

Aus dem Institut für Pharmakologie  
der  
Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt über das Institut für Pharmakologie,  
Toxikologie und Pharmazie  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

**Beteiligung der Phospholipase D  
an der Regulation der Synthese von  
Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat  
durch Arf- und Rho-GTPasen**

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

**Marei Signe Corinne Mühlhoff**

aus Düsseldorf

München 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle  
Referent: Univ.-Prof. Dr. R. Schulz  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr.hc.mult. H.-G. Liebich

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Inhaltsverzeichnis.....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>1. Verwendete Abkürzungen.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. Einleitung.....</b>   | <b>3</b>  |
| 2.1 Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat: Funktionen und Synthese .....         | 3         |
| 2.1.1 Zelluläre Funktionen von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat.....        | 3         |
| 2.1.2 Synthese von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat.....                    | 4         |
| 2.2 Monomere GTPasen.....   | 6         |
| 2.2.1 Rho-GTPasen .....   | 6         |
| 2.2.2 Arf-GTPasen .....   | 7         |
| 2.2.3 Die Rolle von GTPasen im Phosphoinositidmetabolismus.....                 | 9         |
| 2.3 Phospholipase D.....  | 9         |
| 2.3.1 Physiologische Bedeutung der Phospholipase D .....                        | 9         |
| 2.3.2 PLD-Isoenzyme: Struktur und subzelluläre Lokalisation .....               | 10        |
| 2.3.3 Regulation der PLD-Aktivität .....  | 11        |
| 2.3.4 Regulation der PLD-Aktivität in HEK-293-Zellen.....                       | 13        |
| 2.4 Lipid Rafts und Caveolae .....  | 14        |
| 2.5 Zielsetzung der Arbeit.....   | 16        |
| <b>3. Material und Methoden.....</b>  | <b>17</b> |
| 3.1 Materialien .....   | 17        |
| 3.1.1 Chemikalien .....   | 17        |
| 3.1.2 Radioaktive Chemikalien .....   | 19        |
| 3.1.3 Antikörper .....  | 19        |
| 3.1.4 Sonstige Verbrauchsmaterialien.....                                       | 19        |
| 3.2 Methoden.....   | 20        |
| 3.2.1 Kultivierung von HEK-293-Zellen .....                                     | 20        |
| 3.2.2 Präparation von Plasmid-DNA (Birnboim & Doly, 1979) .....                 | 21        |
| 3.2.3 Verwendete Konstrukte.....  | 21        |
| 3.2.4 Transfizierung von HEK-293-Zellen .....                                   | 22        |
| 3.2.5 Proteinbestimmung (Bradford, 1976).....                                   | 23        |
| 3.2.6 Bestimmung der PIP-5-kinase-Aktivität (Oude Weernink et al., 2000b) ..... | 23        |
| 3.2.7 Bestimmung des zellulären Gehaltes von PIP <sub>2</sub> .....             | 25        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.2.8     | Isolierung von Caveolin-angereicherten Membranen .....   | 27        |
| 3.2.9     | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....  | 28        |
| 3.2.10    | Immunoblot-Analyse (Towbin et al., 1979).....  | 29        |
| 3.2.11    | Datenauswertung .....  | 30        |
| <b>4.</b> | <b>Ergebnisse .....</b>  | <b>31</b> |
| 4.1       | Stimulation der PIP <sub>2</sub> -Synthese durch Phospholipase D .....   | 31        |
| 4.2       | PLD1 ist ein Effektor von Arf1 im Signalweg zur PIP-5-kinase.....  | 35        |
| 4.3       | Beteiligung der PLD1 an der Stimulation der PIP-5-kinase durch Rho und Rho-kinase<br>41                          |           |
| 4.4       | Effekte von Arf1 und PLD1 auf subzelluläre PIP <sub>2</sub> -Pools .....   | 45        |
| <b>5.</b> | <b>Diskussion .....</b>  | <b>50</b> |
| 5.1       | Beteiligung der Phospholipase D an der Regulation der Synthese von<br>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ..... | 50        |
| 5.2       | Beteiligung der PLD1 an der durch Arf1 und Rho/Rho-kinase regulierten PIP <sub>2</sub> -<br>Synthese .....       | 52        |
| <b>6.</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>   | <b>59</b> |
| 6.1       | Summary .....  | 60        |
| <b>7.</b> | <b>Referenzen.....</b>   | <b>61</b> |
|           | <b>Danksagung.....</b>   | <b>72</b> |

# 1. Verwendete Abkürzungen

|  |   |
|--|---|
| Arf  | ADP-Ribosylierungs-Faktor   |
| BFA  | Brefeldin A   |
| BSA  | bovines Serumalbumin  |
| COP  | <i>Coat</i> -Protein  |
| DAG  | Diacylglycerol  |
| DMEM                                       | <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>                           |
| DMSO                                       | Dimethylsulfoxid  |
| DTT  | 1,4-Dithiothreitol  |
| ECL <sup>®</sup>                           | <i>enhanced chemoluminescence</i>                                   |
| FKS  | Fetales Kälberserum   |
| GAP  | GTPase-aktivierendes Protein  |
| GDI  | Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor                             |
| GEF  | Guaninnukleotid-Austauschfaktor                                     |
| GPCR                                       | G-Protein-gekoppelter Rezeptor                                      |
| G-Protein                                  | Guaninnukleotid-bindendes Protein                                   |
| GTP $\gamma$ S                             | Guanosin-5'-[ $\gamma$ -thio]-triphosphat                           |
| HBSS                                       | <i>Hank's balanced salt solution</i>                                |
| HeBS                                       | <i>HEPES-buffered saline</i>  |
| HEK-293-Zellen                             | humane embryonale Nierenzellen                                      |
| HEPES                                      | <i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-piperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure |
| IP <sub>3</sub>                            | Inositol-1,4,5-trisphosphat   |
| LPA  | Lysophosphatidsäure   |
| mAChR                                      | muskarinerner Acetylcholin-Rezeptor                                 |
| PA   | Phosphatidsäure   |
| PBS  | <i>phosphate-buffered saline</i>                                    |
| PE   | Phosphatidylethanol   |
| PH   | Pleckstrin-Homologie  |
| PI   | Phosphatidylinositol  |
| PI(4)P, PIP                                | Phosphatidylinositol-4-phosphat                                     |
| PI(4,5)P <sub>2</sub> , PIP <sub>2</sub>   | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat                                |
| PI(3,4,5)P <sub>3</sub> , PIP <sub>3</sub> | Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat                             |
| PI-3-kinase                                | Phosphoinositid-3-kinase  |

---

|              |  |
|--------------|--|
| PI-4-kinase  | Phosphoinositid-4-kinase                   |
| PIP-5-kinase | Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-kinase   |
| PITP         | Phosphatidylinositol-Transfer-Protein      |
| PKC          | Proteinkinase C                            |
| PLC          | Phospholipase C                            |
| PLD          | Phospholipase D                            |
| PMSF         | Phenylmethylsulfonylfluorid                |
| PS           | Phosphatidylserin                          |
| PX           | Phox-Homologie                             |
| SDS          | <i>sodium dodecylsulfate</i>               |
| TBS          | <i>Tris-buffered saline</i>                |
| TCA          | Trichloressigsäure                         |
| TEMED        | <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin |
| Tris         | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan           |

## 2. Einleitung

### 2.1 Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat: Funktionen und Synthese

#### 2.1.1 Zelluläre Funktionen von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub> oder kurz PIP<sub>2</sub>) nimmt eine zentrale Stellung in der intrazellulären Signaltransduktion ein (Toker, 2002). Dieses Membranphospholipid reguliert in eukaryotischen Zellen eine Vielzahl wichtiger zellulärer Funktionen, wie die Reorganisation des Aktinzytoskelettes (Sechi & Wehland, 2000), die Aktivität von Ionenkanälen (Hilgemann & Ball, 1996; Shyng *et al.*, 2000) sowie endozytotische (Fensome *et al.*, 1996; Way *et al.*, 2000) und exozytotische Vorgänge im Vesikeltransport (Jost *et al.*, 1998; Marsh *et al.*, 1999). PIP<sub>2</sub> kann sowohl als Substrat von Enzymen dienen als auch direkt mit intrazellulären Proteinen interagieren und so deren Aktivität und Lokalisation beeinflussen (Toker, 1998).

Schon lange bekannt ist die Funktion von PIP<sub>2</sub> als Substrat der zwei Enzymfamilien Phospholipase C (PLC) und Phosphoinositid-3-kinase (PI-3-kinase). Die rezeptorregulierte PLC wird durch zahlreiche Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren stimuliert und führt durch Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> zur Bildung der beiden sekundären Botenstoffen Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) (Berridge & Irvine, 1989; Berridge, 1993). IP<sub>3</sub> bindet an spezifische Rezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum und löst dadurch eine Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus den intrazellulären Speichern aus. Die Ca<sup>2+</sup>-Ionen ihrerseits können durch Bindung an verschiedene Proteine, wie z.B. Calmodulin, zahlreiche zelluläre Vorgänge regulieren (Clapham, 1995). Der zweite Botenstoff DAG führt zusammen mit Ca<sup>2+</sup> zu einer Aktivierung von Isoformen der Proteinkinase C (PKC), die besonders an Prozessen wie Zellwachstum und -differenzierung beteiligt sind (Nishizuka, 1995). Die PI-3-kinasen, welche PIP<sub>2</sub> an der D3-Position des Inositolringes zu dem sekundären Botenstoff Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PI(3,4,5)P<sub>3</sub> oder kurz PIP<sub>3</sub>) phosphorylieren, werden ebenfalls durch verschiedene Rezeptortyrosinkinasen und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) aktiviert und greifen damit ebenfalls in Zellwachstumsprozesse ein (Carpenter & Cantley, 1996).

Die Regulation des Aktinzytoskelettes durch PIP<sub>2</sub> erfolgt über Bindung von PIP<sub>2</sub> an Aktin-bindende Proteine, zuerst beschrieben für Profilin und Gelsolin, später auch für  $\alpha$ -Aktinin, Vinculin, Filamin, Cofilin, gCap39 und Capz (Janmey, 1994). Diese sogenannten

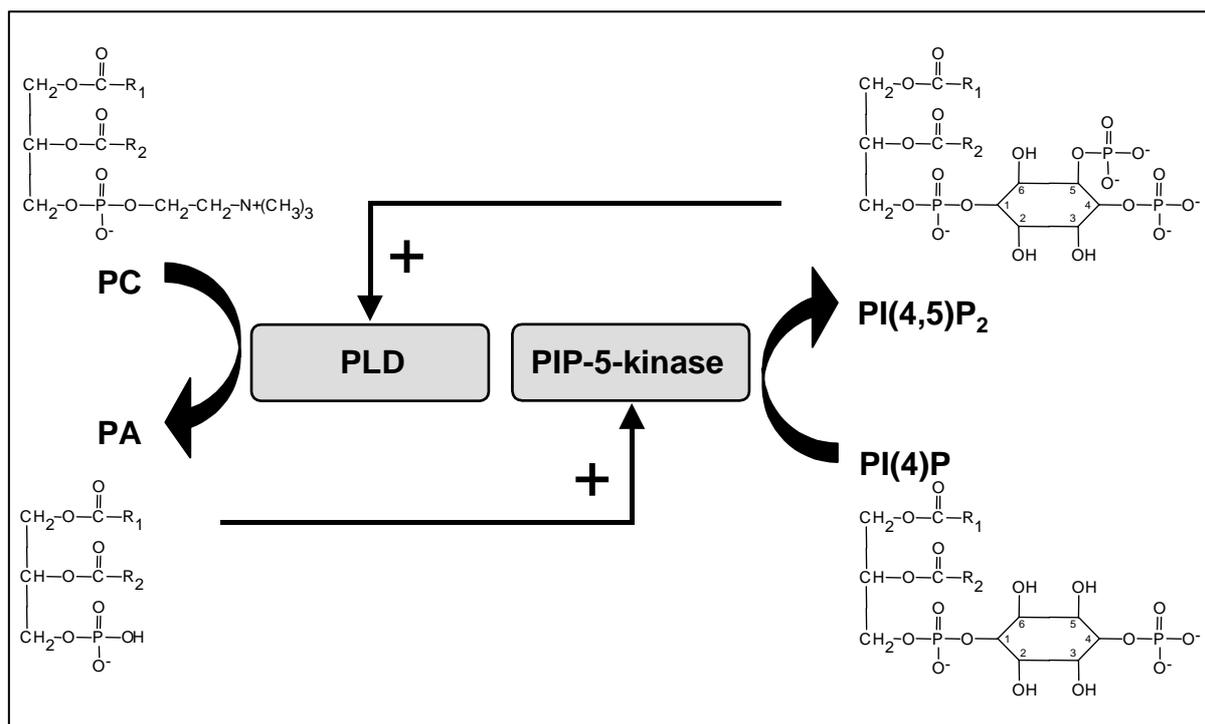
*Actin-capping* Proteine halten die Aktinfilamente von spontaner Polymerisation ab. Durch die Bindung von Phosphoinositiden, vor allem PIP<sub>2</sub>, werden die Aktin-bindenden Proteine von den *barbed ends* der Aktinfilamente entfernt, was anschließend zur Aktinpolymerisierung führt (Schafer *et al.*, 1996).

Neben seiner Rolle als Vorläufer von Botenstoffen und seinen Wirkungen auf das Aktinzytoskelett kann PIP<sub>2</sub> mit vielen weiteren Proteinen und Enzymen interagieren. So wurde PIP<sub>2</sub> als ein essentieller Kofaktor und spezifischer Aktivator der Phospholipase D (PLD) identifiziert (Lisovitch *et al.*, 1994, Schmidt *et al.*, 1996a). Des Weiteren kann PIP<sub>2</sub> die Funktion der monomeren GTPase Arf1 regulieren, die gemeinsam mit der PLD an der Regulation des Vesikeltransportes in der Zelle beteiligt ist. Phosphoinositide können sowohl direkt an Arf1 binden (Randazzo, 1997) als auch mit Arf-spezifischen GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs) oder Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) interagieren. Auf diese Weise können Phosphoinositide die Aktivität und insbesondere die subzelluläre Lokalisation von Arf1 beeinflussen (Paris *et al.*, 1997; Klarlund *et al.*, 1998). Die Arf-GAPs und Arf-GEFs sowie auch andere Proteine, die mit hoher Affinität und Spezifität an Phosphoinositide binden, besitzen eine als Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne bezeichnete Struktur. Dieses Phosphoinositid-bindende Motiv wurde erstmals in Pleckstrin, einem Substrat der PKC identifiziert und ist bis heute in mehr als 100 Proteinen gefunden worden. Bereits Harlan *et al.* (1994) erkannten die spezifische Bindung von PIP<sub>2</sub> an Proteine mit PH-Domänen und deren Bedeutung bei der Translokation von Proteinen an Membranen. Neben PH-Domänen sind auch Phox-Homologie (PX)-Domänen an direkten Wechselwirkungen mit spezifischen Phosphoinositiden beteiligt (Wishart *et al.*, 2001; Simonsen & Stenmark, 2001). Durch die Interaktion von PIP<sub>2</sub> mit diesen Domänen kann die intrazelluläre Lokalisation, aber auch die Aktivität und Funktion einer Vielzahl von Signalmolekülen moduliert werden (Kavran *et al.*, 1998; Hirata *et al.*, 1998; Teruel & Meyer, 2000; Cullen *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2001; Itoh & Takenawa, 2002).

### **2.1.2 Synthese von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat**

PI(4)P, welches durch Phosphorylierung an der D4-Position von PI durch die PI-4-kinasen entsteht, dient im Phosphoinositid-Metabolismus als Substrat der PIP-5-kinase für die Synthese von PI(4,5)P<sub>2</sub>. Die Bezeichnungen der Kinasen ergeben sich aus der Position der Phosphorylierung am Inositolring der Phosphoinositide. Aufgrund von Proteinaufreinigungen und biochemischer Charakterisierung wurden anfangs Typ I und Typ II PIP-5-kinasen unterschieden. Später wurde jedoch festgestellt, dass die Typ II-Kinasen (Isoenzyme  $\alpha$ ,  $\beta$  und

$\gamma$ ) nur die D4-Position am Inositolring von PI(5)P und PI(3)P phosphorylieren. Sie werden daher heute als PIP-4-kinasen bezeichnet. Die Typ I-Kinasen (Isoenzyme  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) hingegen phosphorylieren die Phosphoinositide PI(3)P, PI(4)P und PI(3,4)P<sub>2</sub> an der D5-Position des Inositolringes (Rameh *et al.*, 1997; Hsuan *et al.*, 1998; Ishihara *et al.*, 1996; Ishihara *et al.*, 1998). PI(4,5)P<sub>2</sub> kann somit in der Zelle theoretisch über zwei Synthesewege gebildet werden. Der heute angenommene Hauptsyntheseweg verläuft durch die Phosphorylierung von PI(4)P zu PI(4,5)P<sub>2</sub> mittels der PIP-5-kinasen. Ein zweiter möglicher Syntheseweg besteht in der Phosphorylierung von PI(5)P durch die PIP-4-kinasen. Die Bedeutung dieses alternativen Syntheseweges *in vivo* bleibt noch zu klären. Alle drei Isoformen der PIP-5-kinase können *in vitro* durch Phosphatidsäure (PA), dem Reaktionsprodukt der PLD aktiviert werden (Jenkins *et al.*, 1994; Ishihara *et al.*, 1998). Hierdurch ergibt sich ein positiver Rückkopplungsmechanismus im Phospholipid-metabolismus (siehe Abb. 1).



**Abb. 1. Interaktion zwischen PLD und PIP-5-kinase**

Diese kurzen Ausführungen lassen erkennen, dass PIP<sub>2</sub> ein vielseitiges Phospholipid mit zahlreichen unterschiedlichen zellulären Funktionen ist und dass Änderungen des zellulären PIP<sub>2</sub>-Gehaltes sicherlich bedeutende Auswirkungen auf die Zellphysiologie haben

sollten. Dies lässt eine genaue Regulation der Synthese von PIP<sub>2</sub> durch die Kinasen und dessen Abbau durch Phosphatasen vermuten. Die zeitliche und räumliche Regulation der PIP<sub>2</sub>-Synthese ist jedoch nur fragmentarisch untersucht worden und bisher noch weitgehend ungeklärt.

## 2.2 Monomere GTPasen

Monomere GTPasen stellen, ähnlich wie die heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden Proteine (G-Proteine) wichtige intrazelluläre Informationsüberträger dar, die zahlreiche zelluläre Vorgänge regulieren (Bourne *et al.*, 1991; Zerial & Huber, 1995). Sie sind aus jeweils einer Polypeptidkette mit einer relativen Molekülmasse von 20-40 kDa aufgebaut. Sie besitzen eine intrinsische GTPase-Aktivität und kommen in zwei Aktivitätszuständen vor. Sie sind inaktiv im GDP-gebundenem Zustand, während sie nach GDP/GTP-Austausch aktiv sind und dann mit spezifischen Effektoren interagieren. Die Inaktivierung erfolgt durch Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP. Die Regulation des Aktivitätszustandes obliegt verschiedenen Proteinen: hierzu gehören spezifische GEFs, durch welche die Dissoziation von GDP und dadurch die Bindung von GTP gefördert wird, und spezifische GAPs, die die hydrolytische GTPase-Aktivität und damit die Abschaltung der GTPasen vermitteln. Schließlich sind für Mitglieder der Rho- und Rab-Familie Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) beschrieben, die den Nukleotidaustausch hemmen und den GDP-gebundenen, inaktiven Zustand stabilisieren (Boguski & McCormick, 1993).

Gegenwärtig sind mehr als 100 verschiedene monomere GTPasen bekannt, die in fünf verschiedene Familien (Ras, Ran, Rab, Rho und Arf) zusammengefasst werden (Hall, 2000; Takai *et al.*, 2001). Mitglieder der Ras-Familie spielen eine Rolle bei der Kontrolle von Zellwachstum und -differenzierung sowie in der Genexpression (Feig *et al.*, 1996; Vojtek & Der, 1998; Reuther & Der, 2000). Ran-Proteine sind an der Steuerung des Proteintransportes in und aus dem Zellkern und an der Organisation von Mikrotubuli beteiligt (Hall, 2000; Azuma & Dasso, 2000; Takai *et al.*, 2001). Mitglieder der Rab-Familie regulieren den intrazellulären Vesikeltransport und Membranverkehr (Chavrier & Goud, 1999). Die Rho- und Arf-GTPasen werden im Folgenden etwas ausführlicher beschrieben.

### 2.2.1 Rho-GTPasen

Die Familie der Rho-GTPasen umfasst 14 Mitglieder, zu welchen Rac (Isoformen 1-3), Cdc42, Tc10, Rho (Isoformen A-E, G, H) und Rnd (1 und 2) zählen. Besonders gut

charakterisiert ist die Funktion der Subtypen RhoA, Rac1 und Cdc42. Im aktiven GTP-gebundenem Zustand interagieren die Rho-Proteine mit verschiedenen nachgeschalteten Effektoren und regulieren hierdurch insbesondere die Reorganisation des Aktinzytoskelettes, aber auch eine große Zahl weiterer Signalprozesse (Hall, 1998; Schmidt & Hall, 1998; Kjøller & Hall, 1999; Schmitz *et al.*, 2000). So gibt es gute Daten dafür, dass Rho-Proteine an der Ausbildung der Zellmorphologie (Paterson *et al.*, 1990), Zellmotilität (Takaishi *et al.*, 1994), Zelladhäsion (Tominaga *et al.*, 1993), Zytokinese (Kishi *et al.*, 1993), Zellproliferation (Olson *et al.*, 1995), Endozytose (Schmalzing *et al.*, 1995; Lamaze *et al.*, 1996), Apoptose (Moorman *et al.*, 1996) und an der Regulation der Genexpression (Hill *et al.*, 1995) beteiligt sind. Die Bedeutung der Rho-Proteine bei der Regulation und Organisation des Aktinzytoskelettes wurde durch Mikroinjektion von konstitutiv aktiven Rho-Mutanten belegt (Paterson *et al.*, 1990). So induziert aktives RhoA die rasche Ausbildung von Aktin-Stressfasern und Adhäsionspunkten, während Rac und Cdc42 zur Ausbildung von Lamellipodien (*membrane ruffles*) bzw. Filopodien (*microspikes*) führen (Bishop & Hall, 2000; Ridley, 2001).

Bei der Erforschung der zellulären Funktionen der Rho-GTPasen waren vor allem zwei clostridiale Toxine von Bedeutung, die Rho-Proteine spezifisch inaktivieren. Hierzu zählen das C3 Exoenzym von *Clostridium botulinum*, welches die Isoformen RhoA, B und C durch ADP-Ribosylierung inaktiviert (Aullo *et al.*, 1993), und das Toxin B von *Clostridium difficile*, das Rho, Rac und Cdc42 durch Monoglukosylierung eines Threoninrestes der Effektorregion inaktiviert (Just *et al.*, 1995). Diese bakteriellen Toxine sind damit bedeutende Werkzeuge in der Grundlagenforschung geworden und haben maßgeblich zur Aufklärung der zellulären Funktion der Rho-GTPasen beigetragen.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche nachgeschaltete Effektoren der Rho-Proteine identifiziert. Dazu gehören unter anderem verschiedene Serin/Threoninkinasen, wie die Rho-kinase (Leung *et al.*, 1995; Ishizaki *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 1996), die Citron-kinase (Madaule *et al.*, 1998; Di Cunto *et al.*, 1998) und die Proteinkinase N (Amano *et al.*, 1996a; Watanabe *et al.*, 1996). Hinsichtlich der Regulation des Phospholipid-metabolismus durch Rho-GTPasen sei auf die folgenden Abschnitte verwiesen.

### **2.2.2 Arf-GTPasen**

Die in der Phylogenie hochkonservierten Arf-Proteine werden ubiquitär exprimiert und kontrollieren grundlegende Ereignisse im intrazellulären Vesikeltransport einschließlich Vesikelbildung und Sekretion (Moss & Vaughan, 1995; Chavrier & Goud, 1999). Ihre Bezeichnung Arf, ADP-Ribosylierungs-Faktor, ist hergeleitet aus ihrer Funktion als Kofaktor

der durch Cholera-toxin katalysierten ADP-Ribosylierung von  $G\alpha_s$ -Proteinen (Kahn & Gilman, 1986). Die Superfamilie der Arf-Proteine wird aufgrund von Sequenzhomologien und Funktionen in Arf-Proteine (Arf1-6), Arf-like-Proteine (ARLs 1-7), SARs (SAR1a und 1b) und Arf-related-Protein (ARFRP1) eingeteilt. Die stark homologen Arf-Proteine selbst werden basierend auf genetischen und phylogenetischen Analysen und Proteingröße in drei Klassen eingeteilt: Klasse I (Arf1, Arf2, Arf3), Klasse II (Arf4, Arf5) und Klasse III (Arf6) (Moss & Vaughan, 1998; Chavrier & Goud, 1999).

Arf1, der am Besten untersuchte Vertreter der Arf-GTPasen, ist an der Regulation verschiedener Schritte der Vesikelbildung und an exo- und endozytotischen Vorgängen in der Zelle beteiligt (Stearns *et al.*, 1990). Arf1-Proteine sind hauptsächlich am Golgi-Apparat lokalisiert und vermitteln dort die Rekrutierung spezifischer Coat-Proteine (COPs) an die Membran, die der Ausbildung und der mechanischen Stabilität von Vesikeln dienen. Während der Vesikelknospung wird Arf1 in die Transportvesikel eingebaut und stellt sicher, dass die Vesikelinhaltsstoffe an das dafür vorgesehene Kompartiment in der Zelle abgegeben werden. Arf-Proteine sind auch an der Bildung von Clathrin-coats (AP-1) und Non-Clathrin-coats (COP1) beteiligt, die verschiedene selektive Transportschritte innerhalb der Zelle vermitteln (Schmid & Damke, 1995; Schekman & Orci, 1996). So sind Clathrin-coated-vesicles Bestandteile der sekretorischen Maschinerie, während COP1-coated vesicles den retrograden Transport zwischen Golgi-Apparat und Endoplasmatischem Retikulum sowie innerhalb der Golgi-Zisternen versorgen (Kirchhausen, 2000).

Der Zyklus der Aktivierung/Inaktivierung von Arf-GTPasen wird, wie auch der anderen GTPasen, durch spezifische GEFs und GAPs jedoch nicht durch GDIs reguliert (Moss & Vaughan, 1998; Jackson & Casanova, 2000). Während die GDP-gebundene, inaktive Form meistens im Zytosol zu finden ist, werden die aktivierten, GTP-gebundenen Arf-Proteine an Zellmembranen transloziert und verankern sich dort über ihre N-terminale myristoylierte Seitenkette (Cherfils & Chardin, 1999; Donaldson & Jackson, 2000).

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Arf-GEFs isoliert. Sie verfügen alle über eine konservierte Sec7-Domäne, die den GDP/GTP-Austausch katalysiert. Aufgrund von Sequenzhomologien und ihrer Sensitivität für Brefeldin A (BFA), einem Metabolit aus *Penicillium brefeldianum*, der die Struktur und Funktion des Golgi-Apparates zerstört, werden Arf-GEFs in zwei Klassen eingeteilt (Roth, 2000; Jackson & Casanova, 2000). Zur ersten Gruppe zählen die Hefeproteine Sec7, Gea1 und -2 sowie die Säugerproteine p200, BIG2 und GBF1, die alle durch BFA gehemmt werden. Die zweite Gruppe der vergleichsweise kleinen Arf-GEFs ARNO, Cytohesin-1, EFA6 und GRP1 sind hingegen BFA-insensitiv und besitzen

eine PH-Domäne, welche die direkte Interaktion mit Phosphoinositiden vermittelt (Klarlund *et al.*, 1997; Klarlund *et al.*, 1998).

### **2.2.3 Die Rolle von GTPasen im Phosphoinositidmetabolismus**

Zu den wichtigen nachgeschalteten Effektoren von Arf-Proteinen zählen die PIP-5-kinase und die PLD (Goldberg, 1998; Cherfils & Chardin, 1999; Honda *et al.*, 1999; D.H. Jones *et al.*, 2000). Verschiedene Daten belegen, dass Arf-Proteine die PIP-5-kinase-Aktivität und damit die Synthese von PIP<sub>2</sub> in verschiedenen Zellen steigern können (Fensome *et al.*, 1996; Way *et al.*, 2000). Da Arf zudem ein direkter Aktivator der PLD ist, werden zur Zeit drei Mechanismen diskutiert, wie Arf-Proteine zu einem zellulären PIP<sub>2</sub>-Anstieg führen: zum ersten durch direkte Aktivierung der PIP-5-kinase, zum zweiten durch eine indirekte Aktivierung über das PLD-Produkt PA, sowie eine Kombination aus beiden Möglichkeiten (Jones *et al.*, 1999; Honda *et al.*, 1999; Skippen *et al.*, 2002).

Neben Arf können auch Rho- und Rac-GTPasen den Phosphoinositid-metabolismus regulieren (Ren *et al.*, 1998). So führte die Zugabe von Rac in permeabilisierten Zellen über die Stimulation der PIP-5-kinase I $\alpha$  zu einem Anstieg von PIP<sub>2</sub> (Tolias *et al.*, 2000). In HEK-293-Zellen konnte gezeigt werden, dass RhoA über die Rho-kinase die PIP<sub>2</sub>-Synthese steigert (Oude Weernink *et al.*, 2000b). Da RhoA und die Rho-kinase auch die PLD stimulieren (Schmidt *et al.*, 1999), ist auch in diesem Signalweg eine Beteiligung von PA an der Aktivierung der PIP-5-kinase denkbar.

## **2.3 Phospholipase D**

### **2.3.1 Physiologische Bedeutung der Phospholipase D**

PLD-Enzyme hydrolysieren bevorzugt das Membranphospholipid Phosphatidylcholin zu PA und Cholin. Aus diesen Reaktionsprodukten können wichtige intrazelluläre Botenstoffe oder extrazelluläre Signalmoleküle gebildet werden, welche ihrerseits auf spezifische Zielproteine wirken. So können aus PA durch die Aktivität einer PA-Phosphohydrolase und Phospholipase A<sub>2</sub> die beiden Botenstoffe DAG und Lysophosphatidsäure (LPA) gebildet werden (Dennis, 1994; Sciorra & Morris, 1999). Während aus PA gebildetes DAG offensichtlich eine intrazelluläre Funktion hat (Pettitt *et al.*, 1997; Hodgkin *et al.*, 1998), kann LPA nach Ausschleusung aus der Zelle mit spezifischen LPA-GPCRs interagieren (Fukushima *et al.*, 2001). Das gebildete Cholin dient u.a. für die Biosynthese von Acetylcholin in Neuronen und

kann weiter zu Phosphorylcholin umgewandelt werden, welches möglicherweise für die Zellproliferation von Bedeutung ist (Cuadrado *et al.*, 1993).

Aber auch PA selbst, das direkte PLD-Reaktionsprodukt, fungiert als intrazellulärer Botenstoff. Zahlreiche biologische Funktionen, die der PLD zugeschrieben werden, wie Regulation von Vesikeltransport, Sekretion, Reorganisation des Zytoskelettes und Mitogenese werden durch PA beeinflusst. PA kann durch direkte Interaktion die Aktivität und die zelluläre Lokalisation verschiedener Proteine, wie z.B. der PIP-5-kinase und der Arf-GTPasen beeinflussen (Jenkins *et al.*, 1994; Gosh *et al.*, 1996; Exton, 1997a, b; Kishikawa *et al.*, 1999, Rizzo *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2001; Manifava *et al.*, 2001; Jones & Hannun, 2002). Somit könnte PA auch an der Regulation des zellulären PIP<sub>2</sub>-Gehaltes beteiligt sein (Anderson *et al.*, 1999), wodurch in der Zelle theoretisch eine positive Rückkoppelung zwischen der PLD und der PIP-5-kinase möglich ist (siehe Abb. 1).

### **2.3.2 PLD-Isoenzyme: Struktur und subzelluläre Lokalisation**

Auf der Basis der Gene von Pflanzen und Hefen wurden beim Säuger die beiden PLD-Isoformen PLD1 und PLD2 identifiziert und kloniert (Hammond *et al.*, 1995; Hammond *et al.*, 1997; Colley *et al.*, 1997a, b). Von der humanen PLD1 sind zwei Varianten (1a und 1b, ~124 kDa) mit ähnlichen regulatorischen Eigenschaften bekannt. Die PLD2, mit einem Molekulargewicht von 106 kDa, ist zu 50% mit der Sequenz der PLD1 identisch. Die katalytischen Eigenschaften der PLD-Enzyme sind in vier hoch konservierten Bereichen, den Domänen I-IV lokalisiert. Die Domänen I und IV enthalten jeweils ein am N- und am C-Terminus lokalisiertes HKD-Motiv. Funktionelle Studien mit Punktmutationen haben ergeben, dass dieses Motiv für die katalytische Aktivität der PLD-Enzyme essentiell ist (Sung *et al.*, 1997). Die Rolle der konservierten Domäne III ist noch weitgehend ungeklärt. Es wird vermutet, dass diese Region an der Substrat-Bindung beteiligt ist oder eine Interaktion mit Cholin vermittelt (Sung *et al.*, 1999a, b). Außerdem gibt es Hinweise dafür, dass diese Region möglicherweise als Zielsignal für Caveolae (siehe unten) fungiert.

Neben den Domänen I-IV sind im N-Terminus von PLD1 und PLD2 konservierte PH- und PX-Domänen zu finden. Beide PLD-Isoformen benötigen PIP<sub>2</sub> als essentiellen Kofaktor für ihre Aktivität. Deletionsanalysen von PLD1 und PLD2 haben allerdings die Bedeutung dieser N-terminalen Domänen für die Interaktion mit PIP<sub>2</sub> bezweifelt (Sung *et al.*, 1999a, b), weshalb weitere, PH-ähnliche Domänen für die Bindung von PIP<sub>2</sub> angenommen werden (Steed *et al.*, 1998).

Für das Verständnis der physiologischen Funktion der PLD-Isoenzyme ist es wichtig, ihre subzelluläre Lokalisation zu kennen. Die humanen PLD-Isoformen PLD1 und PLD2 wurden sowohl an der Plasmamembran als auch in verschiedenen Zellkompartimenten einschließlich Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Lysosomen, Endosomen und Sekretorische Granula gefunden (Liscovitch *et al.*, 2000; Cockcroft, 2001; Exton, 2002). Während PLD1 eher mit intrazellulären Kompartimenten assoziiert scheint, wird PLD2 vorwiegend an der Plasmamembran gefunden (Colley *et al.*, 1997a, b; Emoto *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Freyberg *et al.*, 2001). Außerdem wurde berichtet, dass beide PLD-Isoformen in Caveolae lokalisiert sind oder dorthin nach Stimulation transloziert werden (Czarny *et al.*, 1999; Sciorra & Morris, 1999; Kim *et al.*, 2000; Denmat-Ouisse *et al.*, 2001). Insgesamt deuten alle diese Befunde darauf hin, dass die beiden PLD-Isoformen in bestimmten zellulären Kompartimenten lokalisiert sind, wo sie unterschiedliche Pools von Phosphatidylcholin als Substrat umsetzen.

### **2.3.3 Regulation der PLD-Aktivität**

Eine große Zahl von extrazellulären Signalmolekülen führt über Aktivierung von membranständigen Rezeptoren zur Stimulation der PLD-Aktivität (Morris *et al.*, 1996; Singer *et al.*, 1997; Exton, 1999). In Untersuchungen zu den Mechanismen der Rezeptor-induzierten PLD-Stimulation an Zellmembranen, permeabilisierten Zellen und intakten Zellen wurden verschiedene Lipid- und Protein-Regulatoren der PLD identifiziert, wie monomere GTPasen, Serin/Threoninkinasen, Tyrosinkinasen und Phosphoinositide (Frohman *et al.*, 1999; Liscovitch *et al.*, 2000; Cockcroft, 2001; Exton, 2002).

Wie oben erwähnt, haben zahlreiche Untersuchungen gezeigt, dass Phosphoinositide die Aktivität und die zelluläre Lokalisation der PLD-Enzyme beeinflussen können (Brown *et al.*, 1993; Liscovitch *et al.*, 1994; Pertile *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1996a, b; Hodkin *et al.*, 1999; Sciorra *et al.*, 1999). So ist für die enzymatische Aktivität von sowohl PLD1 als auch von PLD2 die Anwesenheit von PIP<sub>2</sub> *in vitro* erforderlich (Hammond *et al.*, 1995; Hammond *et al.*, 1997; Colley *et al.*, 1997a, b). Neben PIP<sub>2</sub> kann auch PIP<sub>3</sub>, jedoch mit geringerer Potenz, die PLD-Enzyme stimulieren, während andere Phospholipide nahezu ineffektiv sind. Dementsprechend führte eine Reduktion des zellulären PIP<sub>2</sub>-Gehaltes durch die PIP<sub>2</sub>-Phosphatase Synaptojanin oder Fodrin, vermutlich über eine Hemmung von PI-kinasen, zu einer Reduktion der PLD-Aktivität (Lukowski *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 1997). Eine weitere mögliche Funktion von PIP<sub>2</sub> ergibt sich aus der Beobachtung, dass Phosphoinositide eine Rolle bei der Verankerung von zahlreichen Proteinen in Membranen spielen. Somit könnte

PIP<sub>2</sub> als Membrananker für die PLD-Enzyme dienen und sie dadurch in die räumliche Nähe ihrer Substrate bringen (Yokozeki, 1996).

Eine Beteiligung von sog. konventionellen PKC-Isoformen an der PLD1-Stimulation konnte in Studien mit verschiedenen Zellsystemen nachgewiesen werden (Schmidt *et al.*, 1994; Cockcroft, 1997; Exton, 1997a). Die Stimulation der PLD durch diese PKC-Enzyme erfolgt anscheinend sowohl durch Phosphorylierungs-abhängige als auch durch Phosphorylierungs-unabhängige Mechanismen (Singer *et al.*, 1997; Exton, 1997a; Exton, 1999). In Versuchen mit Ratten-PLD1 wurde eine direkte Phosphorylierung durch konventionelle PKC-Isoformen gezeigt, wobei die Phosphorylierung der PLD1 durch PKC- $\alpha$  überraschenderweise zu einer Reduzierung der Enzymaktivität führte (Min *et al.*, 1998). Zudem wurde in Ratten-Fibroblasten die Bildung eines Komplexes aus PLD1, PKC- $\alpha$  und einem noch nicht identifizierten 220 kDa Protein entdeckt, bei dem es sich möglicherweise um einen Arf-spezifischen Austauschfaktor handelt (Min & Exton, 1998). Die PKC-Isoformen sind an der PLD-Stimulation durch Rezeptortyrosinkinasen sowie verschiedene GPGRs beteiligt (Cockcroft, 2001; Exton, 2002). Weiterhin sind anscheinend zytosolische Tyrosinkinasen an der Stimulation der PLD durch Rezeptoren in bestimmten Zellen beteiligt, wie Untersuchungen mit spezifischen Hemmstoffen zeigen (Natarajan *et al.*, 1996; Cockcroft, 1997; Exton, 1999).

Ganz entscheidende Regulatoren der PLD1-Aktivität sind GTPasen der Arf-, Rho- und Ras-Familien. Eine Beteiligung von Arf-Proteinen bei der PLD-Stimulation wurde erstmalig in Untersuchungen mit humanen promyeloischen Leukämiezellen (HL-60-Zellen) und neutrophilen Granulozyten festgestellt (Brown *et al.*, 1993; Cockcroft *et al.*, 1994). Zwischen den Arf-Isoformen gibt es offensichtlich Unterschiede hinsichtlich ihrer Effizienz der PLD1-Aktivierung. So stimulieren insbesondere die Isoformen Arf1 und Arf6 die PLD-Aktivität. Arf-GTPasen sind auch an der PLD-Stimulation durch Rezeptoren beteiligt, wie Untersuchungen mit dem Arf-GEF-Hemmstoff BFA in verschiedenen Zellsystemen zeigten (Cockcroft, 1997; Exton, 2002).

Ähnlich wie Arf-GTPasen können auch GTPasen der Rho-Familie, vor allem RhoA, Rac und Cdc42 direkt mit der PLD1 interagieren und sie aktivieren. Die ersten Beweise, dass die PLD auch von Rho-GTPasen reguliert wird, lieferten Studien von Bowman *et al.* (1993). Sie zeigten in Versuchen mit Plasmamembranen von neutrophilen Leukozyten, dass die Stimulation der PLD durch das hydrolysestabile GTP-Analogon GTP $\gamma$ S durch Zugabe eines Rho-GDI gehemmt wurde. In nachfolgenden Studien stellte sich heraus, dass von den Rho-GTPasen die Isoform RhoA den effektivsten Aktivator darstellt. Interessanterweise sind für

eine effektive Stimulation von PLD1a und PLD1b durch Rho-GTPasen auch Arf-GTPasen und andere Komponenten, wie die PKC- $\alpha$  erforderlich (Kwak *et al.*, 1995; Shimooku *et al.*, 1996; Ohguchi *et al.*, 1996; Hammond *et al.*, 1997). Eine Beteiligung von Rho-GTPasen, spezifisch von RhoA, an der PLD-Stimulation durch membranständige Rezeptoren wurde in zahlreichen Zellsystemen gefunden (Exton, 2002). Ob der PLD-Stimulation eine Rolle bei den bekannten zellulären Funktion der Rho-GTPasen, wie Regulation der Gentranskription und Änderungen der Zellmorphologie und -beweglichkeit zukommt, ist bisher noch nicht bewiesen.

Eine Beteiligung von Mitgliedern der Ras-Familie, insbesondere von Ras und Ral, bei der PLD-Regulation wurde zuerst in *v*-Src-transformierten Fibroblasten beschrieben (Jiang *et al.*, 1995; Feig *et al.*, 1996). In diesen Zellen wurde die PLD-Stimulation durch eine Ras/Ral-Signalkaskade ausgelöst. Außerdem wurde von einer direkten Interaktion von PLD1 mit RalA berichtet. Hierbei scheint RalA für die PLD-Aktivierung zudem mit Arf- (Luo *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998) und Rho-Proteinen zu kooperieren (Frankel *et al.*, 1999; Wilde *et al.*, 2002). Andere Studien berichteten, dass bei der Ras/Ral-abhängigen Aktivierung der PLD auch Ral-spezifische GEFs, wie Ral-GDS, bedeutsam sind (Just *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1998; Chaves-Olarte *et al.*, 1999; Voß *et al.*, 1999).

Über die genaue Regulation der PLD2 ist bisher wenig bekannt ist. Rekombinante PLD2-Isoformen zeigten *in vitro*, im Vergleich zu PLD1-Isoformen, eine wesentlich höhere Basalaktivität, die *in vivo* jedoch viel geringer war. Daher wird vermutet, dass die PLD2-Aktivität in Zellen durch spezifische Inhibitoren reguliert wird. Tatsächlich wurden verschiedene hemmende Proteine identifiziert, welche die PLD2-Aktivität hemmen können. Dazu gehören die Synucleine, welchen eine Rolle in der Pathophysiologie neurodegenerativer Erkrankungen zugeschrieben wird, *clathrin assembly proteins* (AP-180), Fodrin und Synaptojanin (Jenco *et al.*, 1998; Cockcroft, 1997; Exton, 2002).

#### **2.3.4 Regulation der PLD-Aktivität in HEK-293-Zellen**

Am Institut für Pharmakologie in Essen werden die Untersuchungen zur Regulation der PLD-Aktivität im Wesentlichen in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293-Zellen) durchgeführt, die den M<sub>3</sub> Subtyp des muskarinischen Acetylcholin-Rezeptors (mAChR) stabil exprimieren. Die Aktivierung des M<sub>3</sub> mAChR führt über Pertussistoxin-insensitive G-Proteine zu einer gleichzeitigen Stimulation von PLC und PLD (Schmidt *et al.*, 1994). Untersuchungen von Rümenapp *et al.* (2001) kamen zu dem Ergebnis, dass der Signalweg

vom M<sub>3</sub> mAChR zur PLD vermutlich über G<sub>12</sub>-Proteine verläuft und unabhängig ist von der gleichzeitigen G<sub>q</sub>-vermittelten Stimulation der PLC durch den Rezeptor.

Studien mit BFA zeigten, dass Arf-GTPasen in die PLD-Stimulation durch den M<sub>3</sub> mAChR eingeschaltet sind (Rümenapp *et al.*, 1995). Eine Beteiligung von Rho-GTPasen, spezifisch von RhoA, bei der PLD-Stimulation durch den M<sub>3</sub> mAChR wurde durch Untersuchungen mit clostridialen Toxinen sowie mittels Expression von RhoA-Mutanten nachgewiesen (Schmidt *et al.*, 1996a; Rümenapp *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 1999). In Gegensatz zur Stimulation durch den M<sub>3</sub> mAChR erfolgt die Stimulation der PLD in diesen Zellen durch Rezeptortyrosinkinasen offensichtlich unter Beteiligung von PKC sowie von Ras- und Ral-GTPasen (Voß *et al.*, 1999). Die Hemmung der PLD-Aktivität durch die Rho-inaktivierenden Toxine war von einer Abnahme des endogenen PIP<sub>2</sub>-Gehaltes begleitet, die durch Zugabe von PIP<sub>2</sub> rekonstituiert werden konnte (Schmidt *et al.*, 1996b; Schmidt *et al.*, 1996c; Zhang *et al.*, 1996; Oude Weernink *et al.*, 2000a; Fahimi-Fahid *et al.*, 2002; Gosau *et al.*, 2002). Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass RhoA die PLD nicht nur direkt, sondern auch indirekt, über die Synthese von PIP<sub>2</sub> reguliert. Tatsächlich wurde in nachfolgenden Untersuchungen gefunden, dass die RhoA-abhängige Stimulation der PLD durch den M<sub>3</sub> mAChR über die Rho-kinase, einem wichtigen Effektor von aktiviertem RhoA (Leung *et al.*, 1995; Leung *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 1996; Nakagawa *et al.*, 1996; Maekawa *et al.*, 1999) vermittelt wird (Schmidt *et al.*, 1999). Weiterhin wurde beobachtet, dass diese Serin/Threoninkinase auch über Aktivierung der PIP-5-kinase den zellulären Gehalt an PIP<sub>2</sub> reguliert (Oude Weernink *et al.*, 2000b). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass in die Stimulation der PLD über RhoA über Rho-kinase offensichtlich weitere Proteine eingeschaltet sind, nämlich die durch Rho-kinase aktivierte LIM-kinase und deren Substrat Cofilin (unveröffentlichte Ergebnisse).

## 2.4 Lipid Rafts und Caveolae

Die Plasmamembran ist aus einer Phospholipid-Doppelschicht aufgebaut, in die weitere Bestandteile, wie Proteine, Sphingolipide und Cholesterin eingebettet sind. Im „flüssigen Mosaik“-Modell (Singer & Nicholson, 1972) stellte man sich die Plasmamembran ursprünglich als eine zweidimensionale Plattform vor, in der die Proteine frei beweglich sind. Heute weiss man, dass die Lipid-Doppelschicht in unterschiedlichen Zuständen vorliegen kann und unterscheidet nach zunehmender Fluidität die Gelphase, die *liquid ordered* und *liquid disordered* Phase (Brown & London, 1998). Die *liquid disordered* Phase entspricht

dem Modell von Singer-Nicholson, während die *liquid ordered* Phase aufgrund ihres hohen Gehaltes an Cholesterol und Sphingolipiden dicht gepackt und weniger flüssig ist als der Großteil der Plasmamembran.

Im Verlauf der letzten Jahre führten diese Erkenntnisse und Untersuchungen der Zellpolarität von Epithelien zur Formulierung der Lipid Raft-Hypothese, nach welcher die strukturierten Membranbereiche der *liquid ordered* Phase ähnlich Flößen (*rafts*) im Meer der frei beweglichen Lipide treiben (Simons & van Meer, 1988; Schroeder et al., 1994; Simons & Ikonen, 1997; Brown & London, 1998). Für diese spezialisierten Mikrodomänen prägten Simons & Ikonen den Begriff Lipid Rafts, welche sich insbesondere durch ihre Zusammensetzung, reich an Sphingolipiden (Sphingomyelin und Glykosphingolipiden) und Cholesterol auszeichnen. Daraus ergeben sich ihre geringe Dichte und Unlöslichkeit in bestimmten nicht-ionischen Detergentien, wie Triton X-100 (Brown & Rose, 1992). Basierend auf diesen biochemischen Eigenschaften werden in der Literatur weitere Bezeichnungen für Lipid Rafts verwendet, wie Detergenz-unlösliche Glykosphingolipid-angereicherte Domänen (DIGs), Glykosphingolipid angereicherte Regionen (GEM) oder Detergenz-resistente Regionen (DRM).

Eine spezielle Form der Lipid Rafts ist die Klasse der Caveolae. Sie werden als kleine (Durchmesser etwa 50-100 nm) Membrandomänen definiert, die sich in Form pleomorpher Strukturen, klassisch als höhlenartige Einstülpung (Caveolae: little caves), in und an der Plasmamembran darstellen (Parton *et al.*, 1997; Smart *et al.*, 1999). Als definierendes Merkmal von Caveolae gilt die formgebende Proteinkomponente Caveolin (Caveolin-1) (Rothberg *et al.*, 1992). Die Entdeckung dieses Markerproteins hat entscheidend zur Erforschung der strukturellen und funktionellen Bedeutung von Caveolae, einschließlich der Entwicklung von Methoden zur Isolation caveolärer Membranen beigetragen. Das 21 kDa Caveolin-1 ist Mitglied einer Familie von drei homologen Proteinen (Caveolin-1 bis -3), welches die Plasmamembran haarnadelförmig durchspannt (Scherer *et al.*, 1996). Ähnlich den Lipid Rafts enthalten Caveolae eine hohe Konzentration an Cholesterol, Phosphatiden und Sphingolipiden mit den daraus resultierenden biochemischen Eigenschaften der geringen Dichte und der Unlöslichkeit in nicht-ionischer Triton X-Lösung (Brown & Rose, 1992).

Lipid Rafts und Caveolae sind an der Ausführung vieler bedeutender zellulärer Prozesse, wie an der Verteilung apikaler Membranproteine in Epithelzellen (Brown & Rose, 1992; Zurzolo *et al.*, 1994), an der Aufnahme von Folaten durch Potozytose (Anderson *et al.*, 1992) und an der Kompartimentierung, Modulation und Integration von Prozessen bei der Signaltransduktion beteiligt (Simons & Ikonen, 1997; Pike, 2003). Die Rolle der

Mikrodomänen als Zentren der Signalübermittlung wurde aufgrund von biochemischen Analysen mit isolierten Lipid Rafts angenommen, in denen eine Vielzahl an Signalkomponenten identifiziert werden konnte (Wu *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1994; Lisanti *et al.*, 1994; Hope *et al.*, 1996). Dazu zählen verschiedene Membranrezeptoren, GPI-verankerte Proteine (CD59, uPAR, EphrinA5), Signal-Effektoren (heterotrimere G-Proteine, Kinasen der Src-Familie, Ras, PKC- $\alpha$ , PLC- $\gamma$ , Adenylylcyclasen) und Lipid-Signalmoleküle. Auch für PIP<sub>2</sub> wurde eine starke Anreicherung in Lipid Rafts gefunden (Pike & Casey, 1996). Dieser PIP<sub>2</sub>-Pool in Caveolin-angereicherten Domänen scheint selektiv als Substrat der PLC zur Verfügung zu stehen, was auf eine funktionelle Kompartimentierung des zellulären PIP<sub>2</sub> hindeutet (Pike & Miller, 1998).

## 2.5 Zielsetzung der Arbeit

PLD und PIP-5-kinase sind für die Bildung zweier wichtiger Lipid-Mediatoren, nämlich von PA bzw. PIP<sub>2</sub> verantwortlich. Die katalytische Aktivität beider Enzyme wird gleichermaßen durch GTPasen der Arf- und Rho-Familie reguliert. Da darüber hinaus PA die PIP-5-kinase *in vitro* stimuliert, während deren Produkt PIP<sub>2</sub> wiederum einen essentiellen Kofaktor der PLD-Aktivität darstellt, dürften beide Enzyme in der Zelle eng interagieren und sich über einen positiven Rückkopplungsmechanismus gegenseitig beeinflussen (siehe Abb. 1). Während die Regulation der PLD durch GTPasen und Phosphoinositide bereits eingehend untersucht wurde, ist das Regulationsnetzwerk der PIP-5-kinase noch weitgehend ungeklärt. Ziel dieser Arbeit sollte es sein, die Bedeutung der PLD für den Phosphoinositidmetabolismus zu untersuchen.

Dazu sind im Einzelnen folgende Fragestellungen untersucht worden:

- Kontrolliert die PLD die PIP-5-kinase und damit den zellulären PIP<sub>2</sub>-Gehalt?
- Ist die PLD in den durch Arf regulierten Signalweg zur PIP-5-kinase eingeschaltet?
- Ist die PLD in den durch Rho regulierten Signalweg zur PIP-5-kinase eingeschaltet?
- Werden durch PLD und Arf räumlich-definierte PIP<sub>2</sub>-Pools selektiv kontrolliert?

Diese Arbeit stellt einen Teil der Grundlagenforschung im Bereich der Tiermedizin dar, die im gleichen Maße Aspekte im pharmakologischen als auch im medizinisch-biologischen Bereich betreffen. In diesem Sinne können die Untersuchungen dazu beitragen, eine Entwicklung in der tiermedizinischen Pharmakologie zu bewirken.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Chemikalien

| <u>Name</u>               | <u>Hersteller/Lieferfirma</u> |
|---------------------------|-------------------------------|
| Acrylamid                 | Serva                         |
| Ammoniaklösung (25%)      | Merck                         |
| Ammoniumperoxodisulfat    | Serva                         |
| Ampicillin                | Grünenthal                    |
| ATP                       | Roche Molecular Biochemicals  |
| Bisacrylamid              | Serva                         |
| Bromphenolblau            | Fluka                         |
| BSA                       | Biomol                        |
| Butanol                   | Baker                         |
| Calciumchlorid            | Merck                         |
| Chloroform                | Baker                         |
| Chloroquin                | Sigma                         |
| Coomassie-Blau            | Serva                         |
| Dinatriumhydrogenphosphat | Merck                         |
| Dithiothreitol            | Serva                         |
| DMEM/Nutrient Mix F-12    | Invitrogen                    |
| ECL-Immunblot-Reagenz     | PerkinElmer Life Sciences     |
| EDTA                      | Merck                         |
| EGTA                      | Merck                         |
| Essigsäure (96%)          | Baker                         |
| Ethanol                   | Baker                         |
| FKS                       | Invitrogen                    |

---

|                           |                              |
|---------------------------|------------------------------|
| Geneticin (G418)          | Gibco BRL                    |
| D(+)-Glukose              | Merck                        |
| Glycerol                  | Fluka                        |
| Glycin                    | Sigma                        |
| HEPES                     | Serva                        |
| Kaliumchlorid             | Merck                        |
| Kaliumdihydrogenphosphat  | Merck                        |
| LB-Medium                 | Invitrogen                   |
| Leupeptin                 | Sigma                        |
| Magermilchpulver          | Merck                        |
| Magnesiumchlorid          | Merck                        |
| 2-Mercaptoethanol         | Merck                        |
| MES                       | Sigma                        |
| Methanol                  | Baker                        |
| Natriumacetat             | Merck                        |
| Natriumchlorid            | Merck                        |
| Natriumhydrogencarbonat   | Merck                        |
| Natriumdihydrogenphosphat | Merck                        |
| Natriumhydroxid           | Merck                        |
| Nonidet P-40              | Fluka                        |
| Orthovanadat              | Merck                        |
| Oxalsäure                 | Sigma                        |
| Penicillin/Streptomycin   | Seromed                      |
| Phosphatidylethanolamin   | Sigma                        |
| Phosphatidylserin         | Sigma                        |
| Phosphorsäure (85 %)      | Merck                        |
| PI(4)P                    | Sigma                        |
| PMSF                      | Roche Molecular Biochemicals |

|  |         |
|--|---------|
| Poly-L-Lysin (>300.000 Da)                   | Seromed |
| Ponceau S                                    | Sigma   |
| Proteinstandard (Rinder- $\gamma$ -Globulin) | Bio-Rad |
| Salzsäure (37%)                              | Merck   |
| SDS  | Serva   |
| Serva-Blau (G und R)                         | Serva   |
| Sucrose                                      | Merck   |
| TEMED  | Serva   |
| Trichloressigsäure                           | Merck   |
| Tris   | Merck   |
| Triton X-100                                 | Roth    |
| Tween 20                                     | Sigma   |

### 3.1.2 Radioaktive Chemikalien

#### Name (spezifische Aktivität)

[<sup>3</sup>H]IP<sub>3</sub> (15-30 Ci/mmol)  
 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (>4.500 Ci/mmol)

#### Hersteller/Lieferfirma

PerkinElmer Life Sciences  
 ICN Biomedicals

### 3.1.3 Antikörper

#### Name

anti-PLD1-Antikörper (Kaninchen)  
 anti-Caveolin-Antikörper (Kaninchen)  
 anti-Kaninchen IgG/Peroxidase-Konjugat der Ziege

#### Hersteller/Lieferfirma

Dr. S. Bourgoïn  
 Transduktion Laboratories  
 Santa Cruz Biotechnology

### 3.1.4 Sonstige Verbrauchsmaterialien

#### Name

Anionenaustauscher AG<sup>®</sup> W50-X8  
 Chromatographie-Blotpapier  
 Emulsifier Szintillator Plus/299  
 Filmentwickler Lösung Neutol Liquid NE

#### Hersteller/Lieferfirma

Bio-Rad  
 Whatman  
 Canberra Packard  
 Agfa Gevaert

|                                    |                       |
|------------------------------------|-----------------------|
| Filmfixierer Lösung Agefix         | Agfa Gevaert          |
| GF/C-Filter                        | Whatman               |
| Kieselgel 60-C-Platten             | Merck                 |
| Kodak X-OMAT AR-Filme              | Kodak                 |
| Nitrocellulosemembranen            | Advanced Microdevices |
| Plasmid Mega Kit                   | Qiagen                |
| Plastik-Einmalküvetten             | Sarstedt              |
| „snap-cap“-Röhrchen (15 ml)        | Sarstedt              |
| Sterilfilter (0,20 µm)             | Sartorius             |
| Szintillationsgefäße               | Packard               |
| Zellkulturschalen (35- und 145-mm) | Greiner               |
| Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml) | Greiner               |

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Kultivierung von HEK-293-Zellen

Die Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank (LaminarAir HA 2472 GS, Heraeus) mit laminarer Verdrängungsströmung durchgeführt. Die Abtötung der Keime der verwendeten Lösungen bzw. Medien und Geräte erfolgte im Autoklaven bei 121°C für 20 min.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden HEK-293-Zellen eingesetzt, die stabil den M<sub>3</sub> mAChR mit einer Dichte von ca. 200.000 Rezeptoren pro Zelle exprimieren. Als Nährmedium wurde DMEM/F12 (pH 7,2) mit einem Zusatz von 10 % FKS (v/v), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Zur Selektion der M<sub>3</sub> mAChR-Expression wurde zudem das Neomycin-Analogon Geneticin (G418; 0,5 mg/ml) dem Nährmedium zugefügt, das eine Neomycin-Resistenz vermittelt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank (B5060 EK/CO<sub>2</sub>) in feuchter Atmosphäre bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C in 145-mm Zellkulturschalen mit 20 ml Wachstumsmedium. Die Zellen wurden einmal wöchentlich subkultiviert, indem sie durch mehrmaliges Aufpipettieren mit warmem Medium abgelöst und auf 35- bzw 145-mm Zellkulturschalen ausgesät wurden. Die Zellschalen wurden für 10 min mit Poly-L-Lysin (MG >300.000 Da, 0,1 mg/Schale) beschichtet, um eine bessere Anhaftung der Zellen an das Plastikmaterial zu erreichen. Die Zellen wurden maximal bis zur 25. Passage für die Versuche eingesetzt.

### 3.2.2 *Präparation von Plasmid-DNA (Birnboim & Doly, 1979)*

Zur Präparation und Aufreinigung von cDNA wurden 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin in "snap-cap"-Röhrchen mit einer Einzelkolonie des Plasmid-tragenden Bakterienstammes angeimpft und ca. 8 h bei 37°C im Warmluftschüttler (Certomat<sup>®</sup>, H. B. Braun) mit 180 Upm inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur in ein größeres Volumen ampicillinhaltiges LB-Medium überführt und über Nacht unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien mit 6.000 Upm bei 4°C für 15 min pelletiert (Sorvall RC-5B, DuPont). Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des "Plasmid Mega Kit" der Firma Qiagen, wobei die Bakterien nach Resuspension in einer NaOH/SDS-haltigen Lösung zunächst alkalisch lysiert wurden. Das Lysat wurde dann unter angepassten Bedingungen (pH 7,0 und niedrigen Salz-Konzentrationen) auf ein Anionenaustauscher-Harz aufgetragen. RNA, Proteine und weitere Unreinheiten wurden durch eine höher-konzentrierte Salzlösung von der Säule entfernt. Schließlich wurde die cDNA mit einer hochkonzentrierten Salzlösung eluiert, durch 70 % Ethanol präzipitiert und in 30 µl TE-Puffer resuspendiert. Die cDNA-Konzentration der Aufreinigungen wurde durch UV-Spektrophotometrie in Quarzküvetten bei  $\lambda = 260$  nm bestimmt (Spektrophotometer LKB Biochrom Ultrospec II, Pharmacia).

TE-Puffer, pH 8,0:                    1 mM EDTA  
     10 mM Tris-HCl

### 3.2.3 *Verwendete Konstrukte*

In dieser Arbeit wurden folgende Konstrukte eingesetzt:

| <b>Konstrukt</b> | <b>Vektor</b> | <b>Größe</b> | <b>Promotor</b> | <b>Referenz</b> |
|------------------|---------------|--------------|-----------------|-----------------|
| hPLD1b           | pCGN          | 5.0 + 3.5 kb | CMV             | Dr. M. Frohman  |
| hPLD1b K898R     | pCGN          | 5.0 + 3.5 kb | CMV             | Dr. M. Frohman  |
| mPLD2            | pCGN          | 5.0 + 3.0 kb | CMV             | Dr. M. Frohman  |
| mPLD2 K758R      | pCGN          | 5.0 + 3.0 kb | CMV             | Dr. M. Frohman  |
| Arf1             | pRK5          | 4.7 + 0.6 kb | SP6             | Dr. B. Lohmann  |
| Arf1 T31N        | pRK5          | 4.7 + 0.6 kb | SP6             | Dr. B. Lohmann  |

|                      |                  |              |             |                 |
|----------------------|------------------|--------------|-------------|-----------------|
| Arf1 Q71L            | pRK5             | 4.7 + 0.6 kb | SP6         | Dr. B. Lohmann  |
| Rho-kinase-CAT       | pEF-BOS-myc      | 5.4 + 1.8 kb | EF-1a       | Dr. K. Kaibuchi |
| Cofilin S3A (HA-tag) | pcDL-SR $\alpha$ | 3.7 + 0.5 kb | SR $\alpha$ | Dr. K. Mizuno   |

Alle Konstrukte sind gegen das Antibiotikum Ampicillin resistent.

### ***3.2.4 Transfizierung von HEK-293-Zellen***

Die zu transfizierenden Zellen wurden bis zu einer optimalen Konfluenz von ca. 70-80% auf 145-mm-Schalen kultiviert. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen mit frischem DMEM/F12-Medium versorgt. Die gewünschten cDNA-Mengen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit sterilem H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100  $\mu$ l aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Ansäuerung mit 25  $\mu$ l 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) sowie die Ausfällung der cDNA mittels 315  $\mu$ l 100 % Ethanol bei 4°C. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13.000 Upm (Biofuge 13, Heraeus) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet 5 min an der Luft getrocknet. Nach Resuspension des Pellets in 700  $\mu$ l H<sub>2</sub>O wurde die cDNA zusammen mit 300  $\mu$ l 2 M CaCl<sub>2</sub> in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und gründlich gemischt. Zu dem cDNA/CaCl<sub>2</sub>-Gemisch wurde tröpfelnd 1 ml HeBS 2x hinzugefügt und die Lösung nochmals gemischt. Das DNA/ Calciumphosphat-Präzipitat auf den Rand der Zellkulturschalen gegeben, welchen zuvor 200  $\mu$ l einer 10 mM Chloroquinlösung hinzugefügt wurde, um den DNA-Abbau in den Lysosomen zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen je nach Wachstumsdichte 3-4 h im Brutschrank (B5060 EK/CO<sub>2</sub>) mit dem gebildeten DNA-Präzipitat inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Rückstände des Präzipitates durch einmaliges Waschen mit FKS-freiem DMEM/F12-Medium entfernt und dann die Zellen mit 20 ml frischem Wachstumsmedium versorgt. Die Transfizierungseffizienz lag zwischen 50 % und 70 %. Die Zellen wurden am folgenden Tag gesplittet und nach weiteren 24 h Inkubation in den jeweiligen Versuchen eingesetzt.

|                  |   |
|------------------|---|
| 2x HeBS, pH 7,5: | 280 mM NaCl                             |
|                  | 50 mM HEPES                             |
|                  | 148 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |

### 3.2.5 *Proteinbestimmung* (Bradford, 1976)

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden die Proben in Plastik-Einwegküvetten mit dH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt. Parallel wurde eine Standardreihe mit Proteinkonzentrationen von 0,4-2,0 µg/ml Rinder-γ-Globulin als Proteinstandard erstellt. Als Blindwert diente eine Standardlösung ohne Rinder-γ-Globulin. Nach gründlicher Durchmischung und 10 min Inkubation wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch gemessen (Spektrometer LKB Biochrom Ultraspec II, Pharmacia). Der Proteingehalt der Proben wurde über die ermittelte Standardreihe berechnet.

Bradford-Reagenz:                    350 mg Serva-Blau G (Comassie Blau)  
    250 ml Ethanol  
    250 ml Phosphorsäure (85%) ad 1 l dH<sub>2</sub>O

### 3.2.6 *Bestimmung der PIP-5-kinase-Aktivität* (Oude Weernink et al., 2000b)

Mit einer Transferpipette wurden die am Vortag auf 145-mm Schalen ausgesäten HEK-293-Zellen durch mehrmaliges Aufpipettieren abgelöst und für 5 min bei 1700 Upm abzentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus) und mit 20 ml eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in 200 µl Lysispuffer resuspendiert. Nach Einwirken des Lysispuffers für 10 min wurden die Zellen mit 1,8 ml Dilutionspuffer verdünnt und durch Sonifizieren mechanisch aufgeschlossen (3 x 20 sec, Sonifer Labsonic U). Nach Bestimmung der Proteingehalte (siehe 3.2.4) wurden die Lysate mit einem Dilutionspuffer/Lysispuffer-Gemisch (9:1; v/v) auf eine Proteinkonzentration von 1,25 mg/ml eingestellt. Zur Herstellung des Lipidgemisches wurden equimolare Mengen von PI(4)P und Phosphatidylserin in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß gemischt und eingedampft (SpeedVac plus SC 110 A, Savant) und anschließend in einer definierten Menge Lipidpuffer resuspendiert und sonifiziert. Das Reaktionsgemisch, bestehend aus 40 µl der Lysatverdünnung und 5 µl des Lipidgemisches, wurde nach Durchmischen für 10 min bei 25°C in einem Thermoblock (Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurde die Phosphorylierungsreaktion durch Zugabe von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (200 µCi/ml, 5 µl) gestartet. Die Reaktion wurde nach 5 min durch Zugabe von 300 µl kaltem Methanol:1N HCl im Verhältnis 1:1 beendet. Nach Extraktion der Lipide durch Zugabe von 250 µl Chloroform erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 13.000 Upm (Megafuge 1.0 R, Heraeus). Anschließend wurden 200 µl aus der unteren, wässrigen Phase entnommen und in einem Vakuumkonzentrator (SpeedVac plus SC 110 A,

Savant) eingedampft. Nach Resuspension des Pellets in 20 µl Chloroform wurden die Proben durch Dünnschichtchromatographie auf einer mit 1 %iger Oxalsäure vorbehandelten Kieselgel 60-C-Platte aufgetragen. Die Auftrennung der Phosphoinositide erfolgte in einer Mischung aus Chloroform:Methanol:2,5 N Ammoniak (9:7:2; v/v/v) als mobiler Phase für 2 h in einer Trennkammer. Zur Autoradiographie wurde die Dünnschichtplatte auf einen Röntgenfilm in einer Filmkassette gelegt, der durch die radioaktiv markierten Phosphoinositide über Nacht geschwärzt wurde. Abschließend wurden die radioaktiven PIP<sub>2</sub>- und PIP-Banden von der Platte abgekratzt und die Radioaktivität durch Cerenkov-Zählung (Beckmann LS6000 SC) bestimmt.

|                          |                        |
|--------------------------|------------------------|
| Lysispuffer, pH 7,4:     | 1 % Nonidet P 40 (w/v) |
|                          | 10 % Glycerol (v/v)    |
|                          | 150 mM NaCl            |
|                          | 25 mM Tris-HCl         |
|                          | 1 mM EDTA              |
|                          | 0,1 mM EGTA            |
|                          | 5 mM MgCl <sub>2</sub> |
|                          | 1 mM DTT               |
| vor Gebrauch hinzufügen: | 2 mM Na-Orthovanadat   |
|                          | 1 mM PMSF              |
|                          | 1 µM Leupeptin         |
| Dilutionspuffer, pH 7,4: | 25 mM Tris-HCl         |
|                          | 1 mM EDTA              |
|                          | 0,1 mM EGTA            |
|                          | 5 mM MgCl <sub>2</sub> |
|                          | 1 mM DTT               |
| Lipidpuffer, pH 7,4:     | 0,02 % Triton X (w/v)  |
|                          | 20 mM Tris-HCl         |

### 3.2.7 Bestimmung des zellulären Gehaltes von $PIP_2$

#### Extraktion von $PIP_2$

Die am Vortag auf 35-mm-Zellkulturschalen bis zur Konfluenz kultivierten HEK-293-Zellen wurden mit 1 ml eiskalter 0,5 M Trichloressigsäure (TCA) versetzt, um eine Fixierung der Zellen und die Ausschwemmung wasserlöslicher Zellbestandteile zu erreichen. Nach 20 min Lagerung der Zellschalen auf einer Eisplatte wurde der Überstand vorsichtig am Rand der Schale abgesaugt, ohne den Zellrasen zu beschädigen. Bei der nun folgenden Lipidextraktion wurden zunächst 940  $\mu$ l eines Chloroform/Methanol/12 N HCl-Gemisches (v:v:v; 40:80:1) auf die Schalen gegeben und der Zellrasen mit einem Plastikstift abgelöst. Anschließend wurde die Membranlipidsuspension in 3,5 ml Röhrchen überführt und mit 310  $\mu$ l Chloroform und 560  $\mu$ l 0,1 M HCl-Lösung versetzt. Nach Phasentrennung durch Zentrifugation für 10 min bei 2.400 Upm und 4°C (Megafuge, 1.0 R, Heraeus) wurden 400  $\mu$ l der in Chloroform gelösten Lipide aus der unteren Phase in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und eingedampft (Vakuumpkonzentrator, SpeedVac plus SC 110 A, Savant). Die eingetrockneten Proben wurden bei -20°C bis maximal 14 Tage bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

#### Hydrolyse von $PIP_2$

Zur Weiterverarbeitung wurden die eingedampften Proben nach Zugabe von 250  $\mu$ l KOH für 15 min bei 100°C (Thermoblock, Eppendorf) inkubiert. Nach gründlicher Durchmischung und Abkühlung auf Eis wurden die Proben zur Neutralisation auf Ionenaustauscher-Säulen (Bio-Rad AG® W50-X8 200-400 mesh, Hydrogenform) aufgetragen. Das Eluat bestehend aus 250  $\mu$ l hydrolysierte Probe und 1 ml H<sub>2</sub>O wurde nach Einstellung des pH auf 6-7 mit einer 1 M Natriumbikarbonatlösung durch Zugabe von 2 ml 1-Butanol-Petrolether (5:1; v:v) gewaschen. Nach Zentrifugieren für 10 min bei 2.400 Upm und 4°C (Megafuge, 1.0 R, Heraeus) wurde das in der unteren, wässrigen Phase enthaltene, aus  $PIP_2$  hydrolysierte  $IP_3$  für die quantitative Massenbestimmung entnommen. Die Säulen wurden mit 5 ml 1 M HCl und 5x je 5 ml dH<sub>2</sub>O regeneriert.

#### $IP_3$ -Massenbestimmung (Chilvers *et al.*, 1991)

Die Menge an  $IP_3$  in den Hydrolysaten wurde mittels der Verdrängung der Bindung von [<sup>3</sup>H] $IP_3$  an ein  $IP_3$ -Bindungsprotein, das aus Rinder-Nebennierenrinde gewonnen wurde, bestimmt. Bei der Durchführung des Assays wurde auf eine maximale Temperatur von 4°C, einen optimalen pH-Wert von 8,0 sowie auf einen Überschuss an EDTA geachtet, um eine maximale  $IP_3$ -Bindung und eine minimale Metabolisierung des Substrates zu gewährleisten (Challiss *et al.*, 1988; Palmer *et al.*, 1989). Für den Bindungsversuch wurden 30  $\mu$ l Eluat, 30  $\mu$ l Assay-Puffer und 30  $\mu$ l [<sup>3</sup>H] $IP_3$  (5000 cpm/Assay) in eisgekühlte 3,5 ml Reaktionsröhrchen

pipettiert. Zu diesem Ansatz wurden 30 µl eisgekühltes IP<sub>3</sub>-Bindungsprotein zugegeben. Anschließend wurden die sorgfältig durchmischt und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Die Trennung des freien vom gebundenen IP<sub>3</sub> wurde durch Vakuum-Filtration der Proben über GF/C-Filter erreicht. Die Filtration erfolgte durch Verdünnung und Spülen der Proben und direkt anschließendes Waschen der Filter mit 3 x 3 ml eisgekühltem Waschpuffer innerhalb von 5-10 sec. Nach Zugabe von 3 ml Szintillator Emulsifer Plus zu den Filtern wurde abschließend die Radioaktivität mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillationszählers (LS 6000 SC) gemessen werden. Die Quantifizierung von IP<sub>3</sub> und damit auch von PIP<sub>2</sub> in den Proben erfolgte mittels einer parallel hergestellten Standardkurve.

### **Herstellung des IP<sub>3</sub>-Bindungsproteins**

Für die Herstellung des IP<sub>3</sub>-Bindungsproteins wurden Nebennierenrinden von Schlachtrindern verwendet. Nach Entfernung der inneren Medulla wurde die Rinde kleingeschnitten und anschließend homogenisiert (2 ml Homogenisierungspuffer pro g Rinde; Ultra-Turrax, Janke & Kunkel). Die Proben wurden für 10 min bei 4°C und 6.500 Upm zentrifugiert und der Überstand aufgehoben. Das Pellet wurde in derselben Menge Puffer resuspendiert and erneut homogenisiert und zentrifugiert. Anschließend wurden beide Überstände vereinigt und bei 15.000 Upm für 20 min bei 4°C (Sorvall RC-5B, DuPont) zentrifugiert. Die Pellets wurden 4 x in Homogenisierungspuffer gewaschen, bevor sie in 8 ml Puffer resuspendiert und zusammengeführt wurden. Nach Bestimmung des Proteingehaltes (siehe 3.2.4) wurde der Proteingehalt auf 15-18 mg/ml eingestellt. Das so gewonnene IP<sub>3</sub>-Bindungsprotein wurde in Aliquots bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| Assay-Puffer, pH 8,0:           | 100 mM Tris/HCl<br>4 mM EDTA                           |
| Wasch-Puffer, pH 8,0:           | 25 mM Tris/HCl<br>1 mM EDTA<br>5 mM NaHCO <sub>3</sub> |
| Homogenisierungspuffer, pH 8,0: | 20 mM NaHCO <sub>3</sub><br>1 mM DTT                   |



### 3.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(Laemmli, 1970; Towbin et al.; 1979)

Auf 30-mm- oder 60-mm-Zellkulturschalen kultivierte HEK-293-Zellen wurden 48 h nach der Transfizierung zunächst zweimal mit HBSS gewaschen und dann mit 0,2 bzw. 0,3 ml kochendem Lyse-Puffer aufgeschlossen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden 10 min bei 95°C erhitzt (Thermoblock, Eppendorf) und mittels einer 25 G Kanüle resuspendiert. Nach Bestimmung des Proteingehaltes mittels der BCA-Methode wurden die entsprechenden Proteinmengen mit Laemmli-Puffer (1×, 2× oder 3,3×) auf 100 µl aufgefüllt und erneut gekocht. Durch das Kochen im Laemmli-Puffer in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol werden Schwefel-Brücken von Proteinen aufgebrochen und so Protein-Untereinheiten voneinander getrennt. Das im Laemmli-Puffer enthaltene SDS ist ein negativ geladenes Detergens, das durch hydrophobe Interaktionen mit den Proteinen dafür sorgt, dass die Proteine sich entfalten und löslich werden.

Für die Gele wurden Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 30:0,8 eingesetzt und mittels TEMED und Ammoniumperoxodisulfat polymerisiert. Der Acrylamidgehalt des Sammelgels betrug konstant 6 % (m/v), während für das Trenngel, abhängig von der erforschten Proteingröße, Acrylamid-Konzentrationen von 10 %, 12,5 % oder 15 % (m/v) eingesetzt wurden. Der Molekulargewichtsstandard bestand bei den 10 %igen Gelen aus Myosin (205 kDa), β-Galaktosidase (116 kDa), Phosphorylase b (97,4 kDa), BSA (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa) und Carboanhydrase (29 kDa). Der Standard für höherprozentige Gele enthielt BSA (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (36 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Trypsinogen (24 kDa), Sojabohnen-Trypsininhibitor (20 kDa) und Lactalbumin (14,2 kDa). Die Elektrophorese fand bei konstant 36 mA für etwa 4 h statt. Zum Nachweis der aufgetrennten Proteine wurde das Gel ca. 15 min lang in Coomassie-Blau inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Entfärbelösung entfernt und die Gele anschließend bei 80°C im Vakuum getrocknet (GelDryer Model 543, Bio-Rad).

Lyse-Puffer, pH 7,4:            1 % SDS (m/v)  
   10 mM Tris-HCl

2× Trenngelpuffer, pH 8,8:    0,2 % SDS (m/v)  
   750 mM Tris-HCl

2× Sammelgelpuffer, pH 6,8:  0,2 % SDS (m/v)

|                         |  |
|-------------------------|--|
|                         | 250 mM Tris-HCl  |
| Laufpuffer:             | 1 % SDS (m/v)<br>200 mM Glycin<br>25 mM Tris   |
| Coomassie-Blau-Färbung: | 1,4 g Serva-Blau R<br>500 ml Methanol<br>100 ml Essigsäure<br>ad 1 l dH <sub>2</sub> O |
| Entfärbelösung:         | 10 % Essigsäure (v/v)<br>10 % Methanol (v/v)   |

### **3.2.10 Immunoblot-Analyse** (Towbin *et al.*, 1979)

Zur Immunoblot-Analyse wurde das Gel nach der elektrophoretischen Proteintrennung direkt auf eine Nitrocellulose-Membran gelegt und in Blotpuffer über Nacht bei 4°C mit einer Ladung von 100 mA und einer Spannung von ca. 20 V gelegt. Mit Ponceau S-Lösung wurden die auf die Membran transferierten Proteine angefärbt und die Standardproteine markiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h in TBS mit 5 % Magermilchpulver (oder BSA, m/v) blockiert. Nach kurzem Waschen mit TBS und dH<sub>2</sub>O wurde die Membran mit dem entsprechenden ersten Antikörper für mindestens 1 h inkubiert. Die Antikörper wurden in TBS mit 0,1 % BSA von 1:500 bis zu 1:2.500 gemäß den Herstellerangaben verdünnt. Die Membran wurde dann viermal für je 5 min in TBS mit 0,2 % Tween<sup>®</sup> 20 (m/v) gewaschen und erneut mit 5 % Magermilchpulver für 10 min abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem dem ersten Antikörper entsprechenden zweiten Antikörper (anti-Maus, anti-Kaninchen oder anti-Ziege IgG/Peroxidase-Antikörperkonjugat; Verdünnung gemäß den Herstellerangaben: 1:5.000 bis zu 1: 10.000, 1 h). Die Membran wurde dann 3x für je 5 min in TBS mit 0,2 % Tween<sup>®</sup> 20 (m/v) und einmal in TBS gewaschen. Schließlich wurde die Membran für 1 min in einer Mischung von je 6 ml ECL<sup>®</sup>-Reagenz 1 und 2 (4°C) inkubiert. Die Detektion der dadurch ausgelösten Chemolumineszenz-Reaktion erfolgte auf Kodak X-Omat-Filmen nach Expositionszeiten von 2 bis 30 min.

|                   |  |
|-------------------|--|
| TBS, pH 7,4       | 150 mM NaCl<br>10 mM Tris-HCl  |
| Blotpuffer:       | 20 % Methanol (v/v)<br>0,01 % SDS (m/v)<br>300 mM Glycin<br>40 mM Tris |
| Ponceau S-Lösung: | 5 % Essigsäure (v/v)<br>0,1 % Ponceau S (m/v)                          |

### ***3.2.11 Datenauswertung***

Die Graphiken wurden mit Hilfe des Computerprogramms GraphPadPrism (Version 3.02, 2000) erstellt. Die Versuche wurden in Doppel- oder Dreifachbestimmungen durchgeführt, und die Ergebnisse sind in den Abbildungen als Mittelwerte  $\pm$  S.D. oder als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M von n-fach wiederholten Versuchen dargestellt.

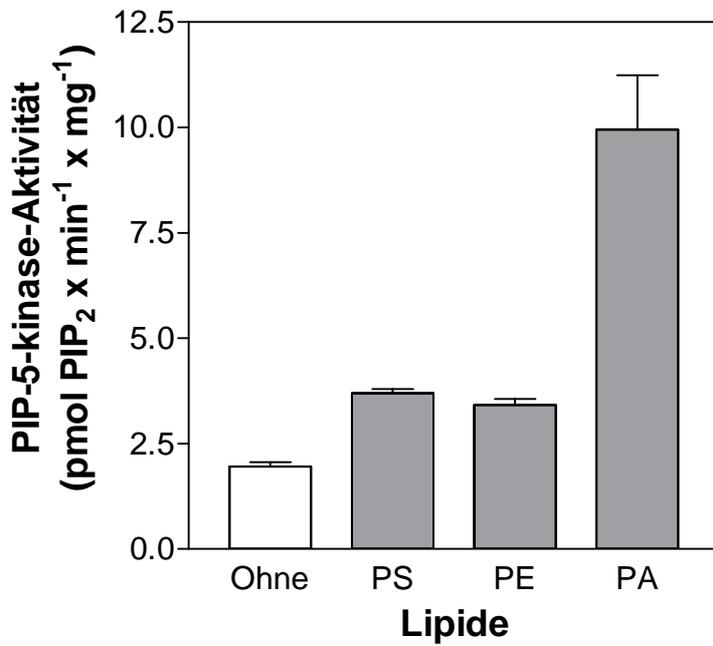
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Stimulation der PIP<sub>2</sub>-Synthese durch Phospholipase D

Wie in der Einleitung dargestellt, gibt es offensichtlich mannigfaltige Interaktionen zwischen der Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-kinase (PIP-5-kinase), ihrem Produkt Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), der Phospholipase D (PLD) und ihrem Produkt Phosphatidsäure (PA) sowie den kleinen GTPasen der Arf- und Rho-Familie. In dieser Arbeit habe ich das Augenmerk auf die Regulation der PIP-5-kinase, die den letzten Schritt im Hauptsyntheseweg von PIP<sub>2</sub> katalysiert, in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293-Zellen) gerichtet.

Verschiedene Arbeitsgruppen hatten berichtet, dass PA die Aktivität der PIP-5-kinase *in vitro* steigern kann. Dies wurde erstmals von Moritz *et al.* (1992) berichtet, die den Einfluss von PA und anderen Lipiden auf die Aktivität einer aus Rinderhirnmembranen aufgereinigten PIP-5-kinase untersuchten. Sie zeigten, dass PA ein hochspezifischer Aktivator der PIP-5-kinase ist, während andere Lipide nur einen geringen oder keinen Effekt auf die Kinase zeigten. Ähnliche Befunde wurden später auch von anderen Autoren erhoben (Jenkins *et al.*, 1994; Ishihara *et al.*, 1996; Ishihara *et al.*, 1998). Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnten ich in Lysaten von HEK-293-Zellen in Gegenwart von PA eine deutliche Steigerung der PIP-5-kinase-Aktivität nachweisen. Zur Messung der Enzymaktivität wurden die Zelllysate mit Lipidvesikeln inkubiert, die neben dem Substrat PI(4)P equimolaren Mengen der getesteten Lipide enthielten. Die Phosphorylierung von PI(4)P zu PI(4,5)P<sub>2</sub> erfolgte in Gegenwart von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, so dass das gebildete PI(4,5)P<sub>2</sub> als radioaktiv markiertes [<sup>32</sup>P]PI(4,5)P<sub>2</sub> detektiert werden konnte. Weiterhin wurde, um die mögliche Synthese von PI(3,4)P<sub>2</sub>, welches ein ähnliches Laufverhalten auf den Dünnschichtplatten aufweist wie PI(4,5)P<sub>2</sub>, durch PI-3-kinasen zu verhindern, die Phosphorylierung in Gegenwart von 0,1% Nonidet P-40 durchgeführt, das die PI-3-kinase-Aktivität hemmt (Endemann *et al.*, 1990; Vlahos *et al.*, 1994). Nach 5 min Inkubation bei 25°C und Stop der Reaktion durch Zugabe eines Methanol/HCl-Gemisches wurden die extrahierten Lipide aufgetrennt, die durch Autoradiographie sichtbar gemachten, radioaktiven PI(4)P- und PI(4,5)P<sub>2</sub>-Banden ausgekratzt und die Mengen an inkorporiertem <sup>32</sup>P mittels Cerenkov-Zählung ermittelt. Wie in Abb. 2 dargestellt, hatten Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanol (PE) nur vergleichsweise geringe Effekte auf die PIP-5-kinase-Aktivität (von 1,95 pmol PIP<sub>2</sub> pro min und mg Protein mit Kontrollvesikeln ohne addiertes Lipid auf 3,69 bzw. 3,41 pmol PIP<sub>2</sub> pro min und mg

Protein). Dagegen führte die Aufnahme von PA in den Lipidvesikeln zu einer erheblich stärkeren Steigerung der PIP-5-kinase-Aktivität (um den Faktor 5), auf 9,95 pmol PIP<sub>2</sub> pro min und mg Protein.



### Abb. 2. Stimulation der PIP-5-kinase durch PA

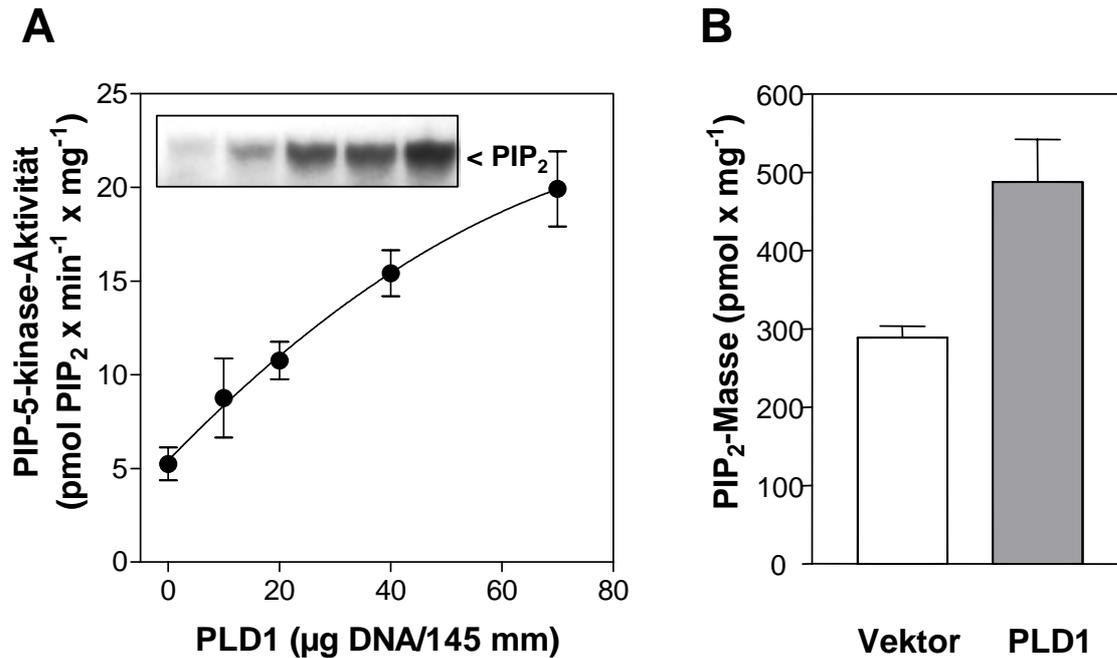
Die Aktivität der PIP-5-kinase wurde in Lysaten von HEK-293-Zellen mit Lipidvesikeln gemessen, die PIP allein (*Ohne*) oder zusätzlich equimolare Mengen der Lipide PS, PE und PA (jeweilige Endkonzentration im Assay 70  $\mu$ M) enthielten. Die Enzymaktivitäten sind als absolute Werte in pmol PIP<sub>2</sub> pro min und mg Protein angegeben. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei Versuchen erzielt.

Da PA das Hydrolyseprodukt der PLD ist, stellte sich nun die Frage, ob die PLD im zellulären Kontext Einfluss auf den Phosphoinositidmetabolismus nimmt. Deshalb habe ich zunächst geprüft, ob die PIP-5-kinase-Aktivität durch eine Überexpression der PLD in HEK-293-Zellen verändert wird. Dazu wurden subkonfluente Zell-Monolayer in 145-mm-Zellkulturschalen mit steigenden Mengen an PLD1 transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Ablösung der Zellen mit anschließender Bestimmung der PIP-5-kinase-Aktivität in den Zelllysaten. Die Phosphorylierung von PI(4)P zu [<sup>32</sup>P]PI(4,5)P<sub>2</sub> wurde nun in Gegenwart von PI(4)P/PS-Micellen bestimmt. Tatsächlich konnte die PIP-5-kinase-Aktivität durch Überexpression der PLD1 konzentrationsabhängig gesteigert werden (Abb. 3A). Bei der höchsten eingesetzten Menge an PLD1-DNA war die Kinase-Aktivität um etwa das 4-fache gesteigert, von  $5,24 \pm 0,88$  pmol PIP<sub>2</sub> pro min und mg Protein in den Lysaten von

Kontrollzellen auf  $19,9 \pm 2,0$  pmol PIP<sub>2</sub> pro min und mg Protein. In dem Inset der Abb. 3A ist ein Beispiel für die vermehrte Synthese von [<sup>32</sup>P]PIP<sub>2</sub>, wie sie auf den Dünnschichtplatten zu erkennen war, dargestellt.

Schließlich sollte geprüft werden, ob der stimulierende Effekt der PLD1 auf die PIP-5-kinase-Aktivität auch zu einem Anstieg des PIP<sub>2</sub>-Gehaltes in intakten Zellen führt. Für die Bestimmung des zellulären PIP<sub>2</sub>-Gehaltes habe ich mich der Methode von Chilvers *et al.* (1991) bedient, bei welcher der Gehalt an PIP<sub>2</sub> indirekt, d.h. nach chemischer Hydrolyse zu IP<sub>3</sub> und anschließender Massenbestimmung von IP<sub>3</sub> erfasst wird. Dafür wurden mit Leervektor oder mit PLD1-DNA transfizierte HEK-293-Zellen in 35-mm-Zellkulturschalen durch Zugabe von TCA fixiert und anschließend die Lipide mit einem Chloroform/Methanol/HCl-Gemisch aus den Membranen extrahiert. Nach chemischer Hydrolyse des extrahierten PIP<sub>2</sub> durch Inkubation mit KOH bei 100°C und Neutralisierung der Proben wurde das entstandene IP<sub>3</sub> in einem kompetitiven Bindungsassay mit [<sup>3</sup>H]IP<sub>3</sub> und einem spezifischen IP<sub>3</sub>-Bindungsprotein aus Rindernebenieren bestimmt. Wie in Abb. 3B zu sehen ist, war die durch PLD1 gesteigerte PIP-5-kinase-Aktivität in der Tat von einer deutlichen Zunahme des PIP<sub>2</sub>-Gehaltes in den intakten Zellen begleitet (von  $289 \pm 15$  pmol PIP<sub>2</sub> pro mg Protein in den Kontrollzellen auf  $488 \pm 54$  pmol PIP<sub>2</sub> pro mg Protein nach Überexpression der PLD1).

Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Überexpression der PLD1, sehr wahrscheinlich über ihr Reaktionsprodukt PA, in HEK-293-Zellen zu einer vermehrten PIP<sub>2</sub>-Produktion durch die Stimulation der PIP-5-kinase führt. Hierbei ist zu unterstreichen, dass dieses Ergebnis nicht nur *in vitro* in Zelllysaten, sondern auch in der intakten Zelle gezeigt werden konnte.



**Abb. 3. Stimulation der zellulären PIP<sub>2</sub>-Synthese durch PLD1**

(A) HEK-293-Zellen wurden auf 145-mm-Zellkulturschalen bis zu etwa 70% Konfluenz bei 37°C kultiviert und mit den angegebenen Mengen (µg DNA) an PLD1 Wild-Typ transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen auf 100-mm-Zellkulturschalen gesplittet und nach weiteren 24 h im PIP-5-kinase-Assay eingesetzt werden. Die Messung der PIP-5-kinase-Aktivität erfolgte in den Zelllysaten (50 µg) wie in „Material und Methoden“ (3.2.6) angegeben. Das Inset zeigt exemplarisch die originalen radioaktiven PIP<sub>2</sub>-Banden in der Autoradiographie. Vergleichbare Ergebnisse wurden in zwei voneinander unabhängigen Versuchen erzielt.

(B) HEK-293-Zellen wurden mit 70 µg Leervektor-DNA (*leere Säule*) oder mit 70 µg PLD1-DNA (*graue Säule*) transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Bestimmung des zellulären PIP<sub>2</sub>-Gehaltes wie in „Material und Methoden“ (3.2.7) beschrieben. Die PIP<sub>2</sub>-Masse ist in pmol PIP<sub>2</sub> pro mg Protein angegeben.

## 4.2 PLD1 ist ein Effektor von Arf1 im Signalweg zur PIP-5-kinase

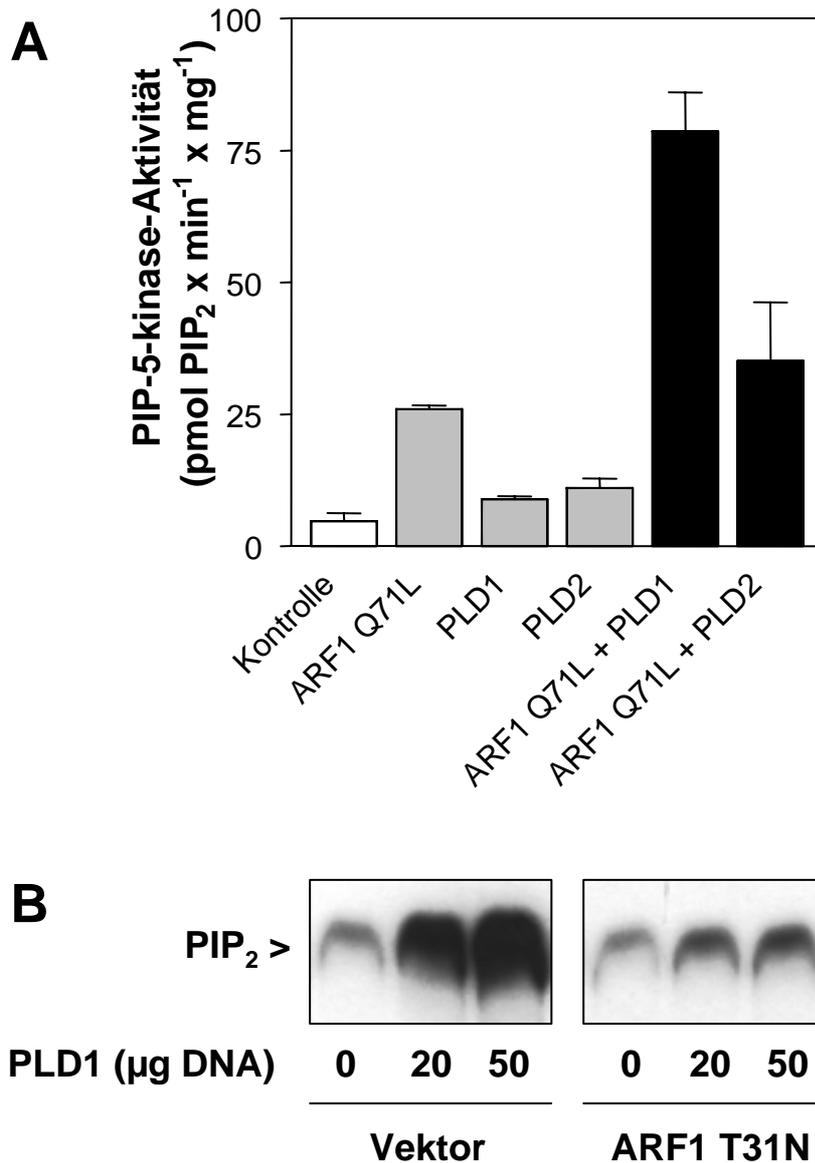
Untersuchungen an unserem Institut hatten gezeigt, dass durch Überexpression von Arf1 in HEK-293-Zellen die PIP-5-kinase-Aktivität und der zelluläre Gehalt an PIP<sub>2</sub> gesteigert werden kann. In Übereinstimmung damit belegen Studien anderer Arbeitsgruppen, dass Arf1 die PIP<sub>2</sub>-Produktion über die Aktivierung der PIP-5-kinase in permeabilisierten Zellen und in aufgereinigten Membranen stimulieren kann (Fensome *et al.*, 1996; Way *et al.*, 2000). Weiterhin konnten Jones *et al.* (2000) in Experimenten mit aus Rattenleber aufgereinigten Golgi-Membranen zeigen, dass Arf1 ein Aktivator der PIP-5-kinase- $\alpha$  ist. Da andererseits in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen wurde (Brown *et al.*, 1993; Cockcroft *et al.*, 1994; Hammond *et al.*, 1997; Sung *et al.*, 1997), dass Arf1 ein direkter Aktivator der PLD ist, lag die Vermutung nahe, dass die stimulierende Wirkung von PLD auf die PIP-5-kinase-Aktivität unter dem Einfluss von Arf1 steht.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden zuerst HEK-293-Zellen mit einer konstitutiv aktiven Arf1-Mutante (Arf1 Q71L) sowie mit Wild-Typ Konstrukten der PLD-Isoformen PLD1 und PLD2 transfiziert. Nach 48 h wurde die PIP-5-kinase-Aktivität in den Lysaten der Zellen unter *in vitro* Versuchsbedingungen wie oben beschrieben bestimmt. Nach alleiniger Transfektion von entweder Arf1 Q71L, PLD1 Wild-Typ oder PLD2 Wild-Typ konnte eine Steigerung der PIP-5-kinase-Aktivität, jedoch zu einem unterschiedlichem Ausmaß beobachtet werden (Abb. 4A). Die Expression von Arf1 Q71L führte zu einer Zunahme der Kinaseaktivität um den Faktor 5 im Vergleich zur Kontrolle, während die Überexpression von PLD1 und PLD2 die Aktivität der PIP-5-kinase um etwa den Faktor 2 erhöhte. Auffallende Unterschiede wurden nach Kotransfektion von Arf1 Q71L mit PLD1 bzw. PLD2 festgestellt. Während durch Koexpression von Arf1 Q71L mit PLD2 eine rein additive Zunahme der PIP-5-kinase-Aktivität beobachtet wurde (Faktor 7), war nach Koexpression von Arf1 Q71L mit PLD1 die Kinaseaktivität drastisch, um etwa das 15-fache im Vergleich zu den Kontrollzellen gesteigert. Diese synergistische Wirkung deutet darauf hin, dass die PIP-5-kinase gemeinsam von Arf1 mit insbesondere der PLD1-Isoform reguliert wird.

Die Hypothese, dass Arf1 und PLD1 die PIP<sub>2</sub>-Synthese kooperativ steuern, konnte durch Kotransfektion von PLD1 mit einer inaktiven Arf1-Mutante (Arf1 T31N) untermauert werden. Hierzu wurde die Aktivität der PIP-5-kinase in Lysaten von Zellen getestet, die entweder mit PLD1 allein oder in Kombination mit Arf1 T31N transfiziert waren. In Lysaten von mit 20 bzw. 50  $\mu$ g PLD1 Wild-Typ-DNA transfizierten Zellen war die PIP<sub>2</sub>-Synthese dosisabhängig gesteigert (Abb. 4B, links). Expression von inaktivem Arf1 T31N hingegen

senkte die basale PIP-5-kinase-Aktivität und unterdrückte die durch PLD1 induzierte Steigerung der PIP-5-kinase-Aktivität (Abb. 4B, rechts). Zusammengenommen deuten diese mit Arf1 Q71L und Arf1 T31N erhobenen Befunde darauf hin, dass Arf1 bei der Regulation der PIP-5-kinase durch PLD1 beteiligt ist.

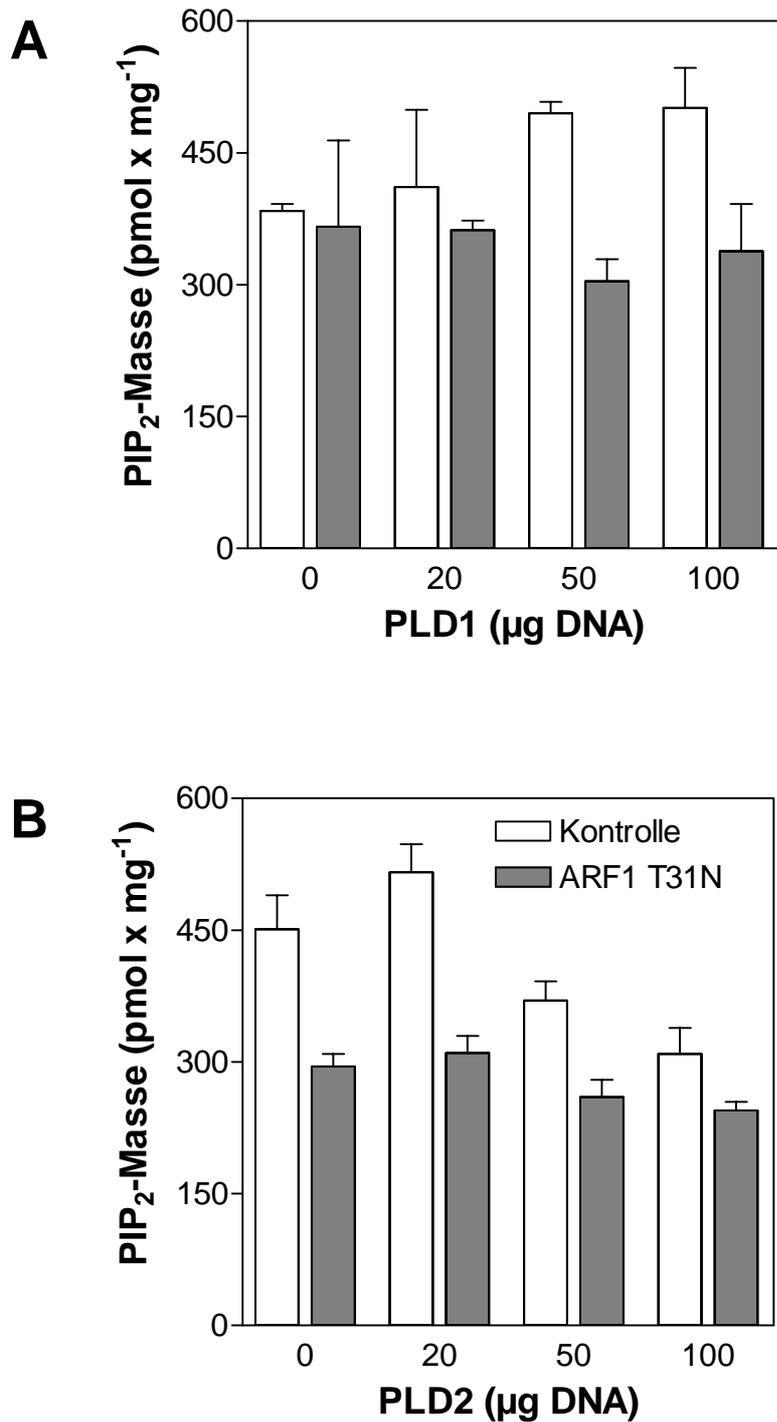
Im Folgenden sollte nun geprüft werden, ob diese Änderungen der *in vitro* bestimmten Kinaseaktivität auch ihren Niederschlag im PIP<sub>2</sub>-Gehalt in intakten Zellen finden, d.h. ob die Kooperation von Arf1 und PLD1 sich auch auf dieser Ebene bestätigen lässt. Dazu wurden HEK-293-Zellen mit Wild-Typ Konstrukten der beiden PLD-Isoenzyme und Arf1 T31N kotransfiziert und die zellulären PIP<sub>2</sub>-Gehalte wie in „Material und Methoden“ (3.2.7) beschrieben bestimmt. Überexpression von PLD1 führte zu einer dosisabhängigen Zunahme des zellulären PIP<sub>2</sub>-Gehaltes von  $384 \pm 8$  in den Kontrollzellen bis auf  $501 \pm 46$  pmol PIP<sub>2</sub> pro mg Protein bei der höchsten getesteten Menge (100 µg DNA) an PLD1 (Abb. 5A). Koexpression der inaktiven Arf1 T31N-Mutante konnte diesen durch die PLD1 induzierten Anstieg der PIP<sub>2</sub>-Masse in den Zellen vollständig verhindern und resultierte in nahezu unveränderten PIP<sub>2</sub>-Mengen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 5A). Unter den gleichen Versuchsbedingungen wurde die Bestimmung des zellulären PIP<sub>2</sub>-Gehaltes durch Koexpression von Arf1 T31N mit dem Wild-Typ Konstrukt der PLD2 durchgeführt. Im Gegensatz zur Expression von PLD1 kam es in Anwesenheit von PLD2 nach einem leichten Anstieg bei 20 µg PLD2-DNA mit steigenden Mengen (50 und 100 µg DNA) zu einem deutlichen Abfall der PIP<sub>2</sub>-Masse, bis unter den Basalwert in den Kontrollzellen ( $451 \pm 39$ ) auf  $309 \pm 30$  pmol PIP<sub>2</sub> pro mg Protein (Abb. 5B). Die inaktive Mutante Arf1 T31N konnte hier ebenfalls den PIP<sub>2</sub>-Gehalt auf einem niedrigen Niveau supprimieren (Abb. 5B). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die inaktive Mutante Arf1 T31N die stimulierende Wirkung der PLD1, mit Einschränkungen auch der PLD2, auf die PIP<sub>2</sub>-Synthese durch die PIP-5-kinase nicht nur im *in vitro* Assay, sondern auch in intakten Zellen blockieren kann.



**Abb. 4. Bedeutung von Arf1 für die Regulation der PIP-5-kinase-Aktivität durch die PLD1**

(A) HEK-293-Zellen wurden mit Leervektor (*leere Säule, Kontrolle*), nach alleiniger Transfektion mit Arf1 Q71L (50 µg DNA), PLD1 (30 µg DNA) oder PLD2 (30 µg DNA) (*graue Säulen*), sowie nach kombinierter Transfektion von 50 µg Arf1 Q71L-DNA mit 30 µg PLD1-DNA oder 50 µg Arf1 Q71L-DNA mit 30 µg PLD2-DNA (*schwarze Säulen*) transfiziert. Die PIP-5-kinase-Aktivität wurde in den Zelllysaten wie in „Material und Methoden“ (3.2.6) beschrieben, bestimmt. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei voneinander unabhängige Versuche.

(B) HEK-293-Zellen wurden mit der angegebenen Menge an PLD1-DNA allein (links, *Vektor*) oder mit 100 µg Arf1 T31N-DNA (rechts, *Arf1 T31N*) transfiziert. Die PIP-5-kinase-Aktivität wurde in den Zelllysaten wie in „Material und Methoden“ (3.2.6) beschrieben, bestimmt. Die Abbildung zeigt exemplarisch die originalen [<sup>32</sup>P]PIP<sub>2</sub>-Banden eines Autoradiogramms. Ähnliche Ergebnisse wurden in zwei Experimenten erzielt.

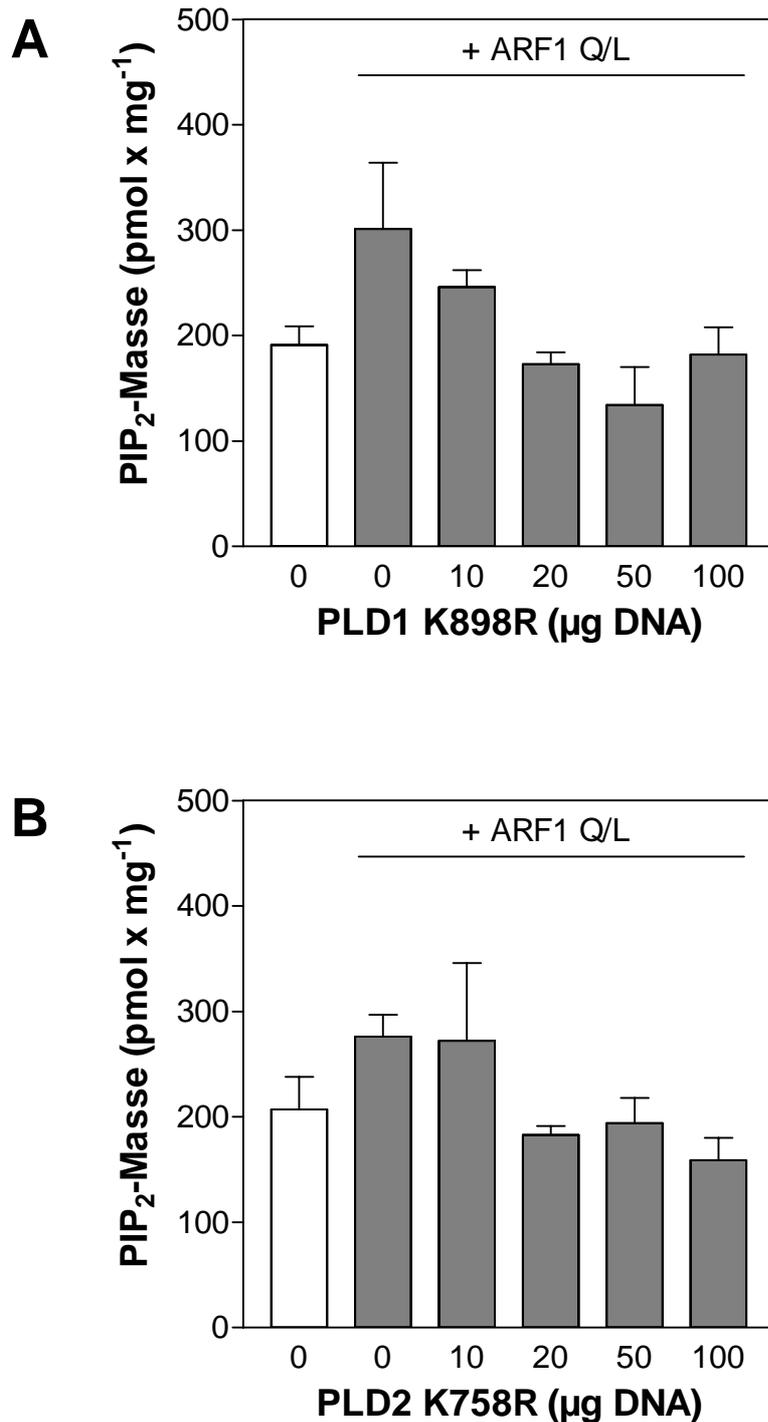


**Abb. 5. Arf1 T31N unterdrückt die steigernde Wirkung von PLD auf den PIP<sub>2</sub>-Gehalt.**

In HEK-293-Zellen, die mit den angegebenen Mengen der Wild-Typ Konstrukte von PLD1 (**A**) oder PLD2 (**B**) allein (*leere Balken*) oder zusammen mit (*schwarze Balken*) 100 µg Arf1 T31N-DNA transfiziert waren, wurde der endogene PIP<sub>2</sub>-Gehalt wie in „Material und Methoden“ (3.2.7) beschrieben, bestimmt. Der PIP<sub>2</sub>-Gehalt ist in pmol PIP<sub>2</sub> pro mg Protein angegeben. Die Ergebnisse sind charakteristisch für zwei unabhängige Versuche.

Um die Zusammenarbeit von Arf1 und PLD-Isoformen bei der Regulation der PIP<sub>2</sub>-Synthese weiter zu charakterisieren, wurden Zellen mit der konstitutiv aktiven Arf1 Q71-Mutante und mit durch Punktmutationen in ihrer katalytischen Domäne inaktivierten PLD-Konstrukten (PLD1 K898R und PLD2 K758R) kotransfiziert. Erneut erfolgte die Bestimmung des zellulären PIP<sub>2</sub>-Gehaltes über die Massenbestimmung von IP<sub>3</sub>. Hierbei zeigte sich, dass der durch Expression von Arf1 Q71L gesteigerte PIP<sub>2</sub>-Gehalt durch Koexpression steigender Mengen an PLD1 K898R bis auf (und bei 50 µg DNA sogar unter) den basalen Gehalt in den Kontrollzellen gesenkt wurde (Abb. 6A). Eine ähnlich hemmende Wirkung wurde auch nach Koexpression von Arf Q71L mit dem inaktiven Konstrukt der PLD2-Isoform festgestellt. Koexpression von PLD2 K758R führte ebenfalls zu einer vollständigen Hemmung der durch Arf1 Q71L erhöhten PIP<sub>2</sub>-Spiegel (Abb. 6B).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse aus den *in vitro* PIP-5-kinase-Versuchen und den PIP<sub>2</sub>-Bestimmungen in intakten Zellen, dass die kleine GTPase Arf1 und PLD-Isoformen an der Regulation der PIP<sub>2</sub>-Synthese beteiligt sind. Weiterhin stützen diese Daten meine Hypothese, dass die PLD in den durch Arf1 regulierten Signalweg zur PIP-5-kinase eingeschaltet ist. Sowohl die eindeutigeren Effekte der PLD1 als auch der Synergismus von Arf1 spezifisch mit der PLD1 (Abb. 3A) deuten darauf hin, dass die PLD1, eher als die PLD2, in den Signalweg von Arf1 zur PIP-5-kinase eingeschaltet sein dürfte. Die Beobachtung, dass inaktive PLD-Konstrukte die Effekte einer konstitutiv aktiven Mutante von Arf1 zu blockieren vermögen (Abb. 6), ermöglicht weiterhin die Einstufung von Arf1 oberhalb von der PLD im Signalweg zur PIP-5-kinase.



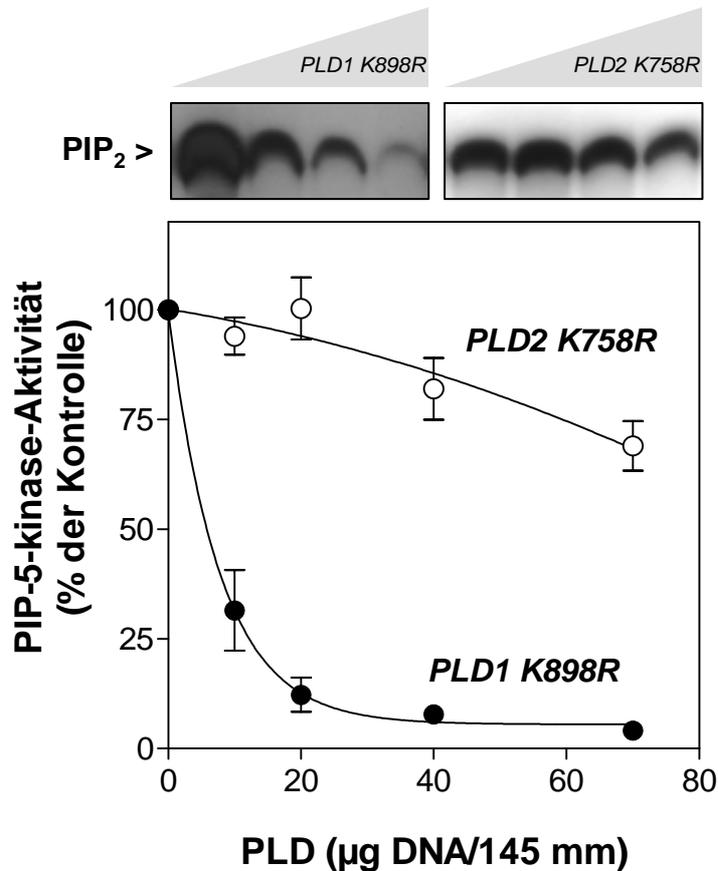
**Abb. 6. Inaktive PLD hemmt die Zunahme des zellulären PIP<sub>2</sub>-Gehaltes durch Arf1 Q71L**

In HEK-293-Zellen, die ohne (*leere Balken*) und mit 50 µg Arf1 Q71L-DNA und den angegebenen Mengen der inaktiven Konstrukte von PLD1 K898R (**A**) oder PLD2 K758R (**B**) (*schwarze Balken*), transfiziert waren, wurde der zelluläre Gehalt an PIP<sub>2</sub> wie in „Material und Methoden“ (3.2.7) beschrieben, bestimmt. Die endogene PIP<sub>2</sub>-Masse ist in pmol PIP<sub>2</sub> pro mg Protein angegeben. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängige Versuche.

### 4.3 Beteiligung der PLD1 an der Stimulation der PIP-5-kinase durch Rho und Rho-kinase

Wie in der Einleitung dargestellt, sind neben den GTPasen der Arf-Familie auch Rho-GTPasen wichtige Regulatoren der PIP<sub>2</sub>-Synthese durch die PIP-5-kinase. Darüber hinaus hatten Untersuchungen an HEK-293-Zellen ergeben, dass Arf- und Rho-GTPasen weitgehend unabhängig voneinander in die Aktivierung der PLD1 durch einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor eingeschaltet sind (Bayer *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1999). Ich habe deshalb untersucht, ob die PLD1 auch im Rho-Aktivierungsweg zur PIP-5-kinase beteiligt ist. Seit der zweiten Hälfte der neunziger Jahre ist bekannt, dass die Aktivität der PLD1 durch eine direkte RhoA-PLD1-Interaktion gesteigert wird (Hammond *et al.*, 1997; Sung *et al.*, 1997; Min *et al.*, 1998; Bae *et al.*, 1998). In späteren Untersuchungen in HEK-293-Zellen wurde ein weiterer, indirekter Mechanismus der PLD-Stimulation durch RhoA nachgewiesen, nämlich über die Rho-kinase (Schmidt *et al.*, 1999). Diese durch RhoA aktivierte Serin/Threoninkinase ist darüber hinaus auch an der durch RhoA induzierten Stimulation der PIP<sub>2</sub>-Synthese durch die PIP-5-kinase in HEK-293-Zellen beteiligt (Oude Weernink *et al.*, 2000b).

Ich bin nun der Frage nachgegangen, ob PLD-Enzyme Einfluss auf die Stimulation der PIP-5-kinase durch RhoA/Rho-kinase in HEK-293-Zellen nehmen. Dazu wurden die Zellen mit einer konstitutiv aktiven Rho-kinase-Mutante (Rho-kinase-CAT) und steigenden Mengen der inaktiven PLD1- und PLD2-Konstrukte kotransfiziert. Nach 48 h wurde die PIP-5-kinase-Aktivität in den Zelllysaten bestimmt. Wie in Abb. 7 dargestellt, führte die Expression der inaktiven PLD-Mutanten, besonders der von PLD1, zu einer Hemmung der durch Rho-kinase-CAT induzierten PIP-5-kinase-Aktivität. Transfizierung der Zellen mit bereits geringen Mengen an PLD1 K898R-DNA führte zu einer nahezu kompletten Inhibition der durch Rho-kinase stimulierten Aktivität der PIP-5-kinase, während durch Expression der PLD2 K758R eine nur geringe Hemmung, von maximal ~30% erzielt wurde. Diese Ergebnisse deuten an, dass speziell die PLD1 in die Aktivierungskaskade von Rho und Rho-kinase zur PIP-5-kinase eingeschaltet ist.

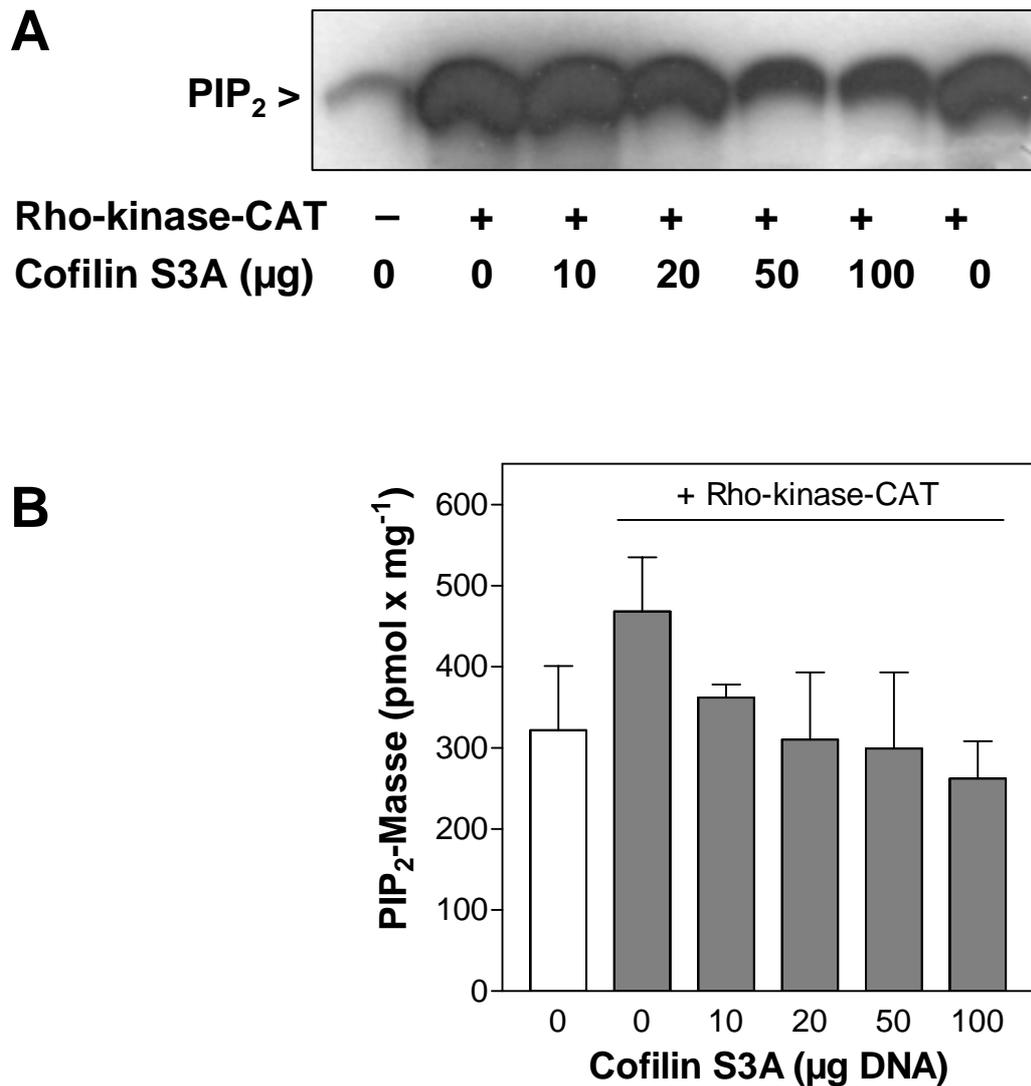


**Abb. 7. Hemmung der durch Rho-kinase-CAT-induzierten PIP-5-kinase-Aktivität durch inaktive PLD**

Auf 145-mm-Zellkulturschalen kultivierte HEK-293-Zellen wurden mit Rho-kinase-CAT (30 µg-DNA) und den angegebenen Mengen (µg DNA) der inaktiven Konstrukte PLD1 K898R und PLD2 K898R kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen abgelöst und die PIP-5-kinase-Aktivität in den Zelllysaten wie in „Material und Methoden“ (3.2.6) beschrieben, bestimmt. Die Enzymaktivitäten sind in Prozent der Kontrolle angegeben, wobei 100 % der maximalen Aktivierung der PIP-5-kinase-Aktivität durch Rho-kinase-CAT entspricht. Das Inset zeigt exemplarisch die durch  $^{32}\text{P}$  markierten  $\text{PIP}_2$ -Banden auf einer der Autoradiographien. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen erzielt.

Da für PLD-Enzyme weder eine direkte Interaktion noch eine Phosphorylierung durch die Rho-kinase gezeigt werden konnte (Schmidt *et al.*, 1999), wurden für die Aktivierung der PLD durch die Rho-kinase zusätzliche Komponenten angenommen. Tatsächlich konnten kürzlich in unserem Institut die durch Rho-kinase aktivierte LIM-kinase und deren Substrat Cofilin als weitere Komponenten identifiziert werden. Aufgrund dieser neuen Ergebnisse wird angenommen, dass die Signalkaskade von RhoA zur PLD1 folgendermaßen abläuft: Aktiviertes RhoA aktiviert die Rho-kinase, die dann die LIM-kinase phosphoryliert, die

dadurch aktivierte LIM-kinase ihrerseits phosphoryliert Cofilin an der Position Serin-3, das dann mit der PLD1 interagiert und ihre Aktivität steigert. Die Aktivierung der PLD1 durch RhoA/Rho-kinase/LIM-kinase kann durch Expression der nicht phosphorylierbaren Cofilin S3A-Mutante blockiert werden (Li Han, Doktorarbeit, Universität Essen, 2003). Aufgrund dieser neuen Erkenntnis habe ich nun untersucht, ob die Blockade einen Reaktionsschritt vor der PLD1, bei Cofilin, Einfluss auf die PIP-5-kinase-Aktivität nimmt. Hierfür wurden HEK-293-Zellen mit Rho-kinase-CAT und dem nicht phosphorylierbaren Cofilin S3A kotransfiziert und die Totallysate hinsichtlich ihrer PIP-5-kinase-Aktivität getestet. Tatsächlich wurde der stimulierende Effekt von Rho-kinase-CAT auf die Aktivität der PIP-5-kinase durch Expression von Cofilin S3A weitgehend blockiert. In der Abb. 8A sind die zum Kinase-Assay gehörenden radioaktiven PIP<sub>2</sub>-Banden in dem Autoradiogramm dargestellt. Expression von Rho-kinase-CAT führte zu einer starken Stimulation der PIP-5-kinase. Diese gesteigerte Synthese von [<sup>32</sup>P]PIP<sub>2</sub> wurde durch Expression von Cofilin S3A konzentrations-abhängig reduziert. Dieses Ergebnis wurde anschließend auch anhand der Bestimmung des PIP<sub>2</sub>-Gehaltes in intakten Zellen überprüft. Expression steigender Mengen an Cofilin S3A führte zu einer kompletten Hemmung des durch Rho-kinase-CAT induzierten Anstiegs von PIP<sub>2</sub> (Abb. 8B). Diese Ergebnisse lassen eine Beteiligung der PLD1, vermutlich über die vorgeschalteten Effektoren LIM-kinase und Cofilin, im Signalweg von RhoA und Rho-kinase zur PIP-5-kinase annehmen.



**Abb. 8. Hemmung der durch Rho-kinase-CAT gesteigerten PIP<sub>2</sub>-Synthese durch Cofilin S3A**

(A) Subkonfluente HEK-293-Zellen wurden ohne (-) oder mit 30  $\mu\text{g DNA}$  von Rho-kinase-CAT (+) und den angegebenen Mengen ( $\mu\text{g DNA}$ ) an Cofilin S3A transfiziert. Die Bestimmung der PIP-5-kinase-Aktivität erfolgte in den Zelllysaten wie in „Material und Methoden“ (3.2.6) beschrieben. Das Autoradiogramm zeigt ein typisches Ergebnis der PIP-5-kinase-Assays und ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

(B) HEK-293-Zellen wurden ohne (*leere Säule*) oder mit 30  $\mu\text{g DNA}$  von Rho-kinase-CAT und den angegebenen Mengen ( $\mu\text{g DNA}$ ) an Cofilin S3A (*graue Säulen*) transfiziert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des zellulären PIP<sub>2</sub>-Gehaltes wie in „Material und Methoden“ (3.2.7) beschrieben. Der zelluläre PIP<sub>2</sub>-Gehalt ist in pmol pro mg Protein angegeben. Dargestellt ist einer von zwei unabhängigen Versuchen, die ähnliche Resultate ergaben.

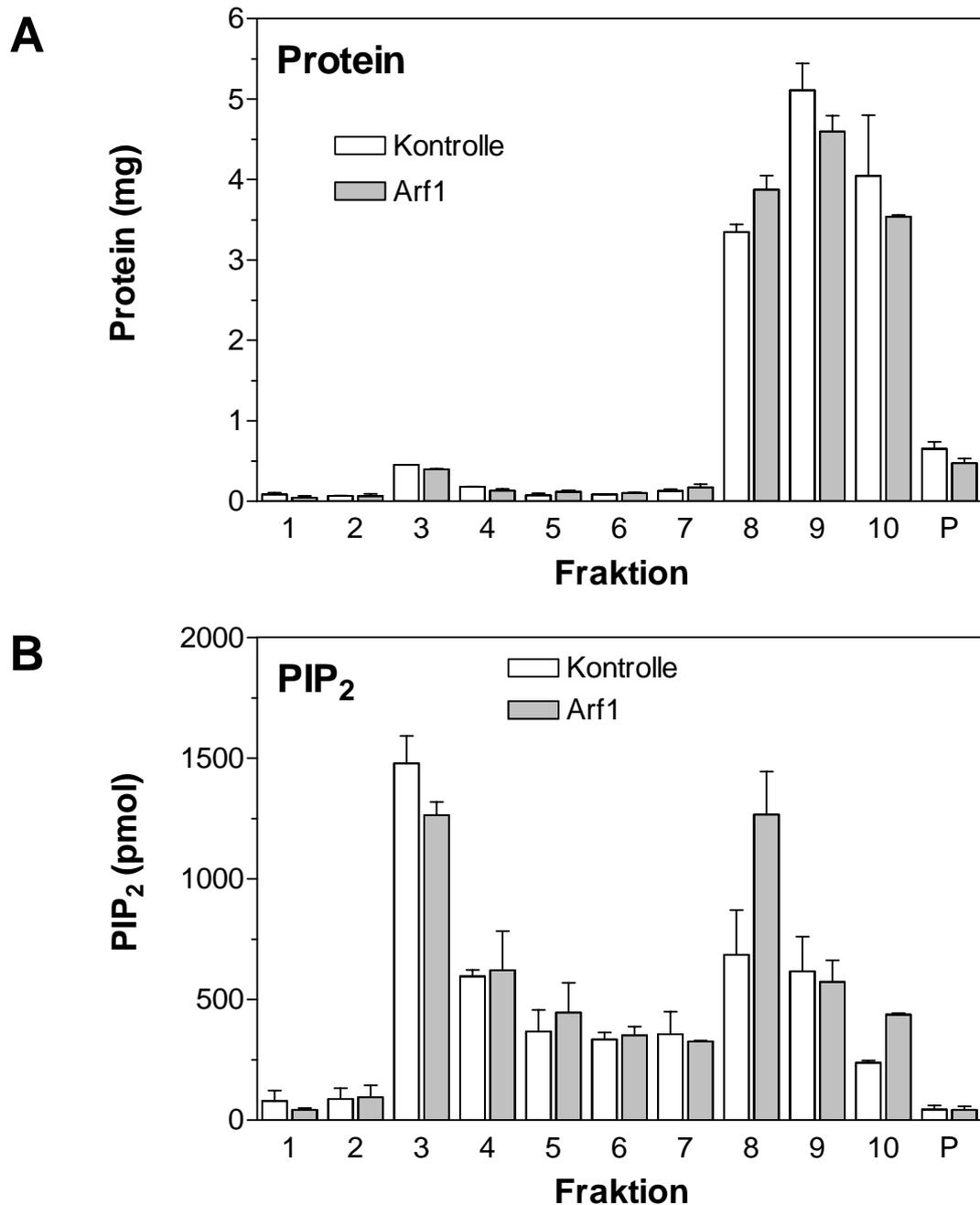
#### 4.4 Effekte von Arf1 und PLD1 auf subzelluläre PIP<sub>2</sub>-Pools

Die bislang dargestellten Ergebnisse zeigten, dass PLD-Enzyme, insbesondere die PLD1, bei der Regulation der PIP-5-kinase durch Arf1 und RhoA beteiligt sind. Im Weiteren sollte nun untersucht werden, welcher PIP<sub>2</sub>-Pool in der Zelle durch die Interaktion zwischen PLD und PIP-5-kinase reguliert wird. Wie bekannt ist, erfüllt PIP<sub>2</sub> als Substrat verschiedener Enzyme und als Regulator zahlreicher intrazellulärer Proteine vielfältige Zellfunktionen, wohingegen über die räumliche Regulation der Synthese von PIP<sub>2</sub> bislang noch wenige Daten vorliegen. Es besteht die Hypothese, dass PIP<sub>2</sub> in kleinen Pools verschiedener Zellkompartimente gruppiert ist, die sowohl funktionell als auch strukturell unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterworfen sind.

Eine Möglichkeit der PIP<sub>2</sub>-Kompartimentierung stellen Caveolae dar, die durch das Markerprotein Caveolin-1, den hohen Gehalt an Glykosphingolipiden und Cholesterol und ihre geringe Dichte charakterisiert sind. Caveolae sind kleine Signaldomänen, welchen aufgrund ihrer Konzentration an Signalmolekülen, auch Phosphoinositiden (Pike & Casey, 1996) eine grundlegende Bedeutung in Prozessen der Signaltransduktion zugesprochen wird. In A431-Zellen konnten nach Sucrosedichte-zentrifugation zwei PIP<sub>2</sub>-Pools nachgewiesen werden, wobei annähernd die Hälfte des totalen PIP<sub>2</sub> im *low density* Bereich (Caveolae) lokalisiert war, während der zweite Pool im *high density* Bereich gefunden wurde (Pike & Casey, 1996). Unsere Arbeitsgruppe hatte sich bereits mit der subzellulären PIP<sub>2</sub>-Verteilung in HEK-293-Zellen befasst und gezeigt, dass die GTPase RhoA vor allem einen PIP<sub>2</sub>-Anstieg im *low density* Bereich eines diskontinuierlichen Sucrosedichtegradienten bewirkt, während Arf1 eher den PIP<sub>2</sub>-Pool im *high density* Bereich zu regulieren scheint. In der vorliegenden Arbeit bin ich nun der Frage nachgegangen, welcher der beiden PIP<sub>2</sub>-Pools durch die PLD1 reguliert wird.

Zunächst wurden HEK-293-Zellen mit Arf1 transfiziert. Nach Aufschluss der Zellen wurden die Lysate in eine 60 %ige Sucroselösung gebracht, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und von einer 35 %- bzw. 5 %igen Sucrosephase überschichtet. Nach anschließender Ultrazentrifugation wurden 10 Fraktionen von jeweils 1,2 ml gesammelt und das verbleibende Pellet in Puffer resuspendiert. Jede Fraktion wurde hinsichtlich ihres Proteingehaltes sowie des Gehaltes an PIP<sub>2</sub> untersucht. Der Hauptanteil der Proteine wurde im *high density* Bereich (Fraktionen 8 - 10) gefunden und nur ein kleiner Anteil (4,8 %) im *low density* Bereich (Fraktionen 3 - 4) (Abb. 9A). Dahingegen ergab die Bestimmung des PIP<sub>2</sub>-Gehaltes in den Kontrollzellen in Übereinstimmung mit früheren Daten, dass ein großer Teil des PIP<sub>2</sub> (42,5 %) im *low density* Bereich gemessen wurde (Abb. 9B). In den mit Arf1

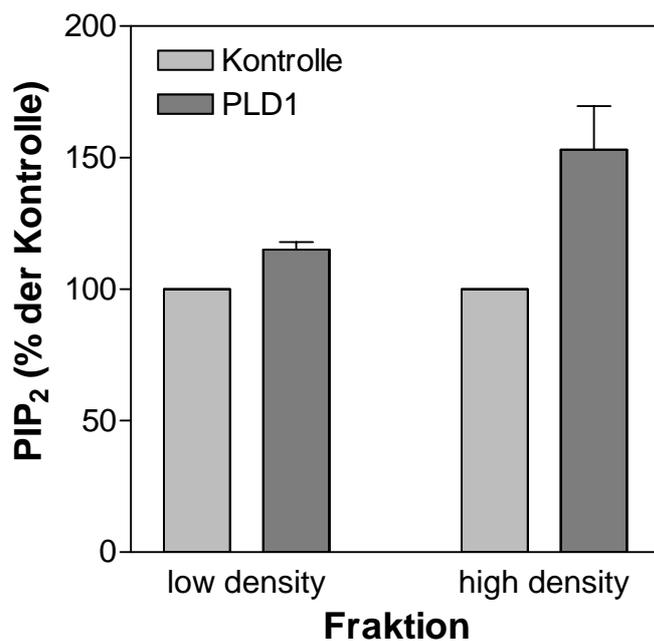
transfizierten Zellen konnte eine ausgeprägte und spezifische Zunahme von PIP<sub>2</sub> im *high density* Bereich beobachtet werden (Abb. 9B). Die Verteilung der Proteine wurde durch die Überexpression von Arf1, im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert. Diese Daten bestätigen frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, die ebenfalls auf eine selektive Regulation des PIP<sub>2</sub>-Gehaltes im *high density* Bereich durch Arf1 hindeuteten.



**Abb. 9. Effekte von Arf1 auf die subzelluläre Protein- und PIP<sub>2</sub>-Verteilung**

HEK-293-Zellen wurden ohne (*leere Säulen*) und mit Arf1 (50 µg DNA) (*graue Säulen*) transfiziert. Anschließend wurden die Zellysate mittels eines Sucroседichtegradienten aufgetrennt. Zum Aufbau des Sucrosegradienten wurde 1 ml Zellysate und 2 ml 60%ige Sucrose-Lösung, 6 ml 60%ige Sucrose-Lösung und 3 ml 5%ige Sucrose-Lösung in einem Zentrifugenröhrchen geschichtet. Nach Ultrazentrifugation (3h bei 32.000 Upm, 4 °C) erfolgte die Aliquotierung des Sucroседichtegradienten in 10 Fraktionen (1 - 10) und Pellet (P) von jeweils 1,2 ml, die in 1,2 ml MBS resuspendiert und in 0,9 ml eines Chloroform-Methanol-HCl-Gemisches extrahiert wurden. Nach Phasentrennung in einer Zentrifuge und Eindampfung der unteren Phase in einem Vakuumkonzentrator wurde der Gehalt der einzelnen Fraktionen an Protein (A) und PIP<sub>2</sub> (B) wie in „Material und Methoden“ (3.2.5 bzw. 3.2.7) beschrieben, bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert ± Bereich von zwei Gradienten angegeben und repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

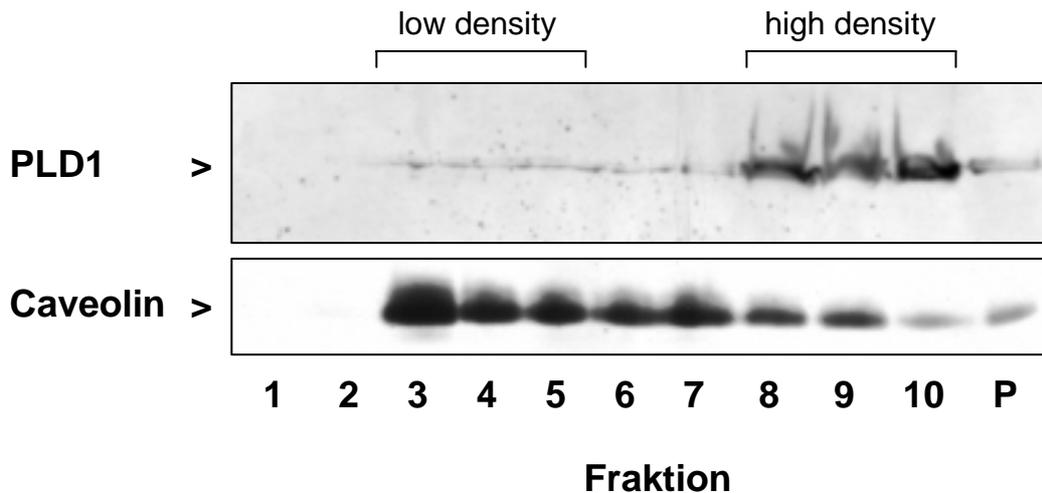
Überexpression von PLD1 in HEK-293-Zellen führte zu einem Anstieg an PIP<sub>2</sub> sowohl im *low density* als auch im *high density* Bereich (Abb. 10). Allerdings war der Anstieg im *high density* Bereich ( $53 \pm 17 \%$ ) deutlich stärker als im *low density* Bereich ( $15 \pm 3 \%$ ). Diese ausgeprägte Erhöhung im *high density* Bereich deutet darauf hin, dass die PLD1, ähnlich wie Arf1, den PIP<sub>2</sub>-Gehalt eher außerhalb von Caveolae kontrolliert. Auch nach Kotransfektion von Arf1 und PLD1 wurde besonders eine Steigerung des PIP<sub>2</sub>-Gehaltes im *high density* Bereich beobachtet (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 10. Effekt von PLD1 auf die subzelluläre PIP<sub>2</sub>-Verteilung**

HEK-293-Zellen wurden ohne (*hellgraue Säulen*) und mit 50 µg PLD1-DNA (*dunkelgraue Säulen*) transfiziert. Die dichteabhängige Fraktionierung der Zellbestandteile erfolgte durch Ultrazentrifugation innerhalb eines Sucrosegradienten wie in Abb. 9 beschrieben. Zur Feststellung der Verteilung von PIP<sub>2</sub> im *low density* bzw. *high density* Bereich wurden die Fraktionen 3 - 4 bzw. 8 - 10 gepoolt und der zelluläre PIP<sub>2</sub>-Gehalt wie in „Material und Methoden“ (3.2.7) beschrieben, bestimmt. Die Menge an PIP<sub>2</sub> ist in % der Kontrolle in nicht transfizierten Zellen angegeben. Die Daten sind Mittelwert  $\pm$  S.E.M. aus vier voneinander unabhängigen Versuchen.

Zur Überprüfung der Verteilung der PLD1 in den einzelnen Fraktionen wurden diese mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Westernblot-Analyse mit einem spezifischen anti-PLD1-Antikörper untersucht. Wie in Abb. 11 dargestellt, wurde die PLD1 überwiegend im *high density* Bereich (Fraktionen 8 - 10) gefunden. Im Vergleich dazu wurde auch eine Immunoblot-Analyse für das Strukturprotein Caveolin-1 als Marker für Caveolae durchgeführt. Tatsächlich wurde die höchste Anreicherung von Caveolin in der Fraktion 3 beobachtet (Abb. 11).



**Abb. 11. Subzelluläre Verteilung von PLD1 und Caveolin**

HEK-293-Zellen wurden wie in Abb. 10 beschrieben mit PLD1 (50 µg DNA) transfiziert und die Zelllysate mittels Sucrosedichtegradientenzentrifugation fraktioniert. In den so erhaltenen Fraktionen wurde der Gehalt an PLD1 (*oberer Teil*) und Caveolin (*unterer Teil*) mittels Immunoblot-Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen PLD1 bzw. Caveolin-1 wie in „Material und Methoden“ (3.2.9 und 3.2.10) beschrieben, bestimmt.

Schließlich wurden die Effekte der Expression der inaktiven PLD-Enzyme PLD1 K898R und PLD2 K758R auf die Verteilung von PIP<sub>2</sub> in den Fraktionen der Sucrosedichtegradientenzentrifugation untersucht. Die Expression von PLD1 K898R verringerte selektiv den PIP<sub>2</sub>-Gehalt im *high density* Bereich im Vergleich zu den Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu führte die Expression von PLD2 K758R zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des PIP<sub>2</sub>-Gehaltes in beiden Dichtegradientenfraktionen (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die GTPase Arf1 gemeinsam mit der PLD1 einen nicht-caveolären PIP<sub>2</sub>-Pool kontrolliert. Welchen PIP<sub>2</sub>-Pool die Rho-Proteine gemeinsam mit der PLD regulieren, bleibt noch zu klären.

## 5. Diskussion

### 5.1 Beteiligung der Phospholipase D an der Regulation der Synthese von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) spielt eine bedeutende Rolle für eine Vielzahl zellulärer Vorgänge (siehe Einleitung). Diese vielfältigen Funktionen von PIP<sub>2</sub>, das einerseits als Substrat für die Bildung von sekundären Botenstoffen dient und andererseits mit vielen zellulären Proteinen interagiert und dadurch ihre Aktivität und/oder subzelluläre Lokalisation ändert, lassen eine kontrollierte Regulation der für seine Synthese und seinen Abbau verantwortlichen Enzyme vermuten. Als Hauptsyntheseweg von PIP<sub>2</sub> wird die Phosphorylierung von PI an der D4-Position des Inositolringes durch die PI-4-kinase und die anschließende Phosphorylierung von PIP an der D5-Position durch die PIP-5-kinase angenommen. Neuere Daten geben jedoch Hinweise darauf, dass sich der zelluläre Phosphoinositidmetabolismus wesentlich komplexer darstellt als bisher angenommen (Anderson *et al.*, 1999). Im Vergleich zu anderen wichtigen Enzymen in der Signaltransduktion, wie der Phospholipase C (PLC) und D (PLD) oder der Proteinkinase C (PKC), ist über den Mechanismus der zeitlichen und räumlichen Regulation dieser Enzyme sehr wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit habe ich deshalb die Regulation der PIP<sub>2</sub>-Synthese durch die PIP-5-kinase über die kleinen GTPasen der Arf- und Rho-Familie untersucht, mit besonderem Interesse an einer möglichen Beteiligung der PLD an diesen Signalwegen.

Die PLD ist an zahlreichen physiologischen Prozessen in eukaryontischen Zellen beteiligt, wie unter anderem an metabolischen Prozessen, Zellwachstum und -differenzierung, Sekretion, Vesikeltransport und Membranverkehr (Exton, 2002). Für einige dieser zellulären Funktionen der PLD, wie z.B. die Reorganisation des Aktinzytoskelettes wurde gezeigt, dass hierfür die Phosphatidsäure (PA), das Reaktionsprodukt der hydrolytischen Spaltung von Phosphatidylcholin durch die PLD verantwortlich ist. Die Wirkungen von PA kommen über direkte Interaktion mit PA-bindenden Proteinen zustande, zu denen auch Protein- und Lipid-kinasen wie die PIP-5-kinasen gehören. Auf diese Weise kann das Lipid die enzymatische Aktivität und zelluläre Lokalisation zahlreicher Proteine beeinflussen (Gosh *et al.*, 1996; Exton, 1997; Kishikawa *et al.*, 1999; Rizzo *et al.*, 2000; Manifava *et al.*, 2001; Jones & Hannun, 2002).

Erstmalig wurde Anfang der neunziger Jahre von Moritz *et al.* (1992) Daten zur spezifischen Regulation der PIP-5-kinase durch PA publiziert. Die Autoren zeigten, dass die

Aktivität einer aus Rinderhirn gereinigten PIP-5-kinase durch Zusatz von PA gesteigert wird, während andere Lipide, einschließlich PI, Phosphatidylserin und Lysophosphatidsäure (LPA) keinen oder nur einen geringen Effekt auf die PIP-5-kinase-Aktivität zeigten. In Übereinstimmung mit diesen *in vitro* Studien konnten auch ich in Lysaten von HEK-293-Zellen einen spezifischen Anstieg der PIP-5-kinase-Aktivität durch PA zeigen. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die PLD über die Bildung von PA an der Aktivierung der PIP-5-kinase in HEK-293-Zellen beteiligt ist.

Eine tatsächliche Beteiligung der PLD an der Regulation der PIP-5-kinase in HEK-293-Zellen konnte durch transiente Überexpression von PLD-Isoformen nachgewiesen werden. Die physiologische Bedeutung dieses Ergebnisses wurde von uns erstmalig auch in Experimenten mit intakten Zellen durch eine Zunahme des PIP<sub>2</sub>-Gehaltes gezeigt. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Zielproteine von PA *in vitro* identifiziert, aber nur bei einigen konnte auch eine Aktivitätsteigerung *in vivo* belegt werden. Dass die Stimulation der PIP-5-kinase durch die PLD über ihr Produkt PA vermittelt wird, ist sehr wahrscheinlich, aber letztendlich noch nicht gesichert. So könnten auch Metabolite von PA, zu welchen Diacylglycerol (DAG), LPA und Arachidonsäure zählen, bei der Aktivierung der PIP-5-kinase theoretisch eine Rolle spielen. Darüber hinaus kann auch eine direkte Interaktion von PLD1 mit der PIP-5-kinase ohne Bildung von PA in Betracht gezogen werden. Ein Beispiel für eine Aktivierung allein durch die direkte Bindung zweier Enzyme ist die Interaktion zwischen PKC und PLD. So kann die PLD durch PKC-Isoenzyme durch einen phosphorylierungsunabhängigen Mechanismus aktiviert werden (Singer *et al.*, 1997; Exton, 1999), und auch eine katalytisch inaktive PKC-Mutante ist in der Lage die PLD zu aktivieren (Singer *et al.*, 1996). Allerdings konnten ich nach Expression von Lipase-defizienten PLD-Mutanten keine Stimulation der PIP-5-kinase-Aktivität, sondern sogar eine deutliche Hemmung beobachten. Somit scheint für eine Aktivierung der PIP-5-kinase durch die PLD in HEK-293-Zellen die katalytische Aktivität der PLD und damit die Bildung von PA notwendig zu sein. In Übereinstimmung damit wurde von D.R. Jones *et al.* (2000) gezeigt, dass eine Überexpression der DAG-kinase, die die Bildung von PA aus DAG katalysiert, ebenfalls zur Stimulation der PIP-5-kinase führt.

Das durch die PIP-5-kinase gebildete PIP<sub>2</sub> wiederum ist ein essentieller Kofaktor für die Stimulation der beiden beim Säuger identifizierten PLD-Isoenzyme PLD1 und PLD2 sowie der PLD-Aktivität in verschiedenen zellfreien Systemen, wie in Rattenhirnmembranen (Liscovitch *et al.*, 1994; Pertile *et al.*, 1995; Hammond *et al.*, 1997, Colley *et al.*, 1997a, b). Dieses Ergebnis wurde auch in Untersuchungen mit HEK-293-Zellen bestätigt. Dabei wurde

gezeigt, dass PIP<sub>2</sub> ein hochspezifischer Faktor bei der Aktivierung der PLD-Aktivität ist, während andere Phospholipide, einschließlich PIP und PI keinen Effekt auf die Aktivität der PLD zeigten (Schmidt *et al.*, 1996c). Da PIP<sub>2</sub> sowohl ein wesentlicher Kofaktor für die Stimulation der PLD-Isoenzyme ist als auch über einen positiven Rückkopplungsmechanismus die Aktivität der PIP-5-kinase steigern kann, lässt eine enge Interaktion dieser beiden Enzyme annehmen.

## **5.2 Beteiligung der PLD1 an der durch Arf1 und Rho/Rho-kinase regulierten PIP<sub>2</sub>-Synthese**

Eine Beteiligung von Mitgliedern der Arf- und Rho-GTPasen an der Rezeptor-vermittelten Stimulation der PLD wurden in zahlreichen Studien mit Zellmembranen, permeabilisierten Zellen und intakten Zellen gezeigt. Dabei wurde sowohl eine synergistische Wirkung von Arf- und Rho-Proteinen als auch eine Regulation der PLD durch Arf und Rho auf getrennten Signalwegen vorgeschlagen (Fensome *et al.*, 1998; Bayer *et al.*, 1999; Fahimi-Vahid *et al.*, 2002; Gosau *et al.*, 2002). Obwohl bislang die Bindungsstelle von PLD für Arf-Proteine noch nicht eindeutig identifiziert wurde, konnte eine Aktivierung der beiden Säuger-Isoformen PLD1 und PLD2 durch Arf1 in verschiedenen Zellsystemen gezeigt werden (Brown *et al.*, 1993; Cockcroft *et al.*, 1994; Hammond *et al.*, 1997; Sung *et al.*, 1997).

Arf-Proteine könnten die PLD aber auch indirekt, über die Aktivierung von PIP-5-kinasen eine gesteigerte PIP<sub>2</sub>-Synthese bewirken. In der Tat wurde gezeigt, dass Arf1 in der Lage ist, die PIP<sub>2</sub>-Synthese in permeabilisierten Zellen zu stimulieren (Fensome *et al.*, 1996; Way *et al.*, 2000). Unklar ist, ob es sich hierbei um eine direkte Aktivierung der PIP-5-kinase handelt oder indirekt aus der Stimulation der PLD resultiert. Nicht zuletzt ist auch eine Kombination aus beiden Mechanismen denkbar. Einzelne Forschergruppen haben sich mit dieser Frage in Studien mit unterschiedlichen Zell- und Testsystemen beschäftigt. In Studien mit aus Rattenleber gereinigten Golgi-Membranen wurde gezeigt, dass Inkubation mit dem stabilen GTP-Analogon GTP $\gamma$ S und Arf1 zu einem drastischen Anstieg des PIP<sub>2</sub>-Spiegels im Golgi-Kompartiment führt (Godi *et al.*, 1999; D.H. Jones *et al.*, 2000). Arf1 stimulierte dabei selektiv die Aktivität der endogenen PI-4-kinase- $\beta$  und interagierte auch mit der PIP-5-kinase- $\alpha$ , ohne dass PA erforderlich war. Im Gegensatz dazu haben Honda *et al.* (1999) in Studien mit Rinderhirnzytosol zeigen können, dass Arf-Proteine nur in Gegenwart von PA zu einem 2- bis 3-fachen Anstieg von PIP<sub>2</sub> führen. Im Einklang mit diesen Befunden wurde in Versuchen mit aufgereinigten Lysosomen und Golgi-Membranen ebenfalls die Notwendigkeit

von PA für die Aktivierung der PIP-5-kinase nachgewiesen (Arneson *et al.*, 1999; Siddhanta *et al.*, 2000).

Zu bedenken ist, dass diese *in vitro* Studien zur Regulation der PIP-5-kinase-Aktivität mit Lipidvesikel-Präparationen durchgeführt wurden, deren Lipidzusammensetzung nicht unbedingt den physiologischen Bedingungen in der Zelle entspricht. Deshalb haben ich den durch Arf1 regulierten Aktivierungsweg zur PIP-5-kinase in intakten HEK-293-Zellen untersucht. Eine Möglichkeit die Beteiligung von PA als Kofaktor für die zelluläre PIP<sub>2</sub>-Synthese zu prüfen, ist die Verwendung von 1-Butanol. In Gegenwart dieses primären Alkohols bildet die PLD, anstatt von PA, durch eine Transphosphatidylierungsreaktion Phosphatidylbutanol. Diese Methode haben vor kurzem Skippen *et al.* (2002) zum Nachweis des indirekten Arf-abhängigen Aktivierungsmechanismus der PIP-5-kinase über PA in permeabilisierten humanen Leukämiezellen (HL-60-Zellen) versucht. Ein wichtiger Vorteil bei der Verwendung von primären Alkoholen besteht darin, dass durch die Zugabe von 1-Butanol eine akute Hemmung der PA-Synthese in nahezu alle Zellen erreicht werden kann. Die Wirkung von 1-Butanol ist konzentrationsabhängig, wobei eine Konzentration von 0,5 % als optimal für eine maximale Transphosphatidylierung angenommen wurde. In Anwesenheit von 0,5 % Butanol konnte jedoch sowohl in Golgi-Membranen (D.H. Jones *et al.*, 2000) als auch in permeabilisierten Zellen (Skippen *et al.*, 2002) kein Effekt auf die durch Arf1 stimulierte PIP<sub>2</sub>-Synthese festgestellt werden. Allerdings wurde durch 0,5 % Butanol die Bildung von PA nicht komplett verhindert. Bei einer Konzentration von 1,5 % Butanol wurde zwar eine Abnahme der PIP<sub>2</sub>-Synthese beobachtet, aber auch eine Hemmung der PLD festgestellt. Da mit dem Einsatz von Butanol keine Beurteilung möglich schien, haben Skippen *et al.* (2002) die Arf1-Mutante Arf1 N52R eingesetzt, die *in vitro* zwar die Aktivität der PIP-5-kinase, jedoch nicht der PLD steigert. Diese selektive Arf1-Mutante stimulierte die PIP<sub>2</sub>-Synthese jedoch um 45 % geringer als die Wild-Typ Form von Arf1. Die Autoren schlossen somit auf eine Kombination aus sowohl direkter Aktivierung der PIP-5-kinase durch Arf1 als auch über die Bildung von PA.

In der vorliegenden Arbeit wurde die zelluläre Bildung von PA durch die transiente Expression katalytisch inaktiver PLD-Mutanten gestört. Im Gegensatz zu Butanol kann so eine chronische und spezifische Hemmung der endogenen PLD-Aktivität erreicht werden, bei einer Transfizierungseffizienz von 50 - 80 % jedoch nicht in allen Zellen. Ich habe zudem konstitutiv aktive und dominant negative Mutanten von Arf1 eingesetzt. Wie in der Einleitung dargestellt, kommen die monomeren GTPasen in zwei funktionellen Zuständen vor. Die GTP-gebundene Form entspricht dem aktiven Zustand, während die GDP-gebundene Form den

inaktiven Zustand darstellt. An der Bindung von GTP durch Arf1 ist unter anderem der Aminosäurenrest Threonin-31 beteiligt (Amor *et al.*, 1994). Durch die Mutation dieses Aminosäurenrestes zu Asparagin entsteht die dominant negative Arf1-Variante Arf1 T31N, die nicht mehr zum GDP-GTP-Austausch befähigt ist und durch ihre Bindung von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) auch die Aktivierung von endogenen Arf-Proteinen verhindert. Die Mutation des Glutamins an Position 71 zu Leucin führt zu der konstitutiv aktiven Variante Arf1 Q71L, bei der die intrinsische GTPase-Aktivität gelöscht ist.

Ich konnte nach Kotransfektion mit inaktiven PLD-Isoenzymen eine deutliche Reduzierung der durch Arf1 Q71L stimulierten PIP<sub>2</sub>-Synthese beobachten. In Abhängigkeit der addierten Mengen inaktiver PLD1 K898R und PLD2 K758R konnte sogar eine komplette Hemmung bis unter den basalen PIP<sub>2</sub>-Spiegel in den Kontrollzellen beobachtet werden. Diese vollständige Blockade durch die inaktiven PLD-Mutanten in Anwesenheit einer konstitutiv aktiven Arf1-Mutante lässt vermuten, dass Arf1 vorgeschaltet zur PLD im Signalweg zur PIP-5-kinase agiert. Basierend auf diesem Resultat lege ich, im Gegensatz zu Skippen *et al.* (2002) eine stärkere Gewichtung auf den Signalweg von Arf1 zur PIP-5-kinase, nämlich unter Einschaltung der PLD. Ein bedeutender Vorteil unserer Vorgehensweise liegt zudem darin, dass durch die Verwendung der katalytisch inaktiven PLD-Isoenzyme PLD1 K898R und PLD2 K758R eine mögliche Isoformselektivität geprüft werden kann. Beide inaktiven PLD-Isoformen waren in der Lage die durch Arf1 Q71L induzierte PIP<sub>2</sub>-Bildung zu verhindern, jedoch erfolgte die Hemmung durch PLD1 K898R deutlicher mengenabhängig.

Die Hypothese, dass speziell die Isoform PLD1 eine physiologische Bedeutung in dem Signalweg von Arf1 zur PIP-5-kinase hat, konnte in weiteren Versuchen erhärtet werden. So führte die Koexpression von Arf1 Q71L mit der Isoform PLD1 zu einer synergistischen Aktivitätssteigerung der PIP-5-kinase, während die simultane Transfizierung mit der PLD2 nur eine additive Steigerung zur Folge hatte. Dieses Ergebnis konnte durch Untersuchungen mit der dominant negativen Variante Arf1 T31N untermauert werden, die den stimulierenden Effekt von PLD1 auf die PIP-5-kinase-Aktivität supprimieren konnte. In intakten Zellen schlug sich die Hemmung der durch PLD1 induzierten PIP-5-kinase-Aktivität durch Arf1 T31N in einem verringerten PIP<sub>2</sub>-Gehalt nieder.

In der intakten Zelle dürfte die Interaktion wesentlich komplexer sein, da sowohl PA als auch Phosphoinositide die Funktion der Arf-GTPasen regulieren können. So wird im Vesikeltransport die Bindung von COP-Proteinen an die Donormembran vermutlich durch PA stimuliert (Roth, 2000). Phosphoinositide, speziell PIP<sub>2</sub>, können direkt mit Arf-Proteinen interagieren, wodurch die Interaktion und die Aktivierung von GTPase-aktivierenden

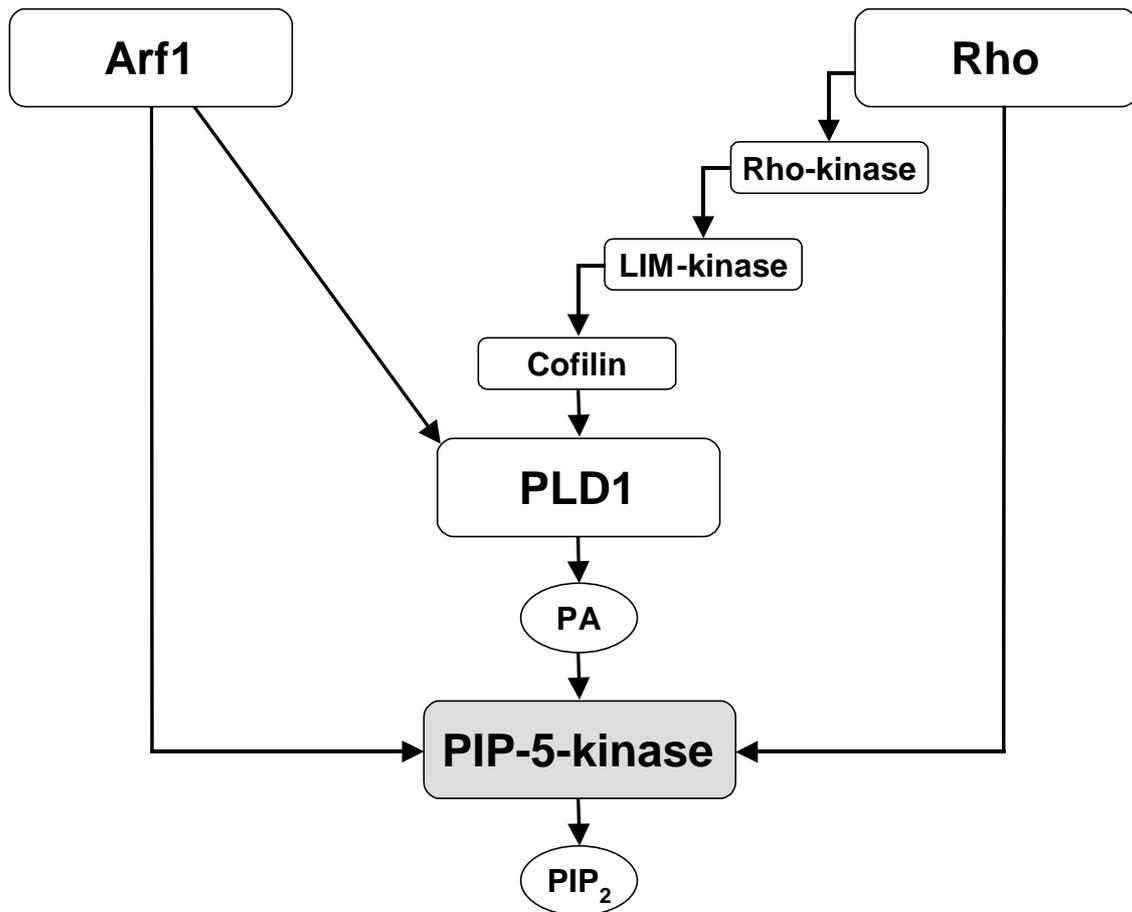
Proteinen (GAPs) mit Arf-Proteinen gefördert wird (Randazzo, 1997). PIP<sub>2</sub> kann weiterhin an Arf-spezifische GEFs binden und auf diese Weise ihre Aktivität und subzelluläre Lokalisation beeinflussen (Paris *et al.*, 1997; Klarlund *et al.*, 1998). So vermittelte die Interaktion mit PIP<sub>2</sub> die Rekrutierung des Arf1-GEFs ARNO an die Plasmamembran (Paris *et al.*, 1997). Somit wird für Phosphoinositide eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung und der Translokation von Arf-Proteinen zu ihrem Wirkort angenommen, wo sie mit ihren Zielproteinen wie z. B. PLD-Enzymen interagieren.

Zusammengenommen sprechen die dargestellten Ergebnisse für eine Beteiligung von PLD-Enzymen im Signalweg von Arf1 zur PIP-5-kinase. Hierbei scheint die Isoform PLD1 eine vorrangige Rolle zu spielen. Weiterhin sprechen die Versuche mit den inaktiven PLD-Isoenzymen dafür, dass PLD1 als Vermittler vermutlich nachgeschaltet zu Arf1 in dem Signalweg zur PIP-5-kinase in HEK-293-Zellen agiert.

Untersuchungen mit speziellen Hemmstoffen und bakteriellen Toxinen konnten zeigen, dass neben Arf-GTPasen auch GTPasen der Rho-Familie an der Regulation der PIP-5-kinase beteiligt sind (Chong *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1996b, c; Oude Weernink *et al.*, 2000a). Die Beteiligung von Rho-Proteinen an der PIP<sub>2</sub>-Synthese wurde erstmalig von Chong *et al.* (1994) in Mausfibroblasten beobachtet. Sie zeigten, dass die spezifische Hemmung von Rho mit dem *Costridium botulinum* C3-Exoenzym zu einer Hemmung der durch GTP $\gamma$ S stimulierten PIP-5-kinase-Aktivität führt. In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass RhoA über die Aktivierung der Rho-kinase die zelluläre PIP<sub>2</sub>-Synthese reguliert (Oude Weernink *et al.*, 2000b). Die physiologische Bedeutung dieser Beobachtung konnte in N1E-115-Neuroblastomzellen bestätigt werden, in welchen die Regulation der Neurit-Architektur durch RhoA/Rho-kinase über die Synthese von PIP<sub>2</sub> vermittelt wird (Yamazaki *et al.*, 2002). Da RhoA und Rho-kinase zudem effektive Regulatoren der PLD-Aktivität sind, besteht die Möglichkeit, dass die PLD auch in der Signalkaskade von RhoA und Rho-kinase zur PIP-5-kinase eingeschaltet ist. Dazu wurden HEK-293-Zellen mit Rho-kinase-CAT transfiziert, welches die konstitutiv aktive Form der Rho-kinase darstellt. Expression dieser katalytischen Rho-kinase führte zu einer ausgeprägten Steigerung der PIP-5-kinase-Aktivität, wie bereits frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten. Der stimulierende Effekt der Rho-kinase-CAT auf die PIP-5-kinase-Aktivität konnte durch Koexpression der inaktiven PLD-Enzyme PLD1 K898R und PLD2 K758R mengenabhängig gehemmt werden. Insbesondere durch Expression der inaktiven PLD1-Mutante wurde eine drastische Reduzierung der PIP-5-kinase-Aktivität beobachtet. Somit scheint, wie bereits für den Arf1-

Signalweg angenommen, auch im Rho-abhängigen Signalweg zur PIP-5-kinase insbesondere die Isoform PLD1 eine Rolle zu spielen.

Kürzlich wurden Hinweise für die Beteiligung von zwei weiteren Signalkomponenten, nämlich von LIM-kinase und Cofilin, an der Stimulation der PLD durch Rho und Rho-kinase gefunden (unveröffentlichte Daten). Rho-kinase aktiviert die LIM-kinase durch Phosphorylierung an Threonin-508, wonach die LIM-kinase ihr einzig bislang identifiziertes Substrat Cofilin an Serin-3 phosphoryliert (Maekawa *et al.*, 1999; Ohashi *et al.*, 2000). Phosphoryliertes Cofilin ist in seiner Funktion als Aktin-modulierendes Protein inaktiv, es kann jedoch in dieser Form direkt mit der PLD1 interagieren und deren enzymatische Aktivität steigern. Tatsächlich wurde durch Expression von Cofilin S3A, das durch Mutation von Serin-3 zu Alanin nicht mehr phosphoryliert werden kann, die durch Rho-Kinase-CAT induzierte positive Signalwirkung zur PIP-5-kinase ebenfalls vollständig inhibiert. Dieses Ergebnis deutet auf eine Beteiligung von Cofilin, das durch LIM-kinase reguliert wird, im RhoA-induzierten Signalweg zur PIP-5-kinase hin. Noch unveröffentlichte Studien aus unserer Arbeitsgruppe haben ergeben, dass die PIP-5-kinase-Aktivität in Lysaten von HEK-293-Zellen durch die LIM-kinase gesteigert werden kann. Da durch die LIM-kinase phosphoryliertes Cofilin direkt mit der PLD1 interagiert und ihre Aktivität steigert, wäre die Signalvermittlung von RhoA und Rho-kinase zur PIP-5-kinase durch einen indirekten Aktivierungsmechanismus über die PLD1 eine attraktive Möglichkeit. Andererseits muss auch eine mögliche direkte Stimulation der PIP-5-kinase-Aktivität durch LIM-kinase oder Cofilin unabhängig von PLD in Betracht gezogen werden. Zusammengefasst lassen meine Ergebnisse zur Regulation der PIP-5-kinase durch Arf1 und Rho somit eine Beteiligung der PLD, spezifisch der PLD1 vermuten (Abb. 13).



**Abb. 13.** Schematische Darstellung der Regulation der PIP-5-kinase durch Arf1 und Rho

Die bisher dargestellten Ergebnisse lieferten gute Hinweise dafür, dass in HEK-293-Zellen wenigstens ein Teil der Signalwirkung von Arf1 zur PIP-5-kinase unter Einschaltung der PLD1, vermutlich über PA verläuft. Jetzt stellt sich die Frage, wo in der Zelle der durch Arf1 und PLD1 regulierte Syntheseweg zu PIP<sub>2</sub> lokalisiert ist. Schon länger wird vermutet, dass in der Zelle PIP<sub>2</sub> in getrennten Reaktionsräumen gruppiert ist und dass die Synthese dieser PIP<sub>2</sub>-Pools durch die verantwortlichen Enzyme unterschiedlich reguliert wird. Erstmals erbrachten Untersuchungen von Pike & Casey (1996) Hinweise dafür, dass PIP<sub>2</sub> kompartimentiert in der Zelle vorliegt. Sie konnten in A431-Zellen nachweisen, dass mehr als 50 % des gesamten PIP<sub>2</sub> in Caveolin-angereicherten Membrandomänen lokalisiert ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass dieser caveoläre PIP<sub>2</sub>-Pool die vorrangige Substratquelle für die Hydrolyse durch die hormonstimulierte PLC darstellt. Der nicht-caveoläre PIP<sub>2</sub>-Pool dürfte eher an strukturellen Aufgaben beteiligt sein. Ich fand nach Sucroседichte-gradientenzentrifugation von Lysaten von HEK-293-Zellen, die Arf1 überexprimierten, einen selektiven Anstieg von PIP<sub>2</sub> in Fraktionen des *high density* Bereiches, der dem nicht-

caveolären Pool entspricht. Dagegen wurde die Proteinverteilung in den einzelnen Fraktionen durch die Überexpression von Arf1 nicht geändert. Überexpression von PLD1 ergab ein vergleichbares Ergebnis, mit einer deutlichen Zunahme des PIP<sub>2</sub>-Gehaltes im *high density* Bereich. Da die PLD1 ebenfalls spezifisch in diesen Fraktionen zu finden war, kann vermutet werden, dass die PLD1 die PIP<sub>2</sub>-Synthese in der *high density* Fraktion reguliert. Dieses Ergebnis steht mit Untersuchungen von Czarny *et al.* (1999) im Einklang, die die PLD2, jedoch nicht die PLD1 in Lipid Rafts und Caveolae verschiedener Zelltypen identifizierten.

In HEK-293-Zellen steht der durch Arf1 regulierte PIP<sub>2</sub>-Pool nicht für die Hydrolyse durch PLC-Enzyme zur Verfügung (unveröffentlichte Daten). In Übereinstimmung damit konnten Skippen *et al.* (2002) in HL-60-Zellen zeigen, dass die PLC nur in Anwesenheit des Phosphatidylinositol-Transfer-Proteins (PITP), das Phosphoinositide ihren jeweiligen Kinasen zuführt (Liscovitch & Cantley, 1995), auf diesen PIP<sub>2</sub>-Pool zugreifen kann. Im Gegensatz zu Arf1 führt die Aktivierung von RhoA und Rho-kinase zu einem Anstieg des PIP<sub>2</sub>-Gehaltes im *low density* Bereich, in denen auch Caveolae lokalisiert sind (unveröffentlichte Daten). Ob und wenn ja wie die PLD und ihr Reaktionsprodukt PA auch an der Regulation dieses PIP<sub>2</sub>-Pools beteiligt sind, bleibt zu klären.

Die Arf-Proteine sind an der Regulation des Membranverkehrs in unterschiedlichen Zellkompartimenten beteiligt, und insbesondere die Funktion von Arf1 am Golgi-Apparat ist bereits gut untersucht worden (Moss & Vaughan, 1998; Roth, 2000). Aktiviertes Arf1 transloziert zu den Golgi-Membranen, wo es die Rekrutierung von Coatomern sowie die Abschnürung der Transportvesikel von den Golgi-Zisternen auslöst und den Transport zum Endoplasmatischen Retikulum veranlasst. Dabei dürften die PLD und die PIP-5-kinase gemeinsam mit Arf1 an Vorgängen des Vesikeltransports im Golgi-Apparat beteiligt sein. So identifizierten Ktistakis *et al.* (1996) in Golgi-Membranen Arf1-regulierte PLD1-Aktivität. Sie konnten zeigen, dass für die Coatomer-Bindung an Golgi-Membranen die Zugabe von aktiver PLD, auch in Abwesenheit von Arf1 ausreicht. Drosselung der PA-Bildung durch primäre Alkohole verhinderte die Synthese von PIP<sub>2</sub> und damit die Bildung von *COPI-coated vesicles* (Arneson *et al.*, 1999) und zerstörte die Architektur und die funktionelle Integrität des Golgi-Apparates (Siddhanta *et al.*, 2000). Zusammengefasst deuten diese und die hier vorlegten Daten auf ein subzellulär lokalisiertes, enges Zusammenspiel von Arf1, PLD und PIP-5-kinase im Vesikeltransport hin. Eine interessante Aufgabe für die Zukunft dürfte nun die Aufklärung der physiologischen Funktion des Trios RhoA, PLD und PIP-5-kinase in Caveolae sein.

## 6. Zusammenfassung

Phosphatidsäure (PA), das Reaktionsprodukt der Phospholipase D (PLD), kann *in vitro* die Aktivität der Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-kinase (PIP-5-kinase) stimulieren. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die PLD die Synthese von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) durch die PIP-5-kinase beeinflusst. Überexpression von PLD-Isoformen in HEK-293-Zellen führte zu einer Steigerung der PIP-5-kinase-Aktivität und zu einem Anstieg des PIP<sub>2</sub>-Gehaltes in intakten Zellen. Da die GTPasen Arf1 und RhoA sowohl die PLD als auch die PIP-5-kinase stimulieren, wurde im Folgenden untersucht, ob die PLD an der Regulation der PIP<sub>2</sub>-Synthese durch diese GTPasen beteiligt ist. Die durch die beiden PLD-Isoformen PLD1 und PLD2 gesteigerte PIP<sub>2</sub>-Synthese konnte durch Koexpression der inaktiven Arf1-Mutante Arf1 T31N vollständig verhindert werden. Umgekehrt wurde der Effekt der konstitutiv aktiven Arf1-Mutante Arf1 Q71L durch Koexpression von katalytisch inaktiven PLD-Konstrukten komplett gehemmt. Während die Effekte von Arf1 Q71L und Wild-Typ PLD2 additiv waren, führte die Koexpression von Arf1 Q71L mit Wild-Typ PLD1 zu einer synergistischen Steigerung der PIP-5-kinase-Aktivität. RhoA reguliert über seinen nachgeschalteten Effektor Rho-kinase die Aktivität der PLD und der PIP-5-kinase. Expression von geringen Mengen der inaktiven PLD1, aber nicht der PLD2, führte zu einer nahezu kompletten Hemmung der durch Rho-kinase stimulierten PIP-5-kinase-Aktivität. Auch die Expression einer nichtphosphorylierbaren Mutante von Cofilin, das in die Signalkaskade von RhoA über Rho-kinase und LIM-kinase zur PLD1 eingeschaltet ist, unterdrückte den stimulierenden Effekt der Rho-kinase auf die PIP<sub>2</sub>-Synthese. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die PLD1 sowohl bei der Stimulation der PIP-5-kinase durch Arf1 als auch durch RhoA und Rho-kinase beteiligt ist. Mittels Sucrosedichtegradientenzentrifugation von Lysaten von HEK-293-Zellen konnten zwei separate PIP<sub>2</sub>-Pools isoliert werden. PLD1 und Arf1 kontrollierten selektiv den nicht-caveolären PIP<sub>2</sub>-Pool im *high density* Bereich, während die PLD2 den PIP<sub>2</sub>-Gehalt in beiden Pools beeinflusste. Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass insbesondere die Isoform PLD1, vermutlich über die Bildung von PA, einen physiologischen Regulator der PIP-5-kinase darstellt und nachgeschaltet zu Arf1 und RhoA die Synthese von PIP<sub>2</sub> kontrolliert.

## 6.1 Summary

### **Involvement of phospholipase D in the regulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis by Arf- and Rho-GTPases**

The reaction product of phospholipase D (PLD), phosphatidic acid (PA), was found to stimulate phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase (PIP-5-kinase) activity *in vitro*. In the present study, we have examined whether PLD affects the synthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) by PIP-5-kinase. Overexpression of PLD isoforms in HEK-293 cells led to an increase in PIP-5-kinase activity and to elevated PIP<sub>2</sub> levels in intact cells. As both PLD and PIP-5-kinase are stimulated by the GTPases Arf1 and RhoA, we investigated in the following, if PLD is involved in the regulation of PIP<sub>2</sub> synthesis by these GTPases. Both PLD1- and PLD2-induced PIP<sub>2</sub> synthesis was completely blocked by coexpression of catalytically inactive Arf1 T31N. Reversely, the effect of constitutive active Arf1 Q71L was fully inhibited by catalytically inactive PLD constructs. Whereas the effects of Arf1 Q71L and wild-type PLD2 were additive, coexpression of Arf1 Q71L with wild-type PLD1 led to a synergistic increase in PIP-5-kinase activity. Previously, we have shown that RhoA regulates the activity of PLD and PIP-5-kinase by its downstream effector Rho-kinase. Expression of small amounts of inactive PLD1, but not of PLD2, nearly completely abolished Rho-kinase-stimulated PIP-5-kinase activity. Also expression of a non-phosphorylatable mutant of cofilin, which participates in the signalling cascade from RhoA via Rho-kinase and LIM-kinase to PLD1, suppressed the stimulating effect of Rho-kinase on PIP<sub>2</sub> synthesis. These findings suggest that PLD1 is involved in the stimulation of PIP-5-kinase by Arf1 as well as by RhoA and Rho-kinase. After sucrose density gradient centrifugation of HEK-293 cell lysates, we isolated two separate PIP<sub>2</sub> pools. PLD1 and Arf1 selectively control the non-caveolar PIP<sub>2</sub> pool in the high density fraction, whereas PLD2 affected PIP<sub>2</sub> in both pools.

In summary, these data suggest that particularly PLD1, apparently by the production of PA, functions as a physiological regulator of PIP-5-kinase that controls the synthesis of cellular PIP<sub>2</sub> downstream to Arf1 and RhoA.

## 7. Referenzen

- Amano, M., Mukai, H., Ono, Y., Chihara, K., Matsui, T., Hamajima, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Kaibuchi K. (1996a) Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N. *Science* **271**, 648-650
- Amor, J.C., Harrison, D.H., Kahn, R.A. & Ringe D. (1994) Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature* **372**, 704-708
- Anderson, R.A., Boronenkov, I.V., Doughman, S.D., Kunz, J. & Loijens, J.C. (1999) Phosphatidyl-inositol phosphate kinases, a multifaceted family of signaling enzymes. *J. Biol. Chem.* **274**, 9907-9910
- Anderson, R.G.W., Kamen, B.A., Rothberg, K.G. & Lacey, S.W. (1992) Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* **255**, 410-411
- Arneson, L.S., Kunz, J., Anderson, R.A. & Traub, L.M. (1999) Coupled inositide phosphorylation and phospholipase D activation initiates clathrin-coat assembly on lysosomes. *J. Biol. Chem.* **274**, 17794-17805
- Aullo, P., Giry, M., Olsnes, S., Popoff, M.R. Kocks, C. & Boquet, P. (1993) A chimeric toxin to study the role of the 21 kDa GTP binding protein rho in the control of actin microfilament assembly. *EMBO J.* **12**, 921-931
- Azuma, Y. & Dasso, M. (2000) The role of Ran in nuclear function. *Curr. Biol.* **12**, 302-307
- Bae, C.D., Min, D.S., Fleming, I.N. & Exton, J.H. (1998) Determination of interaction sites on the small G protein RhoA for phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **273**, 11596-11604
- Bayer, S., Voß, M., Asmus, M., Chardin, P., Jakobs, K.H. & Schmidt, M. (1999) The ARF-specific guanine-nucleotide exchange factor ARNO potentiates phospholipase D activation by m3 muscarinic acetylcholine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **359**, R59
- Berridge, M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325
- Berridge, M.J. & Irvine, R.F. (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* **341**, 197-205
- Birnboim, H.C. & Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids. Res.* **7**, 1513
- Bishop, A.L. & Hall, A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* **348**, 241-255
- Boguski, M.S. & McCormick, F. (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**, 643-654
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. & McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117-127
- Bowman, E.P., Uhlinger, D.J. & Lambeth, J.D. (1993) Neutrophil phospholipase D is activated by a membrane-associated Rho family small molecular weight GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* **268**, 21509-21512
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Brown, D.A. & London, E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev.* **14**, 111-136
- Brown, D.A. & Rose, J.K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid enriched membrane subdomains during transport to the apical surface. *Cell* **68**, 533-544
- Brown, H.A., Gutowski, S., Moomaw, C.R., Slaughter, C. & Sternweis, P.C. (1993) ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein stimulates phospholipase D activity. *Cell* **75**, 1137-1144
- Carpenter, C.L. & Cantley L.C. (1996) Phosphoinositide kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 153-158
- Challiss, R.A., Batty, I.H., & Nahorski, S.R. (1988). Mass measurements of inositol-(1,4,5)trisphosphate in rat cerebral cortex slices using a radioreceptor assay: effects of

- neurotransmitters and depolarization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 684-691
- Chang, W.J., Ying, Y.S., Rothberg, K.G., Hooper, N.M., Turner, A.J., Gambliel H.A., De Gunzburg J., Mumby, S.M., Gilman, A.G. & Anderson, R.G. (1994) Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *J. Cell Biol.* **126**, 127-138
- Chaves-Olarte, E., Löw, P., Freer, E., Norlin, T., Weidmann, M., von Eichel-Streiber, C. & Thelestam, M. (1999) A novel cytotoxin from *Clostridium difficile* serogroup F is a functional hybrid between two other large clostridial cytotoxins. *J. Biol. Chem.* **274**, 11046-11052
- Chavrier, P. & Goud, B. (1999) The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 466-475
- Cherfils J. & Chardin, P. (1999) GEFs: structural basis of their activation of small GTP binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 306-311
- Chilvers, E.R., Batty, I.H., Challis, R.A.J., Barnes, P.J. & Nahorski, S.R. (1991) Determination of mass changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and evidence for agonist-stimulated metabolism of inositol 1,4,5-trisphosphate in airway smooth muscle. *Biochem. J.* **275**, 373-379
- Chong, L.D., Traynor-Kaplan, A., Bokoch, G.M. & Schwartz, M.A. (1994) The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* **79**, 507-513
- Chung, J.K., Sekiya, F., Kang, H.S., Lee, C., Han, J.S., Kim, S.R., Bae, Y.S., Morris, A.J. & Rhee, S.G. (1997) Synaptojanin inhibition of phospholipase D activity by hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **272**, 15980-15985
- Clapham, D.E. (1995) Calcium signaling. *Cell* **80**, 259-268
- Cockcroft, S. (1997) Phospholipase D: Regulation by GTPases and protein kinase C and physiological relevance. *Prog. Lip. Res.* **35**, 345-370
- Cockcroft, S. (2001) Signalling roles of mammalian phospholipase D1 and D2. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 1674-1687
- Cockcroft, S., Thomas, G.M., Fensome, A., Geny, B., Cunningham, E., Gout, I., Hiles, I., Totty, N.F., Truong, O. & Hsuan, J.J. (1994) Phospholipase D: A downstream effector of Arf in granulocytes. *Science* **263**, 523-526
- Colley, W.C., Altshuller, Y.M., Sue-Ling, C.K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Branch, K.D., Tsirka, S.E., Bollag, R.J., Bollag, W.B. & Frohman, M.A. (1997a) Cloning and expression analysis of murine phospholipase D1. *Biochem. J.* **326**, 745-753
- Colley, W.C., Sung, T.C., Roll, R., Jenco, J., Hammond, S.M., Altshuller, Y., Bar-Sagi, D., Morris, A.J. & Frohman, M.A. (1997b) Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr. Biol.* **7**, 191-201
- Cuadrado, A., Carnero, A., Dolfi, F., Jimenez, B. & Lacal, J.C. (1993) Phosphorylcholine: a novel second messenger essential for mitogenic activity of growth factors. *Oncogene* **8**, 2959-2968
- Cullen, P.J., Cozier, G.E., Banting, G. & Mellor, H. (2001) Modular phosphoinositide-binding domains – their role in signalling and membrane trafficking. *Curr. Biol.* **11**, R882-R893
- Czarny, M., Lavie, Y., Fiucci, G. & Liscovitch, M. (1999) Localization of phospholipase D in detergent-insoluble, caveolin-rich membrane domains. Modulation by caveolin-1 expression and caveolin-1<sup>82-101</sup>. *J. Biol. Chem.* **274**, 2717-2724
- Denmat-Ouisse, L.A., Phebidias, C., Honkavaara, P., Robin, P., Geny, B., Min, D.S., Bourgoin, S., Frohman, M.A. & Raymond, M.N. (2001) Regulation of constitutive protein transit by phospholipase D in HT-cl19 A cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 48840-48846
- Dennis, E.A. (1994) Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* **269**, 13057-13060
- Di Cunto, F., Calautti, E., Hsiao, J., Ong, L., Topley, G., Turco, E. & Dotto, G.P. (1998) Citron Rho-interacting kinase, a novel tissue-specific Ser/Thr kinase encompassing the Rho-Rac-binding protein Citron. *J. Biol. Chem.* **273**, 29706-29711
- Donaldson, J.G. & Jackson, C.L. (2000) Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 475-482

- Emoto, M., Klarlund, J.K., Waters, S.B., Hu, V., Buxton, J.M., Chawla, A. & Czech, M.P. (2000) A role for phospholipase D in GLUT4 glucose transporter translocation. *J. Biol. Chem.* **275**, 7144-7151
- Endemann, G., Yonezawa, K. & Roth, R.A. (1990) Phosphatidylinositol kinase or an associated protein is a substrate for the insulin receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **265**, 396-400
- Exton, J.H. (1997a) Phospholipase D: enzymologie, mechanisms of regulation, and function. *Physiol Rev.* **77**, 303-320
- Exton, J.H. (1997b) New developments in phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **272**, 15579-15582
- Exton, J.H. (1999) Regulation of phospholipase D. *Biochim. Biophys. Acta.* **1439**, 121-133
- Exton, J.H. (2002) Phospholipase D - structure, regulation and function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **144**, 1-94
- Fahimi-Vahid, M., Gosau, N., Michalek, C., Han, L., Jakobs, K.H., Schmidt, M., Roberts, N., Avkiran, M. & Wieland, T. (2002) Distinct signaling pathways mediate cardiomyocyte phospholipase D stimulation by endothelin-1 and thrombin. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34**, 441-453
- Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A. & Chen, J. (2001) Phosphatidic-acid mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* **294**, 1942-1945
- Feig, L.A., Urano, T. & Cantor, S. (1996) Evidence for a Ras/Ral signaling cascade. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 438-441
- Fensome, A., Cunningham, E., Prosser S., Tan, S.K., Swigart, P., Thomas, G., Hsuan J. & Cockcroft, S. (1996) ARF and PITP restore GTP $\gamma$ S-stimulated protein secretion from cytosol depleted HL60 cells by promoting PIP2 synthesis. *Curr. Biol.* **6**, 730-738
- Fensome, A., Whatmore, J., Morgan, C., Jones, D. & Cockcroft, S. (1998) ADP-ribosylation factor and Rho proteins mediate fMLP-dependent activation of phospholipase D in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **273**, 13157-13164
- Fiedler, K., Kobayashi, T., Kurzchalia, T.V. & Simons, K. (1993) *Biochemistry* **32**, 6365-6373
- Frankel, P., Ramos, M., Flom, J., Bychenok, S., Joseph, T., Kerkhoff, E., Rapp, U.R., Feig, L.A. & Foster, D.A. (1999) Ral and Rho-dependent activation of phospholipase D in v-Raf-transformed cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 502-507
- Freyberg, Z., Sweeney, D., Siddhanta, A., Bourgoin, S., Frohman, M. & Shields, D. (2001) Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **12**, 943-955
- Frohman, M.A., Sung, T.C. & Morris, A.J. (1999) Mammalian phospholipase D structure and regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1439**, 175-186
- Fukushima, N., Ishii, I., Contos, J.J.A., Weiner, J.A. & Chun, J. (2001) Lysophospholipid receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 507-534
- Godi, A., Pertile, P., Meyers, R., Marra, P., Di Tullio, G., Iurisci, C., Luini, A., Corda, D. & De Matteis, M.A. (1999) ARF mediates recruitment of Ptdins-4-OH kinase- $\beta$  and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P $_2$  on the Golgi complex. *Nature Cell Biol.* **1**, 280-287
- Goldberg, J. (1998) Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanism of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell.* **95**, 237-248
- Gosau, N., Fahimi-Vahid, M., Michalek, C., Schmidt, M. & Wieland, T. (2002) Signalling components involved in the coupling of  $\alpha_1$ -adenoceptors to phospholipase D in neonatal rat cardiac myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **365**, 468-476
- Gosh, S., Strum, J.C., Sciorra, V.A., Daniel, L. & Bell, R.M. (1996) Raf-1 kinase possesses distinct binding domains for phosphatidylserine and phosphatidic acid. Phosphatidic acid regulates the translocation of Raf-1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 8472-8480
- Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514
- Hall, A. (2000) GTPases. Oxford University Press
- Hammond, S.M., Altshuller, Y.M., Sung, T.C., Rudge, S.A., Rose, K., Engebrecht, J., Morris, A.J. & Frohman, M.A. (1995) Human ADP-ribosylation factor-activated

- phosphatidyl-choline specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J. Biol. Chem.* **270**, 29640-29643
- Hammond, S.M., Jenco, J.M., Nakashima, S., Cadwallader, K., Gu, Q.M., Cook, S., Nozawa, Y., Prestwich, G.D., Frohman, M.A. & Morris, A.J. (1997) Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **272**, 3860-3868
- Harlan, J.E., Hajduk, P.J., Yoon, H.S. & Fesik, S.W. (1994) Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* **371**, 168-170
- Hilgemann, D.W. & Ball, R. (1996) Regulation of cardiac Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> exchange and KATP potassium channels by PIP<sub>2</sub>. *Science* **273**, 956-959
- Hill, C.S., Wynne, J. & Treisman, R. (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* **81**, 1159-1170
- Hirata, M., Kanematsu, T., Takeuchi, H. & Yagisawa, H. (1998) Pleckstrin homology domain as an inositol compound binding module. *Jpn. J. Pharmacol.* **76**, 255-263
- Hodgkin, M.N., Clark, J.M., Rose, S., Saqib, K. & Wakelam, M.J.O. (1999) Characterization of the regulation of phospholipase D activity in the detergent-insoluble fraction of HL60 cells by protein kinase C and small G-proteins. *Biochem. J.* **339**, 87-93
- Hodgkin, M.N., Pettitt, T.R., Martin, A., Michell, R.H., Pemberton, A.J. & Wakelam, M.J.O. (1998) Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers? *Trends Biochem. Sci.* **23**, 200-204
- Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A. J., Frohman, M. A. & Kanaho, Y. (1999) Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase  $\alpha$  is a downstream effektor of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* **99**, 521-532
- Hope, H.R. & Pike, L.J. (1996) Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. *Mol. Biol. Cell* **7**, 843-851
- Hsuan, J.J., Minogue S. & dos Santos M. (1998) Phosphoinositide 4- and 5-kinases and the cellular roles of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Adv. Cancer Res.* **74**, 167-216
- Ishihara, H., Shibasaki, Y., Kizuki, N., Katagiri, H., Yazaki, Y., Asano, T. & Oka, Y. (1996) Cloning of cDNAs encoding two isoforms of 68-kDa type I phosphatidylinositol -4-phosphate 5-kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 23611-23614
- Ishihara, H., Shibasaki, Y., Kizuki, N., Wada, T., Yazaki, Y., Asano, T. & Oka, Y. (1998) Type I phosphatidylinositol -4-phosphate 5-kinases. Cloning of the third isoform and deletion/substitution analysis of members of this novel lipid kinase family. *J. Biol. Chem.* **273**, 8741-8748
- Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Watanabe, N., Saito, Y., Kakizuka, A., Morii, N. & Narumiya, S. (1996) The small GTP-binding protein Rho binds and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J.* **15**, 1885-1893
- Itoh, T. & Takenawa, T. (2002) Phosphoinositide-binding domains: Functional units for temporal and spatial regulation of intracellular signalling. *Cell. Signal.* **14**, 733-743
- Jackson, C.L. & Casanova, J.E. (2000) Turning on ARF: the Sec 7 family of guanine-nucleotide exchange-factors. *Trends Cell Biol.* **10**, 60-67
- Janmey, P.A. (1994) Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annu. Rev. Physiol.* **56**, 169-191
- Jenco, J.M., Rawlingson, A., Daniels, B. & Morris, A.J. (1998) Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by  $\alpha$ - and  $\beta$ -synucleins. *Biochemistry* **37**, 4901-4909
- Jenkins, G.H., Fiset P.L. & Anderson R.A. (1994) Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms are specifically stimulated by phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **269**, 11547-11554
- Jiang, H., Luo, J.-Q., Urano, T., Frankel, P., Lu, Z., Foster, D.A. & Feig, L.A. (1995) Involvement of Ral GTPase in v-Src-

- induced phospholipase D activation. *Nature* **378**, 409-412
- Jones, D.H., Bax, B., Fensome, A. & Cockcroft, S. (1999) ADP ribosylation factor 1 mutants identify a phospholipase D effector region and reveal that phospholipase D participates in lysosomal secretion but is not sufficient for recruitment of coatamer 1. *Biochem. J.* **341**, 185-192
- Jones, D.H., Morris, J.B., Morgan, C.P., Kondo, H., Irvine, R.F. & Cockcroft, S. (2000) Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase directly interacts with ADP-ribosylation factor 1 and is responsible for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in the Golgi compartment. *J. Biol. Chem.* **275**, 13962-13966
- Jones, D.R., Sanjuan, M.A. & Mérida, I. (2000) Type I $\alpha$  phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase is a putative target for increased intracellular phosphatidic acid. *FEBS Lett.* **476**, 160-165
- Jones, J.A. & Hannun, Y.A. (2002) Tight binding inhibition of protein phosphatase-1 by phosphatidic acid. Specificity of inhibition by the phospholipid. *J. Biol. Chem.* **277**, 15530-15538
- Jost, M., Simpson, F., Kavran, J.M., Lemmon, M.A. & Schmidt, S.L. (1998) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Curr. Biol.* **8**, 1399-1402
- Just, I., Selzer, J., Hofmann, F., Green, G.A. & Aktories, K. (1996) Inactivation of Ras by *Clostridium sordellii* lethal toxin-catalyzed glucosylation. *J. Biol. Chem.* **271**, 10149-10153
- Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Eichel-Streiber, C., Mann, M. & Aktories, K. (1995) Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* **375**, 500-503
- Kahn, R.A. & Gilman A.G. (1986) The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J. Biol. Chem.* **261**, 7906-7911
- Kavran, J.M., Klein, D.E., Lee, A., Falasca, M., Isakoff, S.J., Skolnik, E.Y. & Lemmon, M.A. (1998) Specificity and promiscuity in phosphoinositide binding by pleckstrin homology domains. *J. Biol. Chem.* **273**, 30497-30508
- Kim, J.H., Han, J.M., Han B.R., Lee, K.A., Kim, J.H., Lee B.D., Jang, I.H., Suh, P.G. & Ryu, S.H. (2000) Phospholipase D1 is phosphorylated and activated by protein kinase C in caveolin-enriched microdomains within the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **275**, 13621-13627
- Kim, J.H., Lee, S.D., Han, J.M., Lee, T.G., Kim, Y., Park, J.B., Lambeth, J.D., Suh, P.G. & Ryu, S.H. (1998) Activation of phospholipase D1 by direct interaction with ADP-ribosylation factor 1 and RalA. *FEBS Lett.* **430**, 231-235
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Kaibuchi, K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **273**, 245-248
- Kirchhausen, T. (2000) Three ways to make a vesicle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 187-198
- Kishi, K., Sasaki, T., Kuroda, S., Itoh, T. & Takai, Y. (1993) Regulation of cytoplasmic division of *Xenopus* embryo by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI). *J. Cell Biol.* **120**, 1187-1195
- Kishikawa, K., Chalfant, C.E., Perry, D.K., Bielawska, A. & Hannun, Y.A. (1999) Phosphatidic acid is a potent and selective inhibitor of protein phosphatase 1 and an inhibitor of ceramide-mediated responses. *J. Biol. Chem.* **274**, 21335-21341
- Kjøller, L. & Hall, A. (1999) Signalling to Rho GTPases. *Exp. Cell Res.* **253**, 166-179
- Klarlund, J.K., Guilherme, A., Holik, J.J., Virbasius, J.V., Chawla, A. & Czech, M.P. (1997) Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. *Science* **275**, 1927-1930
- Klarlund, J.K., Rameh, L.E., Cantley, L.C., Buxton, J.M., Holik, J.J., Sakelis, C., Patki, V., Corvera, S. & Czech, M.P. (1998) Regulation of GRP1-catalyzed ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **273**, 1859-1862
- Ktistakis, N.T., Brown, H.A., Waters, M.G., Sternweis, P.C. & Roth, M.G. (1996) Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent

- formation of Golgi coated vesicles. *J. Cell Biol.* **134**, 295-306
- Kwak, J.Y., Lopez, I., Uhlinger, D.J., Ryu, S.H. & Lambeth, J.D. (1995) RhoA and a cytosolic 50-kDa factor reconstitute GTP gamma S-dependent phospholipase D activity in human neutrophil subcellular fractions. *J. Biol. Chem.* **270**, 27093-27098
- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins using the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Lamaze, C., Chuang, T.H., Terlecky, L.J., Bokoch, G.M. & Schmid, S.L. (1996) Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature* **382**, 177-179
- Lee, S., Park, J.B., Kim, J.H., Kim, Y., Kim, J.H., Shin, K.J., Lee, J.S., Ha, S.H., Suh, P.G. & Ryu, S.H. (2001) Actin directly interacts with phospholipase D, inhibiting its activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 28252-28260
- Leung, T., Chen, X.Q., Manser, E. & Lim, L. (1996) The p160 RhoA-binding kinase ROK $\alpha$  is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5313-5327
- Leung, T., Manser, E., Tan, L. & Lim, L. (1995) A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J. Biol. Chem.* **270**, 29051-29054
- Lisanti, M.P., Scherer, P.E., Vidugiriene, J., Tang, Z., Hermanowski-Vosatka, A., Tu, Y.-H., Cook, R.F. & Sargiacomo, M. (1994) Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J. Cell Biol.* **126**, 111-126
- Liscovitch, M. & Cantley, L.C. (1995) Signal transduction and membrane traffic: the P1TP/phosphoinositide connection. *Cell* **81**, 659-662
- Liscovitch, M., Czarny, M., Fiucci, G. & Tang, X.Q. (2000) Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem. J.* **345**, 401-41
- Lisovitch, M., Chalifa V., Pertile P., Chen C.S. & Cantley, L.C. (1994) Novel function of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **269**, 21403-21406
- Lukowski, S., Lecomte, M.C., Mira, J.P., Marin, P., Gauterol, H., Russo-Marie, F. & Geny, B. (1996) Inhibition of phospholipase D activity by fodrin. An active role for the cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **271**, 24164-24171
- Luo, J.Q., Liu, X., Frankel, P., Rotunda, T., Ramos, M., Flom, J., Jiang, H., Feig, L.A., Morris, A.J., Kahn, R.A. & Foster, D.A. (1998) Functional association between Arf and RalA in active phospholipase D complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3632-3637
- Luo, J.Q., Liu, X., Hammond, S.M., Colley, W.C., Feig, L.A., Frohman, M.A., Morris, A.J. & Foster, D.A. (1997) RalA interacts directly with the Arf-responsive, PIP<sub>2</sub>-dependent phospholipase D1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 854-859
- Madaule, P., Eda, M., Watanabe, N., Fujisawa, K., Matsuoka, T., Bito, H., Ishizaki, T. & Narumiya, S. (1998) Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature* **394**, 491-494
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. & Narumiya, S. (1999) Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and Lim-kinase. *Science* **285**, 895-898
- Manifava, M., Thuring, J.W.J.F., Lim, Z.Y., Packman, L., Holmes, A.B. & Ktistakis, N.T. (2001) Differential binding of traffic-related proteins to phosphatidic acid- or phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate-coupled affinity reagents. *J. Biol. Chem.* **276**, 8987-8994
- Marsh, M. & McMahon, H.T. (1999) The structural era of endocytosis. *Science* **285**, 215-220
- Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Kaibuchi, K. (1996) Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for the small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* **15**, 2208-2216
- Min, D.S. & Exton, J.H. (1998) Phospholipase D is associated in a phorbol ester-dependent manner with protein kinase C- $\alpha$  and with a 220 kDa protein which is phosphorylated on serine and threonine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 533-537

- Min, D.S., Park, S.-K. & Exton, J.H. (1998) Characterization of a rat brain phospholipase D isozyme. *J. Biol. Chem.* **273**, 7044-7051
- Moorman, J.P., Bobak, D.A. & Hahn, C.S. (1996) Inactivation of the small GTP binding protein Rho induces multinucleate cell formation and apoptosis in murine T lymphoma EL4. *J. Immunol.* **156**, 4146-4153
- Moritz, A., De Graan, P.N.E., Gispen, W.H. & Wirtz, K.W.A. (1992) Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase. *J. Biol. Chem.* **267**, 7207-7210
- Morris, A.J., Engebrecht, J. & Frohman, M.A. (1996) Structure and regulation of phospholipase D. *Trends Pharmacol. Sci.* **17**, 182-185
- Moss, J. & Vaughan, M. (1995) Structure and function of ARF proteins: Activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *J. Biol. Chem.* **270**, 12327-12330
- Moss, J. & Vaughan, M. (1998) Molecules in the ARF orbit. *J. Biol. Chem.* **273**, 21431-21434
- Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K. & Narumiya, S. (1996) ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett.* **392**, 189-193
- Natarajan, V., Scribner, W.M. & Vepa, S. (1996) Regulation of phospholipase D by tyrosine kinases. *Chem. Phys. Lip.* **80**, 103-116
- Nishizuka, Y. (1995) Protein kinase C and lipid signalling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**, 484-496
- Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S. & Mizuno, K. (2000) Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J. Biol. Chem.* **275**, 3577-3582
- Ohguchi, K., Banno, Y., Nakashima, S. & Nozawa, Y. (1996) Regulation of membrane-bound phospholipase D by protein kinase C in HL60 cells. Synergistic action of small GTP-binding protein RhoA. *J. Biol. Chem.* **271**, 4366-4372
- Olson, M.F., Ashworth, A. & Hall, A. (1995) An essential role for Rho, Rac and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* **269**, 1270-1272
- Oude Weernink, P.A., Guo, Y.J., Zhang, C., Schmidt, M., von Eichel-Streiber, C. & Jakobs, K.H. (2000a) Control of cellular phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels by adhesion signals and Rho GTPases in NIH 3T3 fibroblasts. Involvement of both phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase and phospholipase C. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5237-5246
- Oude Weernink, P.A., Schulte, P., Guo, Y.J., Wetzel, M., Amano, M., Kaibuchi, K., Haverland, S., Voß, M., Schmidt, M., Mayr, G.W. & Jakobs, K.H. (2000b) Stimulation of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase by Rho-kinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 10168-10174
- Palmer, S., Hughes, K.T., Lee, D.Y., & Wakelam, M.J. (1989). Development of a novel, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-specific binding assay. Its use to determine the intracellular concentration of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> in unstimulated and vasopressin-stimulated rat hepatocytes. *Cell Signal.* **1**, 147-156
- Paris, S., Beraud-Dufour, S., Rubinaeu, S., Bigay, J., Antonny, B., Chabre, M. & Chardin, P. (1997) Role of protein-phospholipid interactions in the activation of Arf1 by the guanine nucleotide exchange factor Arno. *J. Biol. Chem.* **272**, 22221-22226
- Park, J.B., Kim, J.H., Kim, Y., Ha, S.H., Kim, J.H., Yoo, J.S., Du, G., Frohman, M.A., Suh, P.G. & Ryu, S.H. (2000) Cardiac phospholipase D2 localizes to sarcolemmal membranes and is inhibited by  $\alpha$ -actinin in an ADP-ribosylation factor-reversible manner. *J. Biol. Chem.* **275**, 21295-21301
- Parton, R.G., Way, M., Zorzi, N. & Stang, E. (1997) Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J. Cell Biol.* **136**, 137-154
- Paterson, H.F., Self, A.J., Garret, M.D., Just, I., Aktories, K. & Hall, A. (1990) Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J. Cell Biol.* **111**, 1001-1007
- Pertile, P., Liscovitch, M., Chalifa, V. & Cantley, L.C. (1995) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis is required for activation of phospholipase D in U937 cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 5130-5135

- Pettitt, T.R., Martin, A., Horton, T., Liossis, C., Lord, J.M. & Wakelam, M.J.O. (1997) Diacylglycerol and phosphatidate generated by phospholipase C and D, respectively, have distinct fatty acid compositions and functions. Phospholipase D-derived diacylglycerol does not activate protein kinase C in porcine aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 17354-17359
- Pike, L.J. & Casey, L. (1996) Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains. *J. Biol. Chem.* **271**, 26453-26456
- Pike, L.J. & Miller J.M. (1998) Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* **273**, 22298-22304
- Pike, L.J. (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* **44**, 655-667
- Rameh, L.E., Tolias K.F., Duckworth B.C., and Cantley L.C. (1997) A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* **390**, 192-196
- Randazzo, P.A. (1997) Functional interaction of ADP-ribosylation factor 1 with phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **272**, 7688-7692
- Ren, X.D. & Schwartz, M.A. (1998) Regulation of inositol lipid kinases by Rho and Rac. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 63-67
- Reuther, G.W. & Der, C.J. (2000) The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 157-165
- Ridley, A.J. (2001) Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* **11**, 471-477
- Rizzo, M.A., Shome, K., Watkins, S.C. & Romero, G. (2000) The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras. *J. Biol. Chem.* **275**, 23911-23918
- Roth, M.G. (2000) Arf. In: GTPases, edited by Hall, A. Oxford, UK: *Oxford Univ. Press*, p. 176-197
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R. & Anderson, R.G. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* **68**, 673-682
- Rümenapp, U., Asmus, M., Schablowski, H., Woznicki, M., Han, L., Jakobs, K.H., Fahmi-Vahid, M., Michalek, C., Wieland, T. & Schmidt, M. (2001) The M<sub>3</sub> muscarinic acetylcholine receptor expressed in HEK-293 cells signals to phospholipase D via G<sub>12</sub> but not G<sub>q</sub>-type G proteins. Regulators of G proteins as tools to dissect pertussis toxin-resistant G protein in receptor-effector coupling. *J. Biol. Chem.* **276**, 2474-2479
- Rümenapp, U., Geiszt, M., Wahn, F., Schmidt, M. & Jakobs, K.H. (1995) Evidence for ADP-ribosylation-factor-mediated activation of phospholipase D by m3 muscarinic acetylcholine receptor. *Eur. J. Biochem.* **234**, 240-244
- Rümenapp, U., Schmidt, M., Olesch, S., Ott, S., von Eichel-Streiber, C. & Jakobs, K.H. (1998) Tyrosine-phosphorylation-dependent and Rho-protein-mediated control of cellular phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels. *Biochem. J.* **334**, 625-631
- Sato, T.K., Overduin, M. & Emr, S.D. (2001) Location, Location, Location: membrane targeting directed by PX domains. *Science* **294**, 1881-1885
- Schafer, D.A., Jennings, P.B. und Cooper, J.A. (1996) Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by phosphoinositides. *J. Cell Biol.* **135**, 169-179
- Schekman, R. & Orci L. (1996) Coat proteins and vesicle budding. *Science* **271**, 1526-1533
- Scherer, P.E., Okamoto, T., Chun, M., Nishimoto, I., Lodish, H.F. und Lisanti, M.P. (1996) Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 131-135
- Schmalzing, G., Richter, H.P., Hansen, A. Schwarz, W., Just, I. & Aktories, K. (1995) Involvement of the GTP binding protein Rho in constitutive endocytosis in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Cell Biol.* **130**, 1319-1332
- Schmid, S.L. & Damke H. (1995) Coated vesicles: a diversity of form and function. *FASEB J.* **9**, 1445-1453
- Schmidt, A. & Hall, M.N. (1998) Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **14**, 305-338

- Schmidt, M., Bienek, C., Rügenapp, U., Zhang, C., Lümmer, G., Jakobs, K.H., Just, I., Aktories, K., Moos, M. & von Eichel-Streiber, C. (1996a) A role for Rho in receptor- and G protein-stimulated phospholipase C. Reduction in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by *Clostridium difficile* toxin B. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **354**, 87-94
- Schmidt, M., Hüwe, S.M., Fasselt, B., Homann, D., Rügenapp, U., Sandmann, J. & Jakobs, K.H. (1994) Mechanisms of phospholipase D stimulation by m3 muscarinic acetylcholine receptors. Evidence for involvement of tyrosine phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* **225**, 667-675
- Schmidt, M., Rügenapp, U., Bienek, C., Keller, J., von Eichel-Streiber, C. & Jakobs, K.H. (1996b) Inhibition of receptor signaling to phospholipase D by *Clostridium difficile* toxin B. Role of Rho proteins. *J. Biol. Chem.* **271**, 2422-2426
- Schmidt, M., Rügenapp, U., Nehls, C., Ott, S., Keller, J., von Eichel-Streiber, C. & Jakobs, K.H. (1996c) Restoration of *Clostridium difficile* toxin-B-inhibited phospholipase D by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Eur. J. Biochem.* **240**, 707-712
- Schmidt, M., Voß, M., Oude Weernink, P.A., Wetzel, J., Amano, M., Kaibuchi, K. & Jakobs, K.H. (1999) A role for Rho-kinase in Rho-controlled phospholipase D stimulation by the m3 muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* **274**, 14648-14654
- Schmidt, M., Voß, M., Thiel, M., Bauer, B., Grannaß, A., Tapp, E., Cool, R.H., de Gunzburg, J., von Eichel-Streiber, C. & Jakobs, K.H. (1998) Specific inhibition of phorbol ester-stimulated phospholipase D by *Clostridium sordellii* lethal toxin and *Clostridium difficile* toxin B-1470 in HEK-293 cells. Restoration by Ral GTPases. *J. Biol. Chem.* **273**, 7413-7422
- Schmitz, A.A.P., Govek, E.E., Böttner, B. & Van Aelst, L. (2000) Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp. Cell Res.* **261**, 1-12
- Schroeder, R., London, E. & Brown, D. (1994) Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behaviour. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12130-12134
- Sciorra, V.A. & Morris, A.J. (1999) Sequential actions of phospholipase D and phosphatidic acid phosphohydrolase 2b generate diglyceride in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3863-3876
- Sciorra, V.A., Rudge, S.A., Prestwich, G.D., Frohman, M.A., Engebrecht, J. & Morris, A.J. (1999) Identification of a phosphoinositide binding motif that mediates activation of mammalian and yeast phospholipase D isoenzymes. *EMBO J.* **20**, 5911-5921
- Sechi, A.S. & Wehland, J. (2000) The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J. Cell Sci.* **113**, 3685-3695
- Shimooku, K., Akisue, T., Jinnai, H., Hitomi, T., Ogino, C., Yoshida, K., Nakamura, S. & Nishizuka, Y. (1996) Reconstitution of GTP-gamma-S-dependent phospholipase D activity with ARF, RhoA, and soluble 36-kDa protein. *FEBS Lett.* **387**, 141-144
- Shyng, S.-L., Barberi, A., Gumusboga, A., Cukras, C., Pike, L. Davis, J.N., Stahl, P.D. & Nichols, C.G. (2000) Modulation of nucleotide sensitivity of ATP-sensitive potassium channels by phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 937-941
- Siddhanta, A., Backer, J.M. & Shields, D. (2000) Inhibition of phosphatidic acid synthesis alters the structure of the golgi apparatus and inhibits secretion in endocrine cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 12023-12031
- Simons, K. & van Meer, G. (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**, 6197-6202
- Simons, K. & Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572
- Simonsen, A. & Stenmark, H. (2001) PX domains: attracted by phosphoinositides. *Nature Cell Biol.* **3**, E179-E182
- Singer, W.D., Brown H.A., Jiang, X. & Sternweis P.C. (1996) Regulation of phospholipase D by protein kinase C is synergistic with ADP-ribosylation factor and independent of protein kinase activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 4504-4510

- Singer, S.J. & Nicholson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731
- Singer, W.D., Brown, H.A. & Sternweis, P.C. (1997) Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu Rev. Biochem.* **66**, 475-509
- Skippen, A., Jones, D.H., Morgan, C.P., Li, M. & Cockcroft, S. (2002) Mechanism of ADP ribosylation factor-stimulated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in HL60 cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 5823-5831
- Smart, E.J., Graf, G.A., McNiven, M.A., Sessa, W.C., Engelman, J.A., Scherer, P.E., Okamoto, T. & Lisanti, M.P. (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell Biol.* **19**, 7289-7304
- Stearns, T., Willingham, M.C., Botstein D. & Kahn R.A. (1990) ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex. *Proc. Natl. Sci. USA* **87**, 1238-1242
- Steed, P.M., Clark, K.L., Boyer W.C. & Lasala D.J. (1998) Characterization of human PLD2 and the analysis of PLD isoform splice variants. *FASEB J.* **12**, 1309-1317
- Sung, T.C., Altshuller, Y.M., Morris, A.J. & Frohman, M.A. (1999a) Molecular analysis of mammalian phospholipase D2. *J. Biol. Chem.* **274**, 494-502
- Sung, T.C., Roper, R.L., Zhang, Y., Rudge, S.A., Temel, R., Hammond, S.M., Morris, A.J., Moss, B., Engebrecht, J. & Frohman, M.A. (1997) Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *EMBO J.* **16**, 4519-4530
- Sung, T.C., Zhang, Y., Morris, A.J. & Frohman, M.A. (1999b) Structure analysis of human phospholipase D1. *J. Biol. Chem.* **274**, 3659-3666
- Takai, Y., Sasaki, T. & Matozky, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* **81**, 153-208
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kato, M., Yamochi, W., Kuroda, S., Nakamura, T., Takeichi, M & Takai, Y. (1994) Involvement of Rho p21 small GTP- binding protein and its regulator in the HGF-induced cell motility. *Oncogene* **9**, 273- 279
- Teruel, M.N. & Meyer, T. (2000) Translocation and reversible localization of signaling proteins: a dynamic future for signal transduction. *Cell* **103**, 181-184
- Toker, A. (1998) The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 254-261
- Toker, A. (2002) Phosphoinositides and signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 761-779
- Tolias, K.F., Hartwig, J.A., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Cantley, L.C. & Carpenter, C.L. (2000) Type I alpha phosphatidylinositol -4-phosphate 5-kinase mediates Rac dependent actin assembly. *Curr. Biol.* **10**, 153-156
- Tominaga, T., Sugie, K., Hirata, M., Morii, N., Fukata, J., Uccida, A., Imura, H. & Narumiya, S. (1993) Inhibition of PMA-induced, LFA-1-dependent lymphocyte aggregation ribosylation of the small molecular weight GTP binding protein, rho. *J. Cell Biol.* **120**, 1529-1537
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354
- Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y. & Brown, R.F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* **269**, 5241-5248
- Vojtek, A.B. & Der, C.J. (1998) Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 19925-19928
- Voß, M., Oude Weernink, P.A., Hauptenthal, S., Möller, U., Cool, R.H., Bauer, B., Camonis, J.H., Jakobs, K.H. & Schmidt, M. (1999) Phospholipase D stimulation by receptor tyrosine kinases mediated by protein kinase C and a Ras/Ral signaling cascade. *J. Biol. Chem.* **274**, 34691-34698
- Watanabe, G., Saito, Y., Madaule, P., Ishizaki, T., Fujisawa, K., Morii, N., Mukai, H., Ono, Y., Kakizuka, A. & Narumiya, S. (1996) Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein Rophilin as targets of small GTPase Rho. *Science* **271**, 645-648

- Way, G., O'Lunaigh, N. & Cockcroft, S. (2000) Activation of exocytosis by cross-linking of the IgE receptor is dependent on ADP-ribosylation factor 1-regulated phospholipase D in RBL-2H3 mast cells: evidence that the mechanism of activation is via regulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Biochem. J.* **346**, 63-70
- Wilde, C., Barth, H., Sehr, P., Han, L., Schmidt, M., Just, I. & Aktories, K. (2002) Interaction of Rho-ADP-ribosylating C3 exoenzyme with RalA. *J. Biol. Chem.* **277**, 14771-14776
- Wishart, M.J., Taylor, G.S. & Dixon, J.E. (2001) Phoxy lipids: revealing PX domains as phosphoinositide binding modules. *Cell* **105**, 817-820
- Wu, C., Butz, S., Ying, Y & Anderson, R.G.W. (1997) Tyrosine kinase receptors concentrated in caveolin-like domains from neuronal plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **272**, 3554-3559
- Yamazaki, M., Miyazaki, H., Watanabe, H., Sasaki, T., Maehama, T., Frohman, M.A. & Kanaho, Y. (2002) Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase is essential for ROCK-mediated neurite remodeling. *J. Biol. Chem.* **277**, 17226-17230
- Yokozeki, T., Kuribara, H., Katada, T., Touhara, K. & Kanaho, Y. (1996) Partially purified RhoA-stimulated phospholipase D activity specifically binds to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Neurochem.* **66**, 1234-1239
- Zerial, M. & Huber, L.A. (Eds.) (1995) Guidebook to small GTPases. *Oxford University Press*.
- Zhang, C., Schmidt, M., von Eichel-Streiber, C. & Jakobs, K.H. (1996) Inhibition by toxin B of inositol phosphate formation induced by G protein-coupled and tyrosine kinase receptors in N1E-115 neuroblastoma cells: involvement of Rho proteins. *Mol. Pharmacol.* **50**, 864-869
- Zurzolo, C., van't Hof, W., van Meer, G. & Rodriguez-Boulan, E. (1994) VIP21/caveolin, glycosphingolipid clusters and the sorting of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in epithelial cells. *EMBO J.* **13**, 42-53

# Danksagung

Mein Dank gilt

...Herrn Prof. Dr. Karl Heinz Jakobs für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung.

...Herrn Prof. Dr. Rüdiger Schulz für die Vertretung meiner externen Arbeit vor der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.

...insbesondere Herrn Paschal Oude Weernink für die engagierte Betreuung und die stetige Diskussionsbereitschaft, aus denen ich wichtige Anregungen bei der Gestaltung und Abfassung meiner Arbeit gewinnen konnte.

...allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die vielen fachlichen und persönlichen Gespräche, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

...ganz besonders meinen Eltern und Schwestern sowie Christian Henckel, die mich zu jeder Zeit moralisch und menschlich unterstützt haben.

# LEBENS LAUF

## **Persönliche Daten**

---

|                     |  |
|---------------------|--|
| Name                | Marei Signe Corinne Mühlhoff   |
| Geburtsdaten        | 16.09.1975 in Düsseldorf   |
| Familienstand       | ledig  |
| Staatsangehörigkeit | deutsch  |
| Eltern              | Dr. med. Gerhard Mühlhoff, Ltd. Arzt der Klinik Innere<br>Medizin- Interventionelle Angiologie<br>Birgit Mühlhoff, geb. Vorfeld, Restauratorin |

## **Ausbildung**

---

|            |   |
|------------|---|
| 01.10.2001 | Approbation   |
| 10.07.2001 | Staatsexamen  |
| 1995-2001  | Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig- Maximilians-<br>Universität München |
| 13.06.1995 | Abitur  |
| 1982-1986  | Overberg-Grundschule, Kevelaer- Winnekendonk                                    |
| 1986-1995  | Kardinal van Galen Gymnasium, Kevelaer  |

## **Praktika**

---

|              |  |
|--------------|--|
| 05.- 06.2000 | Klinikpraktikum an der Veterinärmedizinischen Universität<br>Wien, I. Medizinische Universitätsklinik für Einhufer und<br>Kleintiere- 6 Wochen |
| 03.- 05.2000 | Praktikum am NFZ-Schlachthof, Kalkar-Kehrum- 6 Wochen  |
| 02.- 03.2000 | Praktikum in der Tierärztlichen Klinik für Kleintiere,<br>Dr. Steffens, Landsberg am Lech- 6 Wochen  |
| 03.- 04.1999 | Praktikum in der Praxisgemeinschaft Dr. Mertens, Küppers und<br>Schüten für Pferde und Kleintiere, Geldern- 6 Wochen                           |

## **Dissertation**

---

|           |   |
|-----------|---|
| 2001-2003 | Anfertigung der experimentellen Dissertation am Institut für<br>Pharmakologie bei Prof. Dr. Karl H. Jakobs,<br>Universitätsklinikum Essen |
|-----------|---|

## **Tierärztliche Tätigkeit**

---

|              |  |
|--------------|--|
| seit 09/2003 | Anfangsassistentin in der Tierärztlichen Klinik für Kleintiere,<br>Dr. H.- J. Apelt, Essen |
|--------------|--|