

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene  
der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Epithelzellinvasion durch *Shigella flexneri*:  
Charakterisierung eines  
Rekrutierungsmoduls  
der kleinen GTPase Rho**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
*Doctor medicinae* (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von Thomas Haustein  
aus Freiburg im Breisgau

**Dekan:** Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

**Gutachter:** Prof. Dr. Dr. Ulf B. Göbel

Prof. Dr. Martin Zeitz

PD Dr. Christoph von Eichel-Streiber

Eingereicht am 21. Mai 2001

Promotionsdatum: 11. Januar 2002

# Inhalt

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>7</b>
<b>1 EINFÜHRUNG</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1 Bakterielle Dysenterie, <i>Shigella</i> und Zellinvasion</b> .....	<b>9</b>
1.1.1 Alle vier <i>Shigella</i> -Spezies sind Erreger der Dysenterie beim Menschen.....	9
1.1.2 Die bakterielle Dysenterie ist eine entzündliche Erkrankung des Dickdarms.....	10
1.1.3 Die Epithelzellinvasion durch <i>Shigella</i> ist ein notwendiger Schritt bei der Pathogenese der dysenterischen Kolitis.....	10
1.1.4 Von <i>Shigella</i> induzierte Rearrangements des Wirtszell-Aktinzytoskeletts führen zur Internalisierung des Pathogens.....	11
1.1.5 Eine effiziente Epithelkolonisierung wird durch intra- und interzelluläre Beweglichkeit von <i>Shigella</i> ermöglicht .....	12
1.1.6 Die Fähigkeit zur Epithelinvasion ist auf einem Plasmid kodiert .....	13
1.1.7 Zellinvasion durch <i>Shigella</i> ist abhängig von einem Protein der Wirtszelle, der kleinen GTPase Rho.....	13
1.1.8 Aspekte der Invasionsstrategien von <i>Salmonella</i> und <i>Listeria</i> .....	14
<b>1.2 Rho gehört zur Superfamilie der Ras-ähnlichen kleinen GTPasen</b> .....	<b>14</b>
1.2.1 GTPasen teilen ein gemeinsames Funktionsprinzip.....	14
1.2.2 Ras ist der Prototyp der Superfamilie der kleinen GTPasen.....	15
1.2.3 Die Rho-Proteine bilden eine eigene Subfamilie kleiner GTPasen.....	16
1.2.4 Die kleinen GTPasen der Rho-Familie sind Regulatoren des Aktinzytoskeletts .....	16
1.2.5 Rho-GTPasen werden posttranslational modifiziert .....	17
<b>1.3 Der „Schalter“ Rho wird von Steuerungsproteinen kontrolliert</b> .....	<b>18</b>
1.3.1 GEFs, GAPs und GDIs .....	18
1.3.2 GEFs versetzen Rho in den aktivierten Zustand .....	18
1.3.3 GAPs erhöhen die GTP-Hydrolyserate von Rho .....	19
1.3.4 RhoGDI inhibiert die Trennung von GDP und Rho .....	19
<b>1.4 Rho steuert das Aktinzytoskelett über vielfältige Angriffspunkte</b> .....	<b>20</b>
1.4.1 Das Aktinzytoskelett reguliert Gestalt und Bewegung von Zellen .....	20
1.4.2 Rho, Rac und Cdc42 spielen bei der Steuerung des Zytoplasmas abgrenzbare Rollen .....	21
1.4.3 Rho reguliert Fokalkomplexe und Streßfilamente .....	22
1.4.4 Rho beeinflusst Zell-Zell-Kontakte.....	24
1.4.5 Rho interagiert in komplexer Weise mit Ezrin, Radixin und Moesin .....	25
1.4.6 RhoD – und möglicherweise RhoB – regulieren die Dynamik von Endosomen .....	26
1.4.7 Mit der Funktion von Rho assoziierte Zytoskelettbestandteile sind an der Zellinvasion durch <i>Shigella</i> beteiligt .....	26
<b>1.5 Rho-Isoformen haben unterschiedliche biologische Eigenschaften</b> .....	<b>28</b>

1.5.1	Rho-Isoformen unterscheiden sich in ihrer intrazellulären Lokalisation .....	28
1.5.2	Rho-Isoformen werden während der Shigelleninvasion differentiell rekrutiert.....	28
1.5.3	Primärstrukturen der Rho-Isoformen .....	29
<b>1.6</b>	<b>Fragestellung.....</b>	<b>30</b>
<b>2</b>	<b>METHODIK.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1</b>	<b>DNS-Präparation.....</b>	<b>31</b>
2.1.1	Bakterienkultur .....	31
2.1.2	Miniprep .....	31
2.1.3	Maxiprep.....	31
2.1.4	Phenol/Chloroform-Extraktion .....	31
2.1.5	Ethanolpräzipitation.....	32
2.1.6	Messen der DNS-Konzentration .....	32
<b>2.2</b>	<b>Klonieren und Sequenzieren .....</b>	<b>32</b>
2.2.1	Klonierungsvektoren.....	32
2.2.2	Schneiden von DNS mit Restriktionsenzymen .....	33
2.2.3	Dephosphorylierung.....	33
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	33
2.2.5	Isolierung von DNS-Fragmenten durch Gelelektrophorese .....	34
2.2.6	DNS-Extraktion aus Agarosegelen .....	34
2.2.7	PCR.....	35
2.2.8	Oligonukleotide (Oligos) .....	36
2.2.9	DNS-Matrizen ( <i>templates</i> ) für die PCR.....	37
2.2.10	DNS-Hybridisierung.....	38
2.2.11	Ligation.....	38
2.2.12	Präparation von kompetenten <i>E. coli</i> (DH <sub>5α</sub> , TG1, ZK501) .....	39
2.2.13	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> .....	39
2.2.14	Sequenzieren.....	40
2.2.15	Sequenzanalyse .....	42
2.2.16	Vorhandene, in Transfektionsexperimenten verwendete Rho-Konstrukte.....	42
<b>2.3</b>	<b><i>Shigella flexneri</i> SC301 .....</b>	<b>42</b>
2.3.1	Bakterienstamm .....	42
2.3.2	Bakterienkultur .....	42
<b>2.4</b>	<b>HeLa-Zellen .....</b>	<b>43</b>
2.4.1	Zellkultur .....	43
<b>2.5</b>	<b>Vorübergehende Expression von Rho-Konstrukten in HeLa-Zellen.....</b>	<b>43</b>
2.5.1	Transiente Transfektion von HeLa-Zellen.....	43
<b>2.6</b>	<b>Infektionsexperimente mit <i>Shigella flexneri</i> SC301.....</b>	<b>44</b>
2.6.1	Infektion von HeLa-Zellen.....	44
<b>2.7</b>	<b>Immunfluoreszenzmikroskopie.....</b>	<b>44</b>
2.7.1	Behandlung der infizierten HeLa-Zellen .....	44

2.7.2	Antikörper und Farbstoffe.....	45
2.7.3	Mikroskopie.....	45
2.7.4	Mikrofotografie.....	46
2.7.5	Digitale Bildbearbeitung: MetaMorph, epr-Algorithmus .....	46
<b>3</b>	<b>ERGEBNISBESCHREIBUNG .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>PCR-vermittelte gezielte Mutagenese.....</b>	<b>48</b>
3.1.1	PCR-Strategie für alle Konstrukte .....	48
3.1.2	Konstrukte auf der Basis von <i>rhoA</i> , <i>B</i> oder <i>C</i> .....	48
3.1.3	Konstrukte, die auf <i>rhoD</i> basieren .....	49
<b>3.2</b>	<b>Präparation der Klonierungsvektoren .....</b>	<b>50</b>
3.2.1	pUC19 für auf <i>rhoA</i> , <i>B</i> oder <i>C</i> basierende Konstrukte.....	50
3.2.2	pKC3 für auf <i>rhoA</i> , <i>B</i> oder <i>C</i> basierende Konstrukte.....	51
3.2.3	pUC19 für auf <i>rhoD</i> basierende Konstrukte .....	51
3.2.4	pKC3 für auf <i>rhoD</i> basierende Konstrukte .....	52
3.2.5	Übersichtstabelle über die Klonierungsvektoren .....	53
<b>3.3</b>	<b>Klonieren und Sequenzieren der auf <i>rhoA</i>, <i>B</i> oder <i>C</i> basierenden DNS-Konstrukte.....</b>	<b>53</b>
3.3.1	Isolierung der PCR-Produkte .....	53
3.3.2	Klonieren der PCR-Produkte in pUC19.....	54
3.3.3	Sequenzierung.....	54
3.3.4	Umklonieren der Konstrukte in pKC3 .....	54
<b>3.4</b>	<b>Klonieren und Sequenzieren der auf <i>rhoD</i> basierenden Konstrukte.....</b>	<b>55</b>
3.4.1	Klonieren der PCR-Produkte in pUC19.....	55
3.4.2	Abweichung der DNS-Sequenz von <i>rhoD</i> gegenüber der publizierten Sequenz.....	56
3.4.3	Umklonieren der Konstrukte in pKC3 .....	56
<b>3.5</b>	<b>Übersicht über die hergestellten Konstrukte .....</b>	<b>57</b>
<b>3.6</b>	<b>Übersichtstabelle über die transformierten <i>E. coli</i>-Stämme.....</b>	<b>58</b>
<b>3.7</b>	<b>Expression der Konstrukte in HeLa-Zellen .....</b>	<b>58</b>
<b>3.8</b>	<b>Zytoskelettdarstellung von nichtinfizierten, aber mit mutierten <i>rho</i>-Konstrukten transfizierten HeLa-Zellen .....</b>	<b>59</b>
3.8.1	Auf <i>rhoA</i> , <i>B</i> oder <i>C</i> basierende Konstrukte.....	59
3.8.2	Auf <i>rhoD</i> basierende Konstrukte .....	60
<b>3.9</b>	<b>Rekrutierungsverhalten der mutierten Rho-Proteine während der HeLa-Zellinvasion durch <i>Shigella flexneri</i> SC301 .....</b>	<b>61</b>
3.9.1	Kontrollen: RhoA, RhoB und RhoC .....	62
3.9.2	RhoD.....	63
3.9.3	RhoA <sup>T19N</sup> und RhoA <sup>G14V</sup> .....	63
3.9.4	RhoAAB, RhoBBA, RhoCCA und RhoDDA.....	64
3.9.5	RhoA <sup>S188P</sup> .....	66
3.9.6	RhoCAC und RhoACA.....	68
3.9.7	RhoA <sup>R183K</sup> .....	69

3.9.8	RhoA <sup>KK186-187RR</sup> .....	69
3.9.9	Übersicht über das Rekrutierungsverhalten der untersuchten Konstrukte .....	71
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>72</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion der Methoden</b> .....	<b>72</b>
4.1.1	System zur fluoreszenzoptischen Darstellung dreidimensionaler Strukturen .....	72
4.1.2	Protein- <i>tagging</i> .....	73
4.1.3	Replikationstreue der PCR.....	74
4.1.4	Eigenschaften des Expressionsvektors.....	75
4.1.5	Plasmidpräparation .....	75
4.1.6	Transfektion und Infektion.....	75
<b>4.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b> .....	<b>77</b>
4.2.1	Funktionalität der mutierten Proteine in der transfizierten Zelle .....	77
4.2.2	Rekrutierungsverhalten von RhoA <sup>G14V</sup> und RhoA <sup>T19N</sup> .....	78
4.2.3	Die Rolle der CaaX-Gruppe.....	78
4.2.4	Rekrutierungsverhalten von RhoD.....	79
4.2.5	Prä- CaaX-Gruppe von RhoA und RhoC.....	80
4.2.6	Mögliche Rollen für die Lysine 186-187 von RhoA.....	81
4.2.7	Differentielle Rekrutierung und Strukturmodelle von RhoA.....	83
4.2.8	Rekrutierung anderer Proteine während der Zellinvasion durch <i>Shigella</i> .....	85
4.2.9	Überlegungen zum Rekrutierungsmechanismus .....	86
4.2.10	<i>Shigella</i> als zellbiologisches Werkzeug .....	87
4.2.11	Modell und natürliche Verhältnisse .....	88
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>90</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>92</b>
	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>93</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>94</b>
	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>102</b>
	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b> .....	<b>103</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>104</b>

## Abkürzungsverzeichnis

3,4-PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
3,4,5-PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
4,5-PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
As	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
ATPase	Adenosintri-phosphatase
BHK	<i>baby hamster kidney</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
CCD	<i>charge-coupled device</i>
Cdc42	Genprodukt des <i>cell-division-cycle-gene 42</i> von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (und homologer Gene anderer Spezies)
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CNF1	<i>cytotoxic necrotizing factor 1</i>
Dam	DNS-Adenin-Methyltransferase
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
<i>dbl</i>	Diffuses-B-Zell-Lymphom-Onkogen
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
epr	<i>exhaustive photon reassignment</i>
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
FAK	Fokaladhäsionskinase
F-Aktin	Filamentöses Aktin
Fc $\gamma$	<i>fragment crystalline <math>\gamma</math></i> , schwere Kette von Immunglobulin G
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDI	GDP-Dissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	GDP/GTP <i>exchange factor</i>
GTP	Guanosintri-phosphat
GTPase	Guanosintri-phosphatase
Ics	<i>intra/intercellular spread</i>
Ipa	Invasionsplasmidantigene
KBE	koloniebildende Einheit

LB	Luria-Bertani-Medium
LPA	Lysophosphatidat
MBS	<i>myosin binding subunit</i>
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
MEM	<i>minimal essential medium</i>
MLC	<i>myosin light chain</i>
Mxi	<i>membrane expression of invasion plasmid antigens</i>
<i>myc</i>	Onkogen des <i>avian-myelocytomatosis</i> -Virus MC29
NHE1	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> - <i>exchanger</i> , Isoform 1
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PKA	cAMP-gesteuerte Proteinkinase A
PKN	Proteinkinase N
PLC	Phospholipase C
pp125 <sup>FAK</sup>	=FAK
PRK1	=PKN
Rac	Ras-verwandtes C3-Botulinumtoxinsubstrat <sup>1</sup>
Ras	Genprodukte des Harvey-Rattensarkomonkogens (und homologer Gene)
Rho	Ras-homologes Protein
RNAse	Ribonuklease
SH3	Src-Homologie-3
Spa	<i>surface presentation of antigens</i>
<i>src</i>	Onkogen des Rous-Sarkomvirus
Tm	"Schmelztemperatur" von Doppelstrang-DNS
TSB	<i>tryptic soy broth</i>
vsv	Vesikuläre-Stomatitis-Virus
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

---

<sup>1</sup> Historisch bedingte Bezeichnung. Inzwischen ist nachgewiesen, daß Rac von C3-Toxin nicht effizient modifiziert wird [160].



# 1 Einführung

## 1.1 Bakterielle Dysenterie, *Shigella* und Zellinvasion

### 1.1.1 Alle vier *Shigella*-Spezies sind Erreger der Dysenterie beim Menschen

Die bakterielle Dysenterie (Ruhr) ist eine durch gramnegative Bakterien der Gattung<sup>2</sup> *Shigella* hervorgerufene entzündliche Erkrankung des Dickdarms, die vor allem in tropischen und subtropischen Entwicklungsländern endemisch ist. Typische klinische Zeichen der Krankheit sind blutig-schleimige Durchfälle, begleitet von abdominellen Krämpfen, Tenesmen und Fieber [101]. Besonders häufig und schwer sind Kinder betroffen [19].

Das Genus *Shigella*, nach dem Erstbeschreiber Kiyoshi Shiga [162] benannt, gehört zur Familie der Enterobacteriaceae und ist eng mit *E. coli* verwandt. Die Gattung wird in vier Spezies gegliedert, die jeweils epidemiologische Besonderheiten aufweisen, jedoch alle das Krankheitsbild der bakteriellen Dysenterie hervorrufen können [137]. *S. sonnei* ist die in gemäßigten Breiten am häufigsten isolierte Spezies, bei insgesamt sehr niedriger Dysenteriemorbidität [22]. *S. dysenteriae*, die als einzige Art das Shiga-Toxin produziert, und *S. flexneri* sind dagegen vor allem in tropischen und subtropischen Regionen endemisch. *S. flexneri* ist dort meist das vorherrschende Pathogen [86, 117, 146]. *S. dysenteriae* wird periodenweise kaum isoliert, kann jedoch als einzige Spezies plötzlich auftretende und sich rasch ausbreitende Pandemien verursachen [55]. *S. boydii* spielt nur eine untergeordnete Rolle. Die Spezies können weiter in Serotypen unterteilt werden.

Die bakterielle Ruhr wird von Mensch zu Mensch übertragen, hauptsächlich auf dem fäkal-oralen Weg [137]. Um das Vollbild der Erkrankung hervorzurufen, sind äußerst niedrige Infektionsdosen in der Größenordnung von  $10^2$  KBE und darunter ausreichend [46, 101]. Eine im Vergleich zu anderen *Enterobacteriaceae* erhöhte Säureresistenz [61] gewährleistet, daß *Shigella* auch bei geringem Inokulum das saure Milieu des Magens unbeschadet passieren und den eigentlichen Ort der Infektion, das Kolon, erreichen kann. Der Mensch gilt als einziger natürlicher Wirt dieses Bakteriums. Ob auch andere Primaten unter natürlichen Bedingungen befallen werden, konnte bisher nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden [1, 137, 170]. Bei

---

<sup>2</sup> In jüngerer Zeit wurde vorgeschlagen, *Shigella* nicht als eigenständige Gattung, sondern als Gruppe von Klonen der Spezies *Escherichia coli* zu betrachten [142]. Da sich diese Einteilung in der internationalen Fachliteratur jedoch noch nicht durchgesetzt hat, wird in dieser Arbeit die bisherige Klassifikation beibehalten.

anderen Säugern kann das Krankheitsbild der Shigellose dagegen – wenn überhaupt – nur unter bestimmten experimentellen Bedingungen und mit entsprechend hohen Infektionsdosen hervorgerufen werden [140, 170].

### **1.1.2 Die bakterielle Dysenterie ist eine entzündliche Erkrankung des Dickdarms**

Histopathologische Studien der Shigellose an Tiermodellen [140, 150, 170] oder menschlichem Biopsiematerial [108, 109] erbrachten prinzipiell vergleichbare Ergebnisse: An der luminalen Seite des befallenen Kolonepithels wird ein hämorrhagisches Exsudat beobachtet, das abgestoßene Epithelzellen, neutrophile Granulozyten, Erythrozyten, Fibrin, sowie massenhaft Shigellen enthält. Die darunterliegende Epithelschicht zeigt ausgeprägte Nekrosen und Erosionen; oft sind große Epithelflächen abgelöst. Ulzera treten bereits in sehr frühen Stadien der Erkrankung in denjenigen Epithelregionen auf, welche die schleimhautassoziierten Lymphfollikel bedecken (Peyer-Plaques). Die befallene Darmschleimhaut ist massiv mit neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen infiltriert und erscheint ödematös und hyperämisch. Die Interzellulärspalten zwischen den Epithelzellen sind verbreitert und werden durch transmigrierende Leukozyten noch stärker aufgeweitet. Die Kolonepithelzellen selbst zeigen häufig Degenerationszeichen. Shigellen sind in den Interzellulärspalten, in Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten zu sehen. Innerhalb von Epithelzellen liegen sie sowohl in Vakuolen eingeschlossen als auch frei im Zytoplasma.

### **1.1.3 Die Epithelzellinvasion durch *Shigella* ist ein notwendiger Schritt bei der Pathogenese der dysenterischen Kolitis**

Die Fähigkeit von *Shigella* in Kolonepithelzellen einzudringen ist eine notwendige Bedingung für die Entstehung der Shigellose. Stämme, die zur Zellinvasion unfähig sind, sind apathogen [95, 101]. Es erscheint dabei zunächst paradox, daß *Shigella* nicht in der Lage ist, in polarisierte Kolonozyten vom apikalen – dem Darmlumen zugewandten und mit Mikrovilli besetzten – Pol her einzudringen. Tatsächlich kann die Invasion nur an der basolateralen Zelloberfläche erfolgen [123], dem Zellpol, der unter physiologischen Bedingungen vom Darmlumen aus nicht direkt zugänglich ist.

*Shigella* benutzt M-Zellen als Eintrittspforte zur Überwindung der Epithelbarriere [150]. M-Zellen sind Bestandteil des follikelassoziierten Epithels und spielen eine wichtige immunologische Rolle: Sie nehmen Makromoleküle (z.B. Antigene) und Mikroorganismen aus dem Darmlumen auf, transportieren sie durch das Epithel, übergeben sie an Makrophagen, B-Lymphozyten oder dendritische Zellen und induzieren so eine spezifische, lokale Immunab

wehr. Mikroorganismen überstehen die Transzytose durch die M-Zellen normalerweise unbeschadet [128]. Nach der Zellpassage findet sich *Shigella* auf der basalen Seite des Epithels sowohl frei im Interzellulärraum als auch im Inneren von Makrophagen wieder [150]. Durch die Fähigkeit, in Makrophagen Apoptose zu induzieren [191, 192], entgehen die Bakterien der lysosomalen Zerstörung, gewinnen (erneut) Zugang zum basolateralen Extrazellulärraum und können von hier aus in Kolonozyten eindringen.

Mit *Shigella* infizierte Makrophagen setzen bereits vor ihrem apoptotischen Untergang das proinflammatorische Interleukin 1 (IL-1) frei [190]. In der Folge wird die Mukosa massiv von chemotaktisch angelockten Granulozyten infiltriert, die in das Darmlumen migrieren, die Basalmembran angreifen und zur Ablösung des Epithels führen. *In vitro* induziert *Shigella* auch direkt vom apikalen Pol aus die Wanderung von Granulozyten durch das Epithel. Nachdem der Epithelzellverband derart aufgelockert ist, gewinnt das Pathogen auch vom Lumen her Zugang zur basolateralen Oberfläche der Kolonozyten [139]. Es konnte gezeigt werden, daß durch Blockade von IL-1-Rezeptoren [151] bzw. der Leukozytenmigration [140] das Ausmaß sowohl der bakteriellen Invasion als auch der Gewebszerstörung vermindert wird. Dies deutet darauf hin, daß die Entzündungsreaktion des Wirts in der Anfangsphase der Erkrankung nicht zur Bekämpfung des Pathogens beiträgt, sondern im Gegenteil dessen Ausbreitung unterstützt und für einen großen Teil der Gewebsläsionen unmittelbar verantwortlich ist [140, 151].

#### **1.1.4 Von *Shigella* induzierte Rearrangements des Wirtszell-Aktinzytoskeletts führen zur Internalisierung des Pathogens**

Seitdem die fundamentale Bedeutung der Zellinvasion für die Pathogenese der Dysenterie erkannt wurde, gilt der Aufklärung der daran beteiligten molekularen Mechanismen große wissenschaftliche Aufmerksamkeit. Einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Invasionsprozesses leisteten elektronenmikroskopisch-morphologische Studien, welche auf eine zentrale Rolle des Aktinzytoskeletts hinwiesen [2, 40]: Kleinere Mengen von F-Aktin akkumulieren sehr rasch nach Adhärenz von *Shigella* an die Wirtszelle an derjenigen Stelle der Zellmembran, die unmittelbar „unter“ dem Pathogen liegt. Räumlich getrennt davon finden sich an der Membran auch im Umkreis des Pathogens Aktinnukleationsfokusse. Ausgehend von diesen unterschiedlich lokalisierten Fokussen bilden sich verschiedene Strukturen aus: Um das Bakterium herum wachsen pfeilerartige Protrusionen mehrere Mikrometer über das Zelloberflächenniveau hinaus; deren Gerüst wird von F-Aktin-Bündeln gebildet, welche mit ihrem *barbed end* in Richtung der Protrusionsspitzen orientiert sind. Da die Membran durch die Aktinbündel mit angehoben wird, bildet sich eine blütenähnliche Struktur aus, die das Pathogen weit überragt. Membranfalten

erstrecken sich von Pfeiler zu Pfeiler, während das Bakterium am Grund des „Blütenkelchs“ liegt. „Unterhalb“ des Bakteriums führt die weitere Ansammlung von F-Aktin dagegen zur Ausbildung einer in Richtung des Zellinneren orientierten „sprinklerartigen“ Filamentstruktur. Indem sich die Blütenstruktur schließt, wird das Pathogen in einer von einem Netz von Mikrofilamenten umgebenen Vakuole in die Zelle aufgenommen. Reste der zellulären Protrusionen bleiben dabei zunächst erhalten. Bei 37°C ist die Aufnahme extrazellulärer Bakterien nach 18 min abgeschlossen [2, 40]. Innerhalb von weniger als 15 min nach Invasion induziert *Shigella* die Lyse der Vakuolenmembran. Nachdem das Bakterium auf diese Weise Zugang zum nährstoffreichen intrazellulären Milieu gewonnen hat, vermehrt es sich sehr rasch und kolonisiert die befallene Zelle [154].

### **1.1.5 Eine effiziente Epithelkolonisierung wird durch intra- und interzelluläre Beweglichkeit von *Shigella* ermöglicht**

*Shigella*, im extrazellulären Medium unbeweglich, kann im Zytoplasma der Wirtszelle zelluläre Komponenten zur Fortbewegung nutzen: So führt in Fibroblasten eine zentripetale „organellenartige“ Bewegung von *Shigella* entlang von Streßfilamenten (vgl. 1.4.1) zur Bildung von Mikrokolonien um den Zellkern [177]. Eine weitere, von Streßfilamenten unabhängige Form der Beweglichkeit wird durch Induktion von Aktinfilamenten an einem Pol der Bakterien ermöglicht. Dabei entsteht eine kometenschweifähnliche F-Aktin-Struktur. Durch diese ungerichtete Motilität kann *Shigella* benachbarte Zellen befallen, ohne erneut mit dem extrazellulären Milieu in Kontakt zu treten [20, 141]. Diese Invasion „von innen“ unterscheidet sich jedoch von der primären Invasion „von außen“: Die Bakterien buchten zunächst lokal durch eine zentrifugale Bewegung die Membran der bereits kolonisierten Zellen von innen aus. Dadurch werden handschuhfingerartige Membranprotrusionen gebildet, welche die Membranen unmittelbar benachbarter Zellen einstülpen können. Die Shigellen, die sich an der Spitze dieser somit aus zwei Membranen bestehenden Protrusionen befinden, werden nun von den penetrierten Zellen in Vakuolen internalisiert („*intercellular spread*“). Auch aus diesen doppelwandigen Vakuolen kann sich *Shigella* durch Lyse der Membranen wieder befreien, sich im Zytoplasma vermehren und von dort aus weitere Zellen kolonisieren [82].

Die bakteriellen Proteine IcsA und B regulieren die intra- und interzelluläre Ausbreitung von *Shigella* [8, 20, 59] und bilden somit die molekulare Grundlage der effizienten Ausbreitung innerhalb größerer Epithelzellverbände. Für die primäre Invasion von Epithelzellen sind diese *ics*-Genprodukte jedoch nicht essentiell.

### 1.1.6 Die Fähigkeit zur Epithelinvasion ist auf einem Plasmid kodiert

Die Fähigkeit von *Shigella* zur Epithelinvasion und -kolonisierung ist an das Vorhandensein eines 220 kb-Virulenzplasmids gebunden [153, 154]. Der Transfer des Plasmids in *E. coli* K-12 vermittelt auch diesem nichtinvasiven Bakterienstamm typische Charakteristika von *Shigella*, darunter die Fähigkeit, in HeLa-Zellen einzudringen [152]. Die für die Ausbildung des invasiven Phänotyps essentiellen Gene liegen auf einem Abschnitt von 31 kb Länge, der die *ipa*-, *mxi*- und *spa*-Operons enthält [116]. Die *mxi*- und *spa*-Genprodukte bilden einen Typ III-Sekretionsapparat, über den die *ipa*-Genprodukte innerhalb von Minuten ins extrazelluläre Medium abgegeben werden können [16]. Das experimentelle Ausschalten einzelner Komponenten des Sekretionsapparats geht mit dem Verlust der Invasivität von *Shigella* einher [9, 10].

Die Ausschüttung von Ipa-Proteinen wird durch den Kontakt des Bakteriums mit Epithelzellen induziert [114, 184]. Die Interaktion mit dem basolateralen Pol polarisierter Epithelzellen führt dabei zu einer stärkeren Sekretion als der Kontakt mit dem apikalen Pol. *In vitro* konnte die Sekretion mit Glykoproteinen der extrazellulären Matrix induziert werden [184]. Vier Ipa-Proteine wurden charakterisiert und mit den Buchstaben A bis D gekennzeichnet. IpaB [70], C [17] und D sind essentiell für Epithelzelloinvasion und die darauf folgende Lyse der Phagosomenmembran [116]. IpaA erhöht die Invasionseffizienz um das Zehnfache [173]. IpaB und C bilden im extrazellulären Medium einen löslichen Komplex, an dem möglicherweise noch weitere Proteine beteiligt sind [115]. Mit diesem Komplex beschichtete Latexpartikel werden von HeLa-Zellen in einem aktinabhängigen Mechanismus internalisiert, der morphologisch und funktionell der Invasion durch intakte Bakterien entspricht [113].

### 1.1.7 Zellinvasion durch *Shigella* ist abhängig von einem Protein der Wirtszelle, der kleinen GTPase Rho

Einen wesentlichen Fortschritt in der Erforschung der Signalübertragungskette zwischen Ipa-Komplex und Zytoskelett brachte der Nachweis, daß die kleine GTPase Rho, ein Protein der Wirtszelle, für die Zellinvasion durch *Shigella* essentiell ist. Durch Inhibition dieses Proteins läßt sich die Invasion von kultivierten Epithelzellen durch *Shigella* blockieren und der blütenartige Invasionskomplex kommt nicht mehr zustande [3, 113, 183]. Die Untersuchung von Rho dürfte somit auch zu einem besseren Verständnis der Epithelzelloinvasion durch *Shigella* auf molekularer Ebene beitragen.

### 1.1.8 Aspekte der Invasionsstrategien von *Salmonella* und *Listeria*

Invasivität ist ein Merkmal vieler Darmpathogene, darunter auch *Salmonella* und *Listeria*. Die Invasionsstrategien von *Listeria monocytogenes* und *Shigella* gleichen sich durch das bevorzugte Eindringen auf der basolateralen Seite polarisierter Epithelzellen, die Lyse des Phagosoms, die Art der intrazellulären Bewegung und die Fähigkeit, sich unmittelbar von Zelle zu Zelle auszubreiten. In der Art des Internalisierungsprozesses ergeben sich hingegen Unterschiede: Während *Shigella* in einem relativ großen Umkreis Membranfältelungen induziert und durch einen makropinozytoseähnlichen Prozeß aufgenommen wird, wird *Listeria* „reißverschlußartig“ eng von der Wirtszellmembran umschlossen und so internalisiert [41].

*Salmonella typhimurium* induziert wie *Shigella* an der Oberfläche der Wirtszelle Membranfältelungen, die zur Aufnahme des Pathogens in nichtphagozytische Darmepithelzellen führen. Die Mikromorphologie des Invasionskomplexes, der Typ-III-Sekretionsapparat und die eingesetzten bakteriellen Invasine ähneln den entsprechenden Merkmalen von *Shigella*. Im Gegensatz zu *Shigella* dringt *Salmonella* in polarisierte Zellen aber von der apikalen Seite her ein. Nach Internalisierung bleibt *Salmonella* innerhalb der phagozytischen Vakuole [54]. Sowohl bei *Salmonella* als auch bei *Listeria* sind die Virulenzfaktoren chromosomal kodiert und nicht, wie bei *Shigella*, auf einem Plasmid [41, 54].

Alle drei Pathogene „benutzen“ das zelluläre Aktinzytoskelett, um in die Wirtszelle einzudringen. Unterschiede bestehen in der Mikromorphologie und der Art, wie die Zytoskelett-rearrangements induziert werden [2, 41 68]. Für die Internalisierung von *S. typhimurium* sind die mit Rho verwandten kleinen GTPasen Rac und Cdc42 notwendig [68], nicht aber Rho selbst [183]. Ob GTPasen der Rho-Familie für die Invasion durch *Listeria* eine wesentliche Rolle spielen, ist noch nicht bekannt [41].

Invasionsstrategien verschiedener enteroinvasiver Bakterien unterscheiden sich in wichtigen Details. Dies eröffnet auch eine Vielfalt wissenschaftlicher Zugänge zur Erforschung von Funktionen der Wirtszellen. *Shigella* läßt sich von diesem Blickwinkel aus auch als zellbiologisches Werkzeug betrachten, mit dem sich – unter anderem – die Funktion von Rho studieren läßt.

## 1.2 Rho gehört zur Superfamilie der Ras-ähnlichen kleinen GTPasen

### 1.2.1 GTPasen teilen ein gemeinsames Funktionsprinzip

Es sind mehrere Gruppen von Guanosintriphosphat-hydrolysierenden Proteinen (GTPasen) beschrieben, die sich in Größe, Struktur und Aufgaben unterscheiden, in ihrem Funktionsprinzip

einander aber gleichen. GTPasen können als molekulare Schalter betrachtet werden, deren Affinität zu anderen Makromolekülen von ihrem Schaltzustand abhängt. Im GTP-gebundenen Zustand sind diese Proteine „aktiv“ bzw. „eingeschaltet“, im Komplex mit GDP dagegen „inaktiv“ bzw. „ausgeschaltet“. Diese beiden Zustände können zum sogenannten GTPase-Zyklus verbunden werden: Wenn GDP freigesetzt wird, tritt das Protein in einen vorübergehenden „Leerzustand“ ein. Unter physiologischen Bedingungen lagert sich an der freigewordenen Bindungsstelle jedoch sofort GTP an, wodurch sich die Konformation des Enzyms und folglich die Affinität zu bestimmten Effektorproteinen ändert. Schließlich wird GTP zu GDP hydrolysiert; die GTPase nimmt ihre Ausgangskonformation an, und der Kreislauf kann von neuem beginnen. Die Kinetik sowohl der Freisetzung von GDP als auch des Hydrolyseschritts wird bei den meisten GTPasen von einer Reihe von Steuerungsproteinen reguliert. Die Hydrolyse von GTP stellt einen irreversiblen Schritt dar. Dadurch ist gewährleistet, daß der Zyklus nur in einer Richtung abläuft [26].

Die GTPasen lassen sich nach Struktur und Funktion in mehrere Superfamilien gliedern: Die heterotrimerischen G-Proteine vermitteln und verstärken Signale an der Zellmembran. GTP-gesteuerte Initiations- und Elongationsfaktoren spielen bei der ribosomalen Proteinbiosynthese wesentliche Rollen. Die „kleinen GTPasen“, zu denen auch die Rho-GTPasen gezählt werden, sind dagegen vor allem mit der Regulation von Differenzierung, Zellproliferation, Endosomenreifung und von Funktionen des Aktinzytoskeletts assoziiert. Ein typisches Merkmal ist ihr geringes Molekulargewicht zwischen 21kDa und 35kDa. Einen weitergehenden Überblick über Funktion und Struktur von GTPasen geben die Referenzen [26] und [27].

### 1.2.2 Ras ist der Prototyp der Superfamilie der kleinen GTPasen

Das onkogene Mäusesarkomvirus (MSV) führte Ende der 70er Jahre auf die Spur der Ras-GTPasen: Es wurde erkannt, daß von den Harvey- und Kirsten-Viren kodierte 21kD-Proteine infizierte Zellen zur Proliferation zwingen. Später stellte sich heraus, daß sich die viralen Onkogene von eukaryotischen Genen ableiten, welche dann als *ras*-Gene bezeichnet wurden. Zelluläre Ras-GTPasen sind als Signalmoleküle an der Steuerung von Zellwachstum, -proliferation und -differenzierung beteiligt [23, 26, 47]. In der Folgezeit wurde eine Fülle von verschiedenen kleinen GTPasen entdeckt. „Ras“ dient seitdem gleichzeitig als Name einzelner GTPasen wie auch einer ganzen Superfamilie von „Ras-ähnlichen“ Proteinen mit unterschiedlichen Aufgaben. Eine detaillierte Übersicht hierzu findet sich z.B. in der Arbeit von Bos [24].

Gene der *ras*-Superfamilie sind evolutionär hochkonserviert und wurden aus einer Vielzahl

eukaryotischer Zellen, von Hefen bis Säugerzellen, isoliert [105]. Die folgende Darstellung beschränkt sich jedoch auf die im Kontext mit *Shigella* unmittelbar relevanten kleinen GTPasen, die mammalischen Vertreter der Rho-Familie.

### 1.2.3 Die Rho-Proteine bilden eine eigene Subfamilie kleiner GTPasen

Die Rho-Familie wurde 1985 von Madaule und Axel als eine neue Familie von *ras*-homologen Genen beschrieben. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von Rho und Ras beträgt etwa 35%, wobei sich Regionen starker Homologie von Abschnitten größerer Variabilität abgrenzen lassen [105]. Rho-GTPasen im engsten Sinne sind die drei Isoformen RhoA, B und C, die eine Vielzahl biochemischer Charakteristika teilen und deren Aminosäuresequenzen zu 84-92% identisch sind<sup>3</sup>. Von ihren Eigenschaften her ähneln sich die drei Isoformen so sehr, daß der Schwerpunkt wissenschaftlicher Arbeit lange Zeit fast ausschließlich auf die Isoform RhoA gelegt wurde. Erst kürzlich konnte am Beispiel der Metastasierung von Melanomzellen in einem Mäusemodell eine spezifische biologische Rolle für RhoC aufgezeigt werden [39].

Ähnlich wie schon im Fall von Ras wurden auch zu RhoA, B und C in rascher Folge homologe GTPasen entdeckt, so daß der Begriff „Rho“ in der Literatur auch zur Kennzeichnung einer ganzen Superfamilie benutzt wird. Die Rho-Superfamilie wird derzeit in acht Mitglieder(gruppen) eingeteilt: Rho (mit den Isoformen A, B und C), Rac (Isoformen 1 und 2), Cdc42 (Isoformen Cdc42Hs und G25K), RhoD, RhoG, Rnd (Isoformen 1, 2 und 3/RhoE), TC10 und RhoH/TTF [42, 104, 131]. Die Aminosäuresequenzen der Rho-verwandten GTPasen stimmen mit der Sequenz von RhoA zu 40% (RhoH) bis 54% (Rac1) überein.

### 1.2.4 Die kleinen GTPasen der Rho-Familie sind Regulatoren des Aktinzytoskeletts

Kleine GTPasen der Rho-Familie kontrollieren die Organisation des Aktin-Zytoskeletts in eukaryotischen Zellen [130], eine Rolle, die bei einer Vielzahl zellulärer Funktionen zum Tragen kommt. Rho-GTPasen werden auch mit der Regulation der Dynamik intrazellulärer Vesikel in Verbindung gebracht [112, 126]. Möglicherweise kommt den Proteinen zusätzlich auch eine Aufgabe bei der Steuerung der Gentranskription zu [71, 159, 171]. In dieser Arbeit gilt das Interesse jedoch der Rolle von Rho als Regulator des Zytoskeletts.

Die meisten Daten liegen zum jetzigen Zeitpunkt zu Rho, Rac und Cdc42 vor. Die übrigen Familienmitglieder sind noch wenig erforscht und bleiben im folgenden – mit Ausnahme von

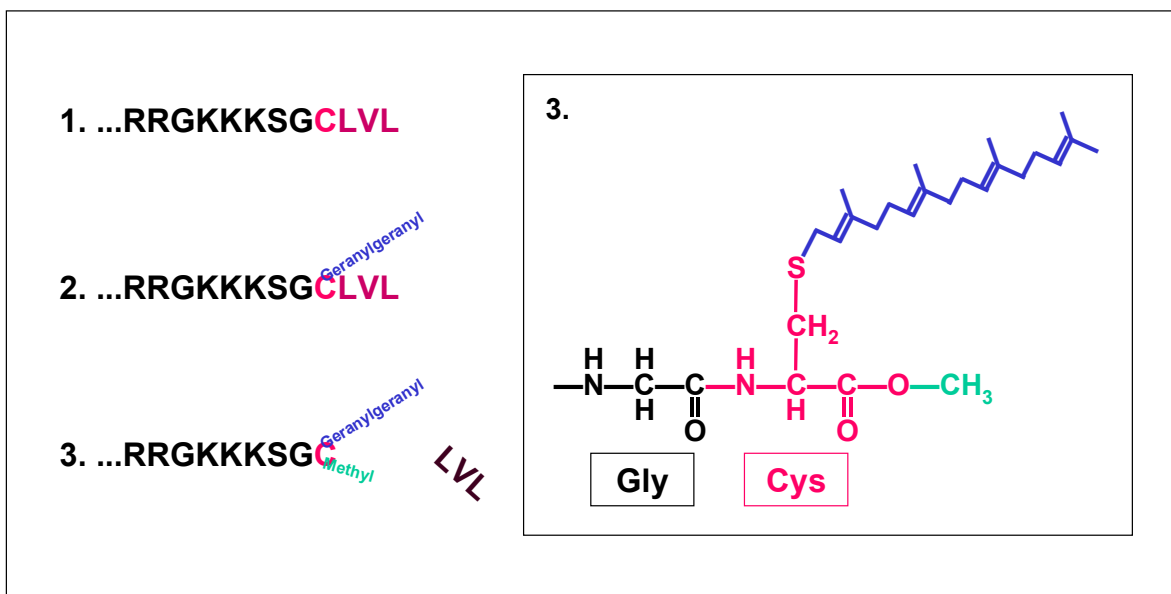
---

<sup>3</sup> Sequenzidentität und -ähnlichkeit wurden mit der Funktion "gap" des unter <http://genome.dkfz-heidelberg.de> zugänglichen Programms "HUSAR" berechnet.



RhoD – unberücksichtigt. TC10 scheint vom erzeugten Phänotyp her Cdc42 nahezustehen [127]. RhoG ist der Nomenklatur zum Trotz näher mit Rac (68% Identität), Cdc42 und TC10 verwandt als mit den klassischen Rho-Isoformen (54% Identität mit RhoA) und stellt evolutionsgeschichtlich möglicherweise eine frühe Abzweigung dar [178]. Rnd/RhoE fördert die Auflösung von F-Aktin-Strukturen [65, 131]. RhoH/TTF wurde nur in hämatopoetischen Zellen nachgewiesen [42].

### 1.2.5 Rho-GTPasen werden posttranslational modifiziert



**Abb. 1-1** Durch posttranslationale Isoprenylierung und Methylierung erhält Rho einen lipophilen C-Terminus (hier am Beispiel von RhoA).

Rho-Proteine werden – wie auch andere kleine GTPasen der Ras-Superfamilie [67] – im C-terminalen Bereich posttranslational modifiziert. Notwendige Bedingung hierfür ist ein sogenanntes CaaX-Motiv am Carboxy-Terminus [67], wobei „C“ für Zystein steht, „a“ für eine aliphatische Aminosäure und „X“ für eine beliebige Aminosäure. RhoA, B und C werden an dem an viertletzter Position stehenden Zystein über eine Thioetherbindung isoprenyliert, und die letzten drei Aminosäuren („-aaX“) werden abgespalten [4]. Am Beispiel von RhoA wurde gezeigt, daß die Prenylierung von Cys190 der Abspaltung des Tripeptids vorausgeht (vgl. Abb. 1-1). Anschließend wird der neue Carboxyterminus methyliert [83]. Sind – wie bei RhoB – vor der CaaX-Gruppe weitere Zysteinreste vorhanden, können auch Palmitoylgruppen angekoppelt werden [4]. Am Beispiel von Ras wurde gezeigt, daß auch für diese Art der Modifikation eine vollständige CaaX-Gruppe notwendig ist [67]. Die genannten posttranslationalen Veränderungen erhöhen die Affinität der Proteine zu Lipidmembranen beträchtlich [164]. Es ist nicht endgültig

geklärt, ob Rho-Isoformen dank ihrer lipophilen posttranslationalen Modifikationen direkt an Membranen binden oder eines „Adapters“ in der Membran bedürfen. Daten aus einem Erythrozytenmodell deuten darauf hin, daß RhoA GTP-abhängig an integrale Membrankomponenten binden kann [25]. Klar gezeigt wurde, daß die posttranslationale Modifikation für eine Reihe von Funktionen, darunter die Interaktion mit Steuerungsproteinen des GTPase-Zyklus, unerlässlich ist [75, 110].

### **1.3 Der „Schalter“ Rho wird von Steuerungsproteinen kontrolliert**

#### **1.3.1 GEFs, GAPs und GDIs**

GTP-Hydrolyse und GDP-GTP-Austausch sind bei RhoA/B/C und anderen kleinen GTPasen komplex regulierte Prozesse. Die intrinsischen GTP-Hydrolyse- und GDP-Dissoziationsraten sind sehr niedrig [26], wobei die Hydrolyserate von RhoA kleiner ist als die von Rac1 oder Cdc42 [188]. Diese Ausgangskonstellation ist Grundlage für die Schalterfunktion der kleinen GTPasen. Durch den Einsatz von Steuerungsproteinen, die den GTPase-Zyklus bei Bedarf vorantreiben oder auch bremsen, wird es möglich, den „Schalter“ Rho präzise zu regulieren. GDP/GTP-Austauschfaktoren (GEF), auch als -Austauschproteine (GEP) oder GDP-Dissoziationsstimulatoren (GDS) bezeichnet, aktivieren Rho, indem sie den Übergang in den GTP-gebundenen Zustand fördern [32]. GTPase-aktivierende Proteine (GAP) beschleunigen den Hydrolyseschritt und inaktivieren Rho [188]. GDP-Dissoziationsinhibitoren (GDI) binden Rho im inaktiven Status [119] und hemmen die Aktivierung durch GEFs [110].

Extrazelluläre Signale müssen auf die Ebene der Steuerung des GDP/GTP-Gleichgewichts transduziert werden (oder unmittelbar auf dieser Ebene wirken), um die Aktivität von Rho zu beeinflussen, wobei über diese Signalkette wenig bekannt ist. Beispiele für Rho-aktivierende extrazelluläre Signale sind die Wachstumsfaktoren LPA [143] und Bombesin [50], die, durch Rho vermittelt, Streßfilamente und Fokaladhäsionskomplexe in Fibroblasten induzieren. Rezeptorgekoppelte heterotrimerische G-Proteine können an der Transduktion des LPA-Signals durch die Plasmamembran beteiligt sein [30]. Sphingosin-1-Phosphat aktiviert Rho ebenfalls in Fibroblasten, scheint aber nicht über einen Rezeptor an der Zelloberfläche zu wirken [180]. Über welche Zwischenschritte der Ipa-Komplex von *Shigella* die Verschiebung des GDP/GTP-Gleichgewichts induziert, ist ebenfalls noch nicht bekannt.

#### **1.3.2 GEFs versetzen Rho in den aktivierten Zustand**

Über 20 verschiedene GEFs für Mitglieder der Rho-Superfamilie sind beschrieben worden.

GEFs werden oft mit einer (proto-)onkogenen Rolle in Verbindung gebracht. Zum Teil können sie mit mehreren Rho-Unterfamilien (Rho, Rac, Cdc42) interagieren, zum Teil sind sie für einzelne Proteine spezifisch [32]. Lbc [189], mNET1-GEF [7] und mRhoGEP [110] gelten als für Rho spezifisch. Eine weitergehende, differentielle Spezifität für einzelne Rho-Isoformen ist bisher nicht nachgewiesen worden. GEFs wurden meist aus der Zytosolfraktion isoliert; es soll jedoch auch membranassoziierte GEFs geben. Ein Beispiel hierfür ist mRhoGEP [110]. Für rhoGDS und mRhoGEP wurde auch gezeigt, daß die posttranslationale Modifikation von Rho für die Interaktion zwischen GEF und GTPase notwendig ist [75, 110].

### 1.3.3 GAPs erhöhen die GTP-Hydrolyserate von Rho

Auch die Rho-inaktivierenden GAPs bilden eine Familie mit mehreren Vertretern unterschiedlicher Spezifität. Die GAPs myr 5 [125], p190 [188] und p122 [74] sollen für Rho spezifisch sein; Isoformspezifität ist auch hier nicht bekannt. Ebenfalls auf Rho wirkt p50<sup>rhoGAP</sup>, jedoch soll dieses Steuerungsprotein zu Cdc42 eine noch höhere Affinität aufweisen [188]. Durch p190 oder p50<sup>rhoGAP</sup> wird die GTP-Hydrolyserate von RhoA mindestens um den Faktor 4000 erhöht [188]. Im Gegensatz zu GDIs und manchen GEFs kann rhoGAP auch an posttranslational unmodifiziertem Rho aktiv sein [75].

Einige GAPs zeigen neben ihrer eigentlichen GAP-Funktion noch andere Aktivitäten. So bindet p122 an PLC-delta 1 und aktiviert dieses Enzym. Dadurch wird die Hydrolyse von 4,5-PIP<sub>2</sub> gesteigert [74] und eine Funktion von Rho, die Stimulation der PIP<sub>2</sub>-Synthese [36], auch indirekt antagonisiert. Das Klasse-IX-Myosin myr5 hat *in vitro* und *in vivo* rhoGAP-Aktivität mit einer hohen Spezifität für Rho. Überexpression von myr5 in HeLa-Zellen führt zur Inaktivierung von Rho [125].

### 1.3.4 RhoGDI inhibiert die Trennung von GDP und Rho

RhoGDI hat neben seiner Rho-inaktivierenden Funktion [119] auch Einfluß auf die intrazelluläre Lokalisation von Rho. Mit RhoGDI komplexiertes Rho liegt im Zytosol vor [80, 94]. GDI löst membrangebundenes RhoB von der Membran ab, wenn RhoB im Komplex mit GDP vorliegt [80]. Mikroinjektion von RhoGDI inhibiert entsprechend die wachstumsfaktorinduzierte Translokation an die Plasmamembran [169]. RhoGDI wird nur an posttranslational modifiziertem Rho aktiv [75] und bindet zehnmal besser an GDP-Rho als an GTP-Rho [155]. Mit GDI komplexiertes GDP-RhoA kann von GEFs nicht aktiviert werden [94, 110].

RhoA verfügt als einzige Rho-Isoform über einen Serinrest an Position 188. Wenn RhoA an Ser188 von der cAMP-gesteuerten Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert wird, ist RhoGDI in

der Lage, auch mit GTP komplexiertes, membrangebundenes RhoA zu binden und ins Zytosol zu translozieren [97]. Die biologische Aktivität von RhoA wird entsprechend durch die PKA-vermittelte Phosphorylierung am Ser188 *in vivo* vermindert [45].

Von RhoGDI sind drei Isoformen bekannt, die mit  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bezeichnet werden und sich in ihrem Expressionsmuster unterscheiden. Während RhoGDI $\alpha$  ubiquitär vorkommt, sind die anderen beiden Isoformen nur aus bestimmten Geweben isoliert worden [156]. Unterschiede in der Substratspezifität wurden bisher nicht beschrieben. RhoGDI ist nicht spezifisch für Rho und interagiert auch mit anderen Vertretern der Rho-Superfamilie wie Rac und Cdc42 [119].

## 1.4 Rho steuert das Aktinzytoskelett über vielfältige Angriffspunkte

### 1.4.1 Das Aktinzytoskelett reguliert Gestalt und Bewegung von Zellen

Die präzise Kontrolle des GTPase-Zyklus durch das oben beschriebene Arsenal von Steuerungsproteinen ermöglicht die feine Regulierung der Aktivität von Rho-Effektormolekülen. Die meisten der bekannten Effektoren von Rho wiederum nehmen Einfluß auf Abläufe innerhalb der Zelle, an denen Aktin und mit Aktin assoziierte Zellkomponenten beteiligt sind. Aktin ist im Zytoplasma von Eukaryotenzellen das am stärksten repräsentierte Protein. Es kann – in Abhängigkeit vom Zelltyp – bis zu 10% der Gesamtproteinmenge ausmachen. Aus 42kD-Aktinmonomeren (G-Aktin) können durch Polymerisation Mikrofilamente (F-Aktin) entstehen. Der Anbau neuer Monomere erfolgt – unter Bedingungen, wie sie im Zytosol herrschen – vorzugsweise an einem Ende der Filamente, dem sogenannten *barbed end*, während das Abspalten von Monomeren im wesentlichen auf das andere Ende (*pointed end*) beschränkt ist [166].

Aktinfilamente sind ein wesentlicher Bestandteil des Zytoskeletts, das an einer Vielzahl von Zellfunktionen beteiligt ist. Es strukturiert die Zelle, bestimmt ihre Morphologie, definiert Polarität und ist für Zellbewegung und -teilung notwendig [166]. Charakteristisch für das Aktinzytoskelett ist die enge Anbindung an Plasmamembranen [175]. Damit Aktinfilamente zu einer funktionsfähigen Einheit zusammengesetzt werden können, bedarf es einer Fülle weiterer Proteine, die Filamente untereinander oder mit anderen Zellelementen verbinden. Beschrieben sind Moleküle, die Aktinfasern bündeln, bewegen oder in der Plasmamembran verankern.

Mit der Wirkung der kleinen GTPasen der Rho-Familie stehen mindestens drei Organisationsformen von F-Aktin in Beziehung: (a) Lange, kontraktile, parallel in Gruppen angeordnete und Myosin enthaltende Bündel von F-Aktin, die die Zelle in vielen Richtungen von Membran zu Membran durchqueren können, werden als Streßfilamente bezeichnet. Sie sind an sogenannt

ten Fokaladhäsionen mit Integrinen und damit – indirekt – mit der extrazellulären Matrix verbunden. (b) Ein dichtes Geflecht von Aktinfasern findet sich am freien, sich vorwölbenden Rand von Lamellipodien und Membranfältelungen (*membrane ruffles*), wellenähnlichen Ausbuchtungen der Plasmamembran. (c) Kurze F-Aktinbündel schließlich geben von der Zelloberfläche abstehenden fadenförmigen Membranprotrusionen, die als Filopodien oder *mikrospikes* bezeichnet werden, ihre Gestalt [130].

#### 1.4.2 Rho, Rac und Cdc42 spielen bei der Steuerung des Zytoskeletts abgrenzbare Rollen

Cdc42, Rac und Rho regulieren die Organisation des Aktinzytoskeletts und interagieren auf komplexe Weise miteinander. Die Entwicklung des entsprechenden Forschungsgebiet weist eine hohe Dynamik auf, und ständig werden neue Aspekte der Funktionen und Interaktionen kleiner Rho-GTPasen aufgedeckt. Hier soll nur ein grober Abriß erfolgen:

In Mikroinjektionsexperimenten an Fibroblasten zeigte sich zuerst, daß Cdc42 Aktinpolymerisation induziert und zur Ausbildung von Filopodien und *microspikes* führt [130]. Rac vermittelt dagegen die Entstehung von Lamellipodien und Membranfältelungen durch Aktinpolymerisation *de novo* [103]. Das nach einer Punktmutation konstitutiv aktive RhoA<sup>G14V</sup> führt nach Mikroinjektion in Fibroblasten zu ausgeprägten Veränderungen der Zellmorphologie. Der Zellkörper kontrahiert sich, während fingerartige Fortsätze noch am Substrat haften bleiben [138]. Mit diesem Phänomen assoziiert ist die durch Rho induzierte Reorganisation von Aktin- und Myosinfilamenten zu Streifasern. Rho scheint hier allerdings keine *De-novo*-Aktinpolymerisation zu induzieren [103, 130]. Anhand dieser Fibroblastenexperimente wurde eine Hierarchie von Rho, Rac und Cdc42 postuliert: Es wurde gezeigt, daß in diesem System unter dem Einfluß von Cdc42 die Aktivität von Rac zunimmt, während andererseits Rac einer der Faktoren ist, die die Aktivität von Rho steigern können [130]. Möglicherweise gilt diese Rangordnung nicht in allen Zelltypen und nicht für alle Aufgaben der GTPasen der Rho-Familie. Wahrscheinlich ist aber, daß die Steuerung der vielfältigen und komplexen Funktionen des Aktinzytoskeletts häufig der Kooperation mehrerer kleiner GTPasen der Rho-Familie bedarf. Dabei können diesen Proteinen auch antagonistische Rollen zufallen: Bei der Steuerung der Morphologie des Wachstumskegels von Neuronen, beispielsweise, sind Rho einerseits und Rac und Cdc42 andererseits an Signalketten beteiligt, die miteinander im Wettbewerb zu stehen scheinen [92].

Trotz des komplexen Zusammenspiels der kleinen GTPasen ist eine Dissektion der Signalketten möglich. So konnte einzelnen Mitgliedern der Rho-Familie eine Reihe spezifischer

und eng definierter Funktionen zugeordnet werden. Dabei ist wichtig zu berücksichtigen, daß Rho-Proteine in verschiedenen Zelltypen nicht die gleichen Aufgaben erfüllen müssen. In Epithelzellen kann Rho auch Membranfältelung induzieren, die zeitlich dem Erscheinen von Streßfilamenten deutlich vorausgeht [169]. Diese Fältelungen lassen sich morphologisch von den *Rac-ruffles* abgrenzen [129]. Die Wirkung von Rac ist andererseits in MDCK-Epithelzellen zwar notwendig, nicht aber hinreichend, um Membranfältelung zu erzeugen [65]. In Thrombozyten ist RhoA notwendig für die Aggregation [120], und in Makrophagen spielt Rho eine essentielle Rolle bei der Fc $\gamma$ -vermittelten Phagozytose [66]. Während der Zellteilung (Zytokinese) reguliert Rho den kontraktilen Aktin-Myosin-Ring an der Teilungsfurche [106].

Im folgenden werden einige Funktionsmechanismen und potentielle Interaktionspartner der klassischen Rho-Isoformen A, B, C, sowie von RhoD im Bereich der Zytoskelettregulation vorgestellt. Dies muß lückenhaft geschehen, da das Wissen darüber, wie Rho wirkt, noch sehr unvollständig ist. In vielen bisher veröffentlichten Arbeiten wurde zwischen RhoA, B und C nicht differenziert, da die biochemischen Unterschiede oft unwesentlich zu sein schienen. Häufig wird „Rho“ synonym verwendet mit RhoA, der wohl am besten untersuchten Isoform. Die Wirkung von Rho auf das Aktinzytoskelett scheint über eine Vielzahl von Angriffspunkten vermittelt zu werden. Insbesondere Zell-Zell-Kontakte, Mitglieder der Ezrin-Radixin-Moesin- (ERM-)Familie sowie die Verankerung von Aktinfilamenten an der Plasmamembran durch Fokalkomplexe stehen unter der Kontrolle von Rho.

### 1.4.3 Rho reguliert Fokalkomplexe und Streßfilamente

Fokalkomplexe oder Fokaladhäsionen sind in der Plasmamembran lokalisierte, plattenförmige Ansammlungen (*cluster*) von Integrinen und aus dem Zytoplasma rekrutierten Proteinen, darunter unter anderem Talin, Vinculin,  $\alpha$ -Aktinin, Paxillin, Tensin und die Tyrosinkinasen pp125<sup>FAK</sup> und Src [38]. Integrine sind weitverbreitete heterodimerische Glykoproteine, die die Plasmamembran durchspannen und mindestens zwei Funktionen erfüllen: Sie können die Zelle an die extrazelluläre Matrix fixieren und Signale in die Zelle übertragen [38]. Die „klassischen“ Fokaladhäsionsplaques tragen auf der zytoplasmatischen Seite Verankerungsstellen für Streßfilamente. Es konnte gezeigt werden, daß – neben dem Kontakt mit der extrazellulären Matrix als Grundvoraussetzung – die Aktivität von Rho notwendig ist, damit diese Fokalkomplexe entstehen können [77, 143]. Und nur wenn zuvor Integrine zu Fokaladhäsionsplaques zusammengezogen wurden, können Aktinfilamente als parallele, kontraktile Streßfasern organisiert werden. In Abwesenheit von Fokaladhäsionen entstehen unter dem Einfluß von Rho lediglich

dünne Aktinfilamentbündel [103, 130]. Fokaladhäsionsplaques können aber auch dann induziert werden, wenn die Bildung von Streßfilamenten unterbunden wird [130]. Fokaladhäsionsplaques sind hochdynamische Strukturen und verschwinden nach experimentellem „Abschalten“ von Rho binnen weniger Minuten [130].

Über welche Mechanismen reguliert Rho die Fokaladhäsionskomplexe? Während dieser Vorgang als Ganzes noch nicht verstanden ist, gibt es bruchstückhafte Informationen zu einzelnen Aspekten. In Fibroblasten kolokalisiert RhoA offenbar nicht mit Fokaladhäsionen [169]. Die Induktion von Streßfilamenten und das Zusammenziehen von phosphotyrosinhaltigen Proteinen an Fokaladhäsionen soll in Fibroblasten aber von einer *downstream* von Rho gelegenen Tyrosinkinase abhängig sein, wobei die Identität dieses Enzyms unklar ist [144]. Bekannt ist, daß Rho (nicht aber Rac) die Phosphorylierung der Tyrosinkinase pp125<sup>FAK</sup>, die ein Substrat von Src ist, stimuliert [50, 180]. Rho induziert weiterhin auch die Tyrosinphosphorylierung der Fokaladhäsionsproteine Paxillin und p130 in Fibroblasten [50]. *In-vitro*-Daten deuten darauf hin, daß Paxillin dabei von pp125<sup>FAK</sup> phosphoryliert werden kann [18]. Die Bedeutung dieser Modifikation ist allerdings unklar; zumindest ist sie keine notwendige Bedingung für die Rekrutierung des Proteins an Fokaladhäsionen [18].

Eine andere Verbindung zwischen Rho und Fokalkomplexen ergibt sich über die von Rho stimulierte 4,5-PIP<sub>2</sub>-Synthese durch Aktivierung einer Phosphatidylinositol-4-phosphat 5-Kinase [36]. RhoA erhöht die Konzentration von Vinculin, einem Protein, das als Ankerstelle für F-Aktin gilt, an Fokalkomplexen von MDCK-Zellen [91]; in Fibroblasten wurde auch die Rekrutierung von Talin als Rho-abhängig beschrieben [143]. Die Bindung von Vinculin sowohl an Aktin als auch an Talin wird in Fibroblasten von 4,5-PIP<sub>2</sub> verstärkt. Durch Blockierung von PIP<sub>2</sub> mit monoklonalen Antikörpern konnte die Ausbildung von Fokaladhäsionsplaques und Streßfilamenten vollständig unterbunden werden [58].

Eines der am besten untersuchten Zielmoleküle von Rho ist die Rho-Kinase, eine 160kDa Serin/Threonin-Kinase, die spezifisch an GTP-Rho bindet und deren Aktivität durch diese Interaktion etwa um den Faktor zwei erhöht wird [111]. In der Literatur trägt dieses Enzym mehrere Namen: „Rho-assoziierte Kinase“, „Rho-Kinase“ und „ROK $\alpha$ “ sind als identisch zu betrachten; p160ROCK ist eine Isoform der Rho-Kinase [53]. Die Mikroinjektion der katalytischen Domäne von Rho-Kinase oder Überexpression des Enzyms können unabhängig von Rho die Bildung von Streßfilamenten und Fokaladhäsionen induzieren [11, 35, 99]. Konstitutiv aktives RhoA bewirkt die Rekrutierung von Rho-Kinase an Membranen und die Kolokalisation

mit F-Aktin in der Zellperipherie [100]. Die Kinase gilt aufgrund dieser Beobachtungen als ein Vermittler von Rho-Signalen.

Die Verbindung zwischen Rho-Kinase und der Induktion von Streßfilamenten ergibt sich möglicherweise über die Interaktion der Kinase mit leichten Myosinketten (MLC): Rho-Kinase ist in der Lage, MLC *in vivo* und *in vitro* zu phosphorylieren [12, 35], und zwar an der gleichen Stelle wie die Calmodulin-gesteuerte MLC-Kinase [12]. Durch diese Modifikation wird die ATPase-Aktivität von MLC – und damit die Motorfunktion von Myosin – angeschaltet [166]. Auch die Myosin-bindende Untereinheit (MBS) der Myosinphosphatase, dem direkten Gegenspieler der Myosin-phosphorylierenden Enzyme, ist ein Substrat der Rho-Kinase. GTP-RhoA scheint diese katalytische Wechselwirkung durch spezifische Interaktion mit der MBS zu vermitteln. Durch Phosphorylierung wird die Myosinphosphatase inaktiviert, was den Phosphorylierungs- und Aktivierungsgrad von MLC indirekt – als Folge verminderter Dephosphorylierung – zusätzlich steigert [89]. Somit ergibt sich ein Modell der doppelten Regulierung der Phosphorylierung von MLC. Dieser Mechanismus könnte auch die beschriebene „Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität“ der Phosphorylierung von MLC in glatten Muskelzellen durch aktiviertes und an die Membran transloziertes RhoA erklären [60].

Über das  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Austauschprotein NHE1 eröffnet sich ein weiterer Signalweg. Aktivität von NHE1 soll für die Entstehung von Streßfasern und Fokaladhäsionen in Fibroblasten und Epithelzellen notwendig sein. RhoA aktiviert NHE1 über p160ROCK [172].

#### 1.4.4 Rho beeinflusst Zell-Zell-Kontakte

Rho ist an der Regulierung von *tight junctions* in polarisierten Epithelzellen beteiligt [134]. In Keratinozyten steuern Rho und Rac die Einrichtung von Zell-Zell-Kontakten über die lokale Anreicherung von Cadherinen in der Plasmamembran. Cadherine sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zell-Zell-Haftmoleküle, die – vermittelt durch Catenine – mit dem Aktinzytoskelett interagieren [28]. Ein anderes aktinbindendes Membran/Skelett-Protein, das an Zell-Zell-Kontaktstellen in Epithelzellen konzentriert ist, ist  $\alpha$ -Adduzin. Auch hier spielt die bereits im Zusammenhang mit der Induktion von Streßfilamenten erwähnte Rho-Kinase möglicherweise eine Rolle, indem sie  $\alpha$ -Adduzin phosphoryliert. Diese Phosphorylierung verstärkt die Interaktion mit Aktinfilamenten *in vitro*. Auch  $\alpha$ -Adduzin kann durch Myosinphosphatase dephosphoryliert werden. Dieser Schritt scheint, ähnlich wie für MLC beschrieben, gleichzeitig von Rho gehemmt zu werden, so daß auch hier eine zweigleisige Regulation vorliegen könnte [88].



### 1.4.5 Rho interagiert in komplexer Weise mit Ezrin, Radixin und Moesin

Die eng verwandten Proteine Ezrin, Radixin und Moesin (ERM) [157] bilden eine weitere Familie von Molekülen, die die Verankerung von F-Aktin in der Plasmamembran vermitteln können [175]. Ein möglicher Verankerungspunkt für ERM-Proteine ist das integrale Membranprotein CD44 [175]. ERM-Proteine sind innerhalb der Zelle an Stellen lokalisiert, wo Aktinfilamente dicht mit der Plasmamembran assoziiert sind, wie Teilungsfurchen, Mikrovilli, Membranfältelungen, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Haftstellen [175]. Ezrin ist konzentriert in Mikrovilli und anderen aktinreichen Protrusionen von Epithelzellen. Moesin findet sich dagegen nur in manchen Epithelzellen, hauptsächlich jedoch in Endothelzellen [21]. ERM-Proteine interagieren in komplexer Weise mit Rho und sollen an der Aktivierung von Rho beteiligt sein [168]. Gleichzeitig gibt es Hinweise, die dafür sprechen, daß Rho umgekehrt auch die Funktion und Lokalisation von Ezrin, Radixin und Moesin reguliert (vgl. Abb. 1-2):

RhoA erzeugt in Fibroblasten Aktin/Membran-Protrusionen. Radixin wird Rho-abhängig phosphoryliert und in diese Protrusionen rekrutiert [161]. Der GEF Dbl interagiert *in vitro* mit der N-terminalen Region von Radixin, ohne daß diese Interaktion einen Einfluß auf die Aktivität von Dbl hätte. Dbl interagiert nicht mit Radixin, wenn dieses mit RhoGDI komplexiert vorliegt. Umgekehrt verdrängt RhoGDI jedoch Dbl von Radixin. Es wird spekuliert, daß Radixin für die Rekrutierung dieser Rho-Steuerungsproteine eine Rolle spielt [167]. In Epithelzellen induziert Rho die Entstehung von Membranfältelungen und die Ansammlung von Moesin und MBS an der Plasmamembran im Bereich der freien Kante der Protrusion [53]. RhoA kolokalisiert mit ERM-Proteinen an Zell-Zell-Haftstellen, in Teilungsfurchen und dort, wo sich Membranfältelungen bilden [169]. Ähnlich wie MLC oder  $\alpha$ -Adduzin ist Moesin ein Substrat sowohl der Rho-Kinase als auch der Myosinphosphatase. Die Phosphorylierung erfolgt in einem Abschnitt von Moesin, der an der Aktinbindung beteiligt ist und könnte somit den Funktionszustand des Moleküls modifizieren [53].

Auch die Bildung des CD44/ERM-Komplexes soll *in vivo* von Rho gesteuert werden. Die Bindung zwischen ERM-Proteinen und CD44 wird in Anwesenheit von 4,5-PIP<sub>2</sub> verstärkt [73]. Die 4,5-PIP<sub>2</sub>-Konzentration wiederum steht unter dem Einfluß von Rho [36]. Darüber hinaus wurde festgestellt, daß der CD44/ERM-Komplex in BHK-Zellen RhoGDI enthält [73]. Wenn RhoGDI an das N-terminale Fragment von ERM-Proteinen, das auch die CD44-Bindungsstelle enthält, bindet, wird die Aktivität des Steuerungsproteins reduziert und damit die Aktivierung von Rho eingeleitet. Somit ergibt sich ein potentieller Mechanismus für die Aktivierung von Rho durch ERM-Proteine [168].

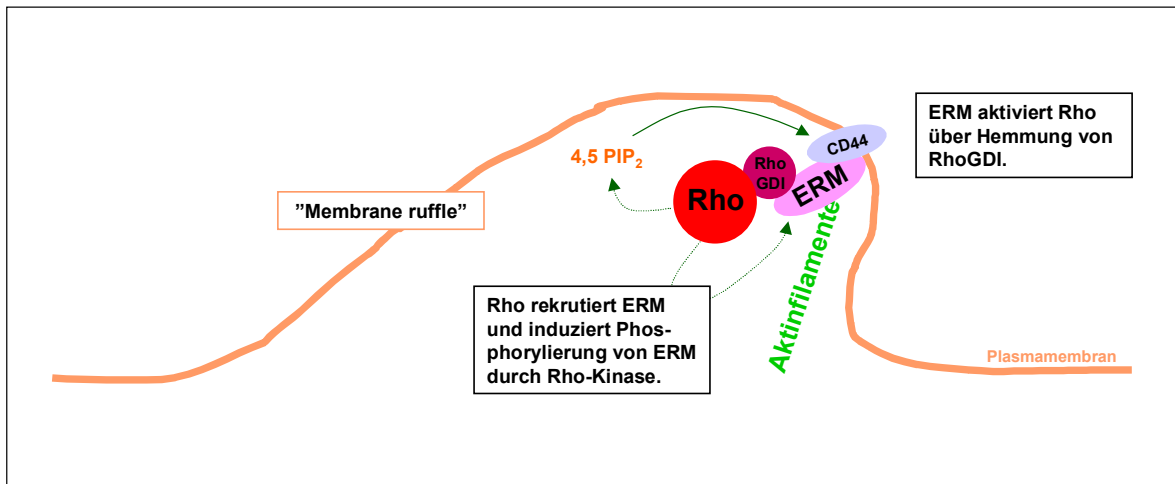


Abb. 1-2 Rho und ERM-Proteine regulieren sich wechselseitig (Erläuterungen vgl. 1.4.5).

#### 1.4.6 RhoD – und möglicherweise RhoB – regulieren die Dynamik von Endosomen

RhoD bewirkt bei Überexpression in BHK-Zellen die Ausbildung F-Aktin-haltiger Membranfortsätze und den Abbau von Streßfasern und Fokaladhäsionen, Funktionen, die das Protein von den drei Isoformen A-C unterscheiden. Weiterhin soll RhoD die Dynamik früher Endosomen regulieren. Expression der konstitutiv aktiven Mutante RhoD<sup>G26V</sup> führt zu verringerter Motilität der Organellen und hemmt – offenbar über diesen Mechanismus – die homotypische Fusion der Endosomen. RhoD ist in BHK-Zellen an der Plasmamembran sowie an vesikulären Strukturen in der ganzen Zelle lokalisiert [126].

RhoB zeigt ein ähnliches subzelluläres Verteilungsmuster und könnte aufgrunddessen ebenfalls für eine Rolle bei der Endosomensteuerung prädisponiert sein [5, 112]. Die Proteinkinase N („PKN“, „PRK1“) wird von RhoB an Endosomen rekrutiert [112]. PRK1 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die *in vitro* sowohl von RhoA [13, 181] als auch RhoB [112] gebunden und aktiviert wird. *In vivo* soll PRK1 jedoch nur mit aktiviertem RhoB interagieren [112]. PRK1 interagiert andererseits auch mit  $\alpha$ -Aktinin [124], einem aktinfilamentbündelnden Protein, das u. a. in Fokalkomplexen gefunden wird [38]. Diese Wechselwirkung ist *in vitro* 4,5-PIP<sub>2</sub>-abhängig [124].

#### 1.4.7 Mit der Funktion von Rho assoziierte Zytoskelettbestandteile sind an der Zellinvasion durch *Shigella* beteiligt

Die Aktivität von Rho ist notwendig, damit *Shigella* in Zellen eindringen kann. An Modellen mit HeLa-Zellen, anderen Epithelzellen und Fibroblasten wurde gezeigt, daß die Invasion stark eingeschränkt ist, wenn zuvor das *Clostridium botulinum*-Toxin C3, das Rho spezifisch inhibiert

[160], in die Zellen eingeschleust wurde [3, 183]. Rho reguliert die Entstehung der langen F-Aktinbündel, die das Gerüst der bakterieninduzierten blütenkelchähnlichen Membranveränderungen bilden. Nur die Aktinnuklei unmittelbar unter den eindringenden Bakterien bilden sich Rho-unabhängig [3].

Ipa B, C und D von *Shigella* interagieren *in vitro* und kolokalisieren *in vivo* mit  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin [182] und können möglicherweise auf diesem Weg eine Aktivierung der Fokaladhäsionskomplexe vermitteln [183]. Die Invasionseffizienz von *Shigella* in CHO-Zellen korreliert mit dem Expressionsniveau von  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin in der Wirtszelle und scheint von der Ipa-Integrin-Interaktion abhängig zu sein [182]. Das in einem anderen Zusammenhang gefundene Ergebnis, daß Rho offenbar nicht nur regulatorische Signale an die Fokaladhäsionen vermittelt, sondern möglicherweise auch umgekehrt extrazelluläre Signale – durch Integrine weitergegeben – die Aktivität von Rho beeinflussen, könnte hier von Bedeutung sein [159].

IpaA interagiert im Zytoplasma von HeLa-Zellen mit Vinculin und induziert die Rekrutierung von Vinculin und  $\alpha$ -Aktinin an die Bakterieneintrittsstelle [173]. Auch Ezrin, dessen Funktion für die Epithelzellinvasion durch *Shigella* notwendig ist, wird an die Invasionskomplexe transloziert und kolokalisiert dort mit Aktinfilamenten [165]. Weitere aktinassoziierte Proteine, die üblicherweise an Fokaladhäsionskomplexen vorkommen, konnten an der Bakterieninvasionsstelle nachgewiesen werden, darunter Paxillin, Talin, Cortactin, pp125<sup>FAK</sup> und Src [43, 182, 183]. Überdies konnte gezeigt werden, daß pp125<sup>FAK</sup> und Paxillin in CHO-Zellen im Laufe des Invasionsprozesses phosphoryliert werden [182, 183]. Auch Cortactin wird tyrosinphosphoryliert. Dieses Phänomen konnte in HeLa- und polarisierten Epithelzellen nachgewiesen werden und soll durch die Tyrosinkinase pp60<sup>c-src</sup> (Src) vermittelt werden [43, 186]. HeLa-Zellen, die Src überexprimieren, können von nichtinvasiven Shigellenstämmen infiziert werden [43]. Src und Cortactin werden an die Bakterieneintrittsstelle rekrutiert, wo sie mit F-Aktin kolokalisieren [43]. Cortactin ist ein F-Aktin-bindendes und -bündelndes Protein [78], das hauptsächlich in randständigen Zellstrukturen wie Lamellipodien und Membranfältelungen konzentriert vorkommt und eine SH3-Domäne enthält [186]. Die Phosphorylierung mindert die Fähigkeit des Proteins, F-Aktin zu binden, *in vitro* geringfügig [78] und *in vivo* nicht meßbar [186]. Die Fähigkeit zur F-Aktin-Bündelung wird jedoch durch die Einwirkung von Src *in vitro* deutlich herabgesetzt [78]. Aufgrund dieser Beobachtung wurde über eine antagonistische Rolle von Cortactin (und damit Src) gegenüber der aktinbündelnden Wirkung von Rho spekuliert [1]. Möglicherweise übt Src überdies auch auf einem anderen Weg eine hemmende Wirkung auf Rho aus: Src kann p190<sup>rhoGAP</sup> phosphorylieren und führt bei Überexpression zur Auflösung von

Streßfilamenten. Es wird vermutet, daß die Phosphorylierung die Aktivität von rhoGAP erhöht und es dadurch sekundär zur Inaktivierung von Rho kommt [33].

## 1.5 Rho-Isoformen haben unterschiedliche biologische Eigenschaften

### 1.5.1 Rho-Isoformen unterscheiden sich in ihrer intrazellulären Lokalisation

Daß RhoB sich im Muster seiner posttranslationalen Modifikation und in der subzellulären Lokalisation von den anderen beiden Isoformen unterscheidet, ist seit längerem bekannt: Während RhoA und RhoC geranylgeranyliert werden, kann RhoB, das im C-terminalen Bereich über zwei weitere Zysteine verfügt, zusätzlich oder alternativ farnesyliert und palmitoyliert werden [4]. Am Beispiel von Ras konnte gezeigt werden, daß die Art des angefügten Isoprenoidrests die intrazelluläre Lokalisation beeinflusst [23]. Entsprechend liegen bei Überexpression in Fibroblasten und Epithelzellen RhoA und RhoC hauptsächlich im Zytosol vor, während RhoB im wesentlichen an Endosomen lokalisiert ist. Ein kleiner Anteil aller drei Isoformen A, B und C findet sich an der Plasmamembran. [5, 112]. RhoD ähnelt in seinem Verteilungsmuster RhoB und kommt ebenfalls an der Plasmamembran und an frühen Endosomen vor [126]. Für RhoD, das wie RhoB in der C-terminalen Region über mehr als ein Zystein verfügt, kann darüber hinaus nach [67] gemutmaßt werden, daß es ebenfalls isoprenyliert und palmitoyliert wird. Vor diesem Hintergrund könnte man versucht sein, zwei Paare mit gemeinsamen Eigenschaften gegenüberzustellen, RhoA/C einerseits und RhoB/D andererseits.

### 1.5.2 Rho-Isoformen werden während der Shigelleninvasion differentiell rekrutiert

Die drei Rho-Isoformen A, B und C werden, induziert durch das Invasionssignal von *Shigella*, in einem Zeitraum von Minuten an die Bakterieneintrittsstelle rekrutiert, wo sie mit F-Aktin kolokalisieren [3]. Die Translokation von RhoA an seine Wirkungsorte, unter anderem an Membranfältelungen, war bereits zuvor beschrieben worden [169]. Im Zusammenhang mit der Shigelleninvasion wurde jedoch ein völlig neuer Aspekt aufgedeckt: Verschiedene Isoformen weisen unterscheidbare Rekrutierungsmuster auf. RhoA akkumuliert in unmittelbarer Nähe der eindringenden Bakterien, während RhoB und RhoC im wesentlichen in die Spitzen der F-Aktinreichen, bakteriell induzierten, zellulären Protrusionen rekrutiert werden [3]. Überraschend war hier, daß RhoA und RhoC, die sich hinsichtlich ihrer Lokalisation in der nichtinfizierten Zelle und ihrer posttranslationalen Modifikation nicht unterscheiden ließen, durch ihr Translokationsverhalten unterscheidbar wurden. Dagegen weisen die Isoformen RhoB und RhoC, die verschieden lokalisiert sind und modifiziert werden [4, 5], lichtmikroskopisch nicht unterscheidbare Rekrutierungsmuster auf. Auf der Grundlage des Rekrutierungsverhaltens läßt sich RhoA

somit nicht nur gegen RhoB, sondern zusätzlich auch gegen RhoC abgrenzen.

Die Vermutung liegt nahe, daß die Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation in der nicht-infizierten Zelle auf die verschiedenen posttranslationalen Modifikationen der Isoformen zurückzuführen sind. Welche Eigenschaften der Isoformen erklären aber die unterschiedlichen differentiellen Rekrutierungsmuster von RhoA und RhoC? Es bot sich an, bei der Suche nach Determinanten der Rekrutierungsmuster von einer Analyse der Primärstruktur auszugehen.

### 1.5.3 Primärstrukturen der Rho-Isoformen

Die Sequenzen von RhoA, RhoB und RhoC (Abb. 1-3) wurden Ende der Achtzigerjahre publiziert [187, 34]. RhoA und RhoC werden als 193 Aminosäuren lange Proteine synthetisiert; RhoB ist drei As länger. Zwischen As1 und 122 unterscheiden sich RhoA und RhoC nur in einer einzigen Aminosäure. Erweitert man den Bereich bis zur Position 180, besteht immer noch eine Übereinstimmung von 96%. Im selben Bereich beträgt die Homologie zwischen RhoA und RhoB 89%. Die Homologie nimmt zum C-Terminus hin ab; die Mehrzahl der Unterschiede findet sich im C-terminalen Sequenzdrittel einschließlich der CaaX-Gruppen.

RhoA	MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFENYVADIEV	48
RhoC	MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFENY <b>T</b> ADIEV	48
RhoB	MAAIRKKLV <b>V</b> VGDGACGKTCLLIVFSK <b>D</b> E <b>F</b> PEVYVPTVFENYVADIEV	48
RhoA	DGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFPC	108
RhoC	DGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFPC	108
RhoB	DGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCF <b>S</b> <b>V</b> DSPDSLENIPEK <b>W</b> <b>V</b> PEVKHFPC	108
RhoA	NVPIILVGNKKDLR <b>N</b> DEHTRELAKMKQEPV <b>K</b> PEEGRDMANRI <b>G</b> AFGY <b>M</b> ECSAKT <b>K</b> DGVR	168
RhoC	NVPIILVGNKKDLR <b>Q</b> DEHTRELAKMKQEPV <b>R</b> SEEGRDMANRI <b>S</b> AFGY <b>L</b> ECSAKT <b>K</b> EGVR	168
RhoB	NVPIILV <b>A</b> NKKDLR <b>S</b> DEH <b>V</b> R <b>T</b> ELAR <b>M</b> KQEPV <b>R</b> <b>T</b> DD <b>G</b> R <b>A</b> MA <b>V</b> RI <b>Q</b> AYDYLECSAKT <b>K</b> EGVR	168
	<b>CaaX</b>	
RhoA	EVFEMATRAALQ <b>A</b> RR <b>G</b> K <b>K</b> --- <b>S</b> G- <b>C</b> L <b>V</b> L	193
RhoC	EVFEMATRA <b>L</b> Q <b>V</b> R <b>K</b> N <b>K</b> R <b>R</b> --- <b>R</b> G- <b>C</b> P <b>I</b> L	193
RhoB	EVF <b>E</b> T <b>A</b> T <b>R</b> AALQ <b>K</b> R <b>Y</b> G <b>S</b> Q <b>N</b> G <b>C</b> I <b>N</b> C- <b>C</b> K <b>V</b> L	196

**Abb. 1-3** DNS-Sequenzen von RhoA, B und C im Vergleich. Unterschiede in den Aminosäuresequenzen sind rot markiert.

Durch die vorangegangenen Untersuchungen von Birgit Bohm in unserem Labor war bereits bekannt, daß das Vorhandensein der CaaX-Region eine notwendige Bedingung für die *Shigella*-induzierte Rekrutierung von Rho in unserem System darstellt. Ebenso ergaben sich durch präliminäre Analysen eines Konstrukts (RhoACA, vgl. Tab. 2-12) mit herkömmlichen fluoreszenzmikroskopischen Techniken Hinweise auf eine wesentliche Rolle des prä-C-terminalen

Sequenzabschnitts As 181-189 für die Determinierung des Rekrutierungsmusters, während die CaaX-Regionen von RhoA und RhoC keinen Einfluß auf das Rekrutierungsmuster hatten.

## 1.6 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluß der CaaX-Gruppe und prä-C-terminaler Aminosäuren auf die Rekrutierung von Rho-Isoformen näher zu untersuchen und den Sequenzabschnitt einzugrenzen, welcher das Rekrutierungsmuster bestimmt. Darüber hinaus wurde der Frage nachgegangen, ob sich das Rekrutierungsphänomen auf die drei Isoformen RhoA, B und C beschränkt, oder ob auch andere, verwandte kleine GTPasen an die Bakterieneintrittsstelle transloziert werden. Zu diesem Zweck wurde hier das Rekrutierungsverhalten der kleinen GTPase RhoD [126], die den drei Isoformen A, B und C auf der Primärstrukturebene nur zu etwa 50% homolog ist (vgl. Abb. 1-4), erstmals untersucht. Eine Reihe von *rho*-Hybridkonstrukten wurde mit Hilfe PCR-vermittelter Mutagenese hergestellt, in Vektoren kloniert und im HeLa-Zell-Modell analysiert. HeLa Zellen wurden mit der Konstrukt-DNS transient transfiziert und mit invasiven *S. flexneri* SC301 infiziert. Nach Fixierung und Färbung wurden die exprimierten Konstrukte schließlich hinsichtlich ihres Verteilungsmusters in der Zelle untersucht. Dies erfolgte durch Markierung der mutierten Proteine mit fluoreszierenden Antikörpern, Aufnahme einer Z-Serie digitaler Mikrofotografien mit definiertem Abstand der Fokussierungsebenen und nachfolgender Bearbeitung der Bilddaten mit dem epr-Dekonvolutionsalgorithmus [48].

RhoA	MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFENYVADIEV	48
RhoD	MNASQVAGEEAPQSGHSVKVVLVGDGGCGKTSLMMVFAKGAFPESYSPTVFERYNATLQM	60
RhoA	DGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPDTDVILMCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFPCP	108
RhoD	KGKPVHLQIWDTAGQDDYDRLRPLFYPDANVLLLCFDVTNPNSEFDNVSNRWYPEVTHFCK	120
RhoA	NVPIILVGNKKDLRNDHTRRELAKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGYMECSAKTKDGVR	168
RhoD	GVPIIVVGCIDLRKDKVLVNNLRKKRLEPVTYHRGHDMARSVGAVAYLECSARLHDNVE	180
<i>CaaX</i>		
RhoA	EVFEMATRAALQARRGK--KK---SG-CLVL	193
RhoD	AVFQEAAEVALSSRRHNEWRITQNC-CLAT	210

**Abb. 1-4** DNS-Sequenzen von RhoA und RhoD im Vergleich. Unterschiede in den Aminosäuresequenzen sind rot markiert.

## 2 Methodik

### 2.1 DNS-Präparation

#### 2.1.1 Bakterienkultur

*E. coli* Wirtsstämme mit den zu isolierenden Plasmiden (vgl. Tab. 3-5) wurden bei  $-70^{\circ}\text{C}$  in 25% Glycerin gelagert. Inokuliert wurde direkt in LB-Flüssigmedium (Fluka) mit Zusatz von  $100\ \mu\text{g/ml}$  Ampicillin. Die Kulturen ( $12\ \text{ml}$  für Miniprep,  $500\ \text{ml}$  für Maxiprep) wuchsen über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  und unter aeroben Bedingungen in einem Schüttler.

#### 2.1.2 Miniprep

Für eine DNS-Ausbeute bis zu  $25\ \mu\text{g}$  wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit von QIAGEN verwendet. Die Bakterienflüssigkultur wurde zehn Minuten lang mit  $3000\ \text{g}$  bei Raumtemperatur zentrifugiert, das Sediment in einem RNase enthaltenden Puffer resuspendiert. Die bakteriellen Zellen wurden alkalisch lysiert in  $100\ \text{mM}$  NaOH und  $0,5\%$  SDS (Endkonzentration). Nach Neutralisieren mit einem Puffer mit hoher Salzkonzentration und Abzentrifugieren ausgefallener Zellbestandteile bei  $15000\ \text{g}$  wurde die Plasmid-DNS selektiv an eine Silikagelmembran gebunden und konnte nach einem Waschschriff mit einem wenig Salz enthaltenden Puffer eluiert werden.

#### 2.1.3 Maxiprep

Größere DNS-Mengen (bis zu  $800\ \mu\text{g}$ ) wurden mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit erhalten. Das Verfahren ist der Miniprep analog, allerdings wurde die Plasmid-DNS an einen Anionenaustauscher gebunden. Die Zentrifugationsschritte nach der Bakterienernte wurden in einer Ultrazentrifuge bei  $80000\ \text{g}$  und  $4^{\circ}\text{C}$  vorgenommen. Nach der Elution wurde die DNS mit Isopropanol präzipitiert, mit  $70\%$ -igem Ethanol gewaschen und in  $400\ \mu\text{l}$  TE-Puffer ( $10\ \text{mM}$  Tris-HCl,  $1\ \text{mM}$  EDTA, pH 8,0) gelöst.

#### 2.1.4 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Extraktion mit Phenol und Chloroform diente dazu, Nukleinsäurelösungen von Proteinbeimischungen zu reinigen [148].  $300\text{-}400\ \mu\text{l}$  DNS-Lösung wurden in ein  $1,5\text{-ml}$ -Eppendorf-Röhrchen überführt. Kleinere Volumina wurden mit TE-Puffer (vgl. 2.1.3) aufgefüllt. Ein Volumen Phenol (pH 7,5-8,0; Roth) wurde hinzugefügt und durch zweiminütiges Schütteln (Vortexen) eine Emulsion hergestellt. Durch  $15\text{-minütiges}$  Zentrifugieren bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $15000\ \text{g}$  wurden die zwei Phasen wieder getrennt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß

überpipettiert und die Extraktion zweimal mit einer Mischung von Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) wiederholt. 10-minütiges Zentrifugieren war hier ausreichend. Ein letzter Extraktionsschritt wurde mit reinem Chloroform vorgenommen. Nach fünfminütigem Zentrifugieren wurde die wäßrige Phase mit der gereinigten DNS in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Unmittelbar darauf folgte immer eine Ethanolpräzipitation (2.1.5).

### 2.1.5 Ethanolpräzipitation

1/10 Volumen 3 M Natriumazetat (pH 5,2) und zwei Volumina eiskaltes, 100%-iges Ethanol wurden zur DNS-Lösung pipettiert. Präzipitiert wurde über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Das Präzipitat wurde 15 min lang bei 15000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das DNS-Pellet zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Dadurch wurden Spuren von Phenol sowie Salze entfernt. Nach einem letzten Waschschrift mit 100%-igem Ethanol wurde die DNS vorsichtig getrocknet und in einem geeigneten Volumen sterilen, deionisierten Wassers gelöst. Die Lagerung erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  (modifiziert nach [85]).

### 2.1.6 Messen der DNS-Konzentration

Die Konzentration von DNS-Lösungen wurde mit einem UV-Photometer (Pharmacia LKB Ultrospec III) durch Absorptionsmessung der 1:200 verdünnten Lösung bei 260 nm Wellenlänge ermittelt.

## 2.2 Klonieren und Sequenzieren

### 2.2.1 Klonierungsvektoren

Plasmid Nr.	Vektor	Insert	Wirtsstamm ( <i>E. coli</i> )	laborinterne Stammnummer
P1	pUC19	<i>EcoRI</i> – vsv – <i>KpnI</i> – <i>rhoA</i> – <i>PstI</i>	TG1	S 117
P2	pKC3	<i>EcoRI</i> – Sendai – <i>KpnI</i> – <i>rhoA</i> – <i>PstI</i>	DH <sub>5α</sub>	S 134
P3	pUC19	(leer)	TG1	S 49
P4	pKC3	<i>EcoRI</i> – Sendai – <i>KpnI</i> – <i>rhoB</i> – <i>XbaI</i>	TG1	S 83

Tab. 2-1 Ausgangsplasmide für Klonierungsvektoren

Konstrukte wurden in pUC19 kloniert und sequenziert. Um die Konstrukt-DNS in HeLa-Zellen zu exprimieren, wurde sie in den eukaryotischen Expressionsvektor pKC3 (Cold Spring Harbor Laboratory), der einen SV40 Promotor enthält, umklont. Auf beiden Plasmiden ist Ampicillinresistenz kodiert, was eine einfache Selektion von transformierten Wirtsbakterien ermöglicht. Klonierungsvektoren wurden ausgehend von den Plasmiden in Tab. 2-1 konstruiert.



### 2.2.2 Schneiden von DNS mit Restriktionsenzymen

DNS wurde mit Restriktionsenzymen von MBI Fermentas geschnitten. Benutzt wurden *EcoRI*, *KpnI*, *PstI* und *XbaI* (Konzentration jeweils 10 U/ $\mu$ l) in den vom Hersteller empfohlenen Puffern inklusive BSA und bei einer Inkubationstemperatur von 37°C. Das in den Vorratslösungen der Enzyme enthaltene Glycerin kann in hoher Konzentration die Reaktion stören. Daher betrug das Ansatzvolumen immer mindestens das 20-fache des Volumens der eingesetzten Vorratslösung. Die Enzymmenge wurde mit 1-2 U/ $\mu$ g DNS berechnet. Nach mindestens vierfachem Überverdau (üblicherweise doppelte Enzymmenge und mindestens 2 h Reaktionszeit) wurde die Reaktion durch 20-minütiges Erhitzen auf 65°C beendet; die Restriktionsenzyme wurden dabei inaktiviert.

### 2.2.3 Dephosphorylierung

Um eine Religation geschnittener Plasmide zu verhindern, wurden DNS-Enden durch Inkubation mit 0,05 U/pmol Alkalischer Phosphatase (CIAP, MBI Fermentas) dephosphoryliert. Dieser Schritt erfolgte im vom Hersteller mitgelieferten Puffer (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, pH 8,0) oder direkt nach dem Schneiden mit Restriktionsenzymen im entsprechenden Restriktionspuffer. 3'-überlappende Enden wurden 15 min bei 37°C und 15 min bei 56°C inkubiert, 5'-überlappende Enden 30 min bei 37°C. In beiden Fällen wurde(n) der (die) Inkubationsschritt(e) nach erneuter Enzymzugabe einmal wiederholt.

### 2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Benutzt wurde der Elektrophoreseapparat Mupid-2 von Eurogentec mit 1,5%-igen Gelen in 0,5x TAE Laufpuffer (20 mM Trisacetat; 0,5 mM EDTA). Agarosepulver wurde abgewogen und in 0,5x TAE durch Erhitzen im Mikrowellenherd gelöst, die Lösung auf 55°C abgekühlt und in Förmchen mit den Maßen 107 x 60 x 8 mm<sup>3</sup> bzw. 52 x 60 x 8 mm<sup>3</sup> gegossen (Gel Maker Set EM-2). Ein Kamm wurde eingesetzt, um Taschen zu bilden, in welche später die zu untersuchende DNS-Lösung pipettiert werden konnte. Die Volumina der Taschen wurden nach Bedarf zwischen etwa 18  $\mu$ l und 160  $\mu$ l variiert. Die einzusetzende DNS-Lösung wurde wie in Tab. 2-2 angegeben eingestellt:

DNS	max. 25 ng/ $\mu$ l
TAE (Endkonzentration)	0,5x
6x loading buffer (MBI Fermentas; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylenzyanol; 30% Glycerin; 50 mM EDTA)	1/6 des Endvolumens

Tab. 2-2 DNS-Lösung für Agarosegelelektrophorese

Für präparative Gele wurde grundsätzlich gereinigte und in deionisiertem Wasser gelöste DNS benutzt. Plasmide wurden in der Regel einmal mit einem Restriktionsenzym geschnitten (linearisiert), um eine größenabhängige Wanderungsgeschwindigkeit der DNS zu erreichen. Als Vergleichsmaßstab für die DNS-Fragmentlänge dienten eine 100 bp- und eine 1 kb-DNS-Leiter (MBI Fermentas).

Das polymerisierte Gel wurde in den Elektrophoreseapparat in 0,5x TAE gelegt. Anschließend wurden die DNS-Lösungen aufgetragen. Nach Anlegen einer Gleichspannung von 100 V wanderten die DNS-Moleküle und die Farbstoffe des *loading buffer* zur Anode. Anhand der Lage der Bromphenol-Farbstoffbande, die im 1,5%-igen Gel mit der gleichen Geschwindigkeit wanderte wie ein DNS-Fragment von etwa 400 bp Länge, konnte die geeignete Laufzeit der Elektrophorese bestimmt werden. Nachdem das Gel 10-20 min in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml, Merck) gefärbt worden war, ließen sich die DNS-Banden im UV-Licht betrachten. Die Dokumentation des Ergebnisses erfolgte durch Fotografie mit einer CCD-Kamera.

### **2.2.5 Isolierung von DNS-Fragmenten durch Gelelektrophorese**

Ein Agarosegel mit zwei kleinen und einer fünf- bis zehnmal so großen Tasche wurde vorbereitet. Die zu trennende DNS-Lösung wurde auf eine kleine und die große Tasche aufgeteilt; die zweite kleine Tasche war für die 1 kb-DNS-Leiter bestimmt. Nach der elektrophoretischen Trennung der DNS-Fragmente wurde das Gel längs zur Wanderungsrichtung in zwei Teile geschnitten. Nur das Gelfragment mit den kleinen Taschen wurde in Ethidiumbromid gefärbt. Unter UV-Beleuchtung konnte die Position der interessierenden Bande auf dem gefärbten Gel erkannt und markiert werden. Nachdem die beiden Gelfragmente wieder zusammengesetzt worden waren, konnte auf die Lage der entsprechenden Bande im ungefärbten Gel geschlossen werden. Das korrespondierende Gelareal wurde ausgeschnitten. Der verbleibende Gelrahmen wurde in Ethidiumbromid gefärbt und die Präzision des Ausschnitts im UV-Licht kontrolliert.

### **2.2.6 DNS-Extraktion aus Agarosegelen**

Einzelne DNS-Banden aus Agarosegelen wurden mit dem QIAquick-Kit von QIAGEN extrahiert: Das ausgeschnittene Gelstück mit der zu extrahierenden DNS-Bande wurde in dem mitgelieferten, auf einen pH <7,5 eingestellten Puffer mit chaotropen Salzen bei 50°C aufgelöst. Die DNS wurde an eine Silikagelmatrix gebunden (vgl. 2.1.2 Miniprep), mit einem ethanolhaltigen Puffer gewaschen und mit deionisiertem Wasser oder dem mitgelieferten Elutionspuffer eluiert.

### 2.2.7 PCR

Die PCR diente als Werkzeug, um gezielt Mutationen in DNS-Sequenzen einzuführen. Es fanden abhängig von der Anforderung an die Güte des PCR-Produkts zwei verschiedene Enzyme Verwendung. *Taq*-DNS-Polymerase (MBI Fermentas) wird aus *Thermus aquaticus* gewonnen und besitzt keine 3'-Exonukleaseaktivität zur Korrektur von Replikationsfehlern. *Pwo*-DNS-Polymerase (SAWADY) ist die rekombinant hergestellte Form einer Polymerase aus *Pyrococcus woesei*. Sie erreicht durch ihre 3'-Exonukleaseaktivität (*proofreading*) eine nach Herstellerangaben zehnmal höhere Replikationstreue als *Taq*-Polymerase. Folgende Bedingungen wurden für die PCRs eingestellt (Tab. 2-3 und 2-4):

<b><i>Taq</i>-Polymerase</b>		
Reaktionsvolumen		100 µl
PCR-Puffer (MBI Fermentas)	Tris-HCl	10 mM (pH 8,8)
	KCl	50 mM
	Nonidet P40	0,08%
MgCl <sub>2</sub>		1,5 mM
dNTP-Mix (MBI Fermentas) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		50 µM (jeweils)
Rinderserumalbumin (BSA) (MBI Fermentas)		100 µg/ml
<i>Taq</i> -DNS-Polymerase (MBI Fermentas)		1 U
5'-Primer		200 nM
3'-Primer		200 nM
DNS-Matrize		variabel
Mineralöl als Verdunstungsschutz (ICN Biomedicals, Inc.)		70 µl
Anzahl der Replikationszyklen		13-30
<b>Inkubationstemperaturen und -zeiten je Zyklus</b>		
Denaturierung der DNS-Doppelstränge		94°C / 1 min (1. Zyklus: 3 min)
Anlagerung der DNS-Einzelstränge (Primer/Matrize)		50°C (wenn nicht anders angegeben) / 1 min
Extensionsreaktion		72°C / 1 min (letzter Zyklus: 10 min)

**Tab. 2-3** PCR-Ansatz mit *Taq*-Polymerase

<b><i>Pwo</i>-Polymerase</b>		
Reaktionsvolumen		100 µl
PCR-Puffer (peqlab)	Tris-HCl	10 mM (pH 8,8)
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 mM
	KCl	25 mM
MgSO <sub>4</sub>		1,5 mM
dNTP-Mix (MBI Fermentas) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		50 µM (jeweils)
<i>Pwo</i> -DNS-Polymerase (peqlab)		1,5 U (entspricht 1,5 µl )
5'-Primer		200 nM
3'-Primer		200 nM
DNS-Matrize		variabel
Mineralöl (Verdunstungsschutz)		70 µl
Anzahl der Replikationszyklen		13-30
<b>Inkubationstemperaturen und -zeiten je Zyklus</b>		
Denaturierung der DNS-Doppelstränge		94°C / 1 min (1. Zyklus: 3 min)
Anlagerung der DNS-Einzelstränge (Primer/Matrize)		50°C (wenn nicht anders angegeben) / 1 min
Extensionsreaktion		72°C / 1 min (letzter Zyklus: 10 min)

**Tab. 2-4** PCR-Ansatz mit *Pwo*-Polymerase

Die Reaktionen wurden auf einer PCR-Maschine von Perkin Elmer Cetus durchgeführt (DNA Thermal Cycler 480).

### 2.2.8 Oligonukleotide (Oligos)

Oligonukleotide wurden auf Bestellung von den Firmen EUROGENTEC oder MWG (nur Nr. 25 und Nr. 79) synthetisiert (Tab. 2-5). Oligo-Paare wurden als PCR-Primer benötigt. Eine Ausnahme bildeten lediglich die Oligos Nr. 68/69, die direkt nach Hybridisierung in einen geeigneten Vektor kloniert werden konnten. Die PCR-Primer wurden alle nach dem gleichen Muster aufgebaut: Am 3'-Ende befindet sich eine Sequenz von Nukleotiden, die zum 3'-Ende eines Strangs der PCR-Matrize vollständig oder größtenteils komplementär ist. Durch einzelne „unpassende“, mutierte Basen konnten in das PCR-Produkt gezielt Mutationen eingeführt werden. Richtung 5'-Ende wurde die palindromische Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym vorangestellt (relevante Erkennungssequenzen sind in Tab. 2-5 **fett** gedruckt). Damit sich das Restriktionsenzym an die DNS anlagern konnte, wurden vor der Restriktionssequenz nochmals einige Nukleotide angefügt.

Nr.	Name	Nukleotidsequenz	Tm/°C
5	RhoB1	5'-CA- <b>GGTACC</b> -ATG-GCG-GCC-ATC-CGC-AAG-A-3'	60,7
6	RhoA5	5'-GC- <b>CTGCAG</b> -TCA-CAA-GAC-AAG-GCA-ACC-AGA-3'	59,0
7	RhoA4	5'-CAT- <b>GGTACC</b> -ATG-GCT-GCC-ATC-CGG-AAG-AAA-CTG-GTG-ATT-G-3'	62,9
25	vsvRhoC	5'-TAC- <b>GAATTC</b> -ATG-TAC-ACC-GAC-ATC-GAG-ATG-AAC-CGG-CTG-GGC-AAG- <b>GGTACC</b> -CAT-ATG-GCT-GCA-3'	68,1 (Temp3)
			66,0 (Temp4)
60	RhoAgly14val	5'-GCAAG- <b>GGTACC</b> -ATG-GCT-GCC-ATC-CGG-AAG-AAA-CTG-GTG-ATT-GTT-GGT-GAT-GTA-GCC-TGT-GGA-3'	68,5
61	RhoAthr19asn	5'-GCAAG- <b>GGTACC</b> -ATG-GCT-GCC-ATC-CGG-AAG-AAA-CTG-GTG-ATT-GTT-GGT-GAT-GGA-GCC-TGT-GGA-AAG-AAT-TGC-TT-3'	68,6
62	RhoBBA3	5'-TGC- <b>CTGCAG</b> -TCA-TAG-CAC-CAG-GCA-GCA-GTT-GA-3'	59,4
63	RhoCCA3	5'-TGC- <b>CTGCAG</b> -TCA-GAG-AAC-GAG-ACA-GCC-CCT-CCG-A-3'	63,0
64	RhoAAB3	5'-TGC- <b>CTGCAG</b> -TCA-CAA-GAC-CTT-GCA-ACC-AGA-3'	55,9
65	RhoD5	5'-ACG- <b>GAATTC</b> -GAT-ATC-ATG-AAC-GCG-TCC-CAG-GTT-GCG-GGA-3'	56,2
66	RhoD3	5'-TAT-CCC-GGG- <b>TCTAGA</b> -TCA-GGT-GGC-CAA-GCA-3'	44,8
67	RhoDDA3	5'-TAT-CCC-GGG- <b>TCTAGA</b> -TCA-GAG-GAC-CAA-GCA-ACA-A-3'	42,1
68	vsvRhoD.cs	5'- <b>AATT</b> -GTC-GAC-ATG-TAC-ACC-GAC-ATC-GAG-ATG-AAC-CGG-CTG-GGC-AAG- <b>GAATTC</b> -GGC-ACC- <b>TCTAGA</b> - <b>CTGCA</b> -3'	68,1
69	vsvRhoD.ncs	5'- <b>G-TCTAGA</b> -GGT-GCC- <b>GAATTC</b> -CTT-GCC-CAG-CCG-GTT-CAT-CTC-GAT-GTC-GGT-GTA-CAT-GTC-GAC-3'	69,6
70	RhoA188p	5'-TATA- <b>CTGCAG</b> -TCA-CAA-GAC-AAG-GCA-ACC-AGG-TTT-TTT-CTT-CCC-A-3'	59,8
79	RhoCAC.3	5'-TATA- <b>CTGCAG</b> -TCA-GAG-AAT-GGG-ACA-GCC-CGA-CTT-CTT-CTT-GCC-CCT-GCG-GGC-CTG-GAG-GCC-A-3'	68,7

**Tab. 2-5** Verwendete Oligonukleotide. Erkennungssequenzen der für diese Studie relevanten Restriktionsenzyme: **CTGCAG**-*Pst*I, **GAATTC**-*Eco*RI, **GGTACC**-*Kpn*I, **TCTAGA**-*Xba*I. Formel für die Berechnung von Tm:  $Tm = 81,5 + 0,41 (\%G + C) + 16,6 \log [K^+] - 500/d$  mit  $(\%G + C)$  – gemeinsamer Anteil von Guanosin und Cytosin am gesamten Oligonukleotid in %;  $[K^+]$  – Molarität von  $K^+$  im Reaktionsansatz (25 mM); d – Länge des hybridisierten DNS-Doppelstrangs Oligo/Matrize (nach [148]).

### 2.2.9 DNS-Matrizen (*templates*) für die PCR

Ausgangsbasis für die PCR-vermittelte Herstellung neuer DNS-Moleküle waren Konstrukte von RhoA, B, C und D, die im Labor bereits vorhanden waren (Tab. 2-6).

Matrize	Isoform	Vektor	Insert (Zahlen beziehen sich auf Kodons)	Wirtsstamm ( <i>E. coli</i> )	laborinterne Stammnummer
Temp1	RhoA	pUC19	<i>EcoRI</i> – vsv – <i>KpnI</i> – <i>rhoA</i> 1-193 – stop – <i>PstI</i>	TG1	S 117
Temp2	RhoB	pKC3	<i>EcoRI</i> – vsv – <i>KpnI</i> – <i>rhoB</i> 1-192 – stop – <i>PstI</i> (interne <i>PstI</i> -Schnittstelle eliminiert: Kodon 180 „CAG“ → „CAA“, beide Glu. CaaX-Gruppe fehlt.)	DH <sub>5α</sub>	S 307
Temp3	RhoC	pUC19	<i>EcoRI</i> – vsv – <i>KpnI</i> – „CAT“ – <i>rhoC</i> 1-193 – stop – <i>PstI</i>	DH <sub>5α</sub>	S 139
Temp4	RhoC	pKC3	<i>SacI</i> – vsv – <i>EcoRI</i> – <i>rhoC</i> 1-193 – stop – <i>PstI</i>	TG1	S 138
Temp5	RhoD	pGEM	<i>NcoI</i> – myc – <i>NdeI</i> – <i>rhoD</i> 1-210 – stop – <i>BamHI</i>	DH <sub>5α</sub>	S 314

**Tab. 2-6** PCR-Matrizen. In Temp3 ist aus technischen Gründen zwischen der *KpnI*-Schnittstelle und dem Beginn der *rhoC*-Sequenz das Triplet „CAT“ eingefügt.

### 2.2.10 DNS-Hybridisierung

Die komplementären Oligonukleotide Nr. 68 und 69 wurden zu Doppelsträngen hybridisiert (Tab. 2-7). Der Reaktionsansatz wurde mit 70 µl Mineralöl überschichtet, zur Denaturierung der DNS 10 min auf 98°C erhitzt, zur Ausbildung komplementärer Doppelstränge langsam auf 65°C gebracht und schließlich in Eiswasser forciert abgekühlt.

Komponente	Konzentration
Oligo Nr. 68	20 µM
Oligo Nr. 69	20 µM
Tris-HCl pH 8,0	20 mM
NaCl	10 mM
H <sub>2</sub> O	(ad 100 µl)

**Tab. 2-7** Reaktionsansatz für DNS-Hybridisierung

### 2.2.11 Ligation

Linearisierte, an den Enden dephosphorylierte Vektoren und passende, nicht dephosphorylierte Inserts wurden mit T4-DNS-Ligase (MBI Fermentas) im mitgelieferten Reaktionspuffer zu zirkulären Plasmiden verbunden (Tab. 2-8) und anschließend zur Transformation von kompetenten Wirtsbakterien eingesetzt.

Um das für die Ligation ideale Verhältnis von Vektor und Insert zu erhalten, wurde die Insertmenge in fünf separaten Ansätzen variiert. Drei Negativkontrollen wurden bei jedem Experiment mit angesetzt: (a) ohne DNS, (b) mit Insert aber ohne Vektor, (c) mit Vektor aber ohne Insert. Mit dem ersten Kontrollansatz konnte nach der Transformation verifiziert werden,

daß nichttransformierte Wirtsbakterien durch das in den Kulturplatten enthaltene Ampicillin ausselektiert wurden. Mit dem zweiten konnte beurteilt werden, ob das Insert ausreichen gut isoliert war (Insertkontrolle). Im dritten Ansatz wurde kontrolliert, ob Religation des Vektors mit seinem ursprünglichen Insert stattfand, bzw. ob ungeschnittener Vektor in der Präparation enthalten war (Vektorkontrolle). Das ursprüngliche Insert war im Ansatz mit enthalten, wenn die Plasmidfragmente nach Restriktion lediglich durch Dephosphorylierung voneinander getrennt wurden. Die Ansätze wurden bei 17°C mindestens 1 h lang inkubiert.

Komponente	Konzentration / Menge
Vektor	$0,5 \cdot 10^{-16}$ mol
Insert	Größenordnung $10^{-14}$ - $10^{-16}$ mol
T4-DNS-Ligase	2 U/Ansatz
Tris-HCl (pH 7,8)	40 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
DTT	10 mM
ATP	0,5 mM
H <sub>2</sub> O ad 20 µl	

Tab. 2-8 Reaktionsansatz für Ligation

### 2.2.12 Präparation von kompetenten *E. coli* (DH<sub>5α</sub>, TG1, ZK501)

Kompetente Bakterien können zirkuläre DNS (Plasmide) aus der Umgebung aufnehmen. *E. coli* (DH<sub>5α</sub>, TG1 oder ZK501) wurden in 50 ml LB inokuliert und über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Von dieser Kultur wurden 4 ml in 400 ml LB verdünnt und weiter bebrütet. Nach Erreichen der frühen log-Phase ( $OD_{590} = 0,375$ ; optische Dichte bei 590 nm Wellenlänge, gemessen mit SPECTRONIC 20<sup>+</sup>-Spectrophotometer) wurde die Bakteriensuspension auf 50-ml-Röhrchen verteilt und 5-10 min auf Eis stehen gelassen. Die Bakterien wurden 7 min bei 1600 g und 4°C zentrifugiert und in je 10 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung (60 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES (pH 7,0), 15% v/v Glycerin) resuspendiert. Nach fünfminütigem Zentrifugieren bei 1100 g wurden die Sedimente nochmals in je 10 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und 30 min auf Eis gestellt. Ein letztes Mal wurde fünf Minuten lang bei 1100 g zentrifugiert, die sedimentierten Bakterien in je 2 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, zu jeweils 1 ml aliquotiert und bei -70°C tiefgefroren (nach [15]).

### 2.2.13 Transformation von kompetenten *E. coli*

In 1,5 ml Eppendorf-Hütchen wurde zu je 100 µl Bakteriensuspension (kompetente *E. coli*

DH<sub>5α</sub>, TG1 oder ZK501) 1 µl gereinigte Plasmidlösung (entsprechend ca. 0,2 µg DNS) bzw. ein kompletter Ligationsansatz (20 µl) gegeben. Nach zwanzigminütiger Lagerung auf Eis wurden die Bakterien einem Hitzeschock ausgesetzt, indem die Reaktionsgefäße 2 min in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt wurden. Durch diese Behandlung wurden einige Bakterien mit dem jeweiligen Plasmid transformiert. Zu den Bakterien wurden rasch 900 µl LB dazupipettiert. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde die Bakteriensuspension 2 min bei 5000 g zentrifugiert, das Sediment in 70 µl LB resuspendiert und auf LB/Ampicillin-Agarplatten (1,5% Agar, 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert.

Ausgehend von den mit pUC19 und pKC3-Plasmiden transformierten und damit ampicillinresistenten Bakterien bildeten sich bei 37°C innerhalb von 20 h sichtbare Einzelkolonien. Negativkontrollen sind in 2.2.11 beschrieben. Auf allen drei Kontrollplatten sollten keine Kolonien erscheinen. Einzelne Kolonien auf der Insert- und Vektorkontrollplatte wurden toleriert, wenn die Anzahl relativ niedrig war (<1/100 der im jeweiligen Experiment maximalen Kolonienzahl). Erst durch Sequenzierung wurde sicher bestätigt, daß das richtige Insert-Vektor-Paar vorlag.

Sollte der transformierte Stamm asserviert werden, wurden einzelne Kolonien zur verlässlichen Abtrennung von ampicillinsensiblen Bakterien erneut auf Ampicillinplatten ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Hierdurch gewonnene Einzelkolonien wurden in LB-Flüssigmedium mit 100 µg/ml Ampicillin kultiviert und nach Zugabe von 25% (v/v) Glycerin bei -70°C eingefroren.

#### 2.2.14 Sequenzieren

Die durch PCR gewonnenen und in pUC19 klonierten DNS-Konstrukte wurden nach der Sanger-Methode [149] sequenziert, um ihre Fehlerfreiheit zu kontrollieren (Übereinstimmung mit Matrize und Primern). Benutzt wurde das „Thermo Sequenase“ Sequenzierkit mit didesoxynucleotids (ddNTPs) und 7-deaza-dGTP (Amersham Pharmacia Biotech). Am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 markierte Primer stammten von MWG (Tab. 2-9).

Primer	Sequenz
M13universalCS(-43)	5'-AGG-GTT-TTC-CCA-GTC-ACG-ACG-TT-3'
M13reverseCS(-49)24	5'-GAG-CGG-ATA-ACA-ATT-TCA-CAC-AGG-3'

**Tab. 2-9** Primer für die Sequenzierung der DNS-Konstrukte

Reaktionsansätze wurden nach Herstellerangaben pipettiert. Um die Sequenz in einer Richtung zu lesen, waren vier Ansätze notwendig, die jeweils ein anderes ddNTP enthielten. Da Strang und Gegenstrang gelesen wurden, ergaben sich insgesamt acht Ansätze. Die in Tab. 2-10



angegebenen Reaktionsbedingungen wurden für jeden Ansatz hergestellt. Nach Ende der Reaktion wurden zu jeder Probe 6 µl *loading buffer* (98% deionisiertes Formamid; 10 mM EDTA pH 8,0; 0,025% Xylenzylanol FF; 0,025% Bromphenolblau [148]) pipettiert.

zu sequenzierende DNS		0,05 pmol
Primer („vorwärts“ oder „rückwärts“)		0,5 pmol
A/C/G/T-Reagens	Tris-HCl (pH 9,5); MgCl <sub>2</sub> ; Tween20; Nonidet P-40; 2-Mercaptoethanol	2 µl
	dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP	
	ddATP oder ddCTP oder ddGTP oder ddTTP	
	thermostabile Pyrophosphatase	
	Thermo Sequenase DNS-Polymerase	
H <sub>2</sub> O		ad 8 µl
Denaturierung		95°C, 5 min
30 Replikationszyklen	Denaturierung	95°C, 30 sec
	Anlagerung	55°C, 30 sec
	Verlängerung	70°C, 1 min

**Tab. 2-10** Reaktionsbedingungen für Sequenzierung

Harnstoff	12,6 g	Vor Zugabe der restlichen Komponenten im Wasserbad bei 37°C auflösen.
TBE 10x (890 mM Tris Base, 890 mM Borsäure, 20 mM Na <sub>2</sub> EDTA·2 H <sub>2</sub> O)	3,6 ml	
H <sub>2</sub> O	ad 26,7 ml	
Long Ranger Gel Lösung (50%)	3,3 ml	
TEMED	14,4 µl	
10% APS	144 µl	(Zugabe direkt vor dem Gießen)

**Tab. 2-11** Zusammensetzung eines 5,5%-igen Sequenziergels

Sequenziert wurde mit einem halbautomatischen Sequenzierer von LICOR (DNA Sequencer model 4000) auf einem Long Ranger Gel (FMC) (Tab. 2-11). Das Gel wurde zwischen zwei LICOR Glasplatten (255 mm x 410 mm) mit einem Abstand von 0,25 mm gegossen, eine bis eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur zum Polymerisieren stehen gelassen, in den Sequenzierapparat eingebaut und vor Auftragen der Proben auf 50°C vorgewärmt. Die Parameter am Apparat wurden nach Herstellerangaben eingestellt. Nachdem der Gellauf beendet war, wurden die Sequenzen halbautomatisch gelesen. Jede Base wurde nochmals manuell nachkontrolliert. Die vorwärts und rückwärts gelesenen Sequenzen überschneiden sich in einem großen Bereich

(56% bei RhoA V14 bis 100% bei RhoD und RhoDDA), so daß hier eine Kontrolle möglich war.

### 2.2.15 Sequenzanalyse

Um DNS- und Aminosäuresequenzen untereinander zu vergleichen und zu analysieren, wurde das über Internet und Telnet zugängliche Computerprogramm HUSAR (<http://genome.dkfz-heidelberg.de>) benutzt.

### 2.2.16 Vorhandene, in Transfektionsexperimenten verwendete Rho-Konstrukte

Konstruktname	tag	Vektor	Insert	Wirtsstamm ( <i>E.coli</i> )	laborint. Stammnummer
RhoA	vsv	pKC3	<i>EcoRI</i> – vsv – <i>KpnI</i> – <i>rhoA</i> – <i>PstI</i>	DH <sub>5α</sub>	S 135
RhoA	Sendai	pKC3	<i>EcoRI</i> – Sendai – <i>KpnI</i> – <i>rhoA</i> – <i>PstI</i>	TG1	S 59
RhoB	vsv	pKC3	<i>SmaI</i> – vsv – <i>KpnI</i> – <i>rhoB</i> – <i>BamHI</i>	DH <sub>5α</sub>	S 129
RhoC	vsv	pKC3	<i>SacI</i> – vsv – <i>EcoRI</i> – <i>rhoC</i> – <i>PstI</i>	DH <sub>5α</sub>	S 130
RhoACA	vsv	pKC3	<i>EcoRI</i> – vsv – <i>KpnI</i> – <i>rhoA</i> 1-180 – <i>rhoC</i> 181-188 – <i>rhoA</i> 189-193 – stop – <i>PstI</i>	DH <sub>5α</sub>	S 148
RhoA <sup>R183K</sup>	vsv	pKC3	<i>EcoRI</i> – vsv – <i>KpnI</i> – <i>rhoA</i> mit Kodon 183 analog zu <i>rhoC</i> – <i>PstI</i>	DH <sub>5α</sub>	S 142
RhoA <sup>KK186-187RR</sup>	vsv	pKC3	<i>EcoRI</i> – vsv – <i>KpnI</i> – <i>rhoA</i> mit Kodons 186 und 187 analog zu <i>rhoC</i> – <i>PstI</i>	DH <sub>5α</sub>	S 143

Tab. 2-12 In der Studie verwendete Rho-Konstrukte, die zu Beginn der Arbeit bereits vorhanden waren.

## 2.3 *Shigella flexneri* SC301

### 2.3.1 Bakterienstamm

Verwendet wurde der Stamm SC301 [40] von *S. flexneri* Serotyp 5, der bei –70°C in 25% Glycerin gelagert wurde. SC301 besitzt das 140 MDa-Virulenzplasmid pWR100 mit eingefügtem Kanamycinresistenz-Transposon Tn5 (=pWR110) [153] sowie das Plasmid pIL22, welches für das afimbrische Adhäsın AFA I von *E. coli* [179] und für Ampicillinresistenz kodiert. AFA I erhöht durch die verbesserte Adhärenz der Bakterien an die Zellen die Infektionseffizienz [40].

### 2.3.2 Bakterienkultur

SC 301 wurde aus dem Glycerin-Vorrat in 20 ml TSB (Fluka) inokuliert und wuchs über Nacht bei 37°C, unter aeroben Bedingungen und ständigem Schütteln. Dem Medium wurden 50 µg/ml Kanamycin (SIGMA) und 100 µg/ml Ampicillin (Fluka) zugesetzt. Um Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase zu erhalten, wurden die Kulturen 1-3 h vor dem

Experiment 1:20 bis 1:50 mit TSB verdünnt, nochmals bei 37°C inkubiert und nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,3 und 0,5 geerntet (optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge, gemessen mit SPECTRONIC 20<sup>+</sup>-Spectrophotometer; OD<sub>600</sub> 1,0 entspricht ca.  $4 \cdot 10^8$  Bakterien ml<sup>-1</sup>). Ein der benötigten Bakterienmenge entsprechendes Volumen der Flüssigkultur wurde zentrifugiert (5000 g, 5 min) und der Überstand verworfen.

## 2.4 HeLa-Zellen

### 2.4.1 Zellkultur

HeLa-Zellen wurden in 600 ml Kunststoff-Zellkulturflaschen (Nunclon) unter sterilen Bedingungen angezüchtet. Alle Arbeitsschritte fanden in einer Sterilbox (antair BSK, Steril) statt. Als Kulturmedium diente MEM (Gibco) mit einem Zusatz von 10% FCS (Gibco; Komplement inaktiviert durch Erhitzen auf 56°C während 20 min). Die Flaschen wurden mit 30 ml Zellsuspension befüllt; die Zellen sedimentierten auf den Boden der Flaschen.

In einer mit 10% CO<sub>2</sub> angereicherten Atmosphäre vermehrten sich die Zellen bei 37°C und bildeten auf dem Flaschenboden innerhalb weniger Tage einen konfluenten Zellrasen. Bei der Ernte wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,25% Trypsin (Gibco), 0,5 mM EDTA, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) vom Flaschenboden abgelöst, in MEM suspendiert und 4 min lang bei 125 g abzentrifugiert. Nach vollständiger Suspension des Zellsediments in 2-4 ml MEM konnte mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer) die Zellkonzentration bestimmt werden. Davon ausgehend konnten mit MEM (+10% FCS) Suspensionen mit einer definierten Zelldichte hergestellt werden. Die Zelllinie wurde fortgeführt, indem ein Teil der Zellen in frische Kulturflaschen eingesät wurde.

Für die Durchführung der Experimente erfolgte die Aussaat in Kunststoffkulturplatten (Cellstar, Greiner Labortechnik) mit sechs zylindrischen Vertiefungen von 35 mm Durchmesser. Jede Vertiefung („Loch“) wurde mit 2 ml Medium bzw. Zellsuspension beschickt (nach [95]).

## 2.5 Vorübergehende Expression von Rho-Konstrukten in HeLa-Zellen

### 2.5.1 Transiente Transfektion von HeLa-Zellen

Nach (2.4.1) kultivierte HeLa-Zellen wurden in einer Dichte von etwa 200/mm<sup>2</sup> ( $1 \cdot 10^5$  ml<sup>-1</sup>, 2 ml/Loch) in Zellkulturplatten auf sterilen, entfetteten Deckgläschen (22 mm x 22 mm) ausgesät und 24 h unter den oben beschriebenen Bedingungen inkubiert. Zwei bis vier Stunden vor Zugabe der zu exprimierenden DNS wurde das Medium erneuert.

Um die Aufnahme von DNS durch die Zellen zu ermöglichen, wurden Kalziumphosphat-DNS-Kopräzipitate hergestellt: 4-20 µg DNS wurden in 130 µl 0,25 M CaCl<sub>2</sub> gelöst. Unter ständigem Vortexen wurden 130 µl 2x BBS (50 mM BES; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 6,95) langsam dazugetropft (um möglichst kleine Präzipitate zu erhalten) und der Ansatz 15-20 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Je Loch wurden 250 µl der Suspension zu den mit Medium bedeckten Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 16-24 h wurden die Zellen dreimal mit je 2 ml MEM gewaschen, um die nicht aufgenommenen Präzipitate zu entfernen, und mit neuem Kompletmedium versetzt. Nach weiteren 16-24 h war das Maximum der DNS-Expression erreicht und die Zellen konnten für Infektionsexperimente benutzt werden (nach [148]).

## 2.6 Infektionsexperimente mit *Shigella flexneri* SC301

### 2.6.1 Infektion von HeLa-Zellen

Für die Infektion von HeLa-Zellen wurden die Shigellen in MEM resuspendiert, wobei eine Bakteriendichte von  $6 \cdot 10^7 \text{ ml}^{-1}$  eingestellt wurde. Das Medium der HeLa-Zellen wurde gegen die Bakteriensuspension ausgetauscht. Die AFA I exprimierenden Bakterien sedimentierten innerhalb von 45 min und hefteten sich an die Zellen. Weitere Interaktionen zwischen Zellen und Shigellen während dieses Schritts wurden durch Kühlung der Kulturplatten auf Eiswasser verhindert. Die Multiplizität der Infektion betrug etwa 50 Bakterien pro Zelle. Zur Infektion flottierten die Zellkulturplatten auf 39,6°C warmem Wasser. Um eine Momentaufnahme des Invasionsprozesses zu erhalten, wurde dieser nach 20 min durch Zellfixation mit Paraformaldehyd unterbrochen (2.7.1).

## 2.7 Immunfluoreszenzmikroskopie

### 2.7.1 Behandlung der infizierten HeLa-Zellen

Nach (2.6.1) infizierte HeLa-Zellen wurden viermal mit 1x PBS gewaschen um nicht adhärenre Bakterien zu entfernen. Während 20 min wurde mit 3,7 % Paraformaldehyd in PBS (w/v) fixiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mindestens 5 min lang mit 0,1 M Glyzin in PBS inkubiert um freie Aldehydgruppen abzusättigen und damit unspezifische Bindung der Antikörper zu verringern. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch Einwirkung von 0,2% Triton X-100 (Sigma) in PBS während 5 min. Abschließend wurde erneut mit PBS gewaschen.

### 2.7.2 Antikörper und Farbstoffe

40 µl der in PBS verdünnten Antikörper- bzw. Farbstofflösung (Tab. 2-13) wurden auf ein Stück Parafilm getropft, und das Deckgläschen mit den HeLa-Zellen wurde mit der bewachsenen Seite nach unten auf den Tropfen gelegt. Die Präparate wurden mindestens 20 min in der Primäantikörperlösung inkubiert und vorsichtig gewaschen. Daran schloß sich die Färbung mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundäantikörper und weiteren Farbstoffen an (standardmäßig: Alexa-Phalloidin zur spezifischen Färbung von F-Aktin, in einzelnen Experimenten auch DAPI zur Markierung von bakterieller und zellulärer DNS). Phalloidin (Tab. 2-13), als methanolische Lösung gelagert, wurde getrocknet, bevor es in PBS aufgenommen wurde. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Präparate in Mowiol [69] eingedeckt, 10 min bei 37°C inkubiert und dann bei Dunkelheit und 4°C gelagert.

Substanz	Farbstoff	Hersteller / Referenz	Verdünnung in 1x PBS	Absorptions-max. (nm)	Emissions-max. (nm)
P5D4 anti-vsv (monoklonal, Maus-Hybridom)	-	[93]	1:200	-	-
Ziegenantikörper anti-Maus IgG	Alexa 594	Molecular Probes	1:300	580	609
Ziegenantikörper anti-Maus IgG	Texas Red	Jackson Immuno Research Labs	1:100	589, 594	623
Phalloidin	Alexa 488	Molecular Probes	1:30	495	519
DAPI	DAPI	Molecular Probes	1:100	359	461

*Tab. 2-13* Antikörper und Farbstoffe

### 2.7.3 Mikroskopie

Benutzt wurde ein konventionelles inverses Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135, ZEISS) mit einer 50W Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe (HBO 50) und einem 10x Binokular. Objektive und Filtersätze sind in Tab. 2-14 und 2-15 angegeben.

Objektiv	Vergrößerung	num. Apertur	Weitere Angaben
Plan-NEOFLUAR	100x	1,30	Ölimmersion
LD (Long Distance) – ACHROPLAN	40x	0,60	Korr Ph2

*Tab. 2-14* Mikroskopobjektive

Filtersatz	Anregungsfilter: Durchlässigkeit	Dichroischer Spiegel: Durchlässig oberhalb von	Sperrfilter: Durchlässigkeit
	Wellenlänge, nm		
I	530-585	600	615- $\infty$
II	450-490	510	515-565
III	365 $\pm$ 12	395	450-490

**Tab. 2-15** Filtersätze für Immunfluoreszenzmikroskopie

Das Mikroskop war auf einem Erschütterungen dämpfenden Tisch (Technical Manufacturing Corporation, Micro-g Modell 63-530), der mit einem Kompressor (JUN-AIR, Modell Troll) betrieben wurde, montiert.

#### 2.7.4 Mikrofotografie

Experimentelle Ergebnisse wurden mit Hilfe einer Peltier-gekühlten CCD-Kamera mit *on-chip*-Integration sowie einer Mutech *frame-grabber*-Karte dokumentiert (Photonic Science CoolView). Die Kamera war mit einem 1,0 C-mount Adapter (ZEISS) an das Mikroskop angeschlossen. Es wurden 8-bit-Schwarzweißbilder (256 mögliche Helligkeitsstufen) mit einer Auflösung von 768 x 568 Pixel erhalten.

Das 100er Objektiv war auf einen Piezomotor (Physik Instrumente, Typ P-721.10) montiert, der über einen Servo positionsgesteuert wurde (E-662.LR LVPZT Position Servo Controller, Physik Instrumente). Damit konnte das Objektiv auf der vertikalen Achse in definierte Positionen gebracht werden, was die Aufnahme einer Serie von Objektebenen mit bestimmten Abständen ermöglichte („*stack*“, „*Z-Serie*“). Standardmäßig wurden Stapel von 20 Ebenen mit je 0,4  $\mu\text{m}$  Abstand aufgenommen. Um deckungsgleiche Fotografien mit verschiedenen Wellenlängen zu machen, wurde die gleiche Serie von optischen Schnitten am selben Bildausschnitt mit unterschiedlichen Filtersätzen wiederholt.

Mit dem 40er Objektiv wurden lediglich Aufnahmen in einer Ebene gemacht, ebenfalls mit verschiedenen Filtersätzen für denselben Ausschnitt.

#### 2.7.5 Digitale Bildbearbeitung: MetaMorph, epr-Algorithmus

Die CCD-Kamera war an einen Rechner angeschlossen, der mit der Bildbearbeitungssoftware MetaMorph Imaging System 3.0 (Universal Imaging Corporation) ausgestattet war. Die Bilderstapel wurden auf quadratische Ausschnitte im Format 360 x 360 Pixel reduziert, von den mit dem 40er Objektiv fotografierten Einzelebenen wurden Ausschnitte von 342 x 342 Pixel

ausgewählt. Der Helligkeitsumfang von Bildern, die die 256 Helligkeitsstufen nicht ganz ausfüllten, wurde auf die volle Breite gespreizt. Durch diesen Schritt wurde zwar die Helligkeitsabstufung vergrößert, der Kontrast aber verstärkt. Die Schwarzweißbilder wurden entsprechend den Fluoreszenzfarbstoffen mit Falschfarben digital eingefärbt.

Die ausgewählten Ausschnitte der Serien von Bildebenen wurden mit dem von Fay et al. entwickelten (US Patent #5047968) Dekonvolutionsalgorithmus (epr, Scanalytics) bearbeitet, der auf folgendem Prinzip basiert [48]: Photonen aus einer idealisiert punktförmigen Lichtquelle werden in einem optischen System (hier: Mikroskop) nicht nur in der optimalen Brennebene sichtbar, sondern auch – unscharf – darüber und darunter. Dieses Streulicht reduziert Kontrast und Bildschärfe und kann Strukturen sogar verdecken. Für das benutzte optische System kann eine sogenannte *Point-spread*-Funktion bestimmt werden, die beschreibt, wie das von einem Punkt ausgehende Licht im benutzten optischen System außerhalb der optimalen Brennebene gestreut wird. Die Funktion wurde charakterisiert, indem von fluoreszierenden Kügelchen (entsprechend den benutzten Farbstoffen) mit einem Durchmesser von  $0,1\ \mu\text{m}$  (Molecular Probes) Z-Serien von Aufnahmen angefertigt wurden. Hierbei wurden die gleichen Parameter (Anzahl und Abstand der Ebenen) eingestellt wie bei den zu bearbeitenden Bilderstapeln. Auf einem handelsüblichen Rechner konnten dann mit der epr-Software für eine Z-Serie von Aufnahmen eines Objekts gestreute Photonen wieder ihrem Ursprungspunkt zugeordnet werden. Dabei liegt die Annahme zugrunde, daß sich alles Licht im Präparat so ausbreitet wie von der empirischen *Point-spread*-Funktion beschrieben. Das nach Korrektur der durch das optische System eingeführten Unschärfe resultierende Bild ist den „wahren“ Strukturverhältnissen näher. Es ist kontrastreicher und zeigt Strukturen, die vorher nicht sichtbar waren. Folgende Parameter wurden bei der Bearbeitung mit epr eingestellt: Konvergenz:  $2,5 \cdot 10^{-5}$ ; maximale Anzahl der Iterationen: 50; *smoothing*: 13; Skalierungsfaktor: 1,0.

Von den bearbeiteten Bildstapeln wurden einzelne Ebenen ausgewählt. Mit verschiedenen Filtersätzen aufgenommene Bilder von identischen Ebenen wurden übereinander gelegt, um die Lagebeziehung der einzelnen Bildkomponenten zu prüfen. Schließlich wurden diese Einzelebenen auf die willkürlich gewählte Standardgröße von  $342 \times 342$  Pixel gebracht.

## 3 Ergebnisbeschreibung

Um Sequenzabschnitte einzugrenzen, die das differentielle Rekrutierungsmuster von Rho-Isoformen während der Zellinvasion durch *Shigella* determinieren, wurde eine Reihe von *rho*-Hybridkonstrukten mit Hilfe PCR-vermittelter Mutagenese hergestellt, in Vektoren kloniert und im HeLa-Zell-Modell analysiert. Bei den exprimierten Hybridkonstrukten war ein kurzer Abschnitt der Aminosäuresequenz durch den entsprechenden Bereich einer anderen Isoform ersetzt. Damit konnte der Einfluß dieser Abschnitte auf das Rekrutierungsverhalten untersucht werden. Durch einen N-terminal angebrachten vsv-Peptid-*tag* wurde eine einfache Markierung mit antikörpergekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht. An den beiden Enden jedes Konstrukts und zwischen *rho*-Sequenz und vsv-*tag*-Sequenz wurden Schnittstellen für definierte Restriktionsenzyme eingefügt.

HeLa Zellen wurden mit *rho*-Konstrukt-DNS transient transfiziert und fixiert. Das exprimierte Konstrukt sowie F-Aktin wurden spezifisch angefärbt, um die Wirkung der Konstrukte auf das Aktinzytoskelett zu beobachten. In weiteren Experimenten wurden die Zellen zusätzlich mit *S. flexneri* SC301 infiziert. Nach Fixierung und Färbung wurde so eine Momentaufnahme des Invasionsprozesses erhalten. Die mutierten Rho-Proteine konnten dann hinsichtlich ihres Verteilungsmusters in der Zelle untersucht werden.

### 3.1 PCR-vermittelte gezielte Mutagenese

#### 3.1.1 PCR-Strategie für alle Konstrukte

Die Molekülregionen, die variiert werden sollten, befanden sich nahe am 5'- oder 3'-Ende der *rho*-DNS (Kodons 14, 19, sowie die letzten 4 (RhoB,D) bzw. 13 (RhoA, C) Kodons). Daher ließen sich Mutationen durch PCR mit modifizierten Oligonukleotiden vergleichsweise einfach einführen. Verwendet wurden *Pwo*-Polymerase, die Oligonukleotide aus Tab. 2-5, sowie DNS-Matrizen aus Tab. 2-6. Die Reaktionsbedingungen wurden zuvor unter Verwendung der preisgünstigeren *Taq*-Polymerase optimiert. Mit Hilfe der Oligos wurde die *rho*-Sequenz auch mit Schnittstellen für Restriktionsenzyme versehen.

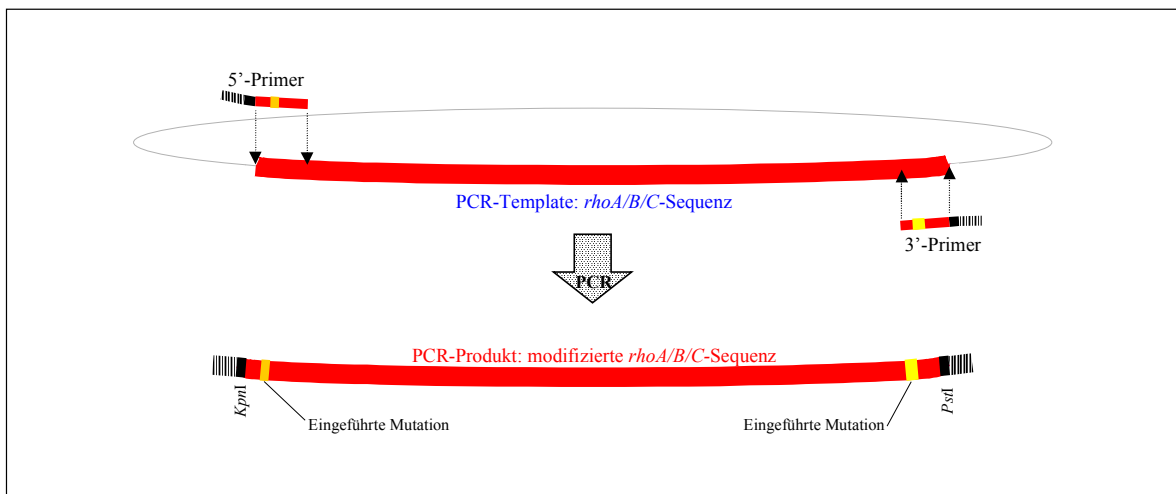
Die Matrizenplasmide wurden mit dem Miniprep-Kit aus *E. coli*-Wirtsstämmen präpariert und durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation gereinigt.

#### 3.1.2 Konstrukte auf der Basis von *rhoA*, *B* oder *C*

Benutzt wurden die Matrizen Temp1-4, sowie alle Oligos außer Nr. 65-69. Alle 5'-Primer



enthielten eine *KpnI*-Schnittstelle, alle 3'-Primer eine *PstI*-Schnittstelle. (Schema: Abb. 3-1)



**Abb. 3-1** PCR-Schema für RhoA/B/C-Konstrukte

Die PCRs zur Herstellung der einzelnen Konstrukte wurden nach Tab. 2-4 durchgeführt. Abweichungen vom Standardprotokoll sind in Tab. 3-1 aufgeführt.

Konstrukt	RhoA <sup>G14V</sup>	RhoA <sup>T19N</sup>	RhoABB	RhoBBA	RhoCCA	RhoA <sup>S188P</sup>	RhoCAC
5'-Oligo	60	61	7	5	25	7	25
3'-Oligo	6	6	64	62	63	70	79
DNS-Matrize ( <i>template</i> )	<i>rhoA</i> (Temp1)	<i>rhoA</i> (Temp1)	<i>rhoA</i> (Temp1)	<i>rhoBdel</i> (Temp2)	<i>rhoC</i> (Temp3)	<i>rhoA</i> (Temp1)	<i>rhoC</i> (Temp4)
Matrizen-DNS-Menge / pmol (gesamt)	0,36	0,36	0,36	0,54	0,36	0,18	0,18
Zahl der Ansätze	2	2	2	3	2	2	2
Zahl der Zyklen	10	13	13	13	13	13	16
Abweichungen von der Standard-Anlagerungstemperatur für Primer und DNS-Matrize (50°C)							2.-16. Zyklus: 55°C

**Tab. 3-1** PCR-Reaktionsbedingungen für RhoA/B/C-Konstrukte

### 3.1.3 Konstrukte, die auf *rhoD* basieren

Für die PCR wurden die Oligos 65-67 sowie die Matrize Temp5 verwendet. Alle 5'-Primer enthielten eine *EcoRI*-Schnittstelle, alle 3'-Primer eine *XbaI*-Schnittstelle (Schema: Abb. 3-2). Für das Konstrukt RhoD wurden lediglich Schnittstellen angefügt, die Sequenz blieb ansonsten unverändert. Reaktionsbedingungen für die RhoD-Konstrukt-PCRs sind in Tab. 2-4 und 3-2 angegeben.

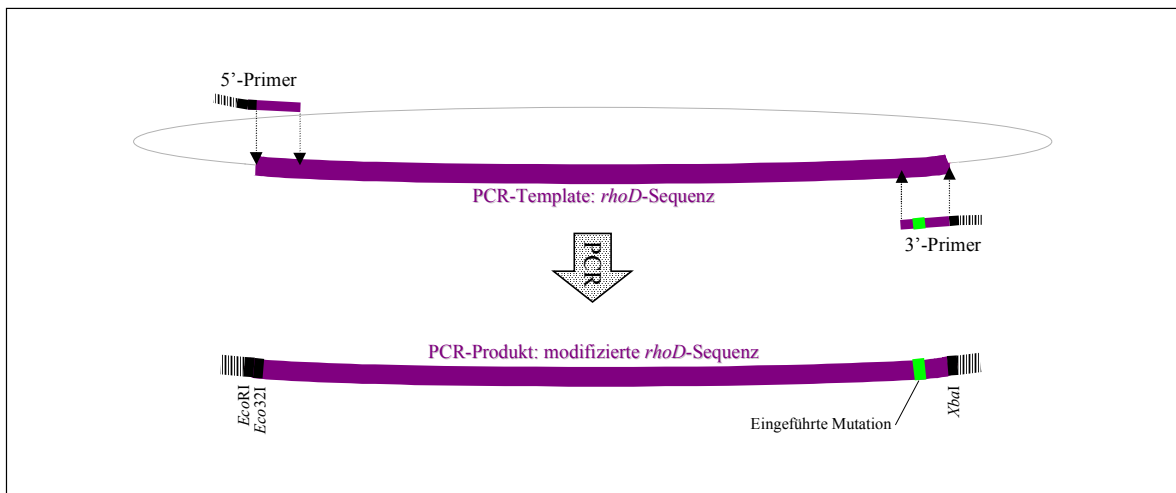


Abb. 3-2 PCR-Schema für RhoD-Konstrukte

Konstrukt	RhoD	RhoDDA
5'-Oligo	65	
3'-Oligo	66	67
DNS-Matrize ( <i>template</i> )	<i>rhoD</i> (Temp5)	
Matrizen-DNS-Menge / pmol (gesamt)	0,18	
Zahl der Ansätze	2	
Zahl der Zyklen	13	
Abweichungen von der Standard-Anlagerungstemperatur für Primer und DNS-Matrize (50°C)	40°C für Zyklen 1-3	

Tab. 3-2 PCR-Reaktionsbedingungen für RhoD-Konstrukte

## 3.2 Präparation der Klonierungsvektoren

Die durch die PCR gewonnenen, veränderten *rho*-DNS-Moleküle wurden zunächst in den Standardvektor pUC19, von dem die vollständige Sequenz bekannt ist, kloniert und sequenziert. Zur Expression in HeLa-Zellen wurden die Konstrukte dann in den eukaryotischen Expressionsvektor pKC3 umklont. Die Konstrukte wurden nicht *direkt*, d.h. ohne den Umweg über pUC19, in pKC3 kloniert, weil die bei den RhoA/B/C-Konstrukten zwischen *vsv-tag* und *rho*-Sequenz angebrachte Schnittstelle *KpnI* in pKC3 außerhalb der Klonierungsstelle noch einmal vorkommt.

### 3.2.1 pUC19 für auf *rhoA*, *B* oder *C* basierende Konstrukte

Das pUC19-Plasmid „P1“ (Tab. 2-1) mit dem Insert „*EcoRI* – *vsv* – *KpnI* – *rhoA* 1-193 – Stop – *PstI*“ wurde mit Hilfe des Miniprep-Kits präpariert. Die DNS wurde dreimal mit *KpnI*

und *PstI* geschnitten und dephosphoryliert, um eine Religation der Fragmente zu verhindern. Nach jedem dieser drei Zyklen wurde die DNS mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. So ergab sich ein für die PCR-Produkte geeigneter Klonierungsvektor, mit dem gleichzeitig N-terminal die Nukleinsäuresequenz für den vsv-Peptid-tag angefügt werden konnte. Der Vektor wird im folgenden als V1 bezeichnet (Abb. 3-3).

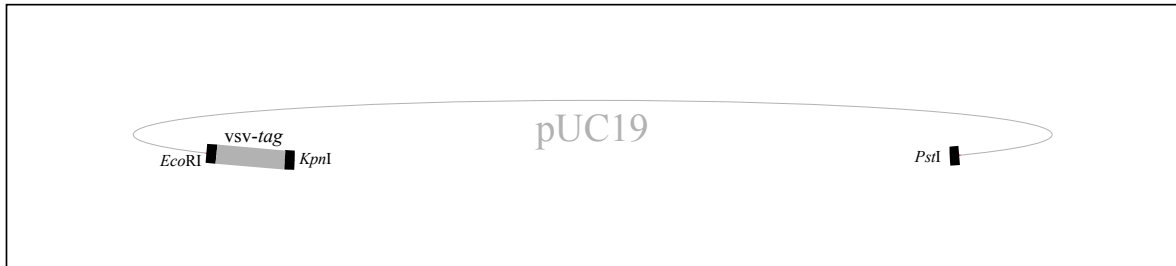


Abb. 3-3 Schema des Klonierungsvektors V1

### 3.2.2 pKC3 für auf *rhoA*, *B* oder *C* basierende Konstrukte

Das Plasmid „P2“ (Tab. 2-1) wurde zweimal mit *EcoRI* und *PstI* geschnitten, an den Enden dephosphoryliert und jeweils gereinigt. In den resultierenden offenen Vektor V2 (Abb. 3-4) konnten die kompletten Konstrukte einschließlich des vsv-tag kloniert werden.

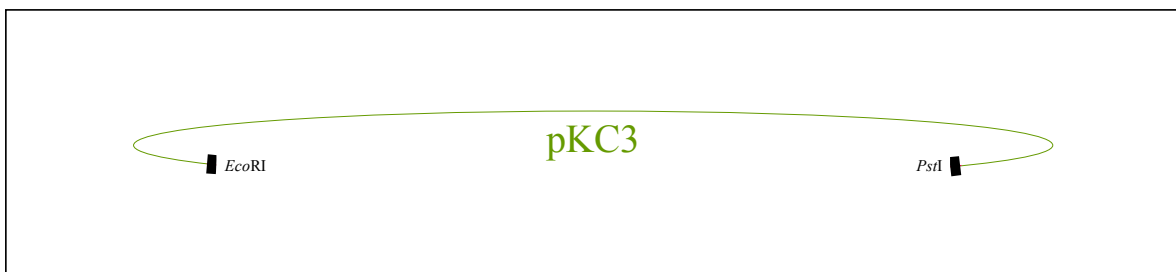


Abb. 3-4 Schema des Klonierungsvektors V2

### 3.2.3 pUC19 für auf *rhoD* basierende Konstrukte

Ein „leerer“ pUC19 Vektor (Plasmid P3, Tab. 2-1) wurde mit dem Miniprep-Kit präpariert, zweimal mit *EcoRI* und *XbaI* geschnitten und dephosphoryliert. Nach jedem Reaktionszyklus wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Es ergab sich ein für die auf *rhoD* basierenden PCR-Produkte geeigneter Klonierungsvektor, ohne vsv-Peptid-tag. Er erhielt die Bezeichnung V3 (Abb. 3-5).

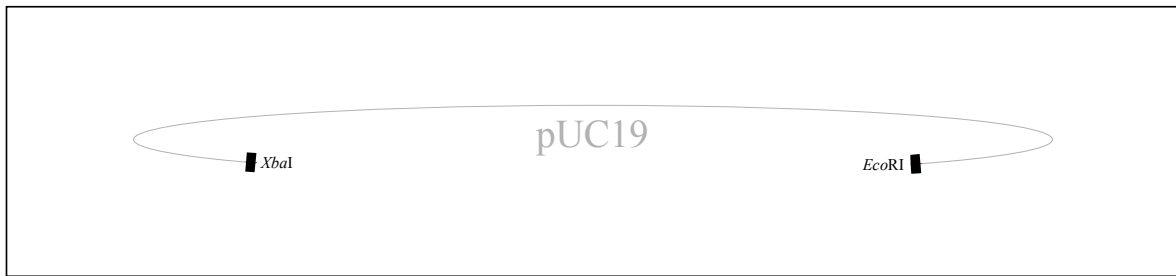
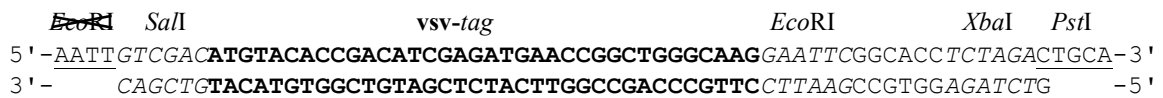


Abb. 3-5 Schema des Klonierungsvektors V3

### 3.2.4 pKC3 für auf *rhoD* basierende Konstrukte

Um die *rhoD*-Sequenzen mit dem vsv-Peptid-tag zu versehen, wurde ein pKC3-Vektor entsprechend vorbereitet: Ein pKC3-Plasmid mit dem Insert *EcoRI* – Sendai-tag – *KpnI* – *rhoB* – *XbaI* wurde mit *EcoRI* und *PstI* geschnitten. Dies ergab drei Fragmente, weil *rhoB* eine interne *PstI*-Schnittstelle enthält. Da ein nicht phosphoryliertes DNS-Molekül mit dem Vektor ligiert werden sollte, durften die Enden der Vektor-DNS nicht dephosphoryliert werden. Deshalb wurde das Vektorfragment über ein Agarosegel von den beiden kleinen Insertfragmenten isoliert, aus dem Gel extrahiert und durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation gereinigt.

Die Oligos 68 und 69 wurden zu folgendem DNS-Doppelstrang hybridisiert:



Dieses Oligo-Insert wurde mit dem präparierten pKC3-Vektor ligiert und zur Transformation von *E. coli* DH<sub>5α</sub> eingesetzt. Am 5'-Ende des Inserts war eine unvollständige, offene *EcoRI*-Schnittstelle angebracht, die eine Ligation mit dem *EcoRI*-geschnittenen Vektor zwar ermöglichte, danach aber nicht mehr von *EcoRI* erkannt werden konnte. Somit wurde die andere, im Insert nach dem vsv-tag angebrachte, *EcoRI*-Sequenz zur einzigen *EcoRI*-Schnittstelle. Zwischen die *EcoRI*- und die *XbaI*-Schnittstelle des pKC3-Plasmids konnten nun die modifizierten *rhoD*-Sequenzen kloniert werden. Das Plasmid wurde zweimal mit *EcoRI* und *XbaI* geschnitten und an den Enden dephosphoryliert. Es erhielt die Bezeichnung V4 (Abb. 3-6).

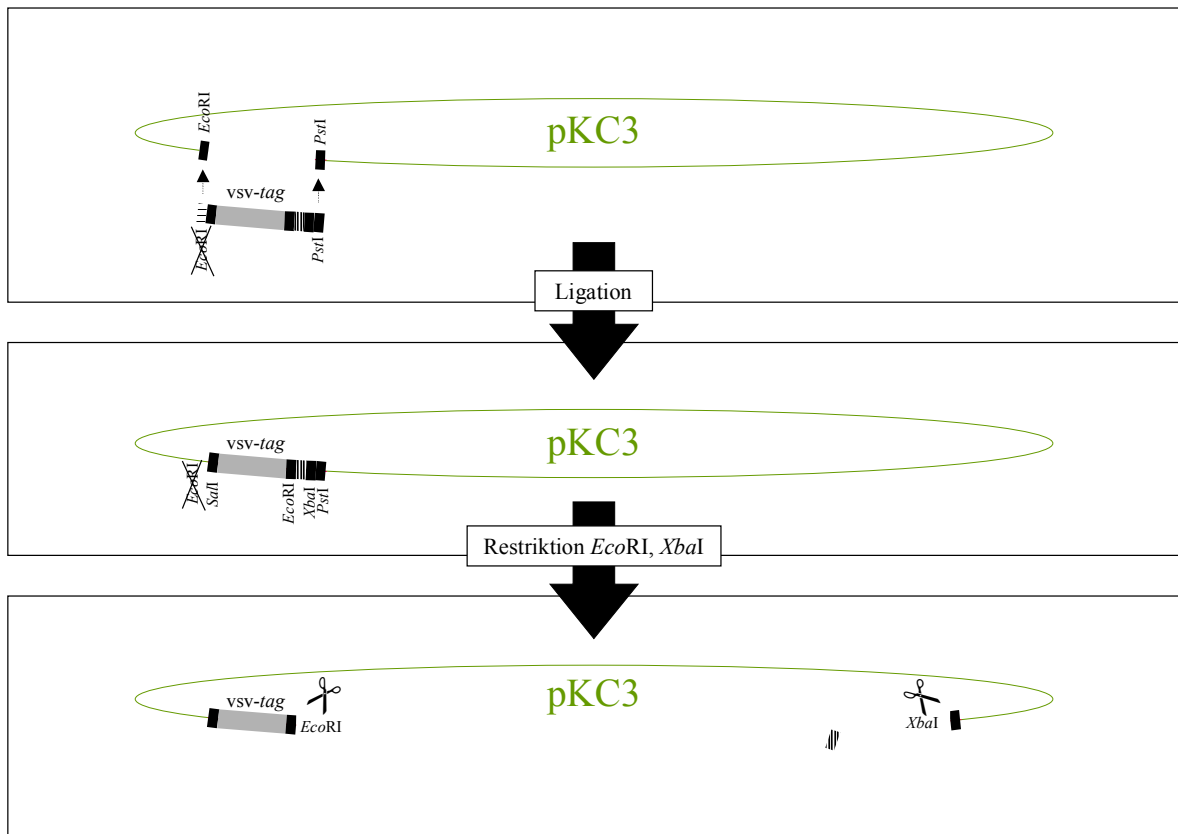


Abb. 3-6 Schema des Klonierungsvektors V4

### 3.2.5 Übersichtstabelle über die Klonierungsvektoren

Bez.	Vektortyp	Ursprungsplasmid (vgl. Tab. 2-1)	Geöffnete Klonierungsstelle	Dephosphorylierte Enden
V1	pUC19	P1	— <i>EcoRI</i> – vsv – <i>KpnI</i>	<i>PstI</i> — ja
V2	pKC3	P2	— <i>EcoRI</i>	<i>PstI</i> — ja
V3	pUC19	P3	— <i>EcoRI</i>	<i>XbaI</i> — ja
V4	pKC3	P4	— <i>SaI</i> I – vsv – <i>EcoRI</i>	<i>XbaI</i> — nein

Tab. 3-3 Übersichtstabelle über die Klonierungsvektoren

## 3.3 Klonieren und Sequenzieren der auf *rhoA*, *B* oder *C* basierenden DNS-Konstrukte

### 3.3.1 Isolierung der PCR-Produkte

Um die DNS aus dem PCR-Ansatz in möglichst reiner Form zu erhalten, wurde zunächst eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolpräzipitation durchgeführt. Darauf wurden die PCR-Produkte von den Matrizenplasmiden elektrophoretisch getrennt. Um eine gleichmäßige Wanderungsgeschwindigkeit der Plasmide zu erreichen, wurden sie zuvor mit *PstI*

geschnitten und damit linearisiert. Dadurch wurde gleichzeitig je ein Ende der PCR-Produkte für die Klonierung präpariert. Die Banden mit den PCR-Produkten wurden aus dem Gel ausgeschnitten, und die DNS wurde extrahiert. Durch Schneiden der DNS mit *KpnI* wurde auch das jeweils andere Ende der PCR-Produkte zum Klonieren in den pUC19-Vektor (V1) vorbereitet.

### 3.3.2 Klonieren der PCR-Produkte in pUC19

Die PCR-Produkte wurden mit dem offenen Vektor V1 ligiert (Abb. 3-7), und die resultierenden Plasmide wurden zur Transformation von kompetenten *E. coli* DH<sub>5</sub> $\alpha$  eingesetzt. Die transformierten Stämme wurden asserviert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

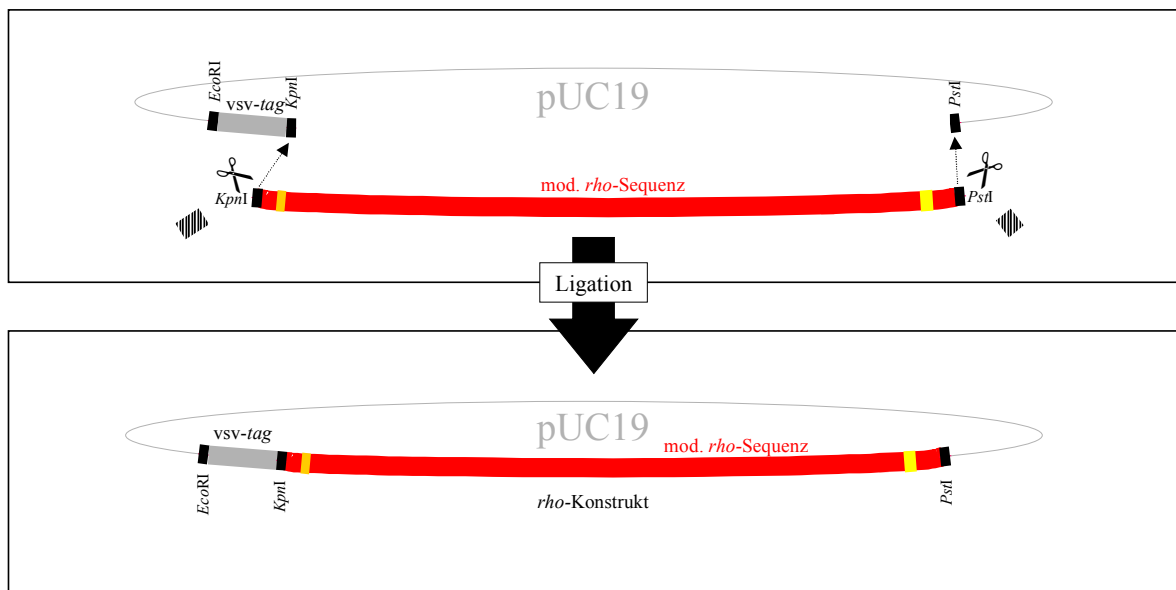


Abb. 3-7 Klonieren der *rhoA/B/C*-PCR-Produkte in pUC19

### 3.3.3 Sequenzierung

Um die PCR-Produkte auf eventuelle Replikationsfehler zu überprüfen, wurden die in pUC19 klonierten DNS-Konstrukte einschließlich des *vsv-tag* sequenziert und mit den ursprünglichen *rho*-Sequenzen sowie den verwendeten Primern verglichen. Alle Konstrukte waren fehlerfrei.

### 3.3.4 Umklonieren der Konstrukte in pKC3

Um die kompletten *vsv-Rho*-Konstrukte in HeLa-Zellen exprimieren zu können, wurde die DNS in den eukaryotischen Expressionsvektor pKC3 umkloniert. Die pUC19-Plasmide mit den *rho*-Sequenzen wurden aus dem transformierten Wirtstamm *E. coli* DH<sub>5</sub> $\alpha$  präpariert und mit *EcoRI* und *PstI* geschnitten. Die Inserts wurden vom pUC19-Vektor elektrophoretisch getrennt, mit Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation gereinigt und mit dem offenen pKC3-Vektor V2 ligiert (Abb. 3-8). Mit den kompletten Plasmiden wurden kompetente *E. coli*

DH<sub>5</sub> $\alpha$  transformiert. Die transformierten Stämme wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

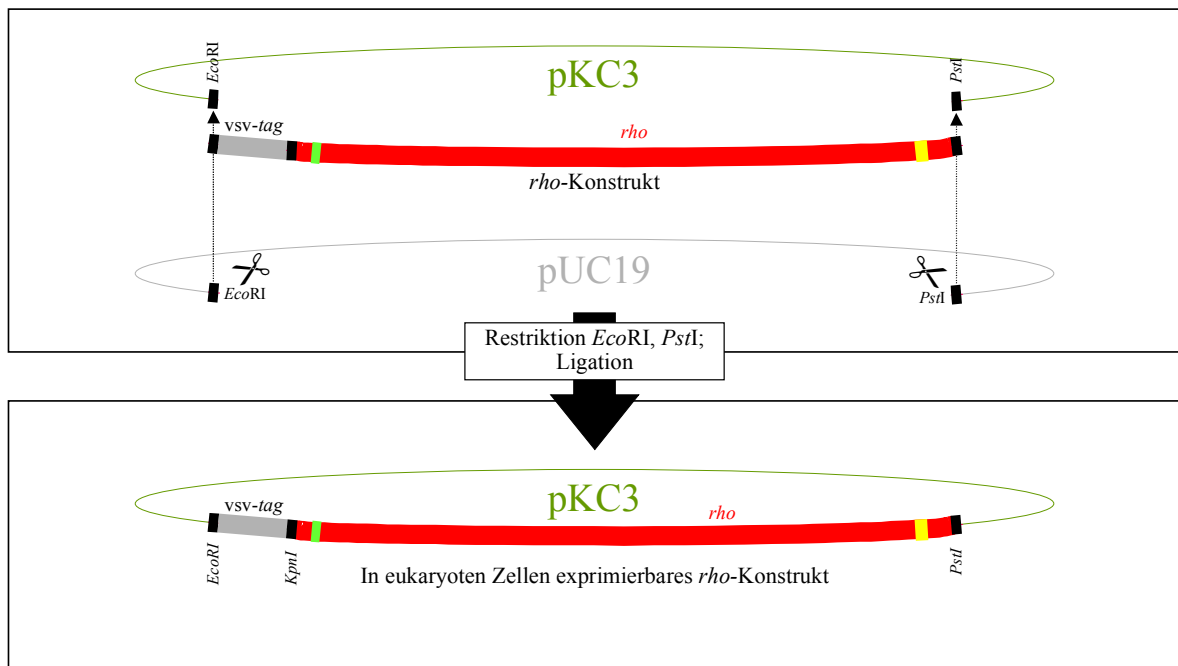


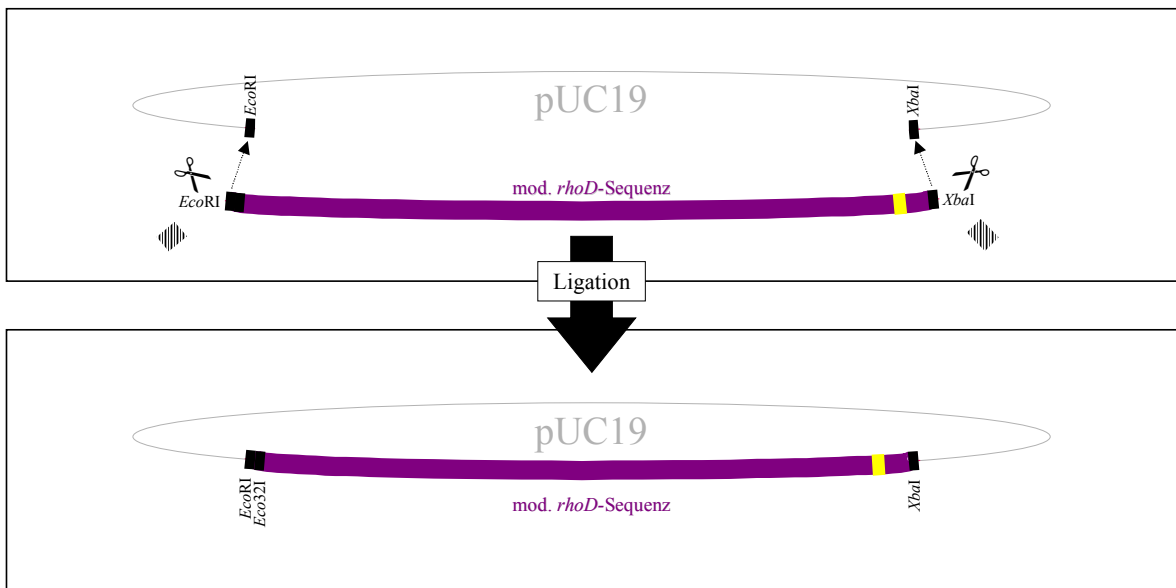
Abb. 3-8 Klonieren der kompletten vsv-*rhoA/B/C*-DNS-Konstrukte in pKC3

### 3.4 Klonieren und Sequenzieren der auf *rhoD* basierenden Konstrukte

Es wurde analog zu Abschnitt 3.3 verfahren. Im folgenden wird daher nur auf Besonderheiten eingegangen.

#### 3.4.1 Klonieren der PCR-Produkte in pUC19

Die mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XbaI* geschnittenen PCR-Produkte wurden mit dem offenen Vektor V3 ligiert; die resultierenden Plasmide (Abb. 3-9) wurden zur Transformation von kompetenten *E. coli* ZK501 eingesetzt. Die Verwendung dieses Stamms erwies sich als notwendig, da sich auf dem nichtkodierenden Strang der *rhoD*-Konstrukte am Übergang zur *XbaI*-Schnittstelle die Dam-sensitive Sequenz 5'-GATC-3' ergab. Die Dam-Methylase erkennt dieses Sequenzmotiv spezifisch und modifiziert die DNS an dieser Stelle durch Methylierung von Adenin [57, 148]. In *dam*-positiven Stämmen wie DH<sub>5</sub> $\alpha$  wird dadurch die *XbaI*-Erkennungssequenz TCTAGA für das Restriktionsenzym unkenntlich, und das Molekül kann an dieser Stelle nicht geschnitten werden. ZK501 ist dagegen *dam*-negativ. Die transformierten Stämme wurden asserviert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.



**Abb. 3-9** Klonieren der *rhoD*-PCR-Produkte in pUC19

### 3.4.2 Abweichung der DNS-Sequenz von *rhoD* gegenüber der publizierten Sequenz

Die in pUC19 klonierten auf *rhoD* basierenden DNS-Konstrukte wurden ebenfalls zur Kontrolle sequenziert. Kodon 27 von *rhoD* wich von der publizierten Sequenz [126] in einer Base ab. Die publizierte Sequenz ist „GGG“ (Glyzin), während die in dieser Studie gefundene Sequenz „GTG“ (Valin) lautet. Dieser Unterschied zeigte sich beim Sequenzieren in beiden Richtungen und bei beiden RhoD-Konstrukten (RhoD und RhoDDA).

### 3.4.3 Umklonieren der Konstrukte in pKC3

Die pUC19-Plasmide mit den von *rhoD* abgeleiteten Konstrukten wurden präpariert und mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XbaI* geschnitten. Die Inserts wurden vom pUC19-Vektor elektrophoretisch getrennt, gereinigt und mit dem offenen Vektor ligiert. Somit wurden vollständige Konstrukte mit *vsv-tag* erhalten, die in HeLa-Zellen exprimiert werden konnten (Abb. 3-10).

Mit den kompletten Plasmiden wurden kompetente *E. coli* DH<sub>5</sub> $\alpha$  transformiert. Dam-Methylierung spielte jetzt keine Rolle mehr, da das DNS-Molekül nicht mehr geschnitten werden mußte. Die transformierten Stämme wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.



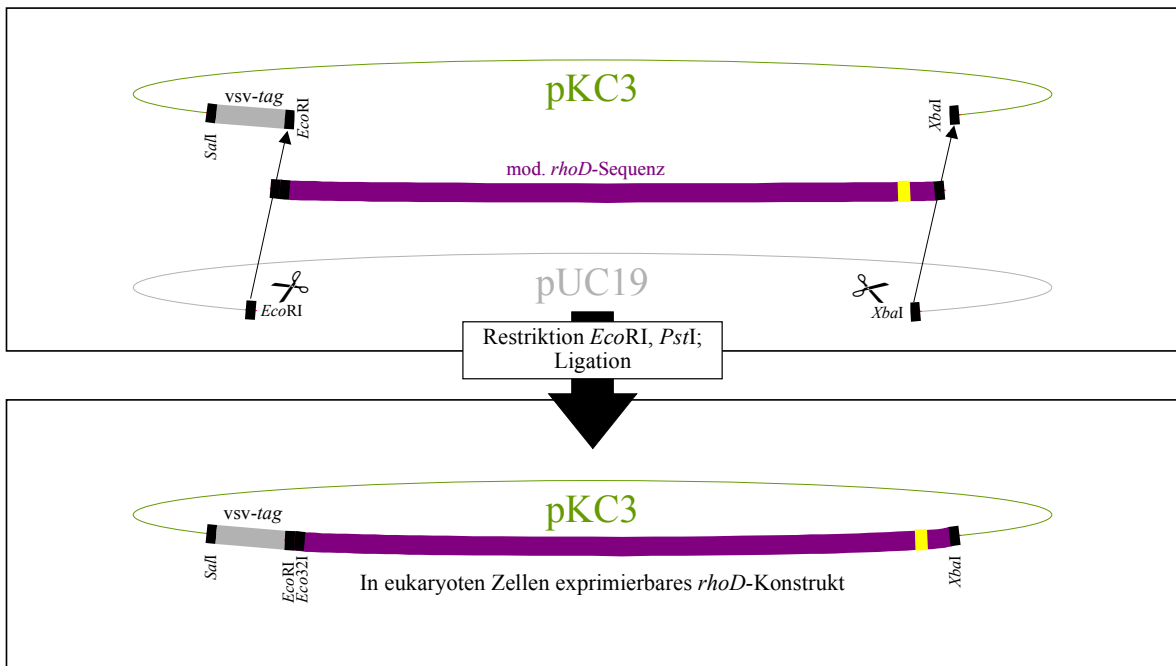


Abb. 3-10 Klonieren der *rhoD*-PCR-Produkte in pKC3 mit *vsv-tag*

### 3.5 Übersicht über die hergestellten Konstrukte

Name des Konstrukts	Länge ohne <i>vsv-tag</i>		As von RhoA	As von RhoB	As von RhoC	As von RhoD	CaaX-Gruppe von
	bp	As					
RhoD	633	210				1-210	RhoD
RhoA <sup>G14V</sup>	582	193	1-13, 15-193				RhoA
RhoA <sup>T19N</sup>	582	193	1-18, 20-193				RhoA
RhoAAB	582	193	1-189	193-196			RhoB
RhoBBA	591	196	190-193	1-193			RhoA
RhoCCA	582	193	190-193		1-189		RhoA
RhoDDA	633	210	190-193			1-206	RhoA
RhoA <sup>S188P</sup>	582	193	1-187, 189-193				RhoA
RhoCAC	582	193	181-188		1-180, 189-193		RhoC

Tab. 3-4 Im Rahmen der vorliegenden Studie hergestellte Konstrukte

### 3.6 Übersichtstabelle über die transformierten *E. coli*-Stämme

Konstrukt	Beschreibung des Inserts	Vektor	Wirtstamm ( <i>E. coli</i> )	Stamm Nr.
(Klonierungsvektor für <i>vsv-rhoD</i> / <i>DDA</i> )	<i>Sall</i> – <i>vsv-tag</i> – <i>EcoRI</i> – <i>XbaI</i> – <i>PstI</i>	pKC3	DH <sub>5α</sub>	S 333
RhoD	<i>EcoRI</i> – <i>Eco32I</i> – <i>rhoD</i> – stop – <i>XbaI</i>	pUC19	DH <sub>5α</sub>	S 321
			ZK 501	S 356
vsv-RhoD	[Vektor von S333 + <i>rhoD</i> von S356] <i>Sall</i> – <i>vsv</i> – <i>EcoRI</i> – <i>Eco32I</i> – <i>rhoD</i> – stop – <i>XbaI</i>	pKC3	DH <sub>5α</sub>	S 334
vsv-RhoA <sup>G14V</sup>	<i>EcoRI</i> – <i>vsv</i> – <i>KpnI</i> – <i>rhoA</i> <sup>G14V</sup> – stop – <i>PstI</i>	pUC19	DH <sub>5α</sub>	S 313
		pKC3	DH <sub>5α</sub>	S 326
vsv-RhoA <sup>T19N</sup>	<i>EcoRI</i> – <i>vsv</i> – <i>KpnI</i> – <i>rhoA</i> <sup>T19N</sup> – stop – <i>PstI</i>	pUC19	DH <sub>5α</sub>	S 312
		pKC3	DH <sub>5α</sub>	S 327
vsv-RhoAAB	<i>EcoRI</i> – <i>vsv</i> – <i>KpnI</i> – <i>rhoAAB</i> – stop – <i>PstI</i>	pUC19	DH <sub>5α</sub>	S 309
		pKC3	DH <sub>5α</sub>	S 323
vsv-RhoBBA	<i>EcoRI</i> – <i>vsv</i> – <i>KpnI</i> – <i>rhoBBA</i> – stop – <i>PstI</i> Kodon 180 von <i>rhoB</i> : CAG => CAA, um <i>PstI</i> -Schnittstelle zu eliminieren (vgl. Temp2)	pUC19	DH <sub>5α</sub>	S 310
		pKC3	DH <sub>5α</sub>	S 324
vsv-RhoCCA	<i>EcoRI</i> – <i>vsv</i> – <i>KpnI</i> – „CAT“ – <i>rhoCCA</i> – stop – <i>PstI</i>	pUC19	DH <sub>5α</sub>	S 311
		pKC3	DH <sub>5α</sub>	S 325
RhoDDA	<i>EcoRI</i> – <i>Eco32I</i> – <i>rhoDDA</i> – stop – <i>XbaI</i>	pUC19	DH <sub>5α</sub>	S 322
			ZK 501	S 357
vsv-RhoDDA	[Vektor von S333 + <i>rhoDDA</i> von S357] <i>Sall</i> – <i>vsv</i> – <i>EcoRI</i> – <i>Eco32I</i> – <i>rhoDDA</i> – stop – <i>XbaI</i>	pKC3	DH <sub>5α</sub>	S 335
vsv-RhoA <sup>S188P</sup>	<i>EcoRI</i> – <i>vsv</i> – <i>KpnI</i> – <i>rhoA</i> <sup>S188P</sup> – stop – <i>PstI</i>	pUC19	DH <sub>5α</sub>	S 337
		pKC3	DH <sub>5α</sub>	S 336
vsv-RhoCAC	<i>EcoRI</i> – <i>vsv</i> – <i>KpnI</i> – „CAT“ – <i>rhoCAC</i> – stop – <i>PstI</i>	pUC19	DH <sub>5α</sub>	S 353
		pKC3	DH <sub>5α</sub>	S 354

Tab. 3-5 Im Rahmen der vorliegenden Studie transformierte und asservierte Stämme von *E. coli*

### 3.7 Expression der Konstrukte in HeLa-Zellen

Die pKC3-Plasmide mit den klonierten *rho*-Konstrukten wurden mit dem Maxiprep-Kit präpariert, um für die Transfektionsexperimente ausreichende Mengen an DNS zur Verfügung zu haben. Die so erhaltene DNS wurde zusätzlich durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation gereinigt. Verwendet wurden sowohl die in Tab. 3-4 aufgeführten Kon

strukturen als auch die im Labor bereits vorhandenen Konstrukte aus Tab. 2-12. Alle analysierten *rho*-DNS-Konstrukte ließen sich mit der oben beschriebenen Transfektionsmethode in HeLa-Zellen einführen und wurden von den Zellen exprimiert. Wurden die exprimierten Proteine, wie beschrieben, mit einem vsv-Antikörper und einem farbstoffkonjugierten Sekundärantikörper markiert, erschienen große Teile des Zytoplasmas transfizierter Zellen intensiv gefärbt.

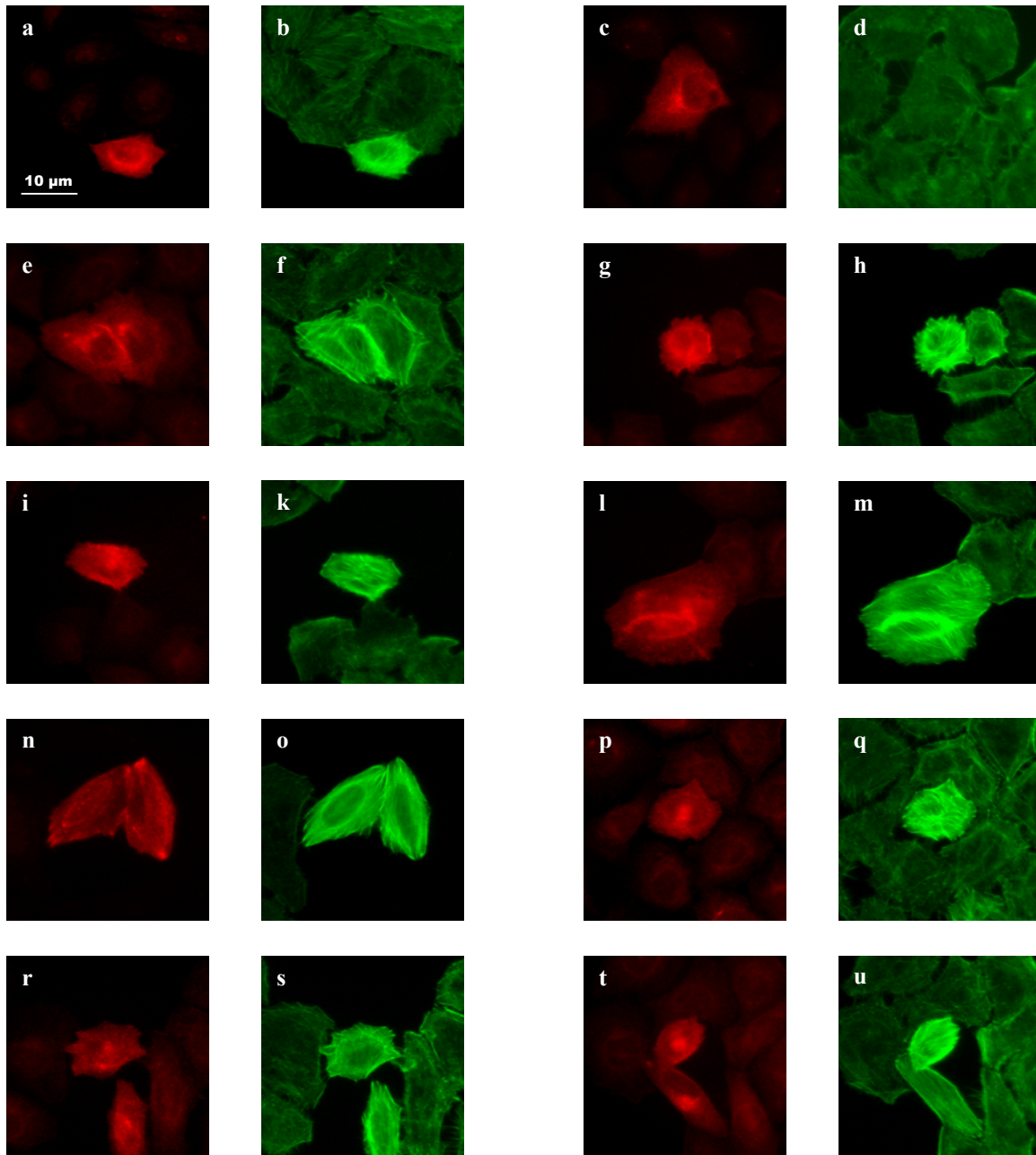
Innerhalb eines Experiments wurden die Zellen in den verschiedenen Löchern der Kulturplatten immer mit unterschiedlichen Konstrukten transfiziert, um die Möglichkeit des unmittelbaren Vergleichs zu haben. Grundsätzlich wurden Kontrollzellen mit *rhoA* einerseits und *rhoB* oder *rhoC* andererseits transfiziert. Außerdem dienten nicht transfizierte Zellen als Kontrollen für die Spezifität der verwendeten Antikörper.

### **3.8 Zytoskelettdarstellung von nichtinfizierten, aber mit mutierten *rho*-Konstrukten transfizierten HeLa-Zellen**

Da gleichzeitig mit den mutierten Rho-Proteinen auch F-Aktin fluoreszenzmarkiert wurde, konnten benachbarte transfizierte und nichttransfizierte Zellen hinsichtlich ihres Aktinzytoskeletts verglichen werden. Paare von Fotografien in einer einzigen Ebene, die denselben Bildausschnitt zeigen, wurden mit dem 40er-Objektiv und der CCD-Kamera mit den Filtersätzen I und II (Tab. 2-15) aufgenommen. Der epr-Algorithmus fand hier keine Anwendung. Für alle gezeigten Bilder gilt: Rho-Proteine sind rot, F-Aktin ist grün eingefärbt.

#### **3.8.1 Auf *rhoA*, *B* oder *C* basierende Konstrukte**

Zellen, die mit auf *rhoA*, *B* oder *C* basierenden Konstrukten transfiziert waren, zeigten im Vergleich zu nicht transfizierten Kontrollzellen deutlich verändertes Aktinzytoskelett (Abb. 3-11 a-u). Die Menge an F-Aktin war vermehrt. Ein dichtes Netz von Streßfaserbündeln war sichtbar, das über das gesamte Zytoplasma verteilt war, während der Zellkern typischerweise als Aussparung in diesem Fasernetz erschien. Die beiden bereits bekannten Rho-Mutanten  $\text{RhoA}^{\text{G14V}}$  (Abb. 3-11 a,b) und  $\text{RhoA}^{\text{T19N}}$  (Abb. 3-11 c,d) dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle: Zellen, die das konstitutiv aktive  $\text{RhoA}^{\text{G14V}}$  exprimierten, zeigten im Vergleich zu nichttransfizierten Zellen sehr dichtes Netz von Streßfilamenten. Zellen, die das konstitutiv inaktive  $\text{RhoA}^{\text{T19N}}$  enthielten, konnten dagegen weder morphologisch, noch aufgrund ihres Gehalts an F-Aktin von nichttransfizierten Nachbarzellen unterschieden werden.

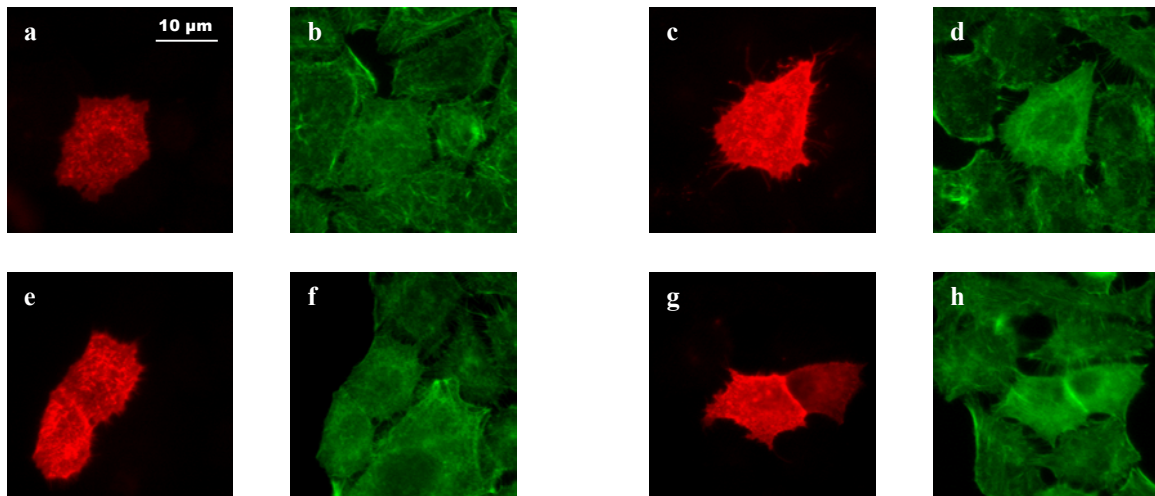


**Abb. 3-11** Expression der auf *rhoA*, *B* oder *C* basierenden Konstrukte in HeLa-Zellen. Für alle Bildpaare gilt: Rho-Proteine sind rot, F-Aktin ist grün angefärbt. Nach Transfektion mit entsprechenden Konstrukten exprimierten die Zellen folgende mutierte Rho-Proteine: RhoA<sup>G14V</sup> (a,b – Positivkontrolle), RhoA<sup>T19N</sup> (c,d – Negativkontrolle), RhoA<sup>AAB</sup> (e,f), RhoA<sup>BBA</sup> (g,h), RhoA<sup>CCA</sup> (i,k), RhoA<sup>ACA</sup> (l,m), RhoA<sup>CAC</sup> (n,o), RhoA<sup>S188P</sup> (p,q), RhoA<sup>R183K</sup> (r,s) und RhoA<sup>KK186-187RR</sup> (t,u). Vgl. Tab. 2-12 und 3-4.

### 3.8.2 Auf *rhoD* basierende Konstrukte

Die beiden auf *rhoD* basierenden Konstrukte RhoD und RhoDDA unterschieden sich in ihrer Wirkung auf das HeLa-Zytoskelett von den anderen Rho-Isoformen. Transfizierte Zellen konnten aufgrund der Morphologie ihres Zellgerüsts entweder nicht sicher von Kontrollzellen abgegrenzt werden (Abb. 3-12 a,b; e,f), oder sie zeigten eher dezente Veränderungen: F-Aktin

war in manchen Zellen, die RhoD-Konstrukte überexprimierten, leicht vermehrt, erschien aber mehr diffus verteilt und war nur vereinzelt in Form von Streißfilamenten organisiert (Abb. 3-12 c,d; g,h). Zwischen RhoD und RhoDDA konnte hier kein Unterschied festgestellt werden.



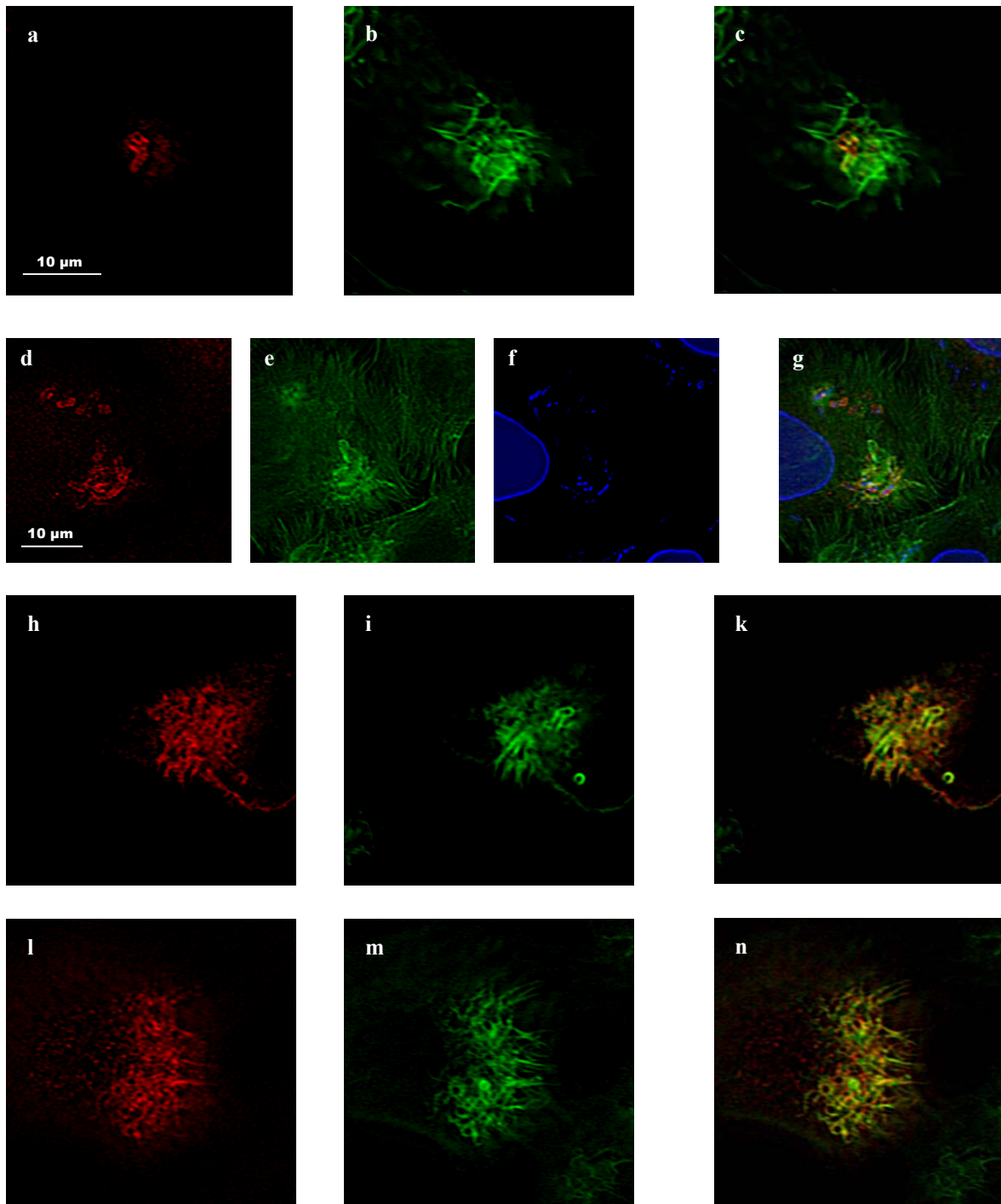
**Abb. 3-12** Expression der auf *rhoD* basierenden Konstrukte in HeLa-Zellen. Für alle Bildpaare gilt: Rho-Proteine sind rot, F-Aktin ist grün eingefärbt. Die Zellen exprimierten nach Transfektion RhoD (a,b; c,d) und RhoDDA (e,f; g,h). Vgl. Tab. 3-4.

### 3.9 Rekrutierungsverhalten der mutierten Rho-Proteine während der HeLa-Zellinvasion durch *Shigella flexneri* SC301

Mit *rho*-Konstrukten transfizierte HeLa-Zellen wurden mit *S. flexneri* SC301 infiziert (vgl. 2.6.1). Die mit dem *vsv-tag* versehenen Rho-Proteine und F-Aktin wurden wie beschrieben (2.7) angefärbt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal reproduziert.

Die Bakterieneintrittsstellen an transfizierten Zellen wurden am Mikroskop mit dem 100er-Objektiv betrachtet und mit der CCD-Kamera fotografiert. Jeder Bildausschnitt (*eine* Ebene eines Bilderstapels) wird hier in drei verschiedenen Ansichten gezeigt: Die einfarbigen Bilder zeigen entweder das Verteilungsmuster des jeweiligen mutierten Rho-Proteins (rot) oder die Architektur des F-Aktin-Zytoskeletts (grün). In der dritten Ansicht sind die beiden monochromen Bilder übereinander projiziert, um die Lagebeziehung der einzelnen Bildkomponenten darzustellen.

### 3.9.1 Kontrollen: RhoA, RhoB und RhoC



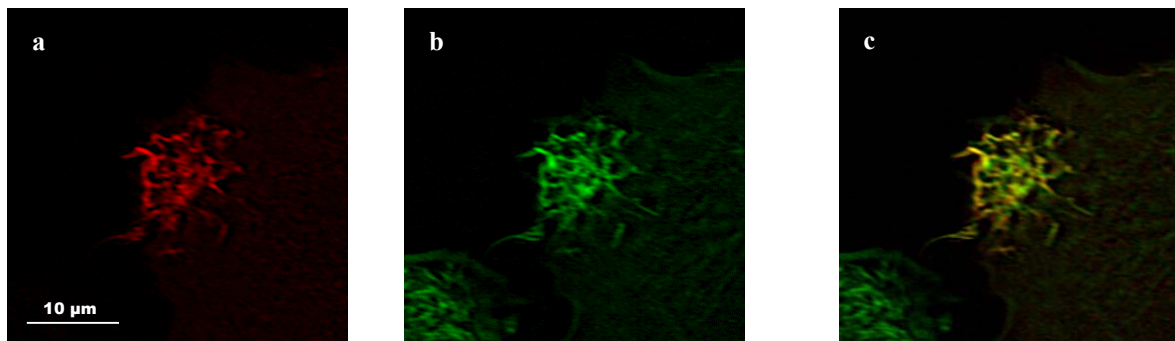
**Abb. 3-13** Rekrutierungsverhalten von RhoA (a-c; d-g), RhoB (h-k) und RhoC (l-n). Rot: Rho. Grün: F-Aktin. Blau (f,g): DNS (Zellkern und Bakterien). Abb. (c), (g), (k) und (n) setzen sich aus den monochromen Bildern der jeweiligen Zeile zusammen.

Das Rekrutierungsverhalten von RhoA (Abb. 3-13 a-g), RhoB (Abb. 3-13 h-k) und RhoC (Abb. 3-13 l-n) war bereits bekannt [3] und diente als Ausgangspunkt für die vorliegende Studie. Um einen Vergleichsmaßstab für die Rekrutierungsmuster der einzelnen hier untersuchten

Mutanten zu haben, mußte das Verhalten der drei Isoformen mit der neuen, hier benutzten Technik jedoch nochmals dokumentiert werden. Die beobachteten Rekrutierungsmuster bestätigten die publizierten Ergebnisse: RhoA akkumulierte hauptsächlich in unmittelbarer Nähe der eindringenden Bakterien, während RhoB und RhoC im wesentlichen in die Spitzen der F-Aktinreichen, bakteriell induzierten, zellulären Protrusionen rekrutiert wurden. Das RhoA-Präparat in Abb. 3-13 d-g wurde zusätzlich mit DAPI gefärbt, wodurch sowohl der Zellkern als auch die Bakterien markiert wurden. Hier wird die für RhoA typische Akkumulation um die Bakterien herum besonders deutlich.

### 3.9.2 RhoD

Bei RhoD galt das Interesse vornehmlich der Frage, ob sich auch hier ein bakterieninduziertes Rekrutierungsphänomen beobachten läßt und welches Muster dabei gegebenenfalls auftritt. Da RhoD auf der Primärstrukturebene mit RhoA, B und C deutlich geringere Homologie aufweist als die drei Isoformen untereinander, war es im voraus kaum möglich, über den Ausgang dieses Experiments zu spekulieren. Es zeigte sich, daß das mit dem *vsv-tag* versehene RhoD, ähnlich wie RhoB und RhoC, hauptsächlich in die von *Shigella* induzierten aktinreichen zellulären Protrusionen rekrutiert wird (Abb. 3-14).



**Abb. 3-14** Rekrutierungsverhalten von RhoD (a-c). Rot: Rho. Grün: F-Aktin. Abb. (c) setzt sich aus (a) und (b) zusammen.

### 3.9.3 RhoA<sup>T19N</sup> und RhoA<sup>G14V</sup>

Um die mögliche Auswirkung von Mutationen, die die Funktion von RhoA alterieren, auf das Rekrutierungsverhalten zu untersuchen, wurden die beiden Konstrukte RhoA<sup>T19N</sup> (Abb. 3-15 a, 3-16 a-c) und RhoA<sup>G14V</sup> (Abb. 3-15 b, 3-16 d-f) hergestellt und im HeLa-Zell-Modell analysiert. Beide Proteine, die die konstitutiv inaktive Mutation Thr19Asn [99] bzw. die konstitutiv aktive Mutation Gly14Val [56] tragen, wurden während der Zellinvasion durch *Shigella* rekrutiert. Die subzelluläre Verteilung beider Moleküle ließ sich dabei nicht vom klassischen RhoA-Vertei

lungsmuster unterscheiden.

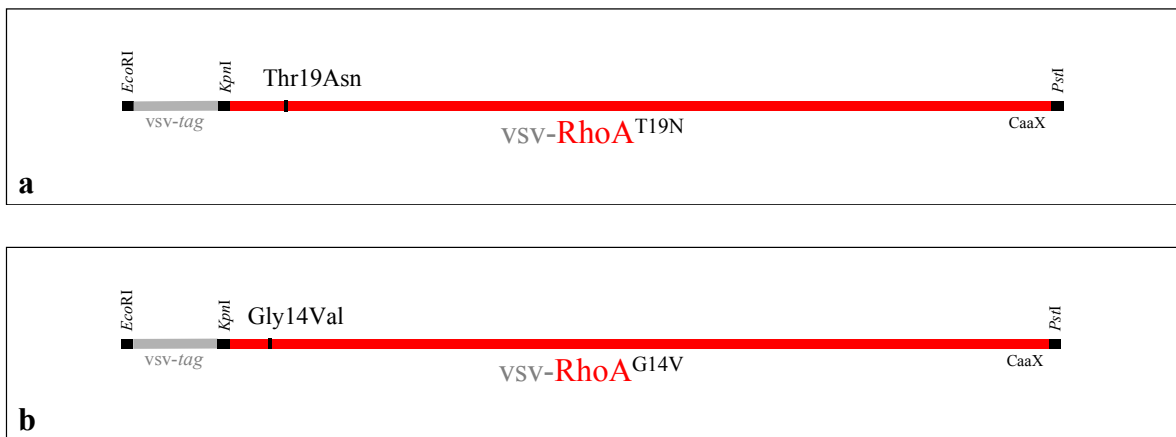


Abb. 3-15 Schematische Darstellung der Konstrukte RhoA<sup>T19N</sup> (a) und RhoA<sup>G14V</sup> (b).

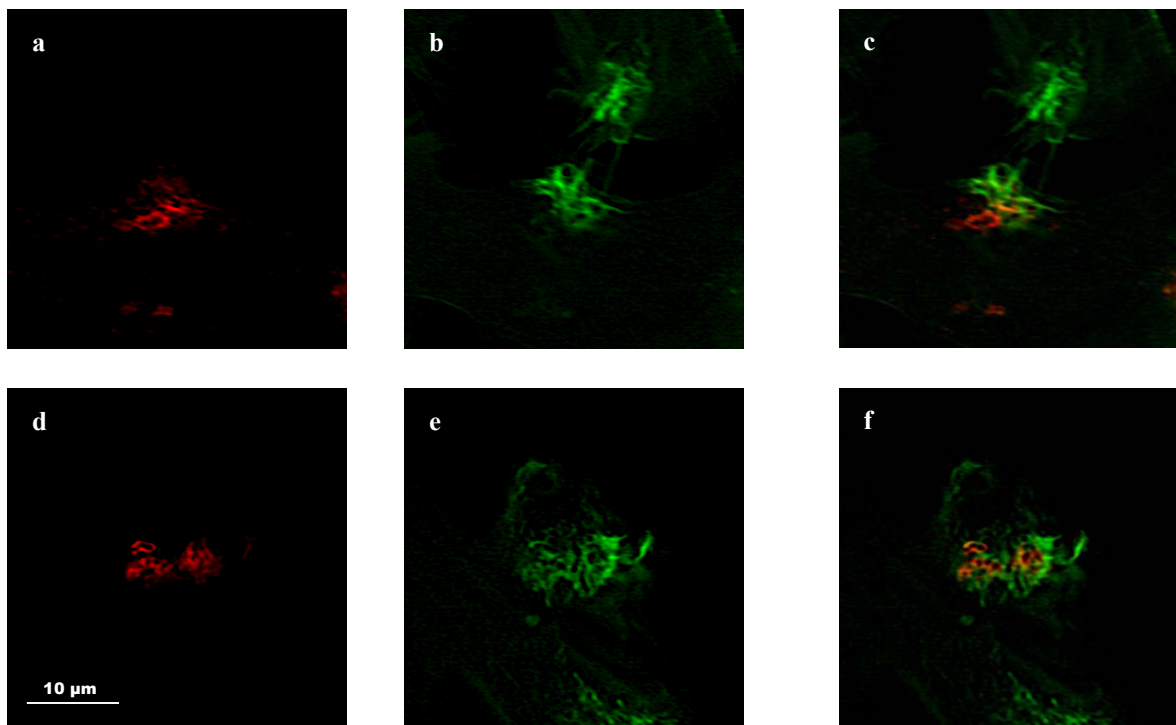


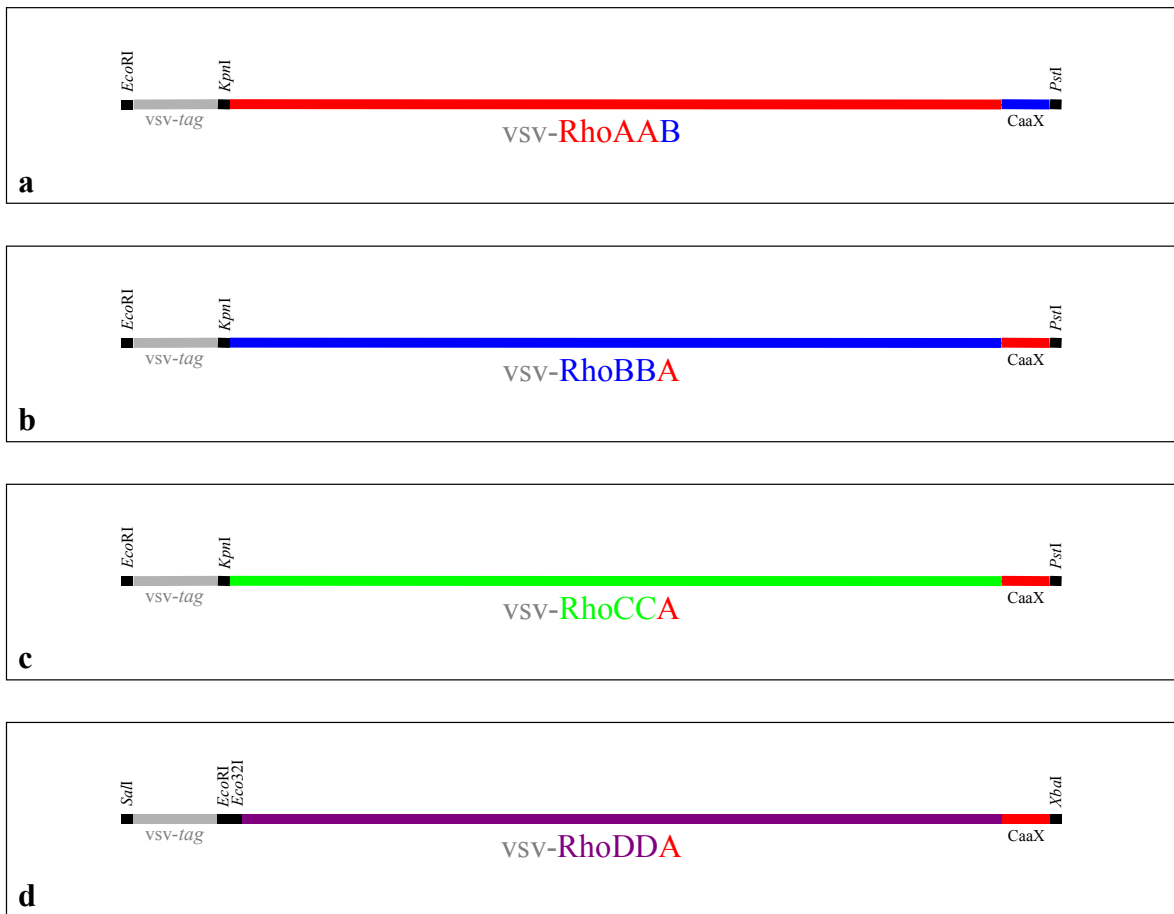
Abb. 3-16 Rekrutierungsverhalten von RhoA<sup>T19N</sup> (a-c) und RhoA<sup>G14V</sup> (d-f). Rot: Rho. Grün: F-Aktin. Abb. (c) und (f) setzen sich aus den monochromen Bildern der jeweiligen Zeile zusammen.

### 3.9.4 RhoAAB, RhoBBA, RhoCCA und RhoDDA

Birgit Bohm, ebenfalls Doktorandin im Labor, hatte bereits vor Beginn dieser Studie klar zeigen können, daß die CaaX-Region für die Rekrutierung eine wesentliche Rolle spielt: Deletionsmutanten von RhoA, B und C, denen die letzten vier Aminosäuren fehlten, verloren die Fähigkeit, während der Shigelleninvasion rekrutiert zu werden und blieben diffus im Zytoplasma verteilt. Das Vorhandensein der CaaX-Region ist also eine notwendige Bedingung dafür, daß das

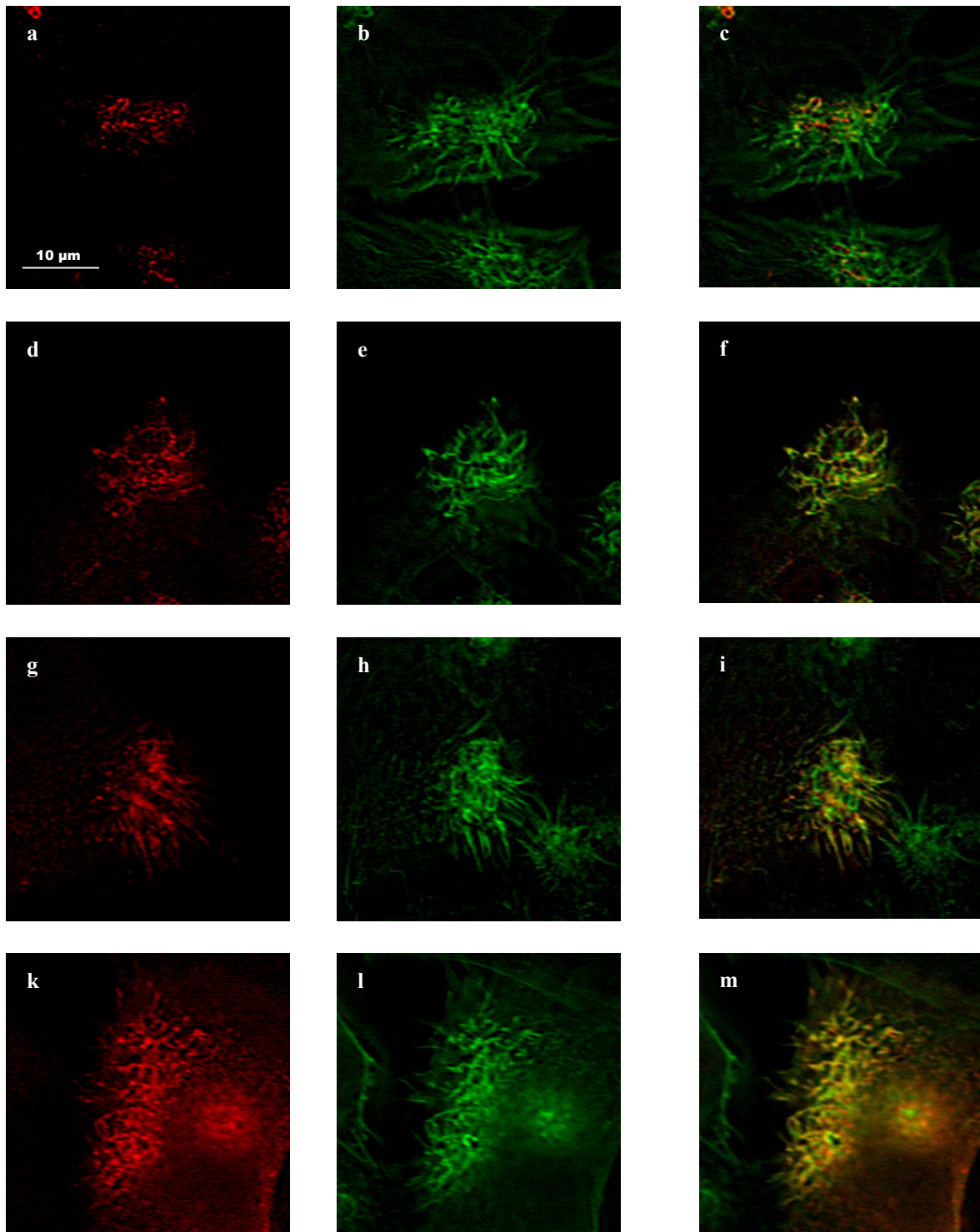


Rekrutierungsphänomen überhaupt auftreten kann. Da sich die Primärstrukturen der CaaX-Boxen der verschiedenen Isoformen unterscheiden, bot es sich an zu untersuchen, ob diese Region auch das differentielle Rekrutierungsmuster bestimmt.



**Abb. 3-17** Schematische Darstellung der Konstrukte RhoAAB (a), RhoBBA (b), RhoCCA (c) und RhoDDA (d).

Von diesen Voraussetzungen ausgehend wurden die Hybridproteine RhoAAB (Abb. 3-17 a), RhoBBA (Abb. 3-17 b), RhoCCA (Abb. 3-17 c) und RhoDDA (Abb. 3-17 d) konstruiert, bei denen die ursprüngliche CaaX-Gruppe gegen diejenige einer anderen Isoform ausgetauscht wurde: RhoA erhielt die CaaX-Box von RhoB, während bei RhoB, RhoC und RhoD die letzten vier Aminosäuren gegen die entsprechende Sequenz von RhoA ausgetauscht wurden. Wenn die CaaX-Gruppe das Verteilungsmuster bestimmte, wäre zu erwarten gewesen, daß das Rekrutierungsverhalten der Hybridproteine sich nach ihr richtete. Es zeigte sich aber, daß trotz der „fremden“ CaaX-Gruppen das ursprüngliche Muster auftrat. RhoAAB wurde wie RhoA rekrutiert (Abb. 3-18 a-c), RhoBBA wie RhoB (Abb. 3-18 d-f), RhoCCA wie RhoC (Abb. 3-18 g-i) und RhoDDA wie RhoD (Abb. 3-18 k-m). Die das Rekrutierungsmuster bestimmenden Aminosäuren mußten also auf einem anderen Abschnitt des Moleküls liegen.



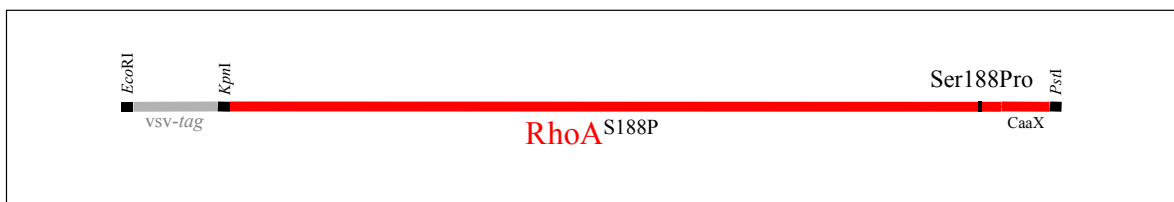
**Abb. 3-18** Rekrutierungsverhalten von RhoAAB (a-c), RhoBBA (d-f), RhoCCA (g-i) und RhoDDA (k-m). Rot: Rho. Grün: F-Aktin. Abb. (c), (f), (i) und (m) setzen sich aus den monochromen Bildern der jeweiligen Zeile zusammen.

### 3.9.5 RhoA<sup>S188P</sup>

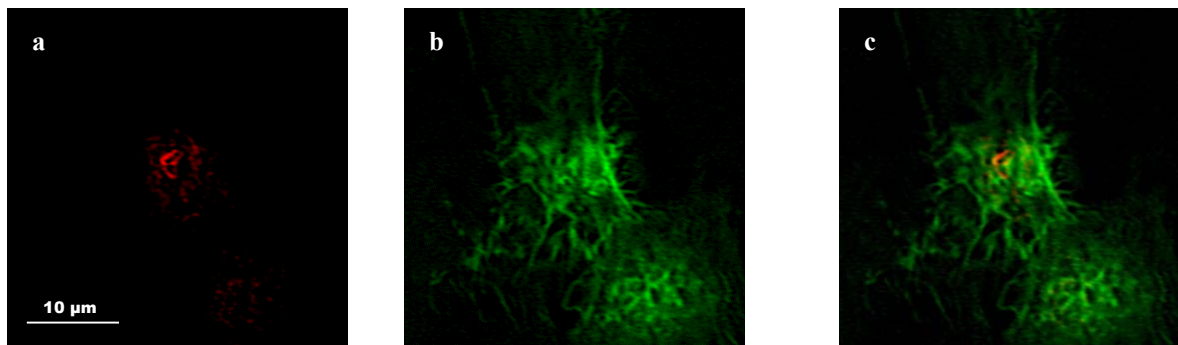
Es lag nahe, als nächstes die Region unmittelbar vor der CaaX-Region zu untersuchen: Der gewählte prä-C-terminale Abschnitt, der bei RhoA und C neun Aminosäuren umfaßt (As

181-189), bei RhoB 12 (As 181-192) und bei RhoD 14 (As 193-206), stellt eine Region starker Heterogenität zwischen den Isoformen dar. Durch seine räumliche Nachbarschaft zu der für die Rekrutierung an sich notwendigen CaaX-Gruppe gewann dieser Bereich zusätzlich an Interesse. Aufgrund der größeren Ähnlichkeit zwischen RhoA und RhoC, insbesondere der besseren Vergleichbarkeit der präterminalen Region, wurde der Sequenzabschnitt anhand dieser beiden Isoformen weiter untersucht.

Innerhalb der prä-CaaX-Region wurde zuerst die Rolle des Ser188 von RhoA betrachtet. Serin kommt bei den anderen Isoformen an vergleichbarer Position nicht vor. Es ist bekannt, daß membrangebundenes RhoA am Ser188 von PKA phosphoryliert und dadurch die Translokation ins Zytosol induziert wird [97]. Bei RhoA<sup>S188P</sup> wurde die PKA-vermittelte Phosphorylierung dadurch verhindert, daß Ser188 durch Prolin ersetzt wurde (Abb. 3-19). Das Rekrutierungsverhalten änderte sich dadurch nicht: RhoA<sup>S188P</sup> akkumulierte wie RhoA vorwiegend um die eindringenden Bakterien (Abb. 3-20 a-c).

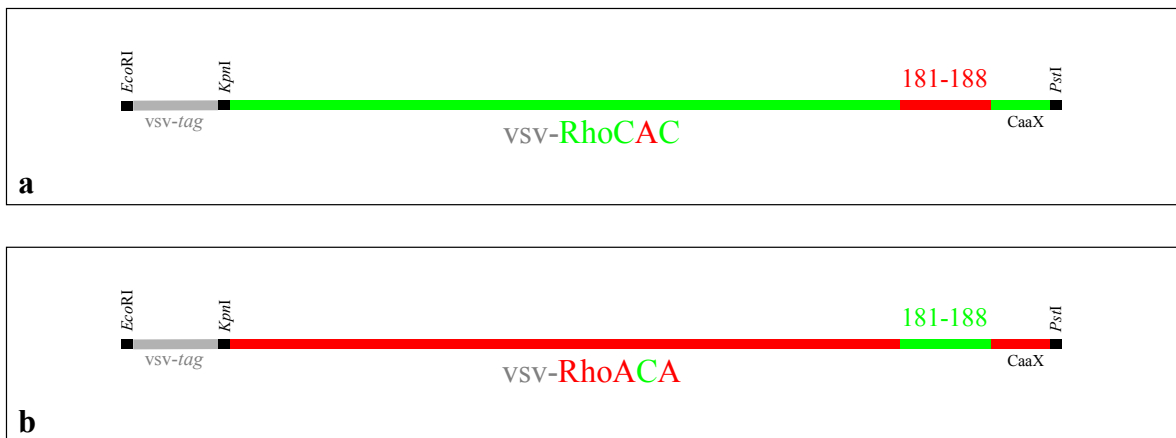


**Abb. 3-19** Schematische Darstellung des Konstrukts RhoA<sup>S188P</sup>.

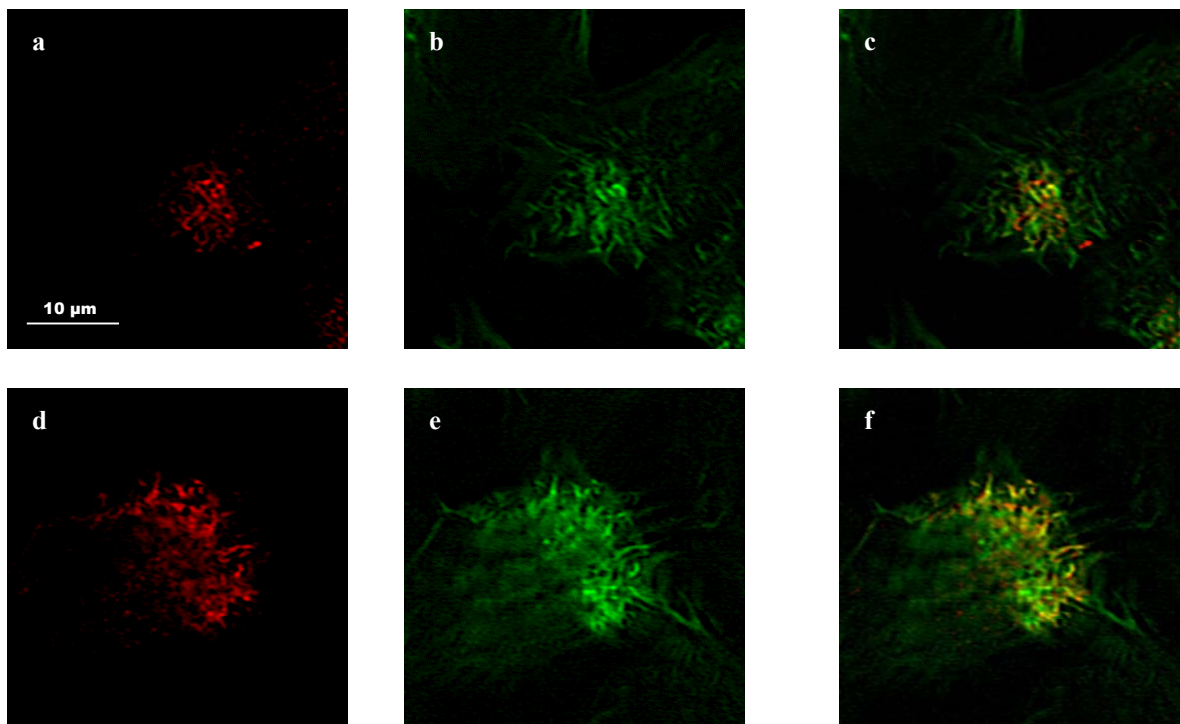


**Abb. 3-20** Rekrutierungsverhalten von RhoA<sup>S188P</sup> (a-c). Rot: Rho. Grün: F-Aktin. Abb. (c) setzt sich aus (a) und (b) zusammen.

### 3.9.6 RhoCAC und RhoACA



**Abb. 3-21** Schematische Darstellung der Konstrukte RhoCAC (a) und RhoACA (b).



**Abb. 3-22** Rekrutierungsverhalten von RhoCAC (a-c) und RhoACA (d-f). Rot: Rho. Grün: F-Aktin.   
 Abb. (c) und (f) setzen sich aus den monochromen Bildern der jeweiligen Zeile zusammen.

In einem nächsten Schritt wurde die gesamte Region der As 181-188 zwischen RhoA und RhoC ausgetauscht (Konstrukte RhoCAC (3-21 a) und RhoACA (3-21 b)). RhoACA war bereits von Birgit Bohm hergestellt worden, und unter Verwendung eines konventionellen Fluoreszenzmikroskops hatten sich bereits erste Hinweise darauf ergeben, daß dieses Protein anders als RhoA rekrutiert werden könnte. Durch die Darstellung von optischen Schnitten mit der in 2.7.4-5 beschriebenen Technik gelang es, die Rekrutierungsmuster von RhoCAC und RhoACA

eindeutig zu beschreiben: RhoCAC akkumulierte wie RhoA um die Bakterien (Abb. 3-22 a-c) und RhoACA wurde wie RhoC in die Spitzen der zellulären Membranprotrusionen rekrutiert (Abb. 3-22 d-f). Im Bereich dieser 8 Aminosäuren liegen somit notwendige Informationen für das differentielle Rekrutierungsmuster von RhoA und RhoC.

### 3.9.7 RhoA<sup>R183K</sup>

Von diesem Ergebnis ausgehend wurden zwei weitere von Birgit Bohm hergestellte Konstrukte – RhoA<sup>R183K</sup> und RhoA<sup>KK186-187RR</sup> – untersucht, mit dem Ziel, den für die Bestimmung des Rekrutierungsmusters hinreichenden Abschnitt der Primärstruktur von Rho weiter einzugrenzen. Die ausgetauschten Aminosäuren entsprachen dabei den Stellen, an denen sich RhoA sowohl von RhoC als auch von RhoB unterschied. Bei RhoA<sup>R183K</sup> wurde das ursprüngliche Arg183 durch Lys183 von RhoC ersetzt (Abb. 3-23). Dieser Austausch brachte keine Modifikation des subzellulären Verteilungsmusters mit sich. RhoA<sup>R183K</sup> konnte in seinem Rekrutierungsverhalten nicht von RhoA unterschieden werden (Abb. 3-24 a-c).

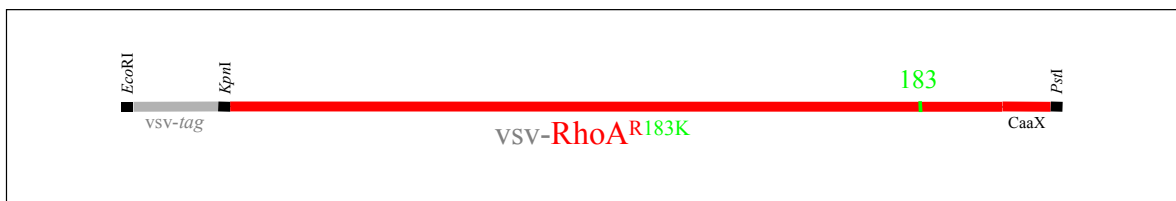


Abb. 3-23 Schematische Darstellung des Konstrukts RhoA<sup>R183K</sup>.

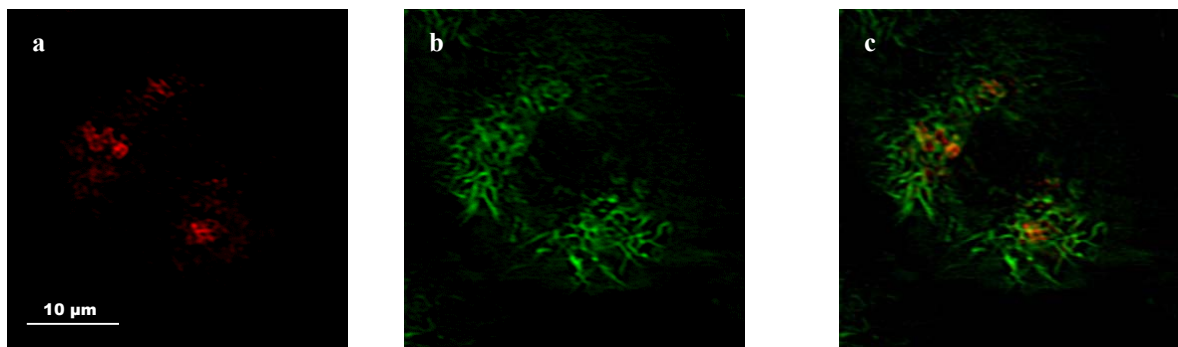
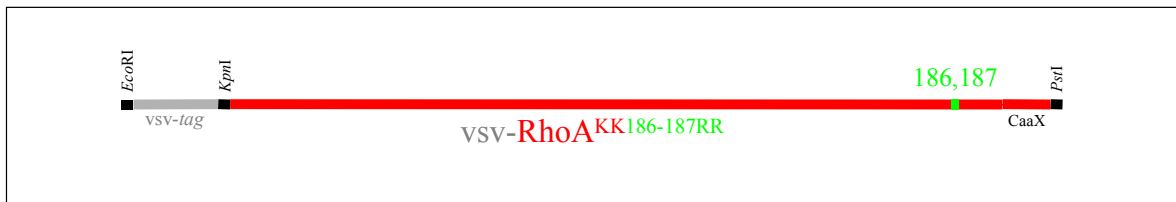


Abb. 3-24 Rekrutierungsverhalten von RhoA<sup>R183K</sup> (a-c). Rot: Rho. Grün: F-Aktin. Abb. (c) setzt sich aus (a) und (b) zusammen.

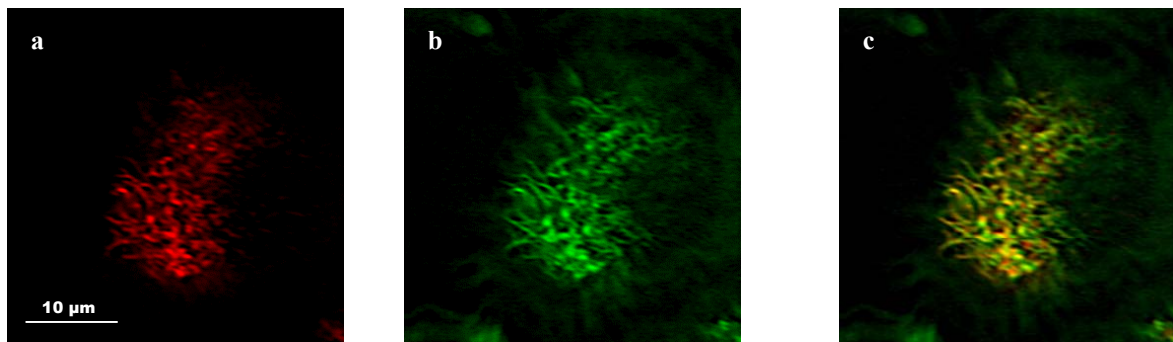
### 3.9.8 RhoA<sup>KK186-187RR</sup>

RhoA<sup>KK186-187RR</sup> basiert auf RhoA, wobei Lys186 und Lys187 durch die Aminosäuren Arg186 und Arg187 von RhoC ersetzt wurden (Abb 3-25). Diese Mutante zeigte kein RhoA-typisches Rekrutierungsverhalten, sondern konzentrierte sich wie RhoC in den während der bakteriellen

Invasion gebildeten Membranprotrusionen (Abb. 3-26 a-c). Mit diesem Konstrukt konnten zwei Aminosäuren (Lys<sup>186-187</sup>) beschrieben werden, deren Austausch allein hinreichend ist, um das RhoC-Muster in ein RhoA-Muster zu konvertieren.



**Abb. 3-25** Schematische Darstellung des Konstrukts RhoA<sup>KK186-187RR</sup>.



**Abb. 3-26** Rekrutierungsverhalten von RhoA<sup>KK186-187RR</sup> (a-c). Rot: Rho. Grün: F-Aktin. Abb. (c) setzt sich aus (a) und (b) zusammen.

### 3.9.9 Übersicht über das Rekrutierungsverhalten der untersuchten Konstrukte

Die Ergebnisse der Transfektions-Infektions-Experimente sind in der folgenden Tabelle nochmals zusammengefasst:

Name des Konstrukts	As von RhoA	As von RhoB	As von RhoC	As von RhoD	CaaX-Gruppe von	Rekrutierungstyp
RhoA	1-193				RhoA	RhoA
RhoB		1-196			RhoB	RhoB/C
RhoC			1-193		RhoC	RhoB/C
RhoD				1-210	RhoD	RhoB/C
RhoA <sup>G14V</sup>	1-13, 15-193				RhoA	RhoA
RhoA <sup>T19N</sup>	1-18, 20-193				RhoA	RhoA
RhoAAB	1-189	193-196			RhoB	RhoA
RhoBBA	190-193	1-193			RhoA	RhoB/C
RhoCCA	190-193		1-189		RhoA	RhoB/C
RhoDDA	190-193			1-206	RhoA	RhoB/C
RhoA <sup>S188P</sup>	1-187, 189-193				RhoA	RhoA
RhoCAC	181-188		1-180, 189-193		RhoC	RhoA
RhoACA	1-180, 189-193		181-188		RhoA	RhoB/C
RhoA <sup>R183K</sup>	1-182, 184-193		183		RhoA	RhoA
RhoA <sup>KK186-187RR</sup>	1-185, 188-193		186,187		RhoA	RhoB/C

**Tab. 3-6** Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Transfektions-Infektions-Experimenten

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methoden

#### 4.1.1 System zur fluoreszenzoptischen Darstellung dreidimensionaler Strukturen

Um das Rekrutierungsmuster der Rho-Mutanten innerhalb der Zellen beurteilen zu können, mußte ein plastischer, dreidimensionaler Eindruck der Präparate gewonnen werden. Dieser kann dadurch erreicht werden, daß eine Serie von horizontalen „optischen Schnitten“ durch die betreffenden Zellen angefertigt wird. Eines der üblichen Verfahren hierzu ist die Konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie [135]. Da die an der Charité vorhandenen Konfokalmikroskope aus organisatorischen oder technischen Gründen für die gegebene Fragestellung nicht genutzt werden konnten und eine Neuanschaffung eines solchen Instruments aus Kostengründen nicht möglich war, wurde auf eine andere, preisgünstigere Technik ausgewichen: Benutzt wurde ein herkömmliches, speziell aufgerüstetes Fluoreszenzmikroskop, und die gewonnenen digitalen Bilddaten wurden mit dem von Fay *et al.* entwickelten Dekonvolutionsalgorithmus bearbeitet (US Patent # 5047968).

Der Ansatz des empirischen Dekonvolutionsalgorithmus ist wie folgt: In der Fokusebene eines optischen Systems ist immer auch Streulicht aus benachbarten Ebenen sichtbar, das die Bildqualität vermindert. Die Ausbreitung dieses Streulichts kann mit einer für das verwendete optische System spezifischen Funktion beschrieben werden. Diese sogenannte *point-spread*-Funktion wird empirisch ermittelt, indem von einer „punkt“-förmigen Lichtquelle, deren Durchmesser ( $0,1 \mu\text{m}$ ) kleiner als das maximale Auflösungsvermögen des Mikroskops ist, eine Z-Serie von Mikrografien aufgenommen wird, d.h. eine Serie von Aufnahmen mit definiertem Abstand der Fokussierungsebenen. Die mittlere Ebene entspricht dabei der Lage der Lichtquelle (Fokusebene); in den Ebenen darüber und darunter ist nur das Streulicht sichtbar. Nach Bestimmung der Funktion, die durch das benutzte Mikroskop, das Untersuchungsobjekt sowie sämtliche brechenden Medien charakterisiert wird, kann Streulicht gezielt wieder seinen Ursprungspunkten zugeordnet werden. Verschwommenheit der Bilder, die durch das optische System verursacht ist, wird gezielt korrigiert, die Abbildung kommt dadurch den „wahren“ Strukturverhältnissen näher [48]. Das bearbeitete Bild verfügt auch über mehr Helligkeitsstufen als das Original. Strukturen, die vorher durch Streulicht verdeckt waren, können durch die Dekonvolution freigelegt werden [31].

Die Qualität der optischen Schnitte, die durch Anwendung des Dekonvolutionsalgorithmus



erhalten werden, ist der von Konfokalbildern vergleichbar. Ein Vorteil gegenüber der Konfokalen *Laserscanning*-Mikroskopie besteht darin, daß das volle Spektrum einer Halogenlampe genutzt werden kann. Während mit einem Laser nur Farbstoffe mit einer eng definierten Wellenlänge angeregt werden können, steht bei der hier verwendeten Methode eine größere Auswahl von Farbstoffen zur Verfügung.

#### 4.1.2 Protein-tagging

Um eine einfache Markierung zu ermöglichen, wurden alle Konstrukte mit einem vsv-Peptid-*tag* versehen. Der vsv-*tag* wurde deshalb gewählt, weil im Labor bereits monoklonale Antikörper gegen dieses Epitop vorhanden waren (P5D4 [93]; Geschenk von T. Kreis). Der *tag* mußte am N-Terminus von Rho angebracht werden, da eine Markierung am C-Terminus aufgrund der dort stattfindenden posttranslationalen Modifikation [4] unmöglich war: Mit Abspaltung der drei C-terminalen Aminosäuren wäre auch der *tag* vom zu markierenden Protein abgetrennt worden.

Das Anfügen eines Epitop-*tag* war eine Grundvoraussetzung für die vorliegende Arbeit: Isoformspezifische Antikörper für Rho waren nicht verfügbar und wären überdies schwierig einsetzbar gewesen. Für jedes der Konstrukte – die sich oft nur in wenigen Aminosäuren unterschieden – hätte ein besonderer Antikörper hergestellt werden müssen, was wiederum methodische Fragen aufgeworfen hätte: Unterschiede im Verteilungsmuster hätten dann auch auf Unterschiede der Antikörperspezifitäten zurückgeführt werden können. Durch das Anfügen des vsv-*tag* konnte für alle Konstrukte derselbe Primärantikörper eingesetzt werden.

Andererseits mußte in Kauf genommen werden, daß mit dem *tag* in die zu untersuchenden Proteine selbst eine Veränderung eingeführt wurde, welche einen Einfluß auf Eigenschaften der Moleküle haben könnte. Dieser Einwand läßt sich aber weitgehend entkräften. Der angefügte *tag* ist relativ kurz; zusammen mit der zwischen *tag* und Rho-Sequenz eingefügten Restriktionschnittstelle beträgt die Länge des angehängten Peptids 14 Aminosäuren oder ungefähr 7% der Länge der Aminosäuresequenz. Da das Peptid am N-Terminus der Rho-Mutanten angebracht werden konnte, ist es – zumindest auf der Ebene der Primärstruktur – weit entfernt von dem im Zusammenhang mit der Rekrutierung funktionell interessanten C-Terminus. In welchem Bereich der dreidimensionalen Struktur sich der *tag* einfügt, ist hingegen nicht genau bekannt. Alle Konstrukte verursachten bei Expression in HeLa-Zellen die erwarteten morphologischen Veränderungen (vgl. Abb. 3-11), allen voran die Ausbildung von Streßfilamenten [143]. Auch mit *tag* blieben die exprimierten Konstrukte also funktionell. Adamson *et al.* berichteten, daß das Anfügen eines zehn Aminosäuren langen myc-*tag* an RhoA, B und C weder Funktion noch

Lokalisation der Proteine beeinflusst [5].

Mit hoher Sicherheit kann ausgeschlossen werden, daß das Rekrutierungsphänomen ein auf den *tag* zurückzuführendes Artefakt ist: Mit demselben *tag* wurden unterschiedliche differentielle Rekrutierungsmuster dargestellt, und andererseits wurden die verschiedenen Rekrutierungsmuster (RhoA bzw. RhoB) mit unterschiedlichen *tags* (*vsv*, Sendai) in gleicher Weise reproduziert. ([3], T. Adam, unveröffentlichte Ergebnisse). Entsprechend wurde in Rekrutierungsexperimenten mit Wachstumsfaktoren als Auslösern gezeigt, daß das Verhalten von myc-markiertem und endogenem RhoA übereinstimmen [169].

### 4.1.3 Replikationstreue der PCR

Die mit Hilfe der PCR hergestellten *vsv-rho*-Konstrukte mußten dem Anspruch auf vollkommene Fehlerfreiheit der Basensequenz genügen. Die PCR unter *In-vitro*-Bedingungen ist jedoch fehlerträchtig, und es können „falsche“ Basen in den Tochterstrang eingebaut werden, die nicht zur Matrize komplementär sind. Für die *Taq*-Polymerase, die keine 3'→5' Korrekturaktivität besitzt, wurde für eine 30 Zyklen umfassende PCR eine Fehlerfrequenz von 0,25% berichtet [147]. Im Falle der hier beschriebenen PCR-Produkte, die je etwa 600 bp lang sind, ist dieser Fehler erheblich. Für die korrekte Herstellung der Konstrukte war es daher essentiell, die Replikationstreue der PCR zu optimieren. Dies wurde auf zwei Wegen erreicht: Erstens wurde die Zahl der PCR-Zyklen auf 10-16 limitiert, was durch Einsetzen einer großen Matrizenmenge (90-180 fmol) kompensiert wurde, und zweitens wurde die thermostabile *Pwo*-DNS-Polymerase verwendet, die eine 3'-Exonukleaseaktivität (Fehlerkorrekturaktivität) besitzt [72]. Da dieses Enzym erheblich teurer als *Taq*-Polymerase ist, wurden die Reaktionsbedingungen vor der Synthese der jeweiligen Konstrukte unter Verwendung der *Taq*-Polymerase optimiert.

Die neuen Konstrukte wurden durch Sequenzierung kontrolliert. Bei der hier verwendeten Sequenzierungsmethode nach Sanger [149] waren die Primer mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 (MWG) markiert. Aufgrund der Verwendung von pUC19 als Sequenziervektor und der relativ geringen Länge der Sequenzen konnte für alle Konstrukte mit demselben Primer-Paar gearbeitet werden. Die ebenfalls mögliche Markierung der Nukleotide wäre in diesem Fall weniger kostengünstig gewesen. Die Ergebnisse der Sequenzierungen bestätigten die hohe Replikationstreue der PCR unter den hier eingestellten Bedingungen: Im Rahmen dieser Arbeit wurden Konstrukte mit einer Gesamtlänge von über 5000 Basen hergestellt, ohne daß bei der Sequenzierung ein Replikationsfehler entdeckt werden konnte.

#### 4.1.4 Eigenschaften des Expressionsvektors

Für die Expression der Konstrukte in HeLa-Zellen wurde der Vektor pKC3 benutzt, der vom Plasmid pko-neo [176] abgeleitet ist. pKC3 war für die hier beschriebenen Experimente optimal, da er einen SV40-Promotor enthält. Dieser Promotor ist schwächer als der CMV-Promotor [44, 98] und ermöglichte die gewünschte mäßige Expression der Rho-Konstrukte. Ein Nachteil des Vektors pKC3 ist, daß seine Nukleinsäuresequenz nicht vollständig vorliegt. Zum Klonieren wurden hier nur beschriebene Schnittstellen benutzt. Da diese Situation nicht völlig befriedigend war, soll im Labor nachfolgend ein neuer Expressionsvektor konstruiert werden.

#### 4.1.5 Plasmidpräparation

Für die Präparation von Plasmid-DNS wurden kommerzielle Kits von QIAGEN verwendet. Grundsätzlich kann Plasmid-DNS auch mit im Labor verfügbaren Reagenzien nach Standardmethoden (z. B. [148]) gewonnen werden. Es hatte sich allerdings bereits im Vorfeld herausgestellt, daß die Transfektionseffizienz bei Verwendung der mit den kommerziellen Kits gewonnenen DNS deutlich höher ist (B. Bohm und T. Adam, unveröffentlichte Ergebnisse). Aufgrund dieses qualitativen Unterschieds war die Investition in die Kits gerechtfertigt.

#### 4.1.6 Transfektion und Infektion

Die für diese Arbeit gewählte Transfektionsmethode sollte einerseits effizient sein und andererseits nicht mit der anschließenden Infektion der transfizierten Zellen interferieren. Unter diesem Aspekt wurden die verschiedenen zur Verfügung stehenden Methoden beurteilt:

Bei der Transfektion durch Elektroporation müssen die Zellen im Medium suspendiert sein [14]. Durch die dazu erforderliche Trypsinbehandlung büßen die Zellen Oberflächenproteine ein und sind zunächst refraktär gegen die Shigelleninvasion (T. Adam, unveröffentlichte Ergebnisse). Erst nach 18-24 h sind die Zellen sedimentiert und die Oberflächenproteine wieder ausreichend exprimiert. Als das Transfektions-Infektions-Modell etabliert wurde, sollten auch kurze Expressionszeiten der Konstrukte nach Transfektion getestet werden. Deshalb schied die Elektroporation als Transfektionsmethode aus. Bei der Transfektion mit Hilfe von Lipid-Mikrosphären (Liposomen) wäre mit dem Einbau von fremden Lipiden in das Membrankompartiment der zu transfizierenden Zelle zu rechnen gewesen [132]. Da die Signaltransduktion an der Plasmamembran für die Shigelleninvasion eine zentrale Rolle spielt, sollte eine Veränderung der Membranzusammensetzung vermieden werden. Aus diesem Grund wurde auch auf die Liposomen-Transfektionsmethode nicht zurückgegriffen.

Die Transfektion mit Kalziumphosphat-DNS-Kopräzipitaten [64], die wahrscheinlich durch Endozytose aufgenommen werden [6], erwies sich als effizient für die hergestellten Rho-Konstrukte und als kompatibel mit der nachfolgenden Infektion mit *Shigella*. Alle Konstrukte konnten in HeLa-Zellen exprimiert werden. Bei der Auswertung der Präparate fiel allerdings auf, daß die auf RhoD basierenden Konstrukte regelmäßiger und stärker exprimiert wurden als DNS, die auf den anderen Rho-Isoformen basierte. Dieser Unterschied spiegelt sich auf der molekularen Ebene wider: Dem ähnlichen Expressionsverhalten der RhoA-, B- und C-Konstrukte entspricht eine DNS-Sequenzhomologie zwischen den Konstrukten von nahezu 80%. Die Übereinstimmung der DNS-Sequenz von *rhoD* mit den Sequenzen von *rhoA*, *B* oder *C* beträgt dagegen jeweils weniger als 60%. Es ist bekannt, daß die Transfektionseffizienz von der eingesetzten DNS abhängt [64]. Ein gemeinsames Sequenzmerkmal von *rhoA*, *B* oder *C* könnte somit die im Vergleich zu *rhoD* geringere Expression bedingen.

Nach Abschluß der DNS-Aufnahme und vor Durchführung der Infektionsexperimente wurden die Zellen mehrfach mit Medium gewaschen. Dadurch wurden auf der Oberfläche liegende  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitate, die den Zustand der Zellen beeinträchtigen und den Infektionsprozeß behindern können, weggespült. Daß der Transfektionsvorgang selbst ohne Effekt auf das Aktinzytoskelett der nichtinfizierten Zelle ist, zeigen die Experimente (ohne Infektion) mit RhoA<sup>T19N</sup>: Mit diesem konstitutiv inaktiven Konstrukt transfizierte HeLa-Zellen ließen sich am Lichtmikroskop morphologisch nicht von nichttransfizierten Zellen unterscheiden (Abb.3-11 c,d). Nach Transfektion mit sämtlichen Konstrukten ließen sich HeLa-Zellen problemlos infizieren. Da die pathogeninduzierte Internalisierung der Bakterien eine aktive Leistung der Zelle darstellt [2, 3, 40], kann auf einen guten funktionellen Status der schwach transfizierten HeLa-Zellen rückgeschlossen werden.

Nur die sehr stark transfizierten Zellen erschienen abgerundet und waren z.T. vom Boden der Kulturplatten abgelöst. Hier konnten auch nur selten intrazelluläre Shigellen beobachtet werden. Diese Zellen wurden bei der Dokumentation und Auswertung der Experimente daher nicht berücksichtigt.

Für die Infektion verwendete Shigellen wurden in der frühen exponentiellen Wachstumsphase geerntet. In diesem Stadium ist das Invasionsvermögen der Bakterien am ausgeprägtesten [121]. Nach Zugabe der Bakteriensuspension wurden die Zellkulturplatten auf Eis gelagert. Bei einer Temperatur von ca. 4°C können die Shigellen zwar auf die Zellen sedimentieren, es findet aber keine Invasion statt [40]. Der verwendete Stamm SC301 besitzt das afimbrische Adhäsın AFA I

von *E. coli* und kann sich damit an die HeLa-Zellen anheften [179]. Daher konnte die bei Wildtypstämmen notwendige Zentrifugation der Bakterien auf die Zellen entfallen [40]. Durch die anschließende rasche Temperaturerhöhung auf etwas über 37°C wurden die Bedingungen für eine mögliche Invasion geschaffen. Der Invasionsprozess läuft an den einzelnen Zellen jedoch nicht völlig synchron ab, so daß verschiedene Stadien beobachtet werden können. Nach weniger als 20 min ist ein großer Teil der Bakterien in die Zellen aufgenommen [40] und der optimale Zeitpunkt für die Beobachtung der Rho-Rekrutierung ist erreicht.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 Funktionalität der mutierten Proteine in der transfizierten Zelle

Um eine orientierende Aussage über die Funktionsfähigkeit der hergestellten Konstrukte treffen zu können, wurde deren Wirkung auf das Aktinzytoskelett transfizierter Zellen (ohne nachfolgende Infektion mit *Shigella*) untersucht und dokumentiert (Abb. 3-11/12). Alle auf der Basis von RhoA, B und C (Sequenzen vgl. Abb. 1-3) hergestellten Konstrukte wiesen die bekannte Fähigkeit, in Epithelzellen ein dichtes Netz von Streßfilamenten zu induzieren ([130] und eigene Beobachtungen), auf. Die einzige – erwartete – Ausnahme bildete das konstitutiv-inaktive Konstrukt RhoA<sup>T19N</sup>.

Die beiden auf *rhoD* (vgl. Abb. 1-4) basierenden Konstrukte RhoD und RhoDDA unterscheiden sich in ihrer Wirkung auf das Aktinzytoskelett ebenfalls erwartungsgemäß von RhoA, B und C. In [126] war die Wirkung von RhoD auf BHK-Zellen bereits beschrieben worden, wobei die Induktion von 20-30 µm langen, aktinreichen Zellfortsätzen und das Verschwinden von Streßfilamenten in transfizierten Zellen als charakteristische Merkmale genannt wurden. In dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Expressionssystem mit HeLa-Zellen konnte der beschriebene RhoD-Phänotyp in ähnlicher Weise, aber mit Abweichungen reproduziert werden. Da hier mit HeLa-Zellen gearbeitet wurde, die zum Zeitpunkt der Transfektion keine oder kaum Streßfilamente ausbildeten, konnte über die Wirkung von RhoD auf bestehende Filamente keine Aussage getroffen werden. Allerdings wurden durch die RhoD-Konstrukte auch keine neuen Streßfilamente induziert: Es konnte höchstens eine leichte, diffuse Vermehrung von F-Aktin in transfizierten Zellen beobachtet werden. Somit stimmt zumindest der beobachtete Endzustand nach Transfektion mit dem in [126] beschriebenen Phänotyp überein. Nicht konstant beobachtet werden konnte im hier verwendeten System die Ausbildung von langen, dünnen, aktinreichen Zellprotrusionen unter der Wirkung von RhoD. Lediglich in Abb. 3-12 c,d weist die sehr stark transfizierte Zelle einige filiforme Fortsätze auf. Die beobachteten Abweichungen im Vergleich

zu [126] können auf eine Vielzahl von Faktoren zurückgeführt werden, darunter auf den verwendeten Zelltyp, die Transfektionsmethode und das erreichte Expressionsniveau. Die zentrale Aussage, daß der Phänotyp mit *rhoD* transfizierter Zellen deutlich vom Aspekt mit *rhoA/B/C* transfizierter Zellen abzugrenzen ist, konnte hier jedoch uneingeschränkt bestätigt werden.

#### 4.2.2 Rekrutierungsverhalten von RhoA<sup>G14V</sup> und RhoA<sup>T19N</sup>

Sowohl das konstitutiv aktive RhoA<sup>G14V</sup>, dessen Fähigkeit zur Hydrolyse von GTP herabgesetzt ist [56], als auch das konstitutiv inaktive RhoA<sup>T19N</sup> [99], welches in GDP-gebundener Form vorliegt [96], werden bei der Zellinvasion durch *Shigella* wie RhoA rekrutiert (Abb. 3-16 a-f). Das Translokationsphänomen erwies sich somit überraschenderweise als vom „Schaltzustand“ der GTPase unabhängig: Ausgehend von der bekannten Aktivität von RhoGDI, mit GDP-gebundenem Rho einen zytosolischen Komplex zu bilden, hätte man RhoA<sup>T19N</sup> eher diffus im Zytoplasma verteilt als an der Membran konzentriert erwartet [80, 155]. Für die Rekrutierung während der bakteriellen Invasion scheint es jedoch ohne Bedeutung zu sein, ob RhoA mit GTP oder mit GDP komplexiert vorliegt. Hieraus läßt sich folgern, daß die Konformationsänderungen, die beim Übergang zwischen GDP- und GTP-gebundenem Zustand auftreten [79], nicht mit den Mechanismen interferieren, die die Rekrutierung von RhoA vermitteln.

Es mag zunächst überraschen, daß bei Überexpression einer konstitutiv inaktiven Mutante die Ausbildung der typischen *Shigella*-Eintrittsstellen nicht unterbunden wird (Abb. 3-16 a-c), wie dies bei Inhibition von Rho durch C3-vermittelte ADP-Ribosylierung der Fall ist [3]. Der fluoreszenzoptische Aspekt der Aktin-„Blüte“ ist bei transfizierten und nichttransfizierten Zellen nicht unterscheidbar. Übereinstimmend damit unterscheiden sich auch Zellen, die nicht mit *Shigella* infiziert, jedoch mit RhoA<sup>T19N</sup>-DNS transfiziert wurden, nicht von nichttransfizierten Kontrollzellen, die nur über endogenes Rho verfügen (Abb. 3-11 c-d). Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der Einstellung experimenteller Parameter: Da in erster Linie die Rekrutierung beurteilt werden sollte, wurde das Expressionsniveau aller Konstrukte bewußt niedrig gehalten. Somit stand intrazellulär möglicherweise zu wenig RhoA<sup>T19N</sup> zur Verfügung, als daß die Mutante eine dominant negative Wirkung hätte entfalten können. Der Bestand an endogenem Rho würde nach dieser Vorstellung immer noch ausreichen, um die typischen Aktinrearrangements induzieren zu können.

#### 4.2.3 Die Rolle der CaaX-Gruppe

Die CaaX-Gruppe der Isoformen RhoA, B und C ist für die Rekrutierung an sich zwar essen

tiell (B. Bohm und T. Adam, unveröffentlichte Ergebnisse), determiniert aber nicht das differentielle Rekrutierungsmuster (Abb. 3-18a-i).

Die verschiedenen Isoformen weisen Unterschiede in der posttranslationalen Isoprenylierung bzw. Palmitoylierung auf. Während RhoB an Cys189 und Cys192 palmitoyliert und an Cys192 und Cys193 geranylgeranyliert bzw. farnesyliert werden kann [4], werden RhoA und RhoC weder farnesyliert noch palmitoyliert, sondern lediglich an Cys190 geranylgeranyliert [83]. Die Sequenz der CaaX-Gruppe scheint das Modifikationsmuster nur eingeschränkt zu beeinflussen. Während bei Ha-Ras die Mutation des C-terminalen Ser189 zu Leu (CaaS zu CaaL) zur Folge hat, daß das Protein *in vivo* und *in vitro* geranylgeranyliert statt farnesyliert wird [90], kann RhoB trotz des terminalen Leuzins auch farnesyliert werden. Auch die beiden „aliphatischen“ („aa“) Aminosäuren spielen hier offenbar keine bestimmende Rolle. Selbst wenn RhoB durch Mutation von Lys194 zu Leu eine RhoA-CaaX-Gruppe erhält, ändert sich sein Prenylierungsmuster nicht [4].

Während das (primäre) Vorhandensein der vier Aminosäuren der CaaX-Gruppe also eine Grundvoraussetzung sowohl für die posttranslationale Modifikation [67, 83] als auch für die Rekrutierung der Proteine während der Shigelleninvasion darzustellen scheint, enthält dieser Sequenzabschnitt für keinen der beiden Vorgänge die vollständige Information. Besondere Beachtung verdient, daß das RhoB/C-Rekrutierungsmuster von der Art der posttranslational angefügten Lipide unabhängig zu sein scheint. RhoB zeigt trotz unterschiedlicher Modifikation das gleiche Verteilungsmuster wie RhoC, während RhoC und RhoA trotz offenbar identischer Isoprenylierung mit Geranylgeranyl verschieden rekrutiert werden. Die Abhängigkeit des Rekrutierungsphänomens vom Vorhandensein der CaaX-Gruppe ist, mit den morphologischen Daten zusammengekommen, ein Indiz dafür, daß der Zielort der Translokation der Rho-Isoformen nicht nur der membrannahe Bereich, sondern die Zytoplasmamembran selbst ist.

#### 4.2.4 Rekrutierungsverhalten von RhoD

Erstmals wurde hier das Translokationsverhalten von RhoD während der Epithelzellinvasion durch *Shigella* untersucht (Abb. 3-14 a-c). Es konnte gezeigt werden, daß auch RhoD rekrutiert wird und dabei ein Verteilungsmuster aufweist, das – nach lichtmikroskopischer Beurteilung – dem von RhoB und RhoC gleicht.

RhoD läßt sich anhand der Primärstruktur innerhalb der Rho-Familie deutlich von den drei „Geschwistern“ RhoA, B und C abgrenzen. Dennoch teilen RhoD und RhoB Eigenschaften, in denen sich diese zwei Moleküle gemeinsam von RhoA und RhoC unterscheiden. Es wurde

gezeigt, daß sowohl RhoD als auch RhoB hauptsächlich an frühen Endosomen lokalisiert sind, während sich nur ein kleiner Anteil an der Plasmamembran findet [5, 126]. Entsprechend finden sich auch in der Zusammensetzung des C-Terminus Parallelen. So liegt unmittelbar vor der CaaX-Box jeweils noch ein zweiter Zysteinrest (bei RhoB noch ein dritter), und der C-terminale Bereich ist länger als bei RhoA und RhoC. Bei RhoB sind drei, bei RhoD fünf zusätzliche Aminosäuren eingefügt. Allerdings endet die Aminosäuresequenz von RhoD im Gegensatz zu RhoA, B und C mit Threonin statt mit Leuzin. Über die Art der posttranslationalen Modifikation von RhoD liegen keine Angaben vor, es erscheint aber aufgrund der genannten Gemeinsamkeiten nicht unwahrscheinlich, daß RhoD das gleiche Prenylierungsmuster aufweist wie RhoB. Der Austausch der CaaX-Gruppe von RhoD gegen die entsprechende Sequenz von RhoA läßt das Rekrutierungsverhalten unberührt (Abb. 3-18 k-m). Ausgehend von der Hypothese, daß RhoD wie RhoB modifiziert wird, kann überdies spekuliert werden, daß, ähnlich wie für RhoB gezeigt [4], der Austausch der CaaX-Gruppe auch das Prenylierungsmuster von RhoD unberührt läßt.

Aus dem Vergleich mit RhoC drängt sich jedoch die Hypothese auf, daß die beschriebenen Rekrutierungsmuster während der bakteriellen Invasion von anderen Merkmalen determiniert werden als die Lokalisation von RhoB und RhoD in der nichtinfizierten Zelle: RhoC wird, obgleich intrazellulär zunächst anders verteilt als RhoB und RhoD [5, 126], in gleicher Weise in die Membranprotrusionen rekrutiert. Immerhin ist denkbar, daß sich die Rekrutierungsmuster von RhoB, C und D in Feinheiten unterscheiden, die mit den benutzten Methoden nicht aufgedeckt werden konnten.

#### 4.2.5 Prä- CaaX-Gruppe von RhoA und RhoC

Ser188 von RhoA, das von der cAMP-gesteuerten Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert wird [97], ist für die Ausprägung des RhoA-typischen Rekrutierungsmusters nicht notwendig (Abb. 3-20 a-c). Somit spielt PKA in ihrer Funktion als Kinase keine Rolle für die Rekrutierung von RhoA an die Bakterieneintrittsstelle. Dem Ser188 scheint vielmehr die Rolle eines „Aus“-Schalters zuzukommen: GTP-RhoA wird durch die Phosphorylierung und durch das dann erleichterte Komplexbilden mit Rho-GDI von der Zellmembran, einem wahrscheinlichen Aktionsort, entfernt [97]. In menschlichen Neuroblastomzelllinien konnte auch gezeigt werden, daß PKA durch die Phosphorylierung die biologische Aktivität von RhoA antagonisiert, möglicherweise durch Verringerung der Affinität zur Rho-Kinase ROK $\alpha$  [45]. Nimmt man an, daß RhoA während der Shigelleninvasion zur Membran hin rekrutiert wird und dort im aktivierten Zustand vorliegen muß, könnte die PKA der Rekrutierung sogar entgegenwirken.



Als essentiell für die Bestimmung des Rekrutierungstyps konnte schließlich eine prä-C-terminale Region ausgemacht werden. Veränderung der Aminosäuren 186-187 von RhoA von „Lys-Lys“ zu „Arg-Arg“ bewirkte die Modifikation des RhoA-Rekrutierungsmusters zum RhoC-Muster (Abb. 3-26 a-c). Umgekehrt zeigte RhoC nach Angleichen von sechs prä-C-terminalen Aminosäuren zwischen Position 181 und 188 an die RhoA-Sequenz einen RhoA-Rekrutierungsphänotyp (Abb. 3-22 a-c). Möglicherweise gibt es also Sequenzmotive, welche die Ausprägung des jeweiligen Rekrutierungsmusters hinreichend bedingen. Bisher sind die jeweilige Rolle der einzelnen präterminalen Aminosäuren für die Rekrutierung sowie der Mechanismus der differentiellen Translokation ungeklärt. Der Vergleich mit publizierten Daten erlaubt jedoch eine Reihe von Rückschlüssen und Spekulationen hinsichtlich möglicher Mechanismen.

#### **4.2.6 Mögliche Rollen für die Lysine 186-187 von RhoA**

Es fällt auf, daß die zweifache Substitution von Lysin (RhoA) durch Arginin (RhoC) einen konservativen Austausch darstellt. Beide Aminosäuren tragen hydrophile, basische, unter physiologischen Bedingungen positiv geladene Reste, wobei der positive Ladungscharakter der Argininseitenkette etwas stärker ausgeprägt ist als der des Lysinrests. Es erscheint nicht sehr wahrscheinlich, daß es durch Austausch dieser beiden Aminosäuren zu einer wesentlichen Beeinflussung der Konformation des C-Terminus von Rho kommen könnte. Interessanterweise ähnelt RhoC an dieser Stelle von der Ladungsverteilung her (polybasischer Abschnitt) viel mehr RhoA als dem „Rekrutierungszwilling“ RhoB, der zwischen Arg182 und dem C-terminalen Zystein keine positiv geladenen Aminosäuren aufweist. Möglicherweise vermittelt also eine andere Eigenschaft von Lysin als die Ladung seiner Seitenkette den Einfluß auf das Rekrutierungsmuster.

Ein oder mehrere Lysinreste von RhoA könnten Ort einer noch zu definierenden posttranslationalen Modifikation sein, welche Konformation, Membranbindungseigenschaften oder Protein-Protein-Bindung beeinflusst. Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A) enthält beispielsweise die Aminosäure Hypusin, die durch posttranslationale Modifikation eines Lysinrests entsteht. Allerdings ist der Initiationsfaktor das einzige bekannte Protein, das diese Modifikation enthält [87]. Lysinreste können auch acetyliert werden, wodurch gleichzeitig die positive Ladung neutralisiert wird [102]. Derartige Modifikationen sind für kleine GTPasen bisher jedoch nicht beschrieben worden.

Die Lysinreste 186 und/oder 187 könnten für das Zustandekommen einer spezifischen Bindung von RhoA an ein Regulator- oder Effektorprotein oder ein Membranphospholipid oder für

die Aktivierung eines Interaktionspartners notwendig sein. Es sind eine Reihe von Fällen bekannt, in denen der Austausch von Lysin zu Arginin die spezifische Interaktion zwischen Proteinen behindert oder unmöglich macht. Für die Tyrosinkinase pp60<sup>v-src</sup> wurde gezeigt, daß der Austausch von drei nahe benachbarten N-terminalen Lysinen gegen Arginin die Bindung an einen membrangebundenen Rezeptor verhindert [163]. Substitution eines einzelnen Lysins durch Arginin im Penizillinbindenden Protein 5 von *E. coli* beeinträchtigt dagegen zwar nicht die Komplexbildung mit Penizillin, wohl aber die Carboxypeptidaseaktivität des Proteins [107]. Ein entsprechendes Modell mit erhaltener Bindung bei Verlust der enzymatischen Interaktion ließe sich auch für die Wechselwirkung von RhoA<sup>S188P</sup> mit PKA konstruieren: Das Lysinpaar, das RhoA von den Isoformen B und C sowie von RhoD unterscheidet, ist Bestandteil einer potentiellen Konsensussequenz für die Interaktion mit PKA [97]. Auch wenn Phosphorylierung von Ser188 für die Rekrutierung keine Rolle spielt, wäre es vorstellbar, daß PKA allein durch eine (hypothetische) Bindung an RhoA das Rekrutierungsmuster beeinflusst. Auch die S188P-Mutante wäre in diesem Modell in der Lage, an PKA zu binden, obwohl die katalytische Aktivität der Kinase blockiert wäre. Der Phosphorylierung könnte schließlich auch im Rahmen der Shigel-leninvasion die Rolle eines Abschaltsignals zukommen. Allerdings kann dies anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden. Möglicherweise konnte dieser hypothetische Mechanismus in den hier durchgeführten Experimenten auch von vorn herein nicht zum Tragen kommen, da der Invasionsprozeß frühzeitig artifiziell unterbrochen wurde.

Wie aber ist zu erklären, daß die anderen drei untersuchten Proteine, RhoB, C und D, die zwar alle nicht über die Lysinreste von RhoA verfügen, deren Sequenzen sich aber untereinander deutlich unterscheiden, bei fluoreszenzoptischer Darstellung identischen Rekrutierungsmustern zu folgen scheinen? Man könnte sich eine Interaktion mit einem Partnermolekül vorstellen, das eine ausreichend große Toleranz besäße, um RhoB, C und D gleichermaßen, RhoA jedoch trotzdem nicht zu erkennen. Andererseits erscheinen die Sequenzunterschiede zwischen den C-Termini von RhoD und RhoC mindestens so groß wie zwischen RhoA und RhoC. Möglicherweise bilden RhoB, C und D am Carboxyende jedoch eine ähnliche Tertiärstruktur aus, die sie von RhoA unterscheidet und für eine spezifische Interaktion hinreichend ist. Denkbar ist ebenfalls, daß RhoA, B, C und D gleichermaßen zu der Interaktion fähig sind, die dem „RhoC“-Muster zugrundeliegt, und daß Rho an dieser Wechselwirkung mit einem Sequenzabschnitt teilnimmt, der allen drei Isoformen und RhoD gemeinsam ist. RhoA könnte nach dieser Vorstellung, ähnlich wie im Zusammenhang mit PKA spekuliert wurde, in einer ausschließlich für diese Isoform spezifischen Interaktion gebunden werden, dadurch in der charakteristischen Art

und Weise rekrutiert werden und so für die „gemeinsame“ Interaktion nicht mehr zur Verfügung stehen. Schließlich wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Rekrutierungsmuster von RhoB, C und D in mit den hier verwendeten Methoden nicht erkennbaren Details differieren könnten und somit an eine Interaktion mit für jedes der drei Proteine jeweils spezifischen Bindungspartnern gedacht werden müßte.

#### 4.2.7 Differentielle Rekrutierung und Strukturmodelle von RhoA

Nach den vorangegangenen Überlegungen zur Primärstruktur verspricht die Gegenüberstellung experimenteller Daten mit dreidimensionalen Strukturmodellen von Rho eine weitere Annäherung an ein Verständnis des Rekrutierungsphänomens. Erste Hinweise auf die funktionelle Architektur von Rho ergaben sich aus der Analyse der Wirkung von bakteriellen Toxinen. Gleich mehrere Toxine greifen Rho an und nehmen dadurch Einfluß auf die Funktion der GTPase. *Clostridium botulinum* C3-Transferase ADP-ribosyliert RhoA-C an Asn41. ADP-ribosyliertes Rho ist konstitutiv inaktiv, wobei der Mechanismus der Inaktivierung des Moleküls noch nicht schlüssig geklärt ist [160]. Toxin B von *Clostridium difficile* glycosyliert RhoA an Thr37. RhoA (und andere GTPasen der Rho-Familie) werden dadurch konstitutiv inaktiv. Die funktionelle Inaktivierung resultiert wahrscheinlich aus einer Inhibition der Interaktion mit Effektorproteinen [160]. Cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) von uropathogenen *E. coli* [49, 158] und Dermonekrotisierendes Toxin von *Bordetella bronchiseptica* [76] deamidieren Gln63 von Rho zu Glutamat. Dadurch wird die GTP-Hydrolyse behindert, auch GAP wird wirkungslos: Rho wird konstitutiv aktiv.

Mit dem *Yeast-Two-Hybrid*-Verfahren konnten Regionen von Rho eingegrenzt werden, welche für die Interaktion mit Effektorproteinen wie Rho-Kinase und PKN wichtig sind [52]. Innerhalb von zwei Abschnitten, As 23-40 und As 75-92, liegen demnach Aminosäuren, die die spezifische Bindung mit Effektoren vermitteln. Die Primärstrukturen von RhoA und RhoC sind in den bezeichneten Abschnitten identisch; RhoB weicht in jedem der beiden Abschnitte an nur einer Position ab, wobei unbekannt ist, ob diese beiden Aminosäuren für die Protein-Protein-Interaktionen eine essentielle Rolle spielen.

Anhand von Kristallstrukturanalysen von RhoA war es möglich, die Konformationsänderungen während des GTPase-Zyklus zu beschreiben und die Aminosäurereste zu definieren, die für die GTPase-Funktion und die Interaktion mit GAP von Bedeutung sind [79, 145, 185]. Abschnitte, deren Position sich in Abhängigkeit vom „Schaltzustand“ am deutlichsten ändert, erstrecken sich demnach zwischen Asp28 und Pro36 im Bereich der „Schalter-I-Region“ (As

28-38) und zwischen Gly62 und Leu69 am Anfang der „Schalter-II-Region“ (As 61-78). Aminosäuren, die möglicherweise für Bindung und Hydrolyse von GTP notwendig sind, finden sich in der sogenannten phosphatbindenden Schleife (As 13-20), im Bereich von Schalter I und unmittelbar vor Schalter II, sowie an den Positionen 116-121 und 160-162. Aminosäuren, die an der Interaktion mit GEF teilnehmen, sind ebenfalls im Bereich der Schalter I und II lokalisiert. Alle genannten Sequenzabschnitte sind bei RhoA und RhoC identisch; RhoB weicht nur an einzelnen Positionen ab.

Keines der veröffentlichten dreidimensionalen Rho-Strukturmodelle enthält den bei dieser Arbeit im Mittelpunkt stehenden C-Terminus nach As 181. Auch die verwandte GTPase Ras konnte nur ohne das Carboxyende kristallisiert werden [136]. Der Grund dafür liegt offenbar darin, daß der C-Terminus stark beweglich ist und keine feste Konformation annimmt [29]. Über Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und der Rolle des C-Terminus bei der Bestimmung des Rekrutierungsmusters kann somit wenig Konkretes gesagt werden. Die Kenntnis der Stelle, an der das bewegliche Carboxyende im Molekül „verankert“ ist (Ala181), kann jedoch als Grundlage für gezielte Spekulationen dienen.

Betrachtet man Rho-Strukturmodelle (<http://molbio.info.nih.gov/cgi-bin/pdb>, Brookhaven-Codes 1a2b, 1ftn, 1tx4;) mit einer der im Internet verfügbaren Visualisierungsprogramme (z.B. RasMol, <http://www.umass.edu/microbio/rasmol>), fällt auf, daß die Guaninnukleotidbindungsstelle und die Schleifen, die im Laufe des GTPase-Zyklus ihre Konformation ändern (Schalter I und II), der „Wurzel“ des C-Terminus gegenüberliegen. GAP bindet ebenfalls an die dem Carboxyende abgewandte Seite von Rho (1tx4). Aufgrund dieser Strukturdaten könnten also Interaktionen, an denen der C-Terminus beteiligt ist, vom „Schaltzustand“ der GTPase unabhängig sein. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, daß sowohl GTP-gebundenes (RhoA<sup>G14V</sup>) als auch GDP-gebundenes (RhoA<sup>T19N</sup>) Rho zum *Shigella*-Invasionskomplex rekrutiert werden.

Die Oberflächensegmente von Rho, die für die Interaktion mit Effektorproteinen notwendig und hinreichend sind, sind weniger präzise definiert, und es ist hier nur eine grobe Orientierung möglich [52]. Der Abschnitt von As 23-40 beinhaltet den Schalter I, und liegt somit dem C-Terminus gegenüber. Die zweite Region, innerhalb derer für die Interaktion mit *Downstream*-Effektoren wichtige Reste vermutet werden, läßt sich in drei Bereiche unterteilen. As 79-84 verlaufen als  $\beta$ -Faltblatt verdeckt im Inneren des Proteins und sind somit für Protein-Protein-Interaktionen nicht von unmittelbarem Interesse. As 85-92 liegen oberflächlich in einer Mulde, deren Rand unter anderem von Resten des Schalters I gebildet wird, dem Carboxyterminus

vermutlich diametral entgegengesetzt. As 75-78 sind dagegen auf der Seite lokalisiert, auf der auch der C-Terminus aus dem Molekül herausragt. Ob sich daraus Interferenzen zwischen Protein-Protein-Interaktionen und Funktionen des C-Terminus ergeben, hängt unter anderem davon ab, welches die möglichen Konformationen des C-Terminus sind und ob die As 75-78 überhaupt eine Rolle für die Vermittlung von Bindungen mit Effektormolekülen spielen.

#### 4.2.8 Rekrutierung anderer Proteine während der Zellinvasion durch *Shigella*

Während diese Arbeit geschrieben wurde, wurde berichtet, daß das *Shigella*-Invasin IpaC die Aktivierung der kleinen GTPasen Cdc42 und (nachfolgend) Rac induziert [174]. Es wurde gezeigt, daß auch Cdc42 und Rac in einem Muster, das dem von RhoA ähnelt, an die Bakterieneintrittsstelle rekrutiert werden [63] und für die Epithelzellinvasion durch *Shigella* ebenfalls essentiell zu sein scheinen [122]. Das Klasse-IX-Myosin und GAP myr5 weist dagegen ein Rekrutierungsmuster auf, das sich lichtmikroskopisch mit demjenigen von RhoC deckt [63].

Ob Rekrutierungsmuster und -mechanismus von RhoA/Cdc42/Rac einerseits und RhoB/C/D/myr5 andererseits identisch oder lediglich sehr ähnlich sind, ist unklar. Die Vorstellung einer Aktivierungskaskade von Cdc42 über Rac zu RhoA [130] läßt an ein identisches Verteilungsmuster dieser drei GTPasen denken. Während für jedes dieser Proteine spezifische Rekrutierungsmechanismen nicht ausgeschlossen werden können, erscheint es möglich, daß die in dieser Arbeit untersuchten prä-C-terminalen Sequenzabschnitte von RhoA und RhoC – Aa 181 bis 188 – Prototypen zweier das jeweilige Rekrutierungsmuster bestimmender Peptidmotive darstellen, die sich auch in den anderen entsprechend rekrutierten Proteinen wiederfinden. Nachdem gezeigt werden konnte, daß auch Cdc42 und Rac im wesentlichen dem Rekrutierungsmuster von RhoA folgen [63], wird es interessant sein zu untersuchen, ob für das RhoA-Rekrutierungsmuster eine Konsensussequenz bei kleinen GTPasen der Rho-Familie definiert werden kann und ob eine solche Konsensussequenz gegebenenfalls auch bei Nicht-Rho-Proteinen mit ähnlichem Rekrutierungsmuster zu finden ist. Schließlich ist von Interesse, ob die Proteinfaltung und damit mögliche intramolekulare Interaktionen der C-terminalen Region eine Rolle spielen für die Determinierung des Rekrutierungsmusters. Dazu wird das C-terminale Motiv derzeit im Labor Adam mit Nicht-Rho-Proteinen fusioniert. Damit soll geklärt werden, ob das hier beschriebene C-terminale Rekrutierungsmotiv allein ausreicht, um ein beliebiges Protein nach Induktion durch invasive Shigellen in spezifischer Weise in den bakteriellen Invasionskomplex zu rekrutieren. Weitere offene Fragen sind, ob auch der Austausch nur eines der beiden Lysine 186/187 von RhoA gegen Arginin ausreichend ist, um ein Rekrutierungsmuster des RhoC-Typs zu erhalten, ob umgekehrt die Substitution der beiden Arginine 186/187 von RhoC

durch Lysin hinreichend ist, um das Rekrutierungsverhalten zu ändern, oder ob weitere Positionen im Bereich der As 181-188 essentiell sind für die Bestimmung des Rekrutierungsmusters von RhoA.

#### 4.2.9 Überlegungen zum Rekrutierungsmechanismus

Durch den bakteriellen Invasionsreiz müssen an der Invasionsstelle in oder an der Plasmamembran „Verankerungspunkte“, also integrale Membranproteine, Lipide oder andere Moleküle, mit denen die rekrutierten Proteine direkt oder indirekt über weitere Mittlermoleküle interagieren können, in einem Muster angeordnet und/oder zugänglich gemacht werden, das dem beobachteten Rekrutierungsmuster entspricht. Mindestens zwei Typen von „Verankerungspunkten“ scheinen für die beiden bekannten Muster erforderlich zu sein. Ob Rho und die anderen rekrutierten Proteine am „Zielort“ mit weiteren Proteinen, oder – vermittelt durch den lipophilen C-Terminus – mit Membranlipiden, oder mit beiden interagieren, ist nicht geklärt.

In der Plasmamembran enthaltene Phosphoinositide können an zwei Stellen spezifisch mit Rho-GTPasen interagieren: an der Insertionsregion (As 124-136 von RhoA [185]) und dem C-Terminus [118] und sind somit mögliche Determinanten der differentiellen Rekrutierung. 3,4,5-PIP<sub>3</sub> und 3,4-PIP<sub>2</sub> binden an Rac1 und RhoA, nicht aber an Cdc42, während 4,5-PIP<sub>2</sub> mit Cdc42 stärker interagiert als mit den anderen beiden GTPasen. Es läßt sich spekulieren, daß auch zwischen RhoA einerseits und RhoB, C und D andererseits Unterschiede hinsichtlich der Interaktion mit verschiedenen Phosphoinositiden bestehen, welche das Phänomen der differentiellen Rekrutierung erklären könnten.

Wie gelangen die rekrutierten Moleküle an die Bakterieneintrittsstelle? Prinzipiell denkbar scheint, daß sie durch ungerichtete Brown'sche Molekülbewegung unter anderem an die Invasionsstelle diffundieren und dort spezifisch konzentriert werden, indem sie an „ihre“ lokalen „Verankerungspunkte“ binden. Ebenso könnten sie spezifisch mit Komponenten an der Oberfläche von verschiedenen Vesikeln interagieren, deren differentielle Rekrutierung zur Invasionsstelle durch *Shigella* ausgelöst wird. Theoretisch denkbar wäre in diesem Zusammenhang auch, daß das Pathogen die Expression von Membranproteinen induziert, die rekrutierten Moleküle bereits am endoplasmatischen Retikulum an diese Proteine binden und dann gemeinsam mit ihnen an die vom Bakterium definierte Region der Plasmamembran transportiert werden. Allerdings ist die Zeit von wenigen Minuten, innerhalb derer die Invasion abläuft, für einen derartigen Prozeß wahrscheinlich nicht ausreichend.

Fraglich ist ebenfalls, ob Rho-GTPasen allein rekrutiert werden oder im Komplex mit einem

oder mehreren weiteren Proteinen. Es ist bekannt, daß Rho im Zytoplasma mit RhoGDI komplexiert vorliegt [80, 94]. Der Rho/RhoGDI-Komplex könnte von einem oder mehreren hypothetischen „Rekrutierungsfaktoren“ spezifisch erkannt, daraufhin gespalten werden, und Rho würde allein an die Membran rekrutiert. Für die kleine GTPase Rab und RabGDI wurde ein solcher Rekrutierungsmechanismus nachgewiesen [133]; allerdings unterscheiden sich RhoGDI und RabGDI hinsichtlich Größe und Aminosäuresequenz beträchtlich [84]. Man könnte andererseits spekulieren, daß Rho-GTPasen und RhoGDI gemeinsam bis an die Membran rekrutiert werden und der Komplex erst unmittelbar am Zielort gespalten wird. Das ähnliche Rekrutierungsmuster von RhoA, Rac und Cdc42 könnte mit diesem Modell erklärt werden. RhoGDI bindet Rho-GTPasen über eine hydrophobe Tasche, welche die C-terminal angefügte Prenylgruppe von posttranslational modifiziertem Rho aufnimmt, sowie über eine Protein-Protein-Interaktion, die wahrscheinlich C-terminale Aminosäuren von Rho involviert. Die Protein-Protein-Interaktion ist alleine für die Komplexbildung nicht ausreichend, könnte der Bindung aber Spezifität verleihen [62, 75, 84]. Die Bindungsenergie von RhoGDI für Cdc42 beträgt etwa 12kcal/mol und liegt damit im selben Bereich wie die Bindungsenergie für geranylgeranyliertes und carboxymethyliertes Zystein an Lipidmembranen [62, 164]. Dies deutet darauf hin, daß sehr feine regulatorische Impulse genügen, um das Verhältnis von membrangebundenen zu zytosolischen RhoGTPasen substantiell zu verändern. Mögliche Regulatoren der Rho/RhoGDI-Bindung sind Membranphospholipide wie Phosphatidat und Phosphoinositide, für die gezeigt werden konnte, daß sie einen Komplex aus RhoGDI und Rac spalten [37]. Verschiedene Phosphoinositide könnten somit gleichzeitig sowohl das Überspringen von Rho-GTPasen an die Membran steuern als auch die Spezifität der Rekrutierung bestimmen, ohne daß dafür unterschiedliche GDIs notwendig wären. Nach Trennung von Rho und RhoGDI könnte der – GEF-gesteuerte – Austausch von GDP zu GTP erfolgen, und das Protein befände sich schließlich am richtigen Ort im erforderlichen Aktivitätszustand.

#### 4.2.10 *Shigella* als zellbiologisches Werkzeug

Eine Fülle von Proteinen, die mit RhoA *in vitro* und *in vivo* interagieren können, sind beschrieben worden. Oft wurde in diesen Studien nur RhoA untersucht, oder es konnten zwischen den Isoformen RhoA, B und C keine Unterschiede gefunden werden. Aufgrund der fast vollständigen Übereinstimmung in den relevanten Molekülregionen kann man davon ausgehen, daß viele Rho-Effektorproteine von allen drei Isoformen aktiviert werden können. Ob eine Interaktion wirklich stattfindet und welche Folgen sie hat, hängt aber letztendlich von der gleichzeitigen Präsenz der beiden Partner an einem genau bestimmten Ort innerhalb der Zelle ab. Durch das

*Shigella*-Invasionsmodell ergibt sich eine Möglichkeit, die Rolle des Ortsaspekts für die Wirkung von Proteinen innerhalb von Zellen näher zu untersuchen. Kürzlich konnte so die Relevanz des Rekrutierungsphänomens für die Selektion eines aus mehreren biochemisch möglichen Interaktionspartnern *in vivo* am Beispiel von *myr5* gezeigt werden: *Myr5* reagiert *in vitro* in ähnlicher Weise mit RhoA-C, kolokalisiert während der Shigelleninvasion aber nur mit RhoC und nicht mit RhoA [63]. So scheint der tatsächliche Reaktionspartner von *myr5* in der Zelle durch die spezifische Rekrutierung bestimmt zu werden. Auch anhand von metastasierenden Tumorzellen wurde unlängst ein Unterschied der Funktionen von RhoA und RhoC *in vivo* aufgezeigt [39]. Ob dieser Unterschied durch Interaktion mit verschiedenen Effektoren oder ebenfalls durch ein Rekrutierungsphänomen (oder durch beide Mechanismen) erklärt werden kann, ist jedoch noch unklar.

#### 4.2.11 Modell und natürliche Verhältnisse

Alle Ergebnisse wurden an einem Zellkulturmodell mit HeLa-Zellen gewonnen, in welche die genetische Information für die untersuchten Proteine künstlich eingeführt wurde. Was die Invasion von *Shigella* unter natürlichen Verhältnisse betrifft, entsteht eine Reihe von neuen Fragen, die mit dem hier benutzten experimentellen System nicht ohne weiteres beantwortet werden können. RhoA und RhoC sind in Säugetiergeweben weit verbreitet, das Expressionsniveau variiert allerdings in Abhängigkeit vom Gewebetyp. Während RhoA in allen untersuchten Geweben detektiert werden konnte, wurde RhoC z. B. in Muskel und Milz nicht nachgewiesen [51]. RhoB wird in vielen Zelltypen nicht konstitutiv exprimiert, sondern muß zunächst induziert werden [81]. RhoD ist im Gewebe von Mäusen weitverbreitet [126]. Darmgewebe wurde jedoch in keiner der Arbeiten über Expression von Rho untersucht. Man muß annehmen, daß nur konstitutiv exprimiertes Rho für die Regulierung der bakteriellen Invasion zur Verfügung stehen kann, da der Invasionsprozeß in einem Zeitraum (wenige Minuten) abgeschlossen ist, in dem wahrscheinlich keine ausreichende *De-novo*-Proteinsynthese stattfinden kann. Welche Rho-GTPasen in menschlichen Enterozyten tatsächlich exprimiert werden, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt.

Es ist gezeigt worden, daß Rho für die Epithelzellinvasion durch *Shigella* notwendig ist, indem HeLa- [3] und eine Reihe anderer kultivierbarer Zellen [183] mit C3-Exoenzym bzw. *Clostridium difficile* Toxin B behandelt wurden. Da diese Toxine nicht spezifisch für einzelne Isoformen sind [160], bleibt ungeklärt, ob alle Rho-Isoformen für die Invasion essentiell sind, oder nur einzelne. Diese Frage stellt sich vor allem für die Rho-Isoformen B und C, sowie für RhoD, für die mit den hier verwendeten Methoden kein Unterschied im Rekrutierungsmuster



festgestellt werden konnte. Können sich diese drei GTPasen während der Internalisierung des Pathogens funktionell gegenseitig vertreten, oder nehmen sie unterschiedliche Funktionen wahr? Um entsprechende Antworten zu finden, müßten Enterozyten auf ihren Gehalt an Rho-Isoformen untersucht, und andererseits durch selektive Blockierung einzelner Isoformen deren Rollen im Invasionsprozeß determiniert werden. Durch die Identifizierung von Aminosäuresequenzabschnitten, die das differentielle Rekrutierungsmuster definieren, ergibt sich ein Ansatzpunkt für eine solche isoformspezifische Blockierung. Die weitere Aufdeckung des komplexen Zusammenspiels zwischen *Shigella* und der Darmepithelzelle im Rahmen der Epithelzellinvasion ist somit von hohem bakteriologischem, zellbiologischem und pathophysiologischem Interesse und verspricht ein vertieftes Verständnis bakterieller Pathogenitätsmechanismen.

## 5 Zusammenfassung

*Shigella* ist der Erreger der bakteriellen Dysenterie (Ruhr), einer entzündlichen Erkrankung des Dickdarms. Notwendige Bedingung für die Pathogenese der Krankheit ist die Invasion von Darmepithelzellen durch den Erreger. Durch Sekretion von Invasionsproteinen (Ipa) induziert das Bakterium dabei seine eigene Aufnahme in Zellen, die normalerweise keine phagozytische Aktivität aufweisen. *Shigella* löst in der Wirtszelle Rearrangements des Aktinzytoskeletts aus, die zum Auswachsen von Plasmamembranprotrusionen und zur Bildung einer blütenkelchähnlichen Struktur führen. Innerhalb dieser Struktur wird das Pathogen schließlich internalisiert.

Die Umbauvorgänge am Aktinzytoskelett sind abhängig von der Funktion eines Wirtszellproteins, der kleinen GTPase Rho. Rho bildet zusammen mit weiteren verwandten Proteinen wie Rac und Cdc42 eine Gruppe (Rho-Familie) innerhalb der Superfamilie der Ras-ähnlichen kleinen GTPasen und funktioniert als molekularer Schalter: Im GTP-gebundenen Zustand ist das Molekül in der Lage, Effektoren zu aktivieren, nach Hydrolyse von GTP zu GDP befindet sich das Protein dagegen im „Aus“-Zustand. Drei Isoformen von Rho (A, B und C) sind beschrieben, deren Sequenzen zu etwa 90% identisch sind und die sich auch von ihren biochemischen Eigenschaften her weitgehend ähneln. Daher konzentrierte sich das wissenschaftliche Interesse bislang vorwiegend auf eine Isoform, RhoA. Allerdings wurden in der Art der posttranslationalen Modifikation und in der intrazellulären Lokalisation schon frühzeitig Unterschiede zwischen RhoB einerseits und RhoA und C andererseits aufgezeigt. Im Laufe der Zellinvasion durch *Shigella* werden Rho-Isoformen differentiell an die Bakterieneintrittsstelle rekrutiert, wobei sich lichtmikroskopisch zwei Muster definieren lassen, anhand derer sich RhoA gegen RhoB und RhoC abgrenzen läßt: RhoA akkumuliert vorwiegend um die eindringenden Bakterien herum, während sich RhoB und RhoC hauptsächlich in den bakterieninduzierten Membranprotrusionen konzentrieren.

Ziel der vorliegenden Studie war es, einen Abschnitt der Aminosäuresequenz der Rho-Isoformen, der die Art des Rekrutierungsmusters determiniert oder zumindest beeinflusst, näher zu charakterisieren. Darüber hinaus wurde der Frage nachgegangen, ob sich das Rekrutierungsphänomen auf die drei Isoformen RhoA, B und C beschränkt, oder ob auch andere, verwandte kleine GTPasen an die Bakterieneintrittsstelle transloziert werden können. Zu diesem Zweck wurde hier das Rekrutierungsverhalten der kleinen GTPase RhoD, die den drei Isoformen A, B und C auf der Primärstrukturebene nur zu etwa 50% homolog ist, untersucht. Durch die Herstellung

einer Reihe mit einem Peptid-*tag* versehener Rho-(Hybrid-)Konstrukte durch PCR-vermittelte gezielte Mutagenese und Analyse dieser Konstrukte in einem HeLa-Zell-Modell gelang es, Primärstrukturabschnitte einzugrenzen, welche die Ausprägung des einen oder anderen Rekrutierungstyps determinieren. Ebenso wurde eine entsprechende Rolle für andere Abschnitte ausgeschlossen.

Das Vorhandensein der CaaX-Gruppe, Ort der posttranslationalen Isoprenylierung und Carboxymethylierung von Rho, ist zwar – wie bereits bekannt war – eine notwendige Voraussetzung für den Ablauf des Rekrutierungsphänomens an sich, das Motiv leistet aber keinen Beitrag zur Bestimmung des differentiellen Rekrutierungsmusters. Auch die Phosphorylierung von RhoA an Ser188 durch die Proteinkinase A (PKA) scheint im Zusammenhang mit der besonderen Rekrutierung dieser Isoform keine Rolle zu spielen. Dagegen konnte ein prä-C-terminal gelegener Abschnitt von acht Aminosäuren eingegrenzt werden, der notwendige Informationen für die Expression des jeweiligen Translokationsmusters während der Shigelleninvasion tragen muß: Der Austausch der Aminosäuren 181-188 zwischen RhoA und RhoC führt zum Wechsel der Rekrutierungsmuster. Nach näherer Untersuchung des präterminalen Abschnitts konnte ein Motiv von zwei Lysin (Lys186-Lys187) definiert werden, das für die Ausprägung des RhoA-Rekrutierungsmusters essentiell ist.

Erstmals wurde hier nachgewiesen, daß außer RhoA, B und C zumindest noch eine weitere verwandte kleine GTPasen an die Bakterieneintrittsstelle rekrutiert werden kann. Interessanterweise wird auch RhoD, ein Protein, das sich in Funktion und Primärstruktur deutlich von den drei „klassischen“ Isoformen A, B und C abgrenzen läßt, im Laufe der Zellinvasion durch *Shigella* transloziert und folgt dabei dem bereits bekannten Rekrutierungsmuster von RhoB und RhoC.

Die gezeigten Ergebnisse lenken die Aufmerksamkeit auf die Bedeutung einer präzise definierten subzellulären Lokalisation für die Funktion von Biomolekülen und geben Anlaß zur Spekulation, daß auch biochemisch sehr ähnliche Proteine wie RhoA und RhoC lediglich aufgrund eines unterschiedlichen Verteilungsmusters unterschiedliche Aufgaben erfüllen könnten. Nach Identifizierung der das differentielle Rekrutierungsmuster definierenden Aminosäuren dürfte eine spezifische Blockierung einzelner Isoformen möglich werden. Dieser Ansatz könnte zu einem besseren Verständnis der konkreten Rolle der jeweiligen Isoformen für die Epithelzellinvasion durch *Shigella* führen.

## Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1-1</i> Durch posttranslationale Isoprenylierung und Methylierung erhält Rho einen lipophilen C-Terminus .....	17
<i>Abb. 1-2</i> Rho und ERM-Proteine regulieren sich wechselseitig .....	26
<i>Abb. 1-3</i> DNS-Sequenzen von RhoA, B und C im Vergleich.....	29
<i>Abb. 1-4</i> DNS-Sequenzen von RhoA und RhoD im Vergleich .....	30
<i>Abb. 3-1</i> PCR-Schema für RhoA/B/C-Konstrukte.....	49
<i>Abb. 3-2</i> PCR-Schema für RhoD-Konstrukte .....	50
<i>Abb. 3-3</i> Schema des Klonierungsvektors V1.....	51
<i>Abb. 3-4</i> Schema des Klonierungsvektors V2.....	51
<i>Abb. 3-5</i> Schema des Klonierungsvektors V3.....	52
<i>Abb. 3-6</i> Schema des Klonierungsvektors V4.....	53
<i>Abb. 3-7</i> Klonieren der <i>rhoA/B/C</i> -PCR-Produkte in pUC19 .....	54
<i>Abb. 3-8</i> Klonieren der kompletten <i>vsv-rhoA/B/C</i> -DNS-Konstrukte in pKC3 .....	55
<i>Abb. 3-9</i> Klonieren der <i>rhoD</i> -PCR-Produkte in pUC19 .....	56
<i>Abb. 3-10</i> Klonieren der <i>rhoD</i> -PCR-Produkte in pKC3 mit <i>vsv-tag</i> .....	57
<i>Abb. 3-11</i> Expression der auf <i>rhoA, B</i> oder <i>C</i> basierenden Konstrukte in HeLa-Zellen.....	60
<i>Abb. 3-12</i> Expression der auf <i>rhoD</i> basierenden Konstrukte in HeLa-Zellen.....	61
<i>Abb. 3-13</i> Rekrutierungsverhalten von RhoA (a-c; d-g), RhoB (h-k) und RhoC (l-n).....	62
<i>Abb. 3-14</i> Rekrutierungsverhalten von RhoD.....	63
<i>Abb. 3-15</i> Schematische Darstellung der Konstrukte RhoA <sup>T19N</sup> (a) und RhoA <sup>G14V</sup> (b). .....	64
<i>Abb. 3-16</i> Rekrutierungsverhalten von RhoA <sup>T19N</sup> (a-c) und RhoA <sup>G14V</sup> (d-f) .....	64
<i>Abb. 3-17</i> Schematische Darstellung der Konstrukte RhoAAB (a), RhoBBA (b), RhoCCA (c) und RhoDDA (d)..	65
<i>Abb. 3-18</i> Rekrutierungsverhalten von RhoAAB (a-c), RhoBBA (d-f), RhoCCA (g-i) und RhoDDA (k-m) .....	66
<i>Abb. 3-19</i> Schematische Darstellung des Konstrukts RhoA <sup>S188P</sup> .....	67
<i>Abb. 3-20</i> Rekrutierungsverhalten von RhoA <sup>S188P</sup> .....	67
<i>Abb. 3-21</i> Schematische Darstellung der Konstrukte RhoCAC (a) und RhoACA (b).....	68
<i>Abb. 3-22</i> Rekrutierungsverhalten von RhoCAC (a-c) und RhoACA (d-f) .....	68
<i>Abb. 3-23</i> Schematische Darstellung des Konstrukts RhoA <sup>R183K</sup> .....	69
<i>Abb. 3-24</i> Rekrutierungsverhalten von RhoA <sup>R183K</sup> .....	69
<i>Abb. 3-25</i> Schematische Darstellung des Konstrukts RhoA <sup>KK186-187RR</sup> .....	70
<i>Abb. 3-26</i> Rekrutierungsverhalten von RhoA <sup>KK186-187RR</sup> .....	70

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 2-1</b> Ausgangsplasmide für Klonierungsvektoren.....	32
<b>Tab. 2-2</b> DNS-Lösung für Agarosegelelektrophorese.....	33
<b>Tab. 2-3</b> PCR-Ansatz mit <i>Taq</i> -Polymerase.....	35
<b>Tab. 2-4</b> PCR-Ansatz mit <i>Pwo</i> -Polymerase.....	36
<b>Tab. 2-5</b> Verwendete Oligonukleotide.....	37
<b>Tab. 2-6</b> PCR-Matrizen.....	38
<b>Tab. 2-7</b> Reaktionsansatz für DNS-Hybridisierung.....	38
<b>Tab. 2-8</b> Reaktionsansatz für Ligation.....	39
<b>Tab. 2-9</b> Primer für die Sequenzierung der DNS-Konstrukte.....	40
<b>Tab. 2-10</b> Reaktionsbedingungen für Sequenzierung.....	41
<b>Tab. 2-11</b> Zusammensetzung eines 5,5%-igen Sequenziergels.....	41
<b>Tab. 2-12</b> In der Studie verwendete Rho-Konstrukte, die zu Beginn der Arbeit bereits vorhanden waren.....	42
<b>Tab. 2-13</b> Antikörper und Farbstoffe.....	45
<b>Tab. 2-14</b> Mikroskopobjektive.....	45
<b>Tab. 2-15</b> Filtersätze für Immunfluoreszenzmikroskopie.....	46
<b>Tab. 3-1</b> PCR-Reaktionsbedingungen für RhoA/B/C-Konstrukte.....	49
<b>Tab. 3-2</b> PCR-Reaktionsbedingungen für RhoD-Konstrukte.....	50
<b>Tab. 3-3</b> Übersichtstabelle über die Klonierungsvektoren.....	53
<b>Tab. 3-4</b> Im Rahmen der vorliegenden Studie hergestellte Konstrukte.....	57
<b>Tab. 3-5</b> Im Rahmen der vorliegenden Studie transformierte und asservierte Stämme von <i>E. coli</i> .....	58
<b>Tab. 3-6</b> Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Transfektions-Infektions-Experimenten.....	71

# Literaturverzeichnis

1. **Adam T.** A role for the small GTPase rho in epithelial cell invasion by *Shigella*. *Bull.Inst.Pasteur* 1998; **96**: 93-102.
2. **Adam T, Arpin M, Prevost MC, Gounon P, Sansonetti PJ.** Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. *J.Cell Biol.* 1995; **129**: 367-381.
3. **Adam T, Giry M, Boquet P, Sansonetti P.** Rho-dependent membrane folding causes *Shigella* entry into epithelial cells. *EMBO J.* 1996; **15**: 3315-3321.
4. **Adamson P, Marshall CJ, Hall A, Tilbrook PA.** Post-translational modifications of p21rho proteins. *J.Biol.Chem.* 1992; **267**: 20033-20038.
5. **Adamson P, Paterson HF, Hall A.** Intracellular localization of the P21rho proteins. *J.Cell Biol.* 1992; **119**: 617-627.
6. **Alam J, Cook JL.** Reporter genes: Application to the study of mammalian gene transcription. *Anal.Biochem.* 1990; **188**: 245-254.
7. **Alberts AS, Treisman R.** Activation of RhoA and SAPK/JNK signalling pathways by the RhoA- specific exchange factor mNET1. *EMBO J.* 1998; **17**: 4075-4085.
8. **Allaoui A, Mounier J, Prevost MC, Sansonetti PJ, Parsot C.** icsB: a *Shigella flexneri* virulence gene necessary for the lysis of protrusions during intercellular spread. *Mol.Microbiol.* 1992; **6**: 1605-1616.
9. **Allaoui A, Sansonetti PJ, Menard R, et al.** MxiG, a membrane protein required for secretion of *Shigella spp.* Ipa invasins: involvement in entry into epithelial cells and in intercellular dissemination. *Mol.Microbiol.* 1995; **17**: 461-470.
10. **Allaoui A, Sansonetti PJ, Parsot C.** MxiD, an outer membrane protein necessary for the secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins. *Mol.Microbiol.* 1993; **7**: 59-68.
11. **Amano M, Chihara K, Kimura K, et al.** Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* 1997; **275**: 1308-1311.
12. **Amano M, Ito M, Kimura K, et al.** Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J.Biol.Chem.* 1996; **271**: 20246-20249.
13. **Amano M, Mukai H, Ono Y, et al.** Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N. *Science* 1996; **271**: 648-650.
14. **Andreason GL, Evans GA.** Optimization of electroporation for transfection of mammalian cell lines. *Anal.Biochem.* 1989; **180**: 269-275.
15. **Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al.** Short protocols in molecular biology. New York: John Wiley & Sons, 1995.
16. **Bahrani FK, Sansonetti PJ, Parsot C.** Secretion of Ipa proteins by *Shigella flexneri*: inducer molecules and kinetics of activation. *Infect.Immun.* 1997; **65**: 4005-4010.
17. **Barzu S, Benjelloun Touimi Z, Phalipon A, Sansonetti P, Parsot C.** Functional analysis of the *Shigella flexneri* IpaC invasin by insertional mutagenesis. *Infect.Immun.* 1997; **65**: 1599-1605.
18. **Bellis SL, Miller JT, Turner CE.** Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *J.Biol.Chem.* 1995; **270**: 17437-17441.
19. **Bennish ML, Wojtyniak BJ.** Mortality due to shigellosis: community and hospital data. *Rev.Infect.Dis.* 1991; **13**: S245-S251.
20. **Bernardini ML, Mounier J, d'Hauteville H, Coquis-Rondon M, Sansonetti PJ.** Identification of icsA, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1989; **86**: 3867-3871.
21. **Berryman M, Franck Z, Bretscher A.** Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *J.Cell Sci.* 1993; **105**: 1025-1043.
22. **Blaser MJ, Pollard RA, Feldman RA.** *Shigella* infections in the United States, 1974-1980. *J.Infect.Dis.* 1983; **147**: 771-775.
23. **Bokoch GM, Der CJ.** Emerging concepts in the Ras superfamily of GTP-binding proteins. *FASEB J.* 1993; **7**: 750-759.

24. **Bos JL.** Ras-like GTPases. *Biochim.Biophys.Acta* 1997; **1333**: M19-31.
25. **Boukharov AA, Cohen CM.** Guanine nucleotide-dependent translocation of RhoA from cytosol to high affinity membrane binding sites in human erythrocytes. *Biochem.J.* 1998; **330**: 1391-1398.
26. **Bourne HR, Sanders DA, McCormick F.** The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 1990; **348**: 125-132.
27. **Bourne HR, Sanders DA, McCormick F.** The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 1991; **349**: 117-127.
28. **Braga VM, Machesky LM, Hall A, Hotchin NA.** The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J.Cell Biol.* 1997; **137**: 1421-1431.
29. **Branden C, Tooze J.** A deletion mutant gene is used to produce truncated p21. In: Introduction to protein structure. New York and London: Garland Publishing, 1991;224.
30. **Buhl AM, Johnson NL, Dhanasekaran N, Johnson GL.** G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J.Biol.Chem.* 1995; **270**: 24631-24634.
31. **Carrington WA, Lynch RM, Moore EDW, Isenberg G, Fogarty KE, Fay FS.** Superresolution three-dimensional images of fluorescence in cells with minimal light exposure. *Science* 1995; **268**: 1483-1487.
32. **Cerione RA, Zheng Y.** The Dbl family of oncogenes. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1996; **8**: 216-222.
33. **Chang JH, Gill S, Settleman J, Parsons SJ.** c-Src regulates the simultaneous rearrangement of actin cytoskeleton, p190RhoGAP, and p120RasGAP following epidermal growth factor stimulation. *J.Cell Biol.* 1995; **130**: 355-368.
34. **Chardin P, Madaule P, Tavitian A.** Coding sequence of human rho cDNAs clone 6 and clone 9. *Nucleic.Acids.Res.* 1988; **16**: 2717.
35. **Chihara K, Amano M, Nakamura N, et al.** Cytoskeletal rearrangements and transcriptional activation of c-fos serum response element by Rho-kinase. *J.Biol.Chem.* 1997; **272**: 25121-25127.
36. **Chong LD, Traynor-Kaplan A, Bokoch GM, Schwartz MA.** The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* 1994; **79**: 507-513.
37. **Chuang TH, Bohl BP, Bokoch GM.** Biologically active lipids are regulators of Rac.GDI complexation. *J.Biol.Chem.* 1993; **268**: 26206-26211.
38. **Clark EA, Brugge JS.** Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995; **268**: 233-239.
39. **Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO.** Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for Rho C. *Nature* 2000; **406**: 532-535.
40. **Clerc P, Sansonetti PJ.** Entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells: evidence for directed phagocytosis involving actin polymerization and myosin accumulation. *Infect.Immun.* 1987; **55**: 2681-2688.
41. **Cossart P, Lecuit M.** Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* 1998; **17**: 3797-3806.
42. **Dallery Prudhomme E, Roumier C, et al.** Genomic structure and assignment of the RhoH/TTF small GTPase gene (ARHH) to 4p13 by in situ hybridization. *Genomics* 1997; **43**: 89-94.
43. **Dehio C, Prevost MC, Sansonetti PJ.** Invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri* induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60c-src-mediated signalling pathway. *EMBO J.* 1995; **14**: 2471-2482.
44. **Doll RF, Crandall JE, Dyer CA, Aucoin JM, Smith FI.** Comparison of promoter strengths on gene delivery into mammalian brain cells using AAV vectors. *Gene Ther.* 1996; **3**: 437-447.
45. **Dong JM, Leung T, Manser E, Lim L.** cAMP-induced morphological changes are counteracted by the activated RhoA small GTPase and the Rho kinase ROKalpha. *J.Biol.Chem.* 1998; **273**: 22554-22562.
46. **DuPont HL, Hornick RB, Snyder MJ, Libonati JP, Formal SB, Gangarosa EJ.** Immunity in shigellosis. II. Protection induced by oral live vaccine or primary infection. *J.Infect.Dis.* 1972; **125**: 12-16.
47. **Ellis RW, Defeo D, Shih TY, et al.** The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature* 1981; **292**: 506-511.
48. **Fay FS, Carrington W, Fogarty KE.** Three-dimensional molecular distribution in single cells analysed using the digital imaging microscope. *J.Microsc.* 1989; **153**: 133-149.
49. **Flatau G, Lemichez E, Gauthier M, et al.** Toxin-induced activation of the G protein p21Rho by deamidation of glutamine. *Nature* 1997; **387**: 729-733.

50. **Flinn HM, Ridley AJ.** Rho stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, p130 and paxillin. *J.Cell Sci.* 1996; **109**: 1133-1141.
51. **Fritz G, Lang P, Just I.** Tissue-specific variations in the expression and regulation of the small GTP-binding protein Rho. *Biochim.Biophys.Acta* 1994; **1222**: 331-338.
52. **Fujisawa K, Madaule P, Ishizaki T, et al.** Different regions of Rho determine Rho-selective binding of different classes of Rho target molecules. *J.Biol.Chem.* 1998; **273**: 18943-18949.
53. **Fukata Y, Kimura K, Oshiro N, Saya H, Matsuura Y, Kaibuchi K.** Association of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase and moesin: dual regulation of moesin phosphorylation by Rho-associated kinase and myosin phosphatase. *J.Cell Biol.* 1998; **141**: 409-418.
54. **Galan JE.** Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol.Microbiol.* 1996; **20**: 263-271.
55. **Gangarosa EJ, Perera DR, Mata LJ, Mendizabal-Morris C, Guzman G, Reller LB.** Epidemic Shiga bacillus dysentery in Central America. II. Epidemiologic studies in 1969. *J.Infect.Dis.* 1970; **122**: 181-190.
56. **Garrett MD, Self AJ, van Oers C, Hall A.** Identification of distinct cytoplasmic targets for ras/R-ras and rho regulatory proteins. *J.Biol.Chem.* 1989; **264**: 10-13.
57. **Geier GE, Modrich P.** Recognition sequence of the dam methylase of *Escherichia coli* K12 and mode of cleavage of Dpn I endonuclease. *J.Biol.Chem.* 1979; **254**: 1408-1413.
58. **Gilmore AP, Burrige K.** Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. *Nature* 1996; **381**: 531-535.
59. **Goldberg MB, Barzu O, Parsot C, Sansonetti PJ.** Unipolar localization and ATPase activity of IcsA, a *Shigella flexneri* protein involved in intracellular movement. *J.Bacteriol.* 1993; **175**: 2189-2196.
60. **Gong MC, Fujihara H, Somlyo AV, Somlyo AP.** Translocation of rhoA associated with Ca<sup>2+</sup> sensitization of smooth muscle. *J.Biol.Chem.* 1997; **272**: 10704-10709.
61. **Gorden J, Small PL.** Acid resistance in enteric bacteria. *Infect.Immun.* 1993; **61**: 364-367.
62. **Gosser YQ, Nomanbhoy TK, Aghazadeh B, et al.** C-terminal binding domain of Rho GDP-dissociation inhibitor directs N-terminal inhibitory peptide to GTPases. *Nature* 1997; **387**: 814-819.
63. **Graf B, Bähler M, Hilpelä P, Böwe C, Adam T.** Functional role for the class IX myosin myr5 in epithelial cell infection by *Shigella flexneri*. *Cell. Microbiol.* 2000; **2**: 601-616.
64. **Graham FL, Eb AJvd.** A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 1973; **52**: 456-467.
65. **Guasch RM, Scambler P, Jones GE, Ridley AJ.** RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol.Cell Biol.* 1998; **18**: 4761-4771.
66. **Hackam DJ, Rotstein OD, Schreiber A, Zhang Wj, Grinstein S.** Rho is required for the initiation of calcium signaling and phagocytosis by Fcγ receptors in macrophages. *J.Exp.Med.* 1997; **186**: 955-966.
67. **Hancock JF, Magee AI, Childs JE, Marshall CJ.** All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 1989; **57**: 1167-1177.
68. **Hardt WD, Chen LM, Schuebel KE, Bustelo XR, Galan JE.** *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 1998; **93**: 815-826.
69. **Harlow E.** Using antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
70. **High N, Mounier J, Prevost MC, Sansonetti PJ.** IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *EMBO J.* 1992; **11**: 1991-1999.
71. **Hill CS, Wynne J, Treisman R.** The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 1995; **81**: 1159-1170.
72. **Hinnisdaels S, Del-Favero J, Vauterin M.** Direct cloning of PCR products amplified with *Pwo* DNA polymerase. *Biotechniques* 1996; **20**: 186-188.
73. **Hirao M, Sato N, Kondo T, et al.** Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J.Cell Biol.* 1996; **135**: 37-51.
74. **Homma Y, Emori Y.** A dual functional signal mediator showing RhoGAP and phospholipase C-delta stimulating activities. *EMBO J.* 1995; **14**: 286-291.



75. **Hori Y, Kikuchi A, Isomura M, et al.** Post-translational modifications of the C-terminal region of the rho protein are important for its interaction with membranes and the stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins. *Oncogene* 1991; **6**: 515-522.
76. **Horiguchi Y, Inoue N, Masuda M, et al.** *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibers through deamidation of Gln- 63 of the GTP-binding protein Rho. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1997; **94**: 11623-11626.
77. **Hotchin NA, Hall A.** The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J.Cell Biol.* 1995; **131**: 1857-1865.
78. **Huang C, Ni Y, Wang T, Gao Y, Haudenschild CC, Zhan X.** Down-regulation of the filamentous actin cross-linking activity of cortactin by Src-mediated tyrosine phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 1997; **272**: 13911-13915.
79. **Ihara K, Muraguchi S, Kato M, et al.** Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J.Biol.Chem.* 1998; **273**: 9656-9666.
80. **Isomura M, Kikuchi A, Ohga N, Takai Y.** Regulation of binding of rhoB p20 to membranes by its specific regulatory protein, GDP dissociation inhibitor. *Oncogene* 1991; **6**: 119-124.
81. **Jahner D, Hunter T.** The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Mol.Cell Biol.* 1991; **11**: 3682-3690.
82. **Kadurugamuwa JL, Rohde M, Wehland J, Timmis KN.** Intercellular spread of *Shigella flexneri* through a monolayer mediated by membranous protrusions and associated with reorganization of the cytoskeletal protein vinculin. *Infect.Immun.* 1991; **59**: 3463-3471.
83. **Katayama M, Kawata M, Yoshida Y, et al.** The posttranslationally modified C-terminal structure of bovine aortic smooth muscle rhoA p21. *J.Biol.Chem.* 1991; **266**: 12639-12645.
84. **Keep NH, Barnes M, Barsukov I, et al.** A modulator of rho family G proteins, rhoGDI, binds these G proteins via an immunoglobulin-like domain and a flexible N- terminal arm. *Structure.* 1997; **5**: 623-633.
85. **Keller GH, Manak MM.** DNA Probes. New York: Stockton Press, 1989.
86. **Khan MU, Roy NC, Islam R, Huq I, Stoll B.** Fourteen years of shigellosis in Dhaka: an epidemiological analysis. *Int.J.Epidemiol.* 1985; **14**: 607-613.
87. **Kim KK, Hung LW, Yokota H, Kim R, Kim SH.** Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 Å resolution. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998; **95**: 10419-10424.
88. **Kimura K, Fukata Y, Matsuoka Y, et al.** Regulation of the association of adducin with actin filaments by Rho-associated kinase (Rho-kinase) and myosin phosphatase. *J.Biol.Chem.* 1998; **273**: 5542-5548.
89. **Kimura K, Ito M, Amano M, et al.** Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 1996; **273**: 245-248.
90. **Kinsella BT, Erdman RA, Maltese WA.** Posttranslational modification of Ha-ras p21 by farnesyl versus geranylgeranyl isoprenoids is determined by the COOH-terminal amino acid. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1991; **88**: 8934-8938.
91. **Kotani H, Takaishi K, Sasaki T, Takai Y.** Rho regulates association of both the ERM family and vinculin with the plasma membrane in MDCK cells. *Oncogene* 1997; **14**: 1705-1713.
92. **Kozma R, Sarner S, Ahmed S, Lim L.** Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol.Cell Biol.* 1997; **17**: 1201-1211.
93. **Kreis TE.** Microinjected antibodies against the cytoplasmic domain of vesicular stomatitis virus glycoprotein block its transport to the cell surface. *EMBO J.* 1986; **5**: 931-941.
94. **Kuroda S, Kikuchi A, Hirata K, et al.** Cooperative function of rho GDS and rho GDI to regulate rho p21 activation in smooth muscle. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1992; **185**: 473-480.
95. **LaBrec EH, Schneider H, Magnani TJ, Formal SB.** Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenesis of bacillary dysentery. *J.Bacteriol.* 1964; **88**: 1503-1518.
96. **Lamaze C, Chuang TH, Terlecky LJ, Bokoch GM, Schmid SL.** Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature* 1996; **382**: 177-179.
97. **Lang P, Gesbert F, Delespine Carmagnat M, Stancou R, Pouchelet M, Bertoglio J.** Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J.* 1996; **15**: 510-519.

98. **Lee AH, Suh YS, Sung JH, Yang SH, Sung YC.** Comparison of various expression plasmids for the induction of immune response by DNA immunization. *Mol.Cells.* 1997; **7**: 495-501.
99. **Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L.** 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.* 1996; **16**: 5313-5327.
100. **Leung T, Manser E, Tan L, Lim L.** A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J.Biol.Chem.* 1995; **270**: 29051-29054.
101. **Levine MM, DuPont HL, Formal SB, et al.** Pathogenesis of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) dysentery. *J.Infect.Dis.* 1973; **127**: 261-270.
102. **Lin PP, Barry RC, Smith DL, Smith JB.** In vivo acetylation identified at lysine 70 of human lens alphaA-crystallin. *Protein Sci.* 1998; **7**: 1451-1457.
103. **Machesky LM, Hall A.** Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J.Cell Biol.* 1997; **138**: 913-926.
104. **Mackay DJ, Hall A.** Rho GTPases. *J.Biol.Chem.* 1998; **273**: 20685-20688.
105. **Madaule P, Axel R.** A novel ras-related gene family. *Cell* 1985; **41**: 31-40.
106. **Madaule P, Eda M, Watanabe N, et al.** Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature* 1998; **394**: 491-494.
107. **Malhotra KT, Nicholas RA.** Substitution of lysine 213 with arginine in penicillin-binding protein 5 of *Escherichia coli* abolishes D-alanine carboxypeptidase activity without affecting penicillin binding. *J.Biol.Chem.* 1992; **267**: 11386-11391.
108. **Mathan MM, Mathan VI.** Ultrastructural pathology of the rectal mucosa in *Shigella* dysentery. *Am.J.Pathol.* 1986; **123**: 25-38.
109. **Mathan MM, Mathan VI.** Morphology of rectal mucosa of patients with shigellosis. *Rev.Infect.Dis.* 1991; **13 Suppl 4**: S314-S318.
110. **Matsuda S, Nakanishi H, Sasaki T, Takai Y.** A membrane-associated GDP/GTP exchange protein specific for Rho small GTP-binding protein – partial purification and characterization from rat brain. *Oncogene* 1996; **12**: 915-920.
111. **Matsui T, Amano M, Yamamoto T, et al.** Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* 1996; **15**: 2208-2216.
112. **Mellor H, Flynn P, Nobes CD, Hall A, Parker PJ.** PRK1 is targeted to endosomes by the small GTPase, RhoB. *J.Biol.Chem.* 1998; **273**: 4811-4814.
113. **Menard R, Prevost MC, Gounon P, Sansonetti P, Dehio C.** The secreted Ipa complex of *Shigella flexneri* promotes entry into mammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1996; **93**: 1254-1258.
114. **Menard R, Sansonetti P, Parsot C.** The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *EMBO J.* 1994; **13**: 5293-5302.
115. **Menard R, Sansonetti P, Parsot C, Vasselon T.** Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell* 1994; **79**: 515-525.
116. **Menard R, Sansonetti PJ, Parsot C.** Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J.Bacteriol.* 1993; **175**: 5899-5906.
117. **Mhalu FS, Moshi WK, Mbagi I.** A bacillary dysentery epidemic in Dar es Salaam, Tanzania. *J.Diarrhoeal Dis.Res.* 1984; **2**: 217-222.
118. **Missy K, Van Poucke V, Raynal P, et al.** Lipid products of phosphoinositide 3-kinase interact with Rac1 GTPase and stimulate GDP dissociation. *J.Biol.Chem.* 1998; **273**: 30279-30286.
119. **Miura Y, Kikuchi A, Musha T, et al.** Regulation of morphology by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI) in Swiss 3T3 cells. *J.Biol.Chem.* 1993; **268**: 510-515.
120. **Morii N, Teru-uchi T, Tominaga T, et al.** A rho gene product in human blood platelets. II. Effects of the ADP- ribosylation by botulinum C3 ADP-ribosyltransferase on platelet aggregation. *J.Biol.Chem.* 1992; **267**: 20921-20926.
121. **Mounier J, Bahrani FK, Sansonetti PJ.** Secretion of *Shigella flexneri* Ipa invasins on contact with epithelial cells and subsequent entry of the bacterium into cells are growth stage dependent. *Infect.Immun.* 1997; **65**: 774-782.
122. **Mounier J, Laurent V, Hall A, et al.** Rho family GTPases control entry of *Shigella flexneri* into epithelial cells but not intracellular motility. *J.Cell Biol.* 1999; **112**: 2069-2080.

123. **Mounier J, Vasselon T, Hellio R, Lesourd M, Sansonetti PJ.** *Shigella flexneri* enters human colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole. *Infect.Immun.* 1992; **60**: 237-248.
124. **Mukai H, Toshimori M, Shibata H, et al.** Interaction of PKN with alpha-actinin. *J.Biol.Chem.* 1997; **272**: 4740-4746.
125. **Muller RT, Honnert U, Reinhard J, Bahler M.** The rat myosin myr 5 is a GTPase-activating protein for Rho in vivo: essential role of arginine 1695. *Mol.Biol.Cell* 1997; **8**: 2039-2053.
126. **Murphy C, Saffrich R, Grummt M, et al.** Endosome dynamics regulated by a Rho protein. *Nature* 1996; **384**: 427-432.
127. **Neudauer CL, Joberty G, Tatsis N, Macara IG.** Distinct cellular effects and interactions of the Rho-family GTPase TC10. *Curr.Biol.* 1998; **8**: 1151-1160.
128. **Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP.** Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 1996; **86**: 345-348.
129. **Nishiyama T, Sasaki T, Takaishi K, et al.** rac p21 is involved in insulin-induced membrane ruffling and rho p21 is involved in hepatocyte growth factor- and 12-O- tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced membrane ruffling in KB cells. *Mol.Cell Biol.* 1994; **14**: 2447-2456.
130. **Nobes CD, Hall A.** Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995; **81**: 53-62.
131. **Nobes CD, Lauritzen I, Mattei MG, Paris S, Hall A, Chardin P.** A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J.Cell Biol.* 1998; **141**: 187-197.
132. **Noguchi A, Furuno T, Kawaura C, Nakanishi M.** Membrane fusion plays an important role in gene transfection mediated by cationic liposomes. *FEBS Letters* 1998; **433**: 169-173.
133. **Novick P, Zerial M.** The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1997; **9**: 496-504.
134. **Nusrat A, Giry M, Turner JR, et al.** Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1995; **92**: 10629-10633.
135. **Ockleford C.** The confocal laser scanning microscope (CLSM). *J.Pathol.* 1995; **176**: 1-2.
136. **Pai EF, Kregel U, Petsko GA, Goody RS, Kabsch W, Wittinghofer A.** Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H- ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* 1990; **9**: 2351-2359.
137. **Parker MT.** Bacillary dysentery. In: Wilson GS, Miles AA, Parker MT, eds. Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity. London: Edward Arnold (Publishers) Ltd., 1984;434-445.
138. **Paterson HF, Self AJ, Garrett MD, Just I, Aktories K, Hall A.** Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J.Cell Biol.* 1990; **111**: 1001-1007.
139. **Perdomo JJ, Gounon P, Sansonetti PJ.** Polymorphonuclear leukocyte transmigration promotes invasion of colonic epithelial monolayer by *Shigella flexneri*. *J.Clin.Invest.* 1994; **93**: 633-643.
140. **Perdomo OJ, Cavaillon JM, Huerre M, Ohayon H, Gounon P, Sansonetti PJ.** Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis. *J.Exp.Med.* 1994; **180**: 1307-1319.
141. **Prevost MC, Lesourd M, Arpin M, et al.** Unipolar reorganization of F-actin layer at bacterial division and bundling of actin filaments by plastin correlate with movement of *Shigella flexneri* within HeLa cells. *Infect.Immun.* 1992; **60**: 4088-4099.
142. **Pupo GM, Karaolis DKR, Lan R, Reeves PR.** Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infect.Immun.* 1997; **65**: 2685-2692.
143. **Ridley AJ, Hall A.** The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992; **70**: 389-399.
144. **Ridley AJ, Hall A.** Signal transduction pathways regulating Rho-mediated stress fibre formation: requirement for a tyrosine kinase. *EMBO J.* 1994; **13**: 2600-2610.
145. **Rittinger K, Walker PA, Eccleston JF, Smerdon SJ, Gamblin SJ.** Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue [see comments]. *Nature* 1997; **389**: 758-762.

146. **Rogerie F, Vimont-Vicary P.** Etude bactériologique des shigelloses dans la région du lac Kivu (Afrique Centrale). Evolution au cours des quinze dernières années (1968-1983). *Bull.Soc.Pathol.Exot.Filiales* 1986; **79**: 435-446.
147. **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; **239** : 487-491.
148. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
149. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1977; **74**: 5463-5467.
150. **Sansonetti PJ, Arondel J, Cantey JR, Prevost MC, Huerre M.** Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium. *Infect.Immun.* 1996; **64**: 2752-2764.
151. **Sansonetti PJ, Arondel J, Cavallion JM, Huerre M.** Role of interleukin-1 in the pathogenesis of experimental shigellosis. *J.Clin.Invest.* 1995; **96**: 884-892.
152. **Sansonetti PJ, Hale TL, Dammin GJ, Kapfer C, Collins HH, Jr., Formal SB.** Alterations in the pathogenicity of *Escherichia coli* K-12 after transfer of plasmid and chromosomal genes from *Shigella flexneri*. *Infect.Immun.* 1983; **39**: 1392-1402.
153. **Sansonetti PJ, Kopecko DJ, Formal SB.** Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect.Immun.* 1982; **35**: 852-860.
154. **Sansonetti PJ, Ryter A, Clerc P, Maurelli AT, Mounier J.** Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect.Immun.* 1986; **51**: 461-469.
155. **Sasaki T, Kato M, Takai Y.** Consequences of weak interaction of rho GDI with the GTP-bound forms of rho p21 and rac p21. *J.Biol.Chem.* 1993; **268**: 23959-23963.
156. **Sasaki T, Takai Y.** The Rho small G protein family-Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1998; **245**: 641-645.
157. **Sato N, Funayama N, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S.** A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *J.Cell Sci.* 1992; **103**: 131-143.
158. **Schmidt G, Sehr P, Wilm M, Selzer J, Mann M, Aktories K.** Gln 63 of Rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature* 1997; **387**: 725-729.
159. **Schwartz MA, Toksoz D, Khosravi Far R.** Transformation by Rho exchange factor oncogenes is mediated by activation of an integrin-dependent pathway. *EMBO J.* 1996; **15**: 6525-6530.
160. **Sehr P, Joseph G, Genth H, Just I, Pick E, Aktories K.** Glucosylation and ADP ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. *Biochemistry* 1998; **37**: 5296-5304.
161. **Shaw RJ, Henry M, Solomon F, Jacks T.** RhoA-dependent phosphorylation and relocalization of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts. *Mol.Biol.Cell* 1998; **9**: 403-419.
162. **Shiga K.** Ueber den Dysenteriebacillus (*Bacillus dysenteriae*). *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde u. Infektionskrankheiten. Erste Abteilung* 1898; **24**: 817-828, 870-874, 913-918.
163. **Silverman L, Resh MD.** Lysine residues form an integral component of a novel NH<sub>2</sub>- terminal membrane targeting motif for myristylated pp60v-src. *J.Cell Biol.* 1992; **119**: 415-425.
164. **Silvius JR, l'Heureux F.** Fluorimetric evaluation of the affinities of isoprenylated peptides for lipid bilayers. *Biochemistry* 1994; **33**: 3014-3022.
165. **Skoudy A, Tran Van Nhieu G, Mantis N, et al.** A functional role for ezrin during *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J.Cell Sci.* 1999; **112**: 2059-2068.
166. **Stryer L.** Biochemie. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akad. Verl., 1996.
167. **Takahashi K, Sasaki T, Mammoto A, et al.** Interaction of radixin with Rho small G protein GDP/GTP exchange protein Dbl. *Oncogene* 1998; **16**: 3279-3284.
168. **Takahashi K, Sasaki T, Mammoto A, et al.** Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J.Biol.Chem.* 1997; **272**: 23371-23375.

169. **Takaishi K, Sasaki T, Kameyama T, Tsukita S, Takai Y.** Translocation of activated Rho from the cytoplasm to membrane ruffling area, cell-cell adhesion sites and cleavage furrows. *Oncogene* 1995; **11**: 39-48.
170. **Takeuchi A, Sprinz H, LaBrec EH, Formal SB.** Experimental bacillary dysentery. An electron microscopic study of the response of the intestinal mucosa to bacterial invasion. *Am.J.Pathol.* 1965; **47**: 1011-1044.
171. **Teramoto H, Crespo P, Coso OA, Igishi T, Xu N, Gutkind JS.** The small GTP-binding protein rho activates c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases in human kidney 293T cells. Evidence for a Pak-independent signaling pathway. *J.Biol.Chem.* 1996; **271**: 25731-25734.
172. **Tominaga T, Ishizaki T, Narumiya S, Barber DL.** p160ROCK mediates RhoA activation of Na-H exchange. *EMBO J.* 1998; **17**: 4712-4722.
173. **Tran Van Nhieu G, Ben Ze'ev A, Sansonetti PJ.** Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin and the *Shigella* IpaA invasin. *EMBO J.* 1997; **16**: 2717-2729.
174. **Tran Van Nhieu G, Hall A, Sansonetti PJ.** IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells. *EMBO J.* 1999; **18**: 3249-3262.
175. **Tsukita S, Yonemura S.** ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1997; **9**: 70-75.
176. **Van Doren K, Hanahan D, Gluzman Y.** Infection of eucaryotic cells by helper-independent recombinant adenoviruses: Early region 1 is not obligatory for integration of viral DNA. *J.Virol.* 1984; **50**: 606-614.
177. **Vasselon T, Mounier J, Prevost MC, Hellio R, Sansonetti PJ.** Stress fiber-based movement of *Shigella flexneri* within cells. *Infect.Immun.* 1991; **59**: 1723-1732.
178. **Vincent S, Jeanteur P, Fort P.** Growth-regulated expression of rhoG, a new member of the ras homolog gene family. *Mol.Cell Biol.* 1992; **12**: 3138-3148.
179. **Walz W, Schmidt MA, Labigne-Roussel AF, Falkow S, Schoolnik G.** AFA-I, a cloned afimbrial X-type adhesin from a human pyelonephritic *Escherichia coli* strain. Purification and chemical, functional and serologic characterization. *Eur.J.Biochem.* 1985; **152**: 315-321.
180. **Wang F, Nobes CD, Hall A, Spiegel S.** Sphingosine 1-phosphate stimulates rho-mediated tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin in Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochem.J.* 1997; **324**: 481-488.
181. **Watanabe G, Saito Y, Madaule P, et al.** Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhophilin as targets of small GTPase Rho. *Science* 1996; **271**: 645-648.
182. **Watarai M, Funato S, Sasakawa C.** Interaction of Ipa proteins of *Shigella flexneri* with alpha5beta1 integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. *J.Exp.Med.* 1996; **183**: 991-999.
183. **Watarai M, Kamata Y, Kozaki S, Sasakawa C.** rho, a small GTP-binding protein, is essential for *Shigella* invasion of epithelial cells. *J.Exp.Med.* 1997; **185**: 281-292.
184. **Watarai M, Tobe T, Yoshikawa M, Sasakawa C.** Contact of *Shigella* with host cells triggers release of Ipa invasins and is an essential function of invasiveness. *EMBO J.* 1995; **14**: 2461-2470.
185. **Wei Y, Zhang Y, Derewenda U, et al.** Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications [letter]. *Nat.Struct.Biol.* 1997; **4**: 699-703.
186. **Wu H, Parsons JT.** Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J.Cell Biol.* 1993; **120**: 1417-1426.
187. **Yeramian P, Chardin P, Madaule P, Tavittian A.** Nucleotide sequence of human rho cDNA clone 12. *Nucleic.Acids.Res.* 1987; **15**: 1869.
188. **Zhang B, Zheng Y.** Regulation of RhoA GTP hydrolysis by the GTPase-activating proteins p190, p50RhoGAP, Bcr, and 3BP-1. *Biochemistry* 1998; **37**: 5249-5257.
189. **Zheng Y, Olson MF, Hall A, Cerione RA, Toksoz D.** Direct involvement of the small GTP-binding protein Rho in lbc oncogene function. *J.Biol.Chem.* 1995; **270**: 9031-9034.
190. **Zychlinsky A, Fitting C, Cavaillon JM, Sansonetti PJ.** Interleukin 1 is released by murine macrophages during apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *J.Clin.Invest.* 1994; **94**: 1328-1332.
191. **Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ.** *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 1992; **358**: 167-169.
192. **Zychlinsky A, Thirumalai K, Arondel J, Cantey JR, Aliprantis AO, Sansonetti PJ.** In vivo apoptosis in *Shigella flexneri* infections. *Infect.Immun.* 1996; **64**: 5357-5365.

## Lebenslauf

Name:	Thomas Haustein
geboren am	30. 07. 1973
Geburtsort:	Freiburg im Breisgau
1979-1983	Adolf-Reichwein-Grundschule in Freiburg
1983-1992	Berthold-Gymnasium in Freiburg
5/1992	Abitur
7/1992-9/1993	Fünfzehnmonatiger Zivildienst im Krankenpflagedienst der Universitäts- kliniken Freiburg
10/1993-9/1995	Medizinstudium an der Universität des Saarlandes in Homburg (Saar)
9/1995	Ärztliche Vorprüfung (sehr gut)
10/1995-1/1997	Medizinstudium an der Université Louis Pasteur (ULP) in Strasbourg (Frankreich) im Rahmen des Programms ECTS/ERASMUS während drei Semester
8/1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (gut)
4/1997- 12/2000	Medizinstudium an der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt Universität zu Berlin und Anfertigung der vorliegenden Promotionsarbeit
8/1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (gut)
10/1999 – 6/2000	Praktisches Jahr (Chirurgie, Innere Medizin) in der Fundación Jimenez Diaz – Clínica de la Concepción, Universidad Autónoma, Madrid (Spanien)
6/2000 – 9/2000	Praktisches Jahr (Dermatologie) an der Charité zu Berlin
12/2000	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (gut)

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den

Thomas Haustein

## Danksagung

Prof. Dr. Dr. Ulf B. Göbel danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut wissenschaftlich zu arbeiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Thomas Adam für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung meiner Arbeit in seinem Labor. Thomas Adam war stets für mich erreichbar und unterstützte diese Arbeit mit vielen wertvollen Anregungen und konstruktiver Kritik. In zahlreichen Gesprächen vermittelte er mir einen Teil seines umfassenden und vielseitigen Wissens.

Ich danke Anke Friedrich und Dr. Barbara Graf für die angenehme Zusammenarbeit und ihre große Geduld bei der Einweisung in den Laborbetrieb.

Christian Böwe, Jan Eucker, Elmira Far, Veronika Gohlke, Stefan Höhne, Abba Moussa, Indre Offermann, Cord Schlötelburg, Roland Siewerdt und Friedrich von Wintzingerode danke ich für die großartige Arbeitsatmosphäre. Ihnen ist zu einem erheblichen Teil zu verdanken, daß die tagtägliche Arbeit im Labor immer Spaß gemacht hat.

Meinen Eltern Irmgard und Gerhard Haustein bin ich zutiefst dankbar für ihre Unterstützung und ihr Verständnis, mit dem sie meinen Weg begleitet haben.