GAP domain at the carboxyl terminus of BNIP-2. *J Biol Chem* **275**, 14415-14422.
- Ludbrook, S. B., Eccleston, J. F., and Strom, M.** (1997). Cloning and characterization of a rhoGAP homolog from Dictyostelium discoideum. *J Biol Chem* **272**, 15682-15686.
- 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., Mullins, R. D., Higgs, H. N., Kaiser, D. A., Blanchoin, L., May, R. C., Hall, M. E., and Pollard, T. D.** (1999). Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **96**, 3739-3744.
- 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.
- Matozaki, T., Nakanishi, H., and Takai, Y.** (2000). Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades. *Cell Signal.* **12**, 515-524.
- May, R. C., Caron, E., Hall, A., and Machesky, L. M.** (2000). Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR 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.
- 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.
- Miaczynska, M. and Zerial, M.** (2002). Mosaic organization of the endocytic pathway. *Exp Cell Res* **272**, 8-14.
- Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M., and Philips, M. R.** (2001). Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol.* **152**, 111-126.
- Michaely, P. A., Mineo, C., Ying, Y. S., and Anderson, R. G.** (1999). Polarized distribution of endogenous Rac1 and RhoA at the cell surface. *J Biol. Chem* **274**, 21430-21436.
- 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.
- Misumi, Y., Misumi, Y., Miki, K., Takatsuki, A., Tamura, G., and Ikehara, Y.** (1986). Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* **261**, 11398-11403.
- 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.
- Mohrmann, K. and van der Sluijs, S. P.** (1999). Regulation of membrane transport through the endocytic pathway by rabGTPases. *Mol Membr. Biol* **16**, 81-87.
- Moon, S. Y. and Zheng, Y.** (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* **13**, 13-22.

- 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.
- Mousavi, S. A., Brech, A., Berg, T., and Kjekten, R.** (2003). Phosphoinositide 3-kinase regulates maturation of lysosomes in rat hepatocytes. *Biochem.J* **372**, 861-869.
- Mukhopadhyay, A., Funato, K., and Stahl, P. D.** (1997). Rab7 regulates transport from early to late endocytic compartments in *Xenopus* oocytes. *J Biol.Chem.* **272**, 13055-13059.
- 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.
- Murphy, C., Saffrich, R., Grummt, M., Gournier, H., Rybin, V., Rubino, M., Auvinen, P., Lutcke, A., Parton, R. G., and Zerial, M.** (1996). Endosome dynamics regulated by a Rho protein. *Nature* **384**, 427-432.
- Murphy, G. A., Jillian, S. A., Michaelson, D., Philips, M. R., D'Eustachio, P., and Rush, M. G.** (2001). Signaling mediated by the closely related mammalian Rho family GTPases TC10 and Cdc42 suggests distinct functional pathways. *Cell Growth Differ.* **12**, 157-167.
- Nassar, N., Hoffman, G. R., Manor, D., Clardy, J. C., and Cerione, R. A.** (1998). Structures of Cdc42 bound to the active and catalytically compromised forms of Cdc42GAP. *Nat.Struct.Biol* **5**, 1047-1052.
- 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.
- 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.
- Nobes, C. and Marsh, M.** (2000). Dendritic cells: new roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake? *Curr.Biol.* **10**, R739-R741.
- Nobes, C. D. and Hall, A.** (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62.
- Ochs, H. D.** (2001). The Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Rev.Allergy Immunol* **20**, 61-86.
- 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 FcgammaR, phagocytosis. *Curr.Biol* **12**, 1413-1418.
- Olofsson, B.** (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal.* **11**, 545-554.

- 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.
- Peck, J., Douglas, G., Wu, C. H., and Burbelo, P. D.** (2002). Human RhoGAP domain-containing proteins: structure, function and evolutionary relationships. *FEBS Lett.* **528**, 27-34.
- Pelchen-Matthews, A., Kramer, B., and Marsh, M.** (2003). Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* **162**, 443-455.
- Pierre, P., Turley, S. J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R. M., and Mellman, I.** (1997). Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* **388**, 787-792.
- 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., da Silva, R. P., and Gordon, S.** (1998). Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol* **8**, 365-372.
- 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.
- Pornillos, O., Garrus, J. E., and Sundquist, W. I.** (2002). Mechanisms of enveloped RNA virus budding. *Trends Cell Biol* **12**, 569-579.
- 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., Kessels, M. M., and Kelly, R. B.** (2000). Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **150**, F111-F116.
- Qualmann, B. and Kelly, R. B.** (2000). Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization. *J Cell Biol* **148**, 1047-1062.

- 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.
- 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.
- Raposo, G., Fevrier, B., Stoorvogel, W. and Marks, M. S.** (2002). Lysosome-related organelles: a view from immunity and pigmentation. *Cell Struct. Funct* **27**, 443-456.
- Raposo, G., Moore, M., Innes, D., Leijendekker, R., Leigh-Brown, A., Benaroch, P., and Geuze, H.** (2002). Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic*. **3**, 718-729.
- 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.
- Ren, M., Xu, G., Zeng, J., Lemos-Chiarandini, C., Adesnik, M., and Sabatini, D. D.** (1998). Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *PNAS* **95**, 6187-6192.
- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., and Hall, A.** (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-410.
- Ridley, A. J. and Hall, A.** (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-399.
- Ridley, A. J., Self, A. J., Kasmi, F., Paterson, H. F., Hall, A., Marshall, C. J., and Ellis, C.** (1993). rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *EMBO J* **12**, 5151-5160.
- Ridley, A. J.** (2001, [1]). Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic*. **2**, 303-310.
- Ridley, A. J.** (2001, [2]). Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* **11**, 471-477.
- Robertson, D., Paterson, H. F., Adamson, P., Hall, A., and Monaghan, P.** (1995). Ultrastructural localization of ras-related proteins using epitope-tagged plasmids. *J Histochem.Cytochem.* **43**, 471-480.

- 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.
- Rollins, B. J.** (1996). Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol Med Today* **2**, 198-204.
- Roof, R. W., Haskell, M. D., Dukes, B. D., Sherman, N., Kinter, M., and Parsons, S. J.** (1998). Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP interaction: Tyr 1105 of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation. *Mol Cell Biol* **18**, 7052-7063.
- Rosqvist, R., Forsberg, A., Rimpilainen, M., Bergman, T., and Wolf-Watz, H.** (1990). The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol Microbiol.* **4**, 657-667.
- 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.
- Sastry, K. and Ezekowitz, R. A.** (1993). Collectins: pattern recognition molecules involved in first line host defense. *Curr.Opin.Immunol* **5**, 59-66.
- Schmid, S. L., McNiven, M. A., and De Camilli, P.** (1998). Dynamin and its partners: a progress report. *Curr.Opin.Cell Biol* **10**, 504-512.
- Schneider, S. W.** (2001). Kiss and run mechanism in exocytosis. *J Membr.Biol* **181**, 67-76.
- 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.
- Senda, T., Horiguchi, Y., Umemoto, M., Sugimoto, N., and Matsuda, M.** (1997). *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin, which activates a small GTP-binding protein rho, induces membrane organelle proliferation and caveolae formation. *Exp Cell Res* **230**, 163-168.
- Sengelov, H.** (1995). Complement receptors in neutrophils. *Crit Rev.Immunol* **15**, 107-131.
- 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.
- Sinha, B., Francois, P. P., Nusse, O., Foti, M., Hartford, O. M., Vaudaux, P., Foster, T. J., Lew, D. P., Herrmann, M., and Krause, K. H.** (1999). Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell Microbiol.* **1**, 101-117.

- Sinha, B., Francois, P., Que, Y. A., Hussain, M., Heilmann, C., Moreillon, P., Lew, D., Krause, K. H., Peters, G., and Herrmann, M.** (2000). Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect.Immun.* **68**, 6871-6878.
- 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.
- Somsel, R. J. and Wandinger-Ness, A.** (2000). Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci* **113 Pt 2**, 183-192.
- Spector, I., Shochet, N. R., Blasberger, D., and Kashman, Y.** (1989). Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil.Cytoskeleton* **13**, 127-144.
- Steinman, R. M. and Swanson, J.** (1995). The endocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* **182**, 283-288.
- 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.
- 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. A.** (1989). Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages. *J Cell Sci* **94**, 135-142.
- 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. and Rusk, N.** (2003). Control of vesicular trafficking by rho GTPases. *Curr.Biol* **13**, R409-R418.
- 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.

- Taunton, J.** (2001). Actin filament nucleation by endosomes, lysosomes and secretory vesicles. *Curr.Opin.Cell Biol.* **13**, 85-91.
- Thrasher, A. J., Burns, S., Lorenzi, R., and Jones, G. E.** (2000). The Wiskott-Aldrich syndrome: disordered actin dynamics in haematopoietic cells. *Immunol Rev.* **178**, 118-128.
- Tijsterman, M., Ketting, R. F., and Plasterk, R. H.** (2002). The genetics of RNA silencing. *Annu.Rev.Genet.* **36**, 489-519.
- 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.
- Tolias, K. F., Cantley, L. C., and Carpenter, C. L.** (1995). Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J Biol.Chem.* **270**, 17656-17659.
- 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.
- Tuschl, T.** (2001). RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem.* **2**, 239-245.
- Ungewickell, E.** (1999). Wrapping the package. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **96**, 8809-8810.
- 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.
- Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C.** (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* **11**, 2295-2322.
- 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.
- Verstreken, P., Kjaerueff, O., Lloyd, T. E., Atkinson, R., Zhou, Y., Meinertzhagen, I. A. and Bellen, H. J.** (2002). Endophilin mutations block clathrin-mediated endocytosis but not neurotransmitter release. *Cell* **109**, 101-112.
- Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y., and Brown, R. F.** (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY 294002). *J Biol Chem* **269**, 5241-5248.
- von Figura, K.** (1977). Human alpha-N-acetylglucosaminidase. 1. Purification and properties. *Eur.J Biochem.* **80**, 523-533.
- 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.
- Wiedemann, A., Linder, S., Grassl, G., Albert, M., Autenrieth, I., and Aepfelbacher, M.** (2001). Yersinia enterocolitica invasin triggers phagocytosis via beta1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages. *Cell Microbiol.* **3**, 693-702.
- Willumsen, B. M., Christensen, A., Hubbert, N. L., Papageorge, A. G., and Lowy, D. R.** (1984). The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* **310**, 583-586.
- 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.
- Wright, S. D. and Griffin, F. M., Jr.** (1985). Activation of phagocytic cells' C3 receptors for phagocytosis. *J Leukoc.Biol* **38**, 327-339.
- Wu, D., Huang, C. K., and Jiang, H.** (2000). Roles of phospholipid signaling in chemoattractant-induced responses. *J Cell Sci* **113 (Pt 17)**, 2935-2940.
- Zhang, X., Bi, E., Novick, P., Du, L., Kozminski, K. G., Lipschutz, J. H., and Guo, W.** (2001). Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion. *J Biol.Chem.* **276**, 46745-46750.
- 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.
- Zheng, Y., Bagrodia, S., and Cerione, R. A.** (1994). Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *J Biol.Chem.* **269**, 18727-18730.
- Zheng, Y.** (2001). Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem.Sci* **26**, 724-732.

VIII. ANHANG**VIII.1. Primer-Sequenzen****VIII.1.1. Mutagenese-Primer**

Name	Sequenz 5' → 3'
GAP-Gex-f	CCGGACTCAGAAGAATTCCTATGGATCCGC
GAP-Gex-r	AATTCGCCCTTGAATTCTCAGAGCCCCG
GAP-Xho-f	CCGGACTCAGAACTCGAGCTATGGATCCGC
GAP-Xho-r	AATTCGCCCTTCTCGAGTCAGAGCCCCG
GAP-R282/3A-f	ACCGAGGGCATCTTCGCCGCATCGGCCAACAC
GAP-R282/3A-r	GTGTTGGCCGATGCGGCGAAGATGCCCTCGGT
GAP-dP-f	GCCCCGCGACAGCCAACCAGCAGTTTGG
GAP-dP-r	GCTGGTTGGCTGTCGCGGGGCTCTTCTG
BCH-f2	GGCCTCGAGTCGTGTTTAGTGCC
BCH-r2	TTGAGGAATTCTCAGCGAGGGATCC
mGAP-fl-f	TCTGCTTCTCTCGAGCCATGGACC
mGAP-fl-r	CTGGAGGTGGAATTCTCAGACCCC
Red-f	CTCAGATCTCGAGATGGATCCGC
Red-r	GACTGCAGAATTCCTGAGAGCC
MG-f	GGACTCGAATTCCGAGCTATGG
MG-r	TCCGTCGTCGACATATTTCTCAGAG

VIII.1.2. Sequenzierungs-Primer

Name	Sequenz 5' → 3'
GAP-int	CCTGAAATCCACACAGAAG
GFP-f	ATCACTCTCGGCATGGAC
GFP-r	TCTACAAATGTGGTATGGC
Gex-5	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
Gex-3	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG
mmG-f	CAGCCAGGCTTCTCTTCT
mmG-r	AATGCCAGGAGGACAAGTCC
mmG-int	CTCTGTACATCGTGCACCC
mGAP-int	CTACCGAGAGTTTGACCG
MAL-f	AAGCCCTGAAAGACGCGCAGAC
MAL-r	GGCGATTAAGTTGGGTAACGCC

VIII.2. Zur Klonierung verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' → 3'
PPro-f	GATCCCCCAAGCCCATGCCCCACGGCCCCCTGCC CTGAG
PPro-r	AATTCTCAGGGCAGGGGGGCGTGGGGGCATGGGC TTGGGG
PPro5-f	GATCCAGCCCCGCGACAGCCCCAAGCCCATGCCCC ACGGCCCCCTGCCCTGAG
PPro5-r	AATTCTCAGGGCAGGGGGGCGTGGGGGCATGGGC TTGGGGGCTGTCGCGGGGCTG

Name	Sequenz 5' → 3'
PPro-GFP-f	TCGAGCCCCCAAGCCCATGCCCCACGGCCCCCCTG CCCTGAG
PPro-GFP-r	AATTCTCAGGGCAGGGGGGGCCGTGGGGGCATGGGC TTGGGGGC
PPro5-GFP-f	TCGAGCCAGCCCCGCGACAGCCCCAAGCCCATGCCC CCACGGCCCCCCTGCCCTGAG
PPro5-GFP-r	AATTCTCAGGGCAGGGGGGGCCGTGGGGGCATGGGC TTGGGGGCTGTCGCGGGGCTGGC
T _V -f	GATCCCCCCTGTGACACACCTGAAGTTTCAAGAGAAC TTCAGGTGTGTCACAGGTTTTTGGAAA
T _V -r	AGCTTTTCCAAAAACCTGTGACACACCTGAAGTTTCA AGAGAAGTTCAGGTGTGTCACAGGGGG
T _M -f	GATCCCCGTGCTCAAGTATGATGACTTTCAAGAGAAG TCATCATACTTGAGCACTTTTTGGAAA
T _M -r	AGCTTTTCCAAAAAGTGCTCAAGTATGATGACTTTCA AGAGAAGTCATCATACTTGAGCACGGG
T _H -f	GATCCCCCACTAACTTGGCTGTAGTCTTCAAGAGAGA CTACAGCCAAGTTAGTGTTTTTGGAAA
T _H -r	AGCTTTTCCAAAAACACTAACTTGGCTGTAGTCTTCA AGAGAGACTACAGCCAAGTTAGTGGGG

VIII.3. Vektorenkarten

1. 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.

2. pEGFP-C1, pEGFP-C3 und pEGFP-N3

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

3. pDsRed1-N1

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

VIII.4. DNA- und Proteinsequenz von Cdc42GAP

VIII.4.1. DNA-Sequenz

```

61 ggcttgcca tggatccgct ctcaagctg caggatgac tgacctgga tgacaccagc
121 gaggctctga accagctgaa gctggcctcc atcgatgaga agaactggcc ctcgatgaa
181 atgcctgact tccccagctc agatgactcc aaaagcagct ccccggaact tgcacacac
241 ctgaagtggg atgaccata ctatgacatc gcccgccacc agatcgtgga ggtggcagga
301 gatgacaagt atgggaggaa gatcattgtg ttagtgctc gtcgaatgcc cccagccac
361 cagctcgacc acagcaagct cctggggtag ctgaagcaca ccctggacca gtacgtggag
421 agtgactaca cacttctgta tctgaccac ggcctgacca gcgacaacaa gcctccctc
481 agctggctcc gtgatgccta ccgggagttt gaccgcaagt acaagaagaa catcaaggcc
541 ttgtacatcg tgcattcaac catgttcac aaaactctgc tcatcctctt caagcccctc

```

```

601 atcagcttca agttcgggca gaagatcttc tatgtgaatt acctgagcga gctgagcgag
661 cacgtgaagc tggagcagct ggggatccct cgccaagtgc tcaaataatga cgacttcctg
721 aaatccacac agaagagccc cgcgacagcc cccaagccca tgcccccacg gccccccctg
781 cccaaccagc agtttggagt ctcgctgcag cacctccagg agaagaatcc agagcaggag
841 cccattccca ttgtactcag ggagactggt gcctacttac aggccacgc tctcaccacc
901 gagggcacatc tccgaggtc ggccaacacc caagtggctc ggggaagtgc gcagaagtac
961 aacatggggc tgctgtgga tttcgaccag tacaatgagc tgcacctgcc agcagtcac
1021 ctcaagacct tcctccggga gcttctgag cccctgctca cctttgacct ctacccccat
1081 gtggtgggct tcctcaacat tgatgaaagc cagaggggtc cagcgacact gcaggtcctc
1141 cagacgctgc ccgaggagaa ctaccagggtg cttcgtttcc tgactgcttt cctgggtgcag
1201 atttctgcac acagtgacca gaacaagatg accaacacta acctggctgt tgttttcggc
1261 cctaacctgc tgtgggcaaa ggatgccc atcacctca aggccattaa tcccatcaac
1321 accttcacca agttccttct ggatcaccaa ggggagctgt tcccaagccc ggacccagc
1381 gggctctga

```

Abb.32: Kodierende Sequenz von Cdc42GAP. Start- und Stopcodon sind grau unterlegt, der kodierende Bereich für die BCH-Domäne unterstrichen, die für die AS der Poly-Proilin-Domäne kodierenden Basen fett und kursiv gedruckt und die kodierende Sequenz der konservierten Arg-Reste eingerahmt.

VIII.4.2. Protein-Sequenz

Aminosäuresequenz von Aminosäure 1 bis 439

```

MDPLSELQDDLTLDDTSEALNQLKLASIDEKNWPSDEMPDFPKSDDSKSSSPPELVT
HLKWDDPYDIARHQIVEVAGDDKYGRKIIVFSACRMPPSHQLDHSKLLGYLKHTL
DQYVESDYTLLEYLHHGLTSDNKPSLSWLRDAYREFDRKYKKNIKALYIVHPTMFIK
TLLILFKPLISFKFGQKIFYVNYLSEELSEHVKLEQLGIPRQVLKYDDFLKSTQKSP
ATAPKPMPRPPLPNQQFGVSLQHLQEKNEQEPPIPIVLRRETVAYLQAHALTTEGI
FRRSANTQVVREVQQKYNMGLPVDQYNEHLPAVILKTFLRELPEPLLLTFDLYP
HVVGFNLNIDESQRVPATLQVLQTLPEENYQVLRFLTAFLVQISAHSDQNKMTNTNL
AVVFGPNLLWAKDAAITLKAINPINTFTKFLLDHQGELFPSPDPSGL

```

Abb.33: Proteinsequenz von Cdc42GAP. Die BCH-Domäne (AS 86-208) ist unterstrichen, die Poly-Proilin-Domäne (AS 228-238) fett gedruckt und die katalytische GAP-Domäne (AS 260-439) kursiv geschrieben. Innerhalb der GAP-Domäne sind die beiden essentiellen Arg-Reste (AS 282 und 283) grau unterlegt.

VIII.5. Inhalt der Video-CD

(1) Der Transport von Cdc42GAP erfolgt entlang von Mikrotubuli

Film 1: HeLa-Zellen, transfiziert mit pEGFP-Cdc42GAP, inkubiert mit Invasin-beads und anschließend behandelt mit Nocodazol

Um die Internalisierung der Invasin-Beads zu ermöglichen, wurden die Zellen erst nach der Inkubation der Beads mit Nocodazol behandelt. GFP-Cdc42GAP (grün) ist auch nach Behandlung mit Nocodazol an vesikulären Strukturen lokalisiert. Im Gegensatz zu unbehandelten Zellen ist jedoch die Dynamik der Cdc42GAP-Vesikel inhibiert, so daß sie sich keine Cdc42GAP-haltigen Vesikel mehr um die aufgenommenen Invasin-Beads anlagern. Die Aufnahmezeit ist in der linken oberen Ecke des Films zu sehen.

Dauer des Films: 5 sec (entspricht in Echtzeit 7 min).

(2) Der Kontakt zwischen Cdc42GAP- und sauren Vesikeln entsteht über einen „Kiss-and-run“-Mechanismus

Film 2: HeLa-Zellen, transfiziert mit pEGFP-Cdc42GAP, und inkubiert mit LysoTracker (LYTr)

In HeLa-Zellen ist GFP-Cdc42GAP (grün) bereits im unbehandelten Zustand an vesikulären Strukturen lokalisiert. LYTr-positive Vesikel sind in Rot dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die hohe Motilität beider Vesikelarten. Cdc42GAP- und LYTr-Vesikel treten kurzzeitig miteinander in Kontakt, wobei es zu partiellen Überlappungen (Gelb) kommt. Anschließend lösen sich die beiden Vesikeln sehr rasch wieder voneinander und werden in unterschiedliche Richtungen in der Zelle transportiert. Dieser als „Kiss-and-run“-Mechanismus bezeichnete Vorgang ist besonders gut in der rechten Zelle zu beobachten. Die Aufnahmezeit ist in der linken oberen Ecke des Films zu sehen. Dauer des Films: 6 sec (entspricht in Echtzeit 20 min).

(3) Cdc42GAP-positive Vesikel reichern sich am Phagosom an

Film 3A: HUVEC, transfiziert mit pEGFP-Cdc42GAP und inkubiert mit *Staphylococcus aureus*

S. aureus invadiert in HUVEC und erscheint in den Zellen als Aussparung (einzelne, kugelförmige Aussparungen oder größere „Lücken“, die aus Tetraden von *S.aureus* resultieren). GFP-Cdc42GAP-positive Vesikel erscheinen als helle Punkte unterschiedlicher Größe. GFP-Cdc42GAP bildet zunächst eine ringförmige Struktur um die *S. aureus*-Tetraden. Danach ist zu erkennen, daß Cdc42GAP-Vesikel zu dem Phagosom, das die Bakterien enthält, transportiert werden, dort kurzzeitig verbleiben und sich dann wieder ablösen. Die Aufnahmezeit ist in der linken oberen Ecke des Films zu sehen. Dauer des Films: 19 sec (entspricht in Echtzeit 23 min).

Film 3B: HeLa-Zellen, transfiziert mit pEGFP-Cdc42GAP und inkubiert mit *Yersinia enterocolitica* Invasin-beschichteten beads

Die Invasin-Beads erscheinen in den Zellen in Form großer, kugelförmiger Aussparungen. GFP-Cdc42GAP (grün) ist in vesikulären Strukturen unterschiedlicher Größe lokalisiert. Deutlich zu erkennen ist, daß die Cdc42GAP-haltigen Vesikel in Richtung des Phagosoms transportiert werden, sich kurzzeitig um dieses herum anlagern und anschließend wieder ablösen. Auch hier ist zu beobachten, daß GFP-Cdc42GAP teilweise einen Ring um das Phagosom, das die internalisierten *Beads* enthält, bildet. Die Aufnahmezeit ist in der linken oberen Ecke des Films zu sehen. Dauer des Films: 17 sec (entspricht in Echtzeit 30 min).

IX. DANKSAGUNG

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

Dem Leiter der Max von Pettenkofer Instituts, Herrn **Prof. Dr. Dr. J. Heesemann**, danke ich für die freundliche Aufnahme in sein Institut und die wohlwollende Unterstützung.

Ich danke Herrn **Prof. Dr. T. Cremer** für die Vertretung meiner Arbeit vor der Biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ich danke allen Kooperationspartnern, die mir ihre Konstrukte oder Antikörper zu Verfügung gestellt haben: H. Faix, L. Feig, G. Fritz, K. Giehl, P. Gierschik, A. Hall, O. Radmark, C. Rottner, C. Roy, M. Schleicher, J.V. Small und T. Takenawa.

Mein Dank geht an Herrn **Dr. Klaus Ruckdeschel** und Frau **Gudrun Pfaffinger**, die mir in allen Fragen rund um J774-Makrophagen stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

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 Erfahrung, die ich im Umgang mit meinen Mitmenschen sammeln durfte.

Mein besonderer Dank gilt dem Doktorandenteam aus dem „Gartenpavillon“ – **Anna, Daniel, Florian, Katharina und Petra** – für das erfreuliche tägliche Miteinander und viele lustige Stunden, auch außerhalb der Arbeit.

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 gewissenhafte Erfüllung aller Arbeiten.

Ich danke **Christian** für seinen administrativen Einsatz, die Rettung meines permanent suboptimal arbeitenden Accounts und seinen subtilen Humor, den wir immer wieder in unseren Freitagbesprechungen erleben durften.

Mein Dank geht an **Georg** für den regen Austausch an „Lebenserfahrung“, die Stunden des Philosophierens und Diskutierens und die gute Zusammenarbeit, auch über Gruppen- und Landesgrenzen hinaus.

Andreas danke ich für seine unendliche Geduld, seine konstruktive Kritik, sein Vertrauen und die Fähigkeit, mich immer wieder zum Lachen zu bringen.

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. Besonders danke ich beiden für den großen Freiraum, den sie mir während der gesamten Zeit gewährt haben, die vielen Ideen und Vorschläge, die ständige Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt für das Vertrauen, das sie mir entgegen gebracht haben.

X. LEBENS LAUF

Name: Barbara Schell

Geburtsdatum: 22.11.1974

Familienstand: ledig

Geburtsort: Neunkirchen/Saar

Schule: 1981-1984 Maximilian-Kolbe Schule, Wiebelskirchen (Saarland)
 1984-1994 Staatliches Gymnasium Ottweiler (Saarland)
 1994 Abitur (Note: 1,3)

Praktikum: 1994 Institut Fresenius, St.Wendel (Saarland)
 Labor für mikrobiologische Qualitätskontrolle

Studium: 1994-1995 Universität des Saarlandes, Saarbrücken
 1995-1999 Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg

1999 Diplom an der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg
Fächerkombination: Molekularbiologie (Hauptfach)
 Zellbiologie und Biochemie
 (Nebenfächer)

1999 Diplomarbeit bei Prof. Dr. E. Fuchs am Institut für
 Molekulare Genetik der Ruprecht-Karls-Universität,
 Heidelberg mit dem Titel:
 „Sequenz- und Strukturabhängigkeit der
 Translationsinitiationsregion des T7-Gens 1,3:
 Bedeutung zweier unmittelbar aufeinanderfolgender
 AUG-Triplets für die Translationsinitiation“
 Gesamtnote: sehr gut (1,4)

Promotion: 2000-2003 Doktorarbeit am Institut für Prophylaxe und
 Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten und am Max von
 Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische
 Mikrobiologie unter Leitung von Prof. Dr. M.
 Aepfelbacher und PD Dr. S. Linder und Betreuung durch
 Prof. Dr. T. Cremer mit dem Thema „Subzelluläre
 Lokalisation und Funktion des RhoGTPase-Regulators
 Cdc42GAP in Makrophagen“