CARL VON OSSIETZKY universität OLDENBURG

Rac1 und PAK1
in Photorezeptorzellen von Vertebraten

Zur Erlangung des Doktorgrades in den Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

angenommene Dissertation

an der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften
der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

von Maike Köster
geboren am 12.03.1986
in Bremerhaven

Erster Gutachter: Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch

Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Christiane Richter-Landsberg

Tag der Disputation: 14. Januar 2015

I. INHALT

I. INHALT I

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS V

III. ZUSAMMENFASSUNG XI

IV. ABSTRACT XII

1. EINLEITUNG 1

1.1. DIE MONOMERE GTPASE RAC1 1
1.1.1. G-Proteine 1
1.1.2. Monomere G-Proteine: die Ras-Superfamilie 2
1.1.3. Die Rho/Rac/Cdc42-Familie 4
1.1.4. Rac1: Eigenschaften und Effekte 5
1.2. DIE P21-AKTIVIERTE KINASE 1 7
1.2.1. p21-aktivierte Kinasen 7
1.2.2. Aktivierung und Deaktivierung von Gruppe I PAKs 8
1.2.3. PAK1: Signalwege und Effekte 10
1.3. RAC1 UND PAK1 IN PHOTOREZEPTORZELLEN DER VERTEBRATEN-RETINA 12
1.3.1. Anatomie der Vertebraten-Retina 12
1.3.2. Photorezeptorzellen 13
1.3.3. Die Phototransduktion in den Stäbchen von Vertebraten 15
1.3.3.1. Dunkelzustand 15
1.3.3.2. Belichtung 17
1.3.3.3. Abschalten der Kaskade und Regeneration 19
1.3.4. Rac1 in Photorezeptorzellen 20
1.3.5. PAK1 in Photorezeptorzellen 21
1.4. ZIEL DER ARBEIT 22

2. MATERIAL UND METHODEN 25

2.1. MATERIAL 25
2.1.1. Geräte 25
2.1.2. Verbrauchsmaterialien und Medien 27
2.1.3. Antibiotika und Chemikalien 28
2.1.4. Bakterienstämme 31
2.1.5. Plasmide und Primer 31
2.1.6. Antikörper 32
2.1.7. Enzyme und Reaktionspuffer 33
2.1.8. Marker 34
2.1.9. Kits 34
2.2. METHODEN 35
2.2.1. Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Zellen 35
2.2.2. Polymerasekettenreaktion 35
2.2.3. Agarosegelelektrophorese 36
2.2.4. Enzymatische DNA-Restriktion 37
2.2.4.1. Präparative Restriktion 37
2.2.4.2. Restriktionsanalyse 39
2.2.5. Glättung von kohäsiven DNA-Fragmentenden 39
2.2.6. Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten 40
2.2.7. Ligation 41
2.2.8. Transformation von Plasmid-DNA in E. coli 43
2.2.8.1. Transformation eines Ligationsansatzes 43
2.2.8.2. Re-Transformation von Plasmid-DNA 43
2.2.9. Plasmidvermehrung und –isolierung 44
2.2.10. DNA-Sequenzierung 45
2.2.11. Proteinexpression in E. coli BL-21 45
2.2.12. Proteinreinigung 46
2.2.12.1. Reinigung von hRac1 aus *E. coli* 46
2.2.12.2. Reinigung von His_6-hPAK1 aus *E. coli* 47
2.2.12.3. Reinigung von hPAK1 aus *E. coli* 49

2.2.12.4. Reinigung von GST-PAK-PBD aus *E. coli* ... 51
2.2.12.5. Reinigung von bovinem Transducin aus ROS ... 52
2.2.13. Proteinauftrennung mittels Polyacrylamidgelelektrophorese ... 53
2.2.13.1. Proteinauftrennung mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese ... 53
2.2.13.1.1. Proteinauftrennung in der ersten Dimension ... 53
2.2.13.1.2. Proteinauftrennung in der zweiten Dimension ... 54
2.2.13.2. Proteinauftrennung mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese ... 55
2.2.13.2.1. Anionische native Polyacrylamidgelelektrophorese ... 55
2.2.13.2.2. Kationische native Polyacrylamidgelelektrophorese ... 55
2.2.14. Coomassie Blau-Färbung ... 56
2.2.14.1. Standardfärbung ... 56
2.2.14.2. Kolloidal-Färbung ... 56
2.2.15. Proteinquantifizierung ... 57
2.2.15.1. Quantifizierung löslicher Proteinen mit Coomassie-Brilliantblau ... 57
2.2.15.2. Quantifizierung von Membranproteinen mit Amidoschwarz ... 57
2.2.15.3. Photometrische Proteinquantifzierung ... 58
2.2.15.4. Densitometrische Proteinquantifizierung ... 58
2.2.16. Größenbestimmung von Proteinen ... 59
2.2.16.1. Native Polyacrylamidgelelektrophorese ... 59
2.2.16.2. Analytische Größenausschlusschromatografie ... 59
2.2.17. Proteinnachweis mittels Immunblot ... 60
2.2.17.1. Elektrophoretische immobilisation der Proteine (Westernblot) ... 60
2.2.17.1.1. Semidryblot ... 60
2.2.17.1.2. Tankblot ... 61
2.2.17.2. Immunologischer Nachweis ... 62
2.2.17.3. Amidoschwarz-Färbung ... 63
2.2.18. Immunhistologischer Proteinnachweis in Rinderretinae ... 63
2.2.18.1. Gewebepräparation und Herstellung von Kryogewebeschnitten ... 63
2.2.18.2. Immunologischer Nachweis ... 64
2.2.19. Kultivierung und Passagieren von HEK293-Zellen ... 65
2.2.20. Zellernte und Membranpräparation ... 66
2.2.21. Isolierung von Stäbchenaußensegmenten aus Rinderretinae ... 66
2.2.22. Schrittweise Solubilisation von Membranproteinen aus ROS ... 67
2.2.23. Lipid-Raft-Isolation ... 68
2.2.24. Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie ... 69
2.2.24.1. Generelles Prinzip der Experimente ... 69
2.2.24.2. Immobilisation des Antikörpers auf der Chipoberfläche ... 69
2.2.24.3. Waschen der ROS-Membranen ... 70
2.2.24.4. Solubilisation und Immobilisation von Rhodopsin ... 70
2.2.24.5. Regeneration von Rhodopsin mit *9-cis* Retinal ... 71
2.2.24.6. Interaktionsstudien ... 71
2.2.24.7. Kinetische Analyse ... 73
2.2.24.8. Regeneration des Antikörpers ... 74
2.2.25. Immobilisation von Proteinen an CNBr-aktivierter Sepharose ... 74
2.2.26. Rac1-Aktivitätsassay ... 74
2.2.27. Kinaseaktivitätsassay ... 77
2.2.27.1. Vorbereitung der putativen Substratproteine ... 77
2.2.27.2. Kinaseaktivitätsassay ... 79
2.2.27.3. Analyse ... 80
2.2.28. Massenspektrometrische Proteinanalyse ... 81
2.2.29. Guanylatzyklaseaktivitätsassay ... 82
2.2.29.1. Waschen der ROS-Membranen ... 82
2.2.29.2. Aktivitätsassay ... 82
2.2.29.3. RP-HPLC-Analyse ... 83

3. ERGEBNISSE ... 85

3.1. RAC1 IN DER BOVINEN RETINA ... 85
3.1.1. Lokalisation von Rac1 ... 85
3.1.2. Rac1-Konzentration in Stäbchenaußensegmenten ... 87
3.2. SOLUBILISATIONSPROFIL VON RAC1 ... 87
3.2.1. Assoziation mit Lipid-Rafts in Stäbchenaußensegmenten ... 87
3.2.2. Schrittweise Solubilisation aus Stäbchenaußensegmenten ... 88
3.3. LICHTABHÄNGIGE AKTIVIERUNG VON RAC1 IN STÄBCHENAUßENSEGMENTEN ... 89
3.4. HETEROLOGE EXPRESSION UND REINIGUNG VON HRAC1 ... 90
3.5. NUKLEOTIDBINDUNG VON REKOMBINANTEM HRAC1 ... 92

3.6. INTERAKTION VON RAC1 UND RHODOPSIN ... 93
3.6.1. Bindung von hRac1 an Rhodopsin und Kinetik der Interaktion ... 93
3.6.2. Lichtabhängigkeit der Interaktion zwischen Rac1 und Rhodopsin ... 95
3.6.3. Kompetition zwischen Rac1 und Transducin ... 97
3.7. KLONIERUNG, HETEROLOGE EXPRESSION UND REINIGUNG VON HPAK1 ... 99
3.7.1. Klonierung von hPAK1 in pET30a(+) ... 99
3.7.2. Heterologe Expression von His_6-hPAK1 ... 100
3.7.3. Reinigung von hPAK1 ... 101
3.7.3.1. Reinigung mit His_6-Tag ... 101
3.7.3.2. Reinigung ohne His_6-Tag ... 104
3.8. DIMERISIERUNG VON REKOMBINANTEM HIS_6-HPAK1 ... 107
3.9. LOKALISATION VON PAK1 IN DER BOVINEN RETINA ... 109
3.10. AKTIVITÄT VON (HIS_6-)HPAK1 ... 110
3.10.1. Generelle Aktivität des rekombinanten Proteins ... 110
3.10.2. Phosphorylierung von ROS-Proteinen ... 111
3.10.2.1. Lösliche ROS-Proteine ... 111
3.10.2.2. ROS-Membranproteine ... 112
3.10.2.3. Einfluss auf die Phosphorylierung von Rhodopsin ... 115
3.10.2.4. Identifizierung von PAK1-Substraten in ROS-Membranen ... 116
3.11. EINFLUSS VON HPAK1 AUF DIE AKTIVITÄT DER GUANYLATZYKLASE ... 125

4. DISKUSSION ... 127

4.1. DAS REKOMBINANTE HRAC1 ... 127
4.1.1. Expression und Reinigung ... 127
4.1.2. Nukleotidbindung ... 128
4.2. RAC1 IN PHOTOREZEPTORZELLEN ... 129
4.2.1. Lokalisation in der bovinen Retina und Konzentration in ROS ... 129
4.2.2. Solubilisationsprofil ... 129
4.2.3. Lichtabhängige Aktivierbarkeit ... 130
4.2.4. Interaktion mit Rhodopsin ... 131
4.2.5. Kompetition mit Transducin ... 132
4.2.6. Fazit ... 134
4.3. DAS REKOMBINANTE HPAK1 ... 135
4.3.1. Klonierung ... 135
4.3.2. Expression und Reinigung ... 135
4.3.3. Dimerisierung ... 136
4.3.4. Generelle Aktivität ... 137
4.4. PAK1 IN PHOTOREZEPTORZELLEN ... 139
4.4.1. Lokalisation in der bovinen Retina ... 139
4.4.2. Phosphorylierung von Proteinen im Stäbchenaußensegment ... 140
4.4.3. Aktivierung der Guanylatzyklase ... 142
4.4.4. Fazit ... 143
4.5. MÖGLICHE RAC1/PAK1-SIGNALWEGE IN PHOTOREZEPTORZELLEN VON VERTEBRATEN ... 144
4.6. AUSBLICK ... 145

5. LITERATURVERZEICHNIS ... 148

6. ANHANG ... 158

6.1. REINIGUNG VON GST-PAK-PBD ... 158
6.2. REINIGUNG DER MUTANTE HRAC1(G12V) ... 159
6.3. REINIGUNG VON TRANSDUCIN AUS ROS ... 160
6.4. SEQUENZIERUNG VON *HIS_6-HPAK1* ... 160
6.5. REINIGUNGSVERSUCH VON HPAK1 MITTELS AEC ... 163
6.6. DIMERISIERUNG VON REKOMBINANTEN HIS_6-HPAK1 ... 165
6.7. MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE VON PAK1-SUBSTRATEN IN ROS-MEMBRANEN ... 166

7. PUBLIKATIONEN ... 176

8. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG ... 178

9. CURRICULUM VITAE ... 180

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aa	*amino acid(s)*, Aminosäure(n)
AC	*adenylate cyclase,* Adenylatzyklase
ADH	Alkoholdehydrogenase
AID	*auotinhibitory domain,* autoinhibitorische Domäne
AEC	*anion exchange chromatography,* Anionenaustauschchromatografie
Amp	Ampicilin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ar	Arrestin
Arf	*ADP-ribosylation factor*
ATP	Adenosintriphosphat
b	bovin, Rind
BAD	*Bcl-2/Bcl-X_L-antagonist of cell death*
Bcl-2/-X_L	*B-cell lymphoma 2/ X_L*
BES	N,N-bis-(2-Hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
bp	*base pair(s)*, Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
Cam	Chloramphenicol
Cav-1	Caveolin-1
CCD	*catalytic cyclase domain*, katalytische Zyklasedomäne
Cdc42	*cell division cycle 42*
cGMP	*cyclic GMP*, zyklisches GMP
CMC	*critic micellar concentration*, kritische mizelläre Konzentration
CN	*cones*, Zapfen
CNG	*cyclic nucleotide-gated*
ConA	Concanavalin A
cpm	*counts per minute*, Zählimpulse pro Minute
CRIPAK	*cysteine-rich inhibitor of PAK1*
CtBP	*C-terminal binding protein*
DAPI	4’,6-Diamidin-2-phenylindol
DLC	*dynein light chain*
DM	n-Dodecyl-β-D-maltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*desoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat

DPAK	*Drosophila* PAK
DRM	*detergent resistant membrane,* Detergens-resistente Membran
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiotreitol
ECL	*enhanced chemiluminiscence*, verstärkte Chemilumineszenz
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ER	endoplasmatisches Reticulum
ERK	*extracellular signal-regulated kinase*
eRIS	Ellipsoid des Stäbcheninnensegments
ESE-1	*epithelium-specific Ets 1*
EtOH	Ethanol
F-Aktin	filamentöses Aktin
FKS	fetales Kälberserum
FPLC	*fast performance/protein liquid chromatography*
Fw	*forward*, vorwärts
G_T	Transducin
GAP	*GTPase-activating protein*, GTPase-aktivierendes Protein
GC	*guanylate cyclase,* Guanylatzyklase
GC-E	auch: GC1, ret-GC1 oder ROS-GC1
GCAP	*guanylate cyclase-activating protein,* Guanylatzyklase-aktivierendes Protein
GCL	*ganglion cell layer,* Ganglienzellschicht
GDI	*guanine nucleotide-dissociation inhibitor*
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	*guanosin nucleotide exchange factor*, Guanosinnukleotidaustauschfaktor
GEFH1	*guanine-nucleotide exchange factor H1*
GGTase-I/-II	Geranylgeranyltransferase I/ II
GIT1	*G-protein-coupled receptor kinase interactor 1*
GMP	Guanosinmonophosphat
GPCR	*G-protein-coupled receptor*, G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	GTP-bindendes Protein
Grb2	*growth-factor-receptor-bound protein 2*
GRK1	*G-protein-coupled receptor kinase 1*, auch: Rhodopsinkinase
GST	Gluthathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat

GTPase	hier : äquivalent mit G-Protein gebraucht
GTPγS	Guanosin 5'-[γ-thio] triphosphat
h	human
H3.3	*histone H3.3*
H_2O_{dd}	bidestilliertes Wasser
H_2O_{VE}	vollentsalztes Wasser
HBS	*HEPES buffered saline*
HDAC1	*histone deacetylase 1*
HEK	*human embryonic kidney*
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His_6	Polyhistidin
hPIP1	*human PAK1-interacting protein 1*
HPLC	*high performance liquid chromatography*
HRP	*horse radish peroxidase*, Meerrettichperoxidase
ILK	*integrin-linked kinase*
IMAC	immobilisierte Metallchelat-Affinitätschromatografie
INL	*inner nuclear layer*, innere nukleäre Schicht
IPL	*inner plexiform layer,* innere plexiforme Schicht
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IS	*inner segment,* Innensegment
Kan	Kanamycin
LC	*liquid chromatography*, Flüssigchromatografie
LIM	LIN-11, ISL-1 und MEC-3 (Proteine aus *C. elegans*)
LIMK	LIM-Kinase
LR	Lipid-Raft
MAP2K	MAPK-Kinase
MAP3K	MAP2K-Kinase
MAPK	*mitogen activated protein kinase*, Mitogen-aktivierte Protein-kinase
MBP	*myelin basic protein*, Myelin basisches Protein
Mbt	*mushroom bodies tiny*
MEK	MAPK/ ERK-Kinase
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MLC	*myosin light chain*
MLCK	MLC-Kinase
MeOH	Methanol
Mnk	*MAPK-interacting kinase*
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure

mPIC	Proteaseinhibitorcocktail
mRNA	*messenger RNA*
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MT	*microtubule*, Mikrotubulus
MW	*molecular weight*, Molmasse
MWCO	*MW cut off*
NaAc	Natriumacetat
NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NC	Nitrocellulose
NCKX	*Na^+/Ca^{2+}, K^+-exchanger*, Na^+/Ca^{2+}, K^+-Austauscher
NCS	*neuronal calcium sensor*
NGS	*normal goat serum*
NFL	*nerve fibre layer*, Nervenfasernschicht
NHS	*N*-Hydroxysuccinimid
nmzGCAP1	nicht-myristyliertes zGCAP1
NMT	N-Myristyltransferase
NTA	Nitrioltriessigsäure
OD	optische Dichte
ONL	*outer nuclear layer,* äußere nukleäre Schicht
OPL	*outer plexiform layer*, äußere plexiforme Schicht
OS	*outer segment*, Außensegment
p.a.	*pro analysi,* zur Analyse
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	*p21 activated kinase*, p21-aktivierte Kinase
Par-1	*partitioning defective 1*
PBD	*p21 binding domain,* p21-bindende Domäne
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction*, Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDK1	*3-phosphoinositide-dependent kinase-1,* Phosphoinositid-abhänige Kinase 1
PDZ-RhoGEF	*PDZ domain Rho guanine-nucleotide-exchange factor*
PE	Pigmentepithel
PKA/C	Proteinkinase A/C
PFA	Paraformaldehyd
pI	isoelektrischer Punkt
PIC3	Phosphataseinhibitorcocktail

PIX	*PAK-interacting exchange factor*
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
POPX1/2	*partner of PIX1/2*
PP1α/2A/2B/2C	Proteinphosphatase Typ1α/ Typ 2A/ Typ 2B/ Typ 2C
PTM	posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvenylidenfluorid
Q-TOF	Quadrupol-TOF
r	*rat*, Ratte
R9AP	*RGS9-ancoring protein*, RGS9-verankerndes Protein
Rab	*Ras-related protein in brain*
Rac	*Ras-related C3 botulinum neurotoxin substrate*
Ran	*Ras-related nuclear protein*
Raf-1	*rapidly accelerated fibrosarcoma 1*
Ras	*rat sarcoma*
Rec	Recoverin
Ret-GC1	retinale GC1, auch: GC-E, GC1 oder ROS-GC1
RGS	*regulator of G-protein signaling*
Rh	Rhodopsin
Rho	*Ras homologue*
RMP	Ruhemembranpotential
RNA	*ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure
RIS	*rod inner segments*, Stäbcheninnensegmente
R-MLC	regulatorische MLC
ROS	*rod outer segment(s),* Stäbchenaußensegment(e)
RPE	*retinal pigmentepithelium,* retinales Pigmentepithel
RT	Raumtemperatur
Rv	*reverse*, rückwärts
SAP	*shrimp AP*
Sar1	*secretion-associated and Ras-related 1*
SDS	*sodium dodecylsulfate*, Natriumdodecylsulfat
SEC	*size exclusion chromatography*, Größenausschlusschromatografie
SH3	*Src homology 3*
SHARP	*SMRT/HDAC1-associated repressor protein*
siRNA	*small interfering RNA*
SMRT	*silencing mediator of retinoid and thyroid receptors*
SPR	*surface plasmon resonance, Oberflächenplasmonresonanz*

Stat	*signal transducer and activator of transcription*
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TAPS	N-Tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropansulfonsäure
TBS	*Tris buffered saline*
TCA	Trichloressigsäure
TCoB	*tubulin cofactor B*
Tet	Tetracyclin
TOF	*time of flight*
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
VE	vollentsalzt
v/v	Volumenprozent
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
z	*zebrafish*, Zebrafisch

III. ZUSAMMENFASSUNG

Die Rho-GTPase Rac1 und die Kinase PAK1, ein Rac1-Effektor, sind ubiquitär vorkommende Proteine, die in einer Vielzahl von zellulären Prozessen involviert sind. Klassischerweise werden sie mit der Regulation des Zytoskeletts in Verbindung gebracht. Die Rolle von Rac1 und PAK1 in Vertebraten-Photorezeptoren ist bisher jedoch unbekannt.

Rac1 zeigt in Photorezeptorzellen eine lichtabhängige Aktivierbarkeit (Balasubramanian und Slepak, 2003; Belmonte *et al.*, 2006) und ist in der Lage mit dem lichtsensitiven Photopigment Rhodopsin (Rh) zu interagieren (Balasubramanian und Slepak, 2003). Außerdem ist es scheinbar in photo-oxidative Prozesse involviert, die zur Degeneration von Photorezeptoren führen (Belmonte *et al.*, 2006; Haruta *et al.*, 2008). Der Aktivierungsmechanismus sowie der Rac1-Signalweg, der zum Zelltod führt, sind unklar. Guo *et al.* (2007) haben gezeigt, dass Rac1 PAK-abhängig membranständige Guanylatzyklasen (GCs) aktivieren kann. Möglich wäre, dass Rac1 durch die Interaktion mit Rh aktiviert wird, was wiederum über die Aktivierung von PAK1 in einer Stimulation der cGMP-Synthese resultieren könnte. In Photorezeptoren würde ein erhöhter cGMP-Level zu einem verstärkten Einstrom von Ca^{2+} führen, was letztendlich den Zelltod bewirken könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine eindeutige Interaktion zwischen Rh und Rac1, die allerdings nicht lichtabhängig ist und Rac1 scheinbar auch nicht aktiviert. Ein Vergleich der Interaktions-Kinetiken von Rac1 und Transducin (G_T) mit Rh und die Simulation einer Kompetition der beiden G-Proteine um Rh zeigen, dass Rac1 in Anwesenheit von G_T nicht an Rh binden kann. Selbst wenn G_T ins Innensegment abwandert, ist die Komplexbildung von Rh und Rac1 nur minimal, sodass die Vorgänge der Phototransduktion nicht beeinflusst werden können. Zusätzlich hat sich gezeigt, dass PAK1 unter den gegebenen Umständen die retinale GC1 nicht stimulieren kann. Aus diesen Gründen muss der Rh/Rac1/PAK1/GC-Signalweg für Photorezeptorzellen von Vertebraten ausgeschlossen werden.

Es konnten jedoch Hinweise gesammelt werden, dass die Aktivität von PAK1 klassischerweise die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts bzw. von Mikrotubuli beeinflusst. Wichtige Prozesse, bei denen die Zytoskelettregulation eine zentrale Rolle spielt, sind z.B. die Neubildung von Disks oder der Proteintransport durch das Zilium. Eine Fehlregulation könnte zur Photorezeptordegeneration führen. Die vollständige Aufklärung der Signalwege, an denen Rac1 und PAK1 in Photorezeptorzellen beteiligt sind, bedarf daher noch weiterer Forschung.

IV. ABSTRACT

The RhoGTPase Rac1 and its effector the kinase PAK1 are from yeast to mammals ubiquitiously expressed and involved in a variety of cellular processes. Typically, they are associated with the regulation of the cytoskeleton. However, the role of Rac1 and PAK1 in photoreceptors of vertebrates is still unravelled.

In photoreceptor cells Rac1 shows light-dependent activity (Balasubramanian und Slepak, 2003; Belmonte *et al*., 2006). Furthermore, it is able to interact with the light-sensitive photopigment rhodopsin (Rh) (Balasubramanian und Slepak, 2003). Obviously, Rac1 seems to be involved in the light-induced degeneration of photoreceptors (Belmonte *et al*., 2006; Haruta *et al.*, 2008). The mechanisms of light-dependent Rac1-activation and of its pro-apoptotic effect at high light-intensities are unclear.

Guo *et al.* (2007) have shown that Rac1 is capable to stimulate membranous guanylate cyclases (GCs) via PAKs. I hypothesize that in photoreceptor cells Rac1 is activated through the interaction with Rh, then, activates PAK1 which in turn increases the cGMP-synthesis stimulating retinal GCs. An elevated cGMP-level would lead to an increased Ca^{2+}-influx which, eventually, could result in apoptosis of photoreceptors.

The findings of this work clearly demonstrate an interaction between Rh and Rac1 but in a light-independent manner. Additionally, it seems that Rac1 is not activated through the direct binding to Rh. Comparing the kinetics of transducin (G_T) and Rac1 interacting with Rh and the simulation of a competition between both G-Proteins for Rh it becomes obvious that in photoreceptor cells Rac1 is not able to bind to Rh while G_T is present. Even if G_T translocates to the inner segment Rac1 and Rh seem to form only few complexes. Consequently, Rac1 is obviously not able to interfere with processes of phototransduction. Besides, it has become apparent that under given conditions PAK1 is not able to stimulate retinal GC1.

However, there is evidence for PAK1 being classically involved in the regulation of the actin-cytoskeleton and microtubules. Processes in which the cytoskeletal dynamics are of high importance are, for example, the disk neoformation and morphogenisis as well as protein trafficking through the cilium. A dysregulation could lead to photoreceptordegeneration. For this reason, further research needs to be done to fully discover the signalling pathways in which Rac1 and PAK1 participate in phototreceptor cells.

1. EINLEITUNG

1.1. Die monomere GTPase Rac1

1.1.1. G-Proteine

Übersicht: Takai *et al.*, 2001; Milligan und Kostenis, 2006. GTP-bindende Proteine (G-Proteine) sind ubiquitär vorkommende GTPasen, welche als molekulare Schalter zahlreicher Signalkaskaden fungieren. Dabei übermitteln sie Signale von aktivierten Rezeptoren an der Zelloberfläche in das Zellinnere.

Es werden zwei generelle Klassen von G-Proteinen unterschieden: (1) heterotrimere G-Proteine und (2) monomere oder kleine G-Proteine (siehe 1.1.2). Beide durchlaufen einen klassischen Zyklus von Aktivierung und Deaktivierung. Dieser ist schematisch in Abb. 1-1 dargestellt. Im inaktiven Zustand hat das G-Protein GDP gebunden. Durch einen extrazellulären Stimulus wird spezifisch ein Guanosinnukleotidaustauschfaktor (*guanosin nucleotide exchange factor*, GEF) aktiviert, welcher für den Nukleotidaustausch (GDP zu GTP) am G-Protein sorgt. Das aktivierte G-Protein interagiert mit einem seiner Effektoren. Dies resultiert final in einer spezifischen zellulären Antwort. Nachdem der extrazelluläre Stimulus verschwunden, d.h. z.B. der Ligand vom Rezeptor dissoziiert ist, erfolgt die Beendigung der Signalkaskade durch Hydrolyse des GTP zu GDP. D.h. das G-Protein kehrt in seinen inaktiven, GDP-gebundenen Zustand zurück. Die intrinsische GTPase-Aktivität von G-Proteinen ist generell jedoch sehr schwach, d.h. eigentlich würden Signalwege, in denen G-Proteine involviert sind, nicht effektiv wieder abschalten. Dies ist allerdings nicht der Fall. Zur schnellen Nukleotidhydrolyse wird die GTPase-Aktivität der G-Proteine durch Interaktion mit GTPase-aktivierenden (oder beschleunigenden) Proteinen (GAPs) gesteigert. Die spontane Aktivierung von G-Proteinen wird durch Interaktion mit so genannten GDIs (*guanosin nucleotide dissociation inhibtors*) ausgeschlossen, welche verhindern, dass GDP ohne entsprechendes Signal vom G-Protein dissoziiert.

Da heterotrimere G-Proteine aus drei verschiedenen Untereinheiten (α, β und γ) bestehen, verläuft bei ihnen die Aktivierung minimal komplexer (Abb. 1-1, rechts). Die α-Untereinheit enthält die Nukleotidbindestelle. Im GDP-gebundenen Zustand bilden die drei Untereinheiten ein inaktives Trimer, wobei die β- und γ-Untereinheit im Komplex (βγ-Komplex) die spontane Aktivierung des G-Proteins verhindern. Sie wirken also als GDI (Brandt und Ross, 1985; Higashijima *et al.*, 1987). Die Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (*G-protein-coupled receptor,* GPCR) durch einen extrazellulären Stimulus führt zunächst zur Assoziation mit dem G-Protein und nachfolgend zum Nukleotidaustausch (GDP zu GTP) an der α-Untereinheit. D.h. GPCRs übernehmen hierbei die GEF-Funktion. Im GTP-gebundenen Zustand dissoziiert die α-Untereinheit vom βγ-Komplex. Sowohl die GTP-beladene α-Untereinheit als auch der freie βγ-Komplex können nun unabhängig voneinander

Effektoren wie Adenylatzyklasen (ACs), Phosphodiesterasen (PDEs), Ionenkanäle oder verschiedene Phospholipasen binden. Die GAPs der heterotrimeren G-Proteine werden als RGS (*regulator of G-protein signaling*)-Proteine bezeichnet, erfüllen jedoch die gleiche Funktion, nämlich die Steigerung der GTPase-Aktivität der α-Untereinheit und somit die Beschleunigung der Inaktivierung des G-Proteins.

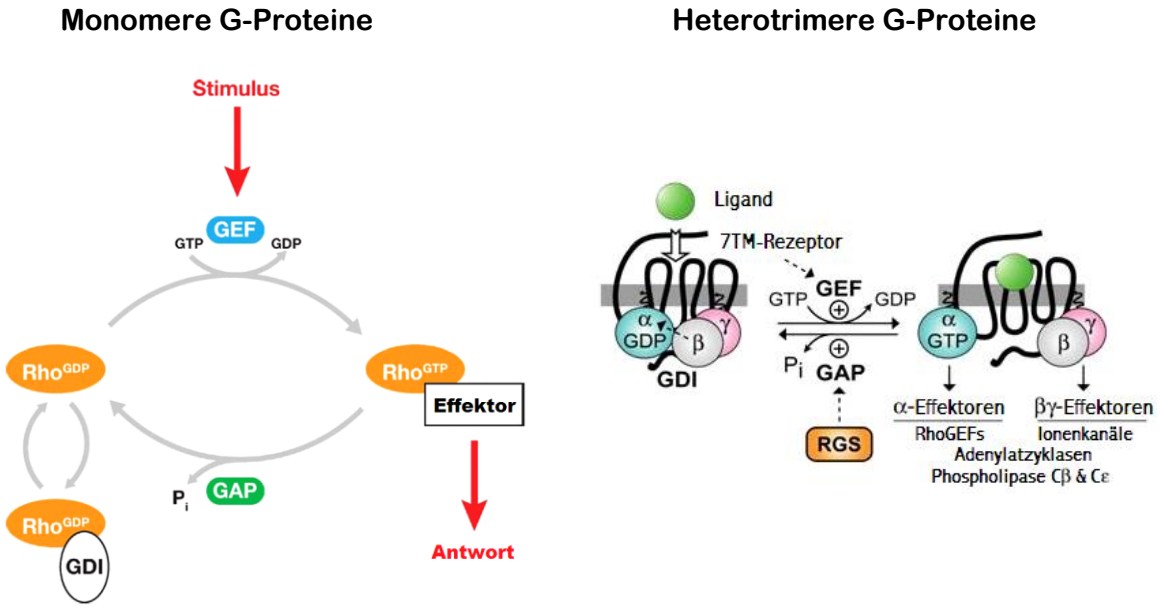


Abb. 1-1. Genereller Zyklus von monomeren und heterotrimeren G-Proteinen. ***Links:*** Modifiziert nach Jaffe und Hall (2005). ***Rechts:*** Modifiziert nach Siderovski und Willard (2005).Das grundsätzliche Prinzip der Aktivierung von heterotrimeren und monomeren G-Proteinen ist das gleiche: durch einen Stimulus wird spezifisch ein GEF aktiviert, welcher für den Nukleotidaustausch (GDP zu GTP) am G-Protein sorgt. Das aktivierte G-Protein interagiert mit einem seiner Effektoren, was final zur zellulären Antwort führt. Durch Hydrolyse des GTP zu GDP nimmt das G-Protein wieder seinen inaktiven Zustand ein und die Signalkaskade wird abgeschaltet. Die intrinsische GTPase-Aktivität von G-Proteinen ist generell sehr schwach. Zur effektiven Nukleotidhydrolyse wird sie durch Interaktion mit GTPase-aktivierenden (oder beschleunigenden) Proteinen (GAPs) gesteigert. Nach Nukleotidaustausch dissoziieren heterotrimere G-Proteine in die α-Untereinheit und den βγ-Komplex (*rechts*). Beide Komponenten können unterschiedliche Effektoren und somit auch zelluläre Effekte haben. *GEF: Guanosinnukleotidaustauschfaktor, GAP: GTPase-aktivierendes Protein, GDI: Guanosinnukleotiddissoziationsinhibitor, RGS: G-Protein-Regulator*

1.1.2. Monomere G-Proteine: die Ras-Superfamilie

Übersicht: Takai *et al.*, 2001. Kleine G-Proteine sind monomere GTPasen mit einer Molmasse von 20-40 kDa (Takai *et al.*, 2001). Sie kommen in allen eukaryotischen Zellen vor und umfassen eine Superfamilie, die Ras-Superfamilie, mit mehr als 100 Mitgliedern. Innerhalb dieser Superfamilie werden strukturell fünf Familien unterschieden (Abb. 1-2), die eine Vielzahl von spezifischen Zellfunktionen räumlich und zeitlich steuern.

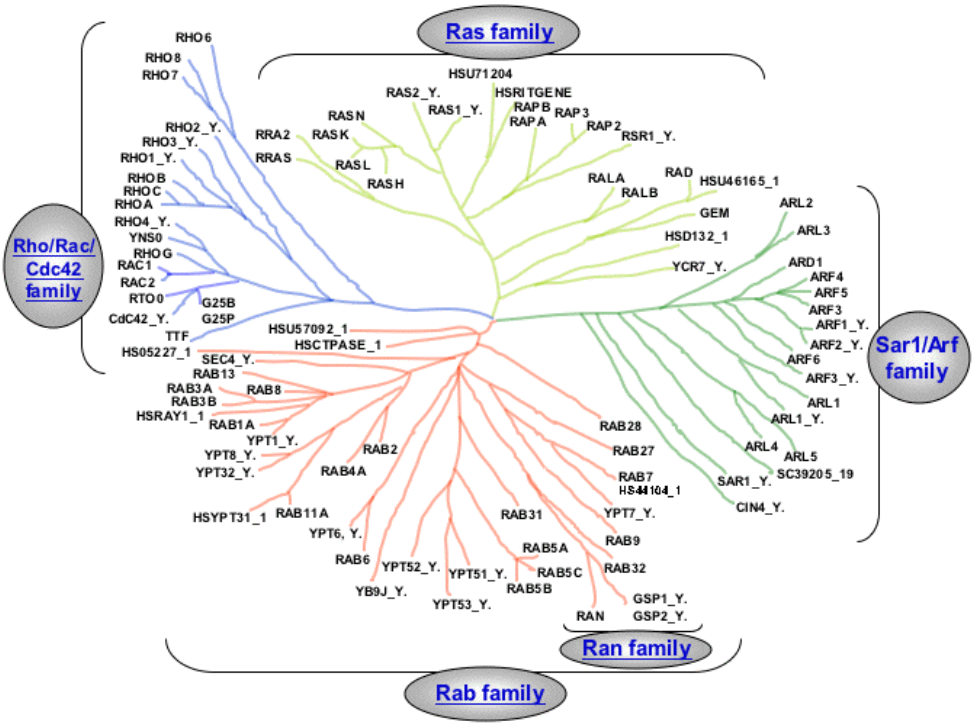


Abb. 1-2: Dendrogramm der Ras-Superfamilie. Entnommen aus Takai *et al.* (2001). Die Ras-Superfamilie besteht aus fünf Familien, die in diesem Dendrogramm dargestellt sind. Jede dieser Familien übernimmt spezifische Aufgaben in der Zelle (Details siehe Text).

Die ersten monomeren G-Proteine, die identifiziert wurden, waren die Mitglieder der **Ras-Familie**. Sie wurden zunächst in Sarkomaviren gefunden (Shih *et al.*, 1978; Chien *et al.*, 1979) und anschließend auch im Menschen als Protoonkogene entdeckt (Der *et al.*, 1982; Hall *et al.*, 1983; Shimizu *et al.*, 1983). Sie übermitteln Signale von Rezeptortyrosinkinasen an der Zelloberfläche zum Nukleus in der Regel als Antwort auf Wachstumsfaktoren. Sie spielen dabei eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und –differenzierung und zwar hauptsächlich dadurch, dass sie die Genexpression beeinflussen.

Die **Ran-Familie** umfasst im Menschen nur ein Gen. Das Ran-Protein reguliert den aktiven Transport von Makromolekülen zwischen Zytoplasma und Nukleus durch Kernporenkomplexe. Des Weiteren ist es während der M-Phase (Mitose und Zytokinese) an der Organisation der Mikrotubuli beteiligt (Kalab *et al.,* 1999; Nakamura *et al.*, 1998).

Die **Rab-Familie** bildet den größten Zweig der Ras-Superfamilie. In Säugerzellen sind über 50 Rab-Proteine (inklusive Isoformen) bekannt (Martinez und Goud, 1998). Sie spielen eine Schlüsselrolle bei der Steuerung des intrazellulären Vesikelverkehrs zum einen zwischen verschiedenen Zellorganellen (endoplasmatisches Reticulum (ER), Golgi, Endosomen, Lysosomen), zum anderen zwischen Zellorganellen und der Plasmamembran. Hierbei sind sie sowohl in regulierte als auch konstitutive endo- und exozytotische Prozesse involviert. Rab-Proteine definieren dabei den Zielort eines Vesikels („*targeting*“) und steuern den

Andock- und Fusionsprozess an bzw. mit der Zielmembran. Die Ausbildung der Vesikel an der Donormembran, das so genannte „*budding*“, wird durch eine weitere Familie von kleinen G-Proteinen vermittelt, nämlich durch die **Sar1/ Arf-Familie** (Schekman und Orci, 1996; Chavier und Goud, 1999). Mitglieder dieser Familie sind essentiell bei der Rekrutierung von so genannten Coating-Proteinen, die zum einen die Krümmung der Membran initiieren und zum anderen auch dafür sorgen, dass bestimmte Membranrezeptoren und ihre gebundenen Moleküle tatsächlich in der abgeschnürten Vesikelmembran vorhanden sind.

Die Mitglieder der **Rho/Rac/Cdc42-Familie (Rho-GTPasen)** werden primär mit der Regulation und Organisation des Zytoskeletts assoziiert, können z.B. aber auch die Genexpression verändern. Ihre Effekte beeinflussen den Zellzyklus, sowie die Zellmorphogenese und sie spielen eine Rolle bei der Zellmigration. Weitere Informationen zu dieser Familie sind Abschnitt 1.1.3 zu entnehmen.

1.1.3. Die Rho/Rac/Cdc42-Familie

Übersicht: Bokoch, 2000; Jaffe und Hall, 2005; Bosco *et al.*, 2009. Die Familie der Rho-GTPasen umfasst 21 Mitglieder (Abb. 1-3).

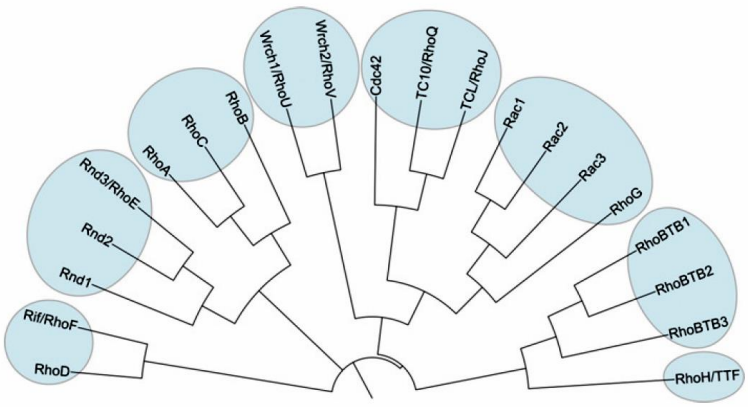


Abb. 1-3: Dendrogramm der Rho/Rac/Cdc42-Familie. Entnommen aus Visvikis *et al.* (2010). Dargestellt sind die Mitglieder der Rho/Rac/Cdc42-Familie, kurz Rho-GTPasen genannt. Die am besten erforschten Mitglieder sind RhoA, Rac1 und Cdc42.

Die meisten Informationen über diese Familie wurden durch die Erforschung von RhoA, Rac1 und Cdc42 erhalten. Bisher wurden für sie über 50 Effektor-Proteine identifiziert, darunter Ser/Thr-Kinasen (z.B. PAKs), Tyr-Kinasen, Lipidkinase, Lipasen, Oxidasen (z.B. die NADPH-Oxidase) und Gerüstproteine (Jaffe und Hall, 2005). Dementsprechend sind ihre biochemischen Funktionen divers. Hauptsächlich werden sie mit der Polymerisation und Organisation des Aktin-Zytoskeletts in Verbindung gebracht. Zusätzlich beeinflussen sie allerdings auch die Mikrotubuli und stellen Regulatoren der Genexpression und von

Enzymaktivitäten dar. Dadurch spielen sie eine Rolle in vielen biologischen Prozessen wie z.B. der Mitose, der Zytokinese, bei der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten (Adhäsionskontake, auch: *adherens junctions*) und der Zellmigration (Bewegung und Richtung). Rac1 spielt in dieser Arbeit eine zentrale Rolle und soll aus diesem Grund im folgenden Abschnitt (1.1.4) näher beleuchtet werden.

1.1.4. Rac1: Eigenschaften und Effekte

Übersicht: Bokoch, 2000; Jaffe und Hall, 2005; Bosco *et al.*, 2009. Das Rho-Protein Rac1 wurde 1989 als Ras-verwandtes C3 Botulinum-Toxin-Substrat 1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1,* Rac1) entdeckt (Didsbury *et al.*, 1989). Es ist ca. 23 kDa groß und wird ubiquitär in eukaryotischen Zellen exprimiert. Am C-Terminus befindet sich ein in allen Rho-GTPasen und auch in den Proteinen der Ras- und Rab-Familie konserviertes Motiv, die so genannte CAAX-Box. Diese stellt eine Zielsequenz für posttranslationale Modifikationen wie Farnesylierung oder Palmitylierung am im Motiv enthaltenen Cystein dar. Im Fall von Rac1 folgen auf das Cystein drei Leucine (CLLL), was das Protein zu einem Substrat für die Geranylgeranyltransferase I macht, d.h. Rac1 am C-terminalen Cystein also einen Geranylgeranyl-Rest trägt. Dies hat zur Folge, dass Rac1 hauptsächlich in der Membran verankert vorliegt. Assoziiert mit Rho-GDI ist es jedoch auch im Zytosol zu finden (Del Pozo *et al.*, 2002). Des Weiteren verfügt das kleine G-Protein über eine ebenfalls C-terminale polybasische Region (KKRKRK), die als zweite Komponente zur Membranlokalisation beiträgt (Michaelson *et al.*, 2001; Yeung *et al.,* 2006). Aktiviertes Rac1 transloziert zum Teil in geordnete Membranbereiche, den so genannten Lipid-Rafts (Del Pozo *et al.*, 2000, 2002; Fujitani *et al.*, 2005). Dies sind Cholesterin-reiche Membranregionen, die einen großen Anteil an Sphingolipiden aufweisen, bestimmte Membranproteine wie z.B. Caveolin-1 enthalten und resistent gegenüber einer Extraktion mit Detergenzien sind. Navarro-Lérida *et al.* (2012) haben gezeigt, dass zur Translokation von Rac1 nach Aktivierung aus den ungeordneten Membranregionen in die Lipid-Rafts eine reversible Palmitylierung verantwortlich ist. Dabei sind sowohl die Geranylgeranylierung als auch die polybasische Region essentiell. Der Vorgang der Acylierung soll dynamisch sein, d.h. dass das inaktive Rac1 wieder depalmityliert wird (Navarro-Lérida *et al.*, 2012).

Rac1 kann durch verschiedene Stimuli an der Zelloberfläche aktiviert werden (Abb. 1-4), z.B. durch Cytokine über Tyr-Kinase assoziierte Rezeptoren, Wachstumsfaktoren, die Rezeptor-Tyr-Kinasen aktivieren oder Adhäsionsmoleküle, wie z.B. E-Cadherin (Ehrlich *et al.*, 2002).

Als Folge dessen durchläuft es eine Konformationsänderung, die die Interaktion mit dem Effektor-Protein ermöglicht. Wie bereits erwähnt, sind die Effektoren der Rho-GTPasen, also auch von Rac1, zahlreich und somit auch die zellulären Auswirkungen divers. Ein Schema

der Rac1-Signalwege mit einer Auswahl von repräsentativen Rac1-Effektoren ist in Abb. 1-4 gezeigt. Aufgrund der großen Zahl an möglichen Interaktionspartnern soll an dieser Stelle nur auf für die Arbeit offensichtlich relevante Rac1-Effektorproteine eingegangen werden. Dies sind die p21-aktivierten Kinasen (PAKs) sowie die NADPH-Oxidase.

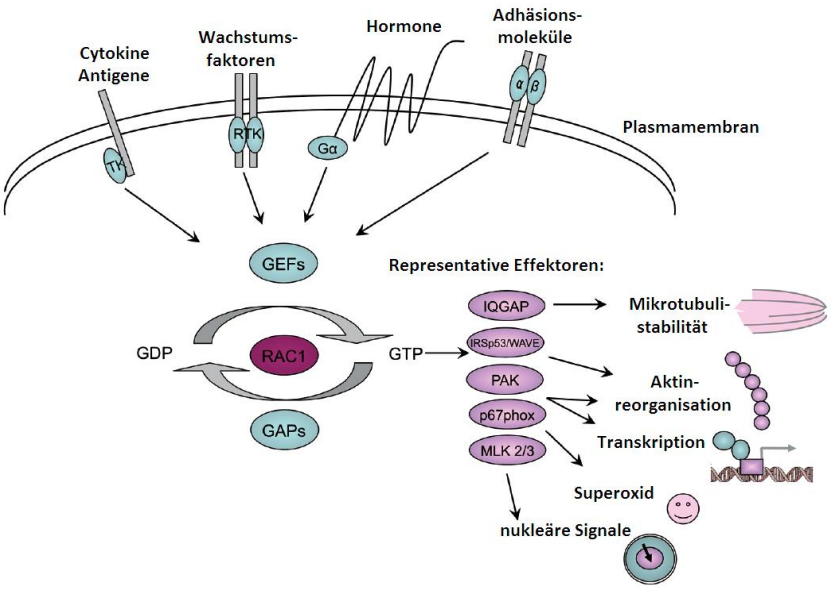


Abb. 1-4: Rac1-Signalwege. Modifiziert nach Bosco *et al*. (2009). Dargestellt ist die schematische Übersicht einer Auswahl von Rac1-Signalwegen. *GEF: Guanosinnukleotidaustauschfaktor, GAP: GTPase-aktivierendes Protein*

Mit die ersten Effektoren, die für Rac1 identifiziert wurden, waren die PAKs (Manser *et al.*, 1994) (siehe 1.2.1). Die zellulären Effekte der Rac1/PAK-Signalwege sind divers, verknüpfen die beiden Proteine allerdings stark mit der Regulation des Zytoskeletts, Zelladhäsion und Effekten auf die Transkription über MAPK (*mitogen activated protein kinase*) -Kaskaden. Einige Beispiele konkreter Signalwege im Zusammenhang mit PAK1 sind in Abschnitt 1.2.3 erläutert.

In nicht-phagozytotischen Zellen stellt Rac1 einen wichtigen Regulator der NADPH-Oxidase dar (Ushio-Fukai, 2006). Bei der NADPH-Oxidase handelt es sich um ein Enzym, welches durch NADPH-gekoppelte Reduktion von O_2 Superoxidanionen (O_2^-) synthetisiert. Bei phagozytotischen Zellen des Immunsystems dient dies vor allem der Abwehr von Mikroorganismen. Des Weiteren kann O_2^- (bzw. daraus resultierende reaktive Sauerstoffspezies) als Signalmolekül u.a. die Transkription regulieren und die Zellproliferation sowie Zelltransformation beeinflussen (Bosco *et al.*, 2009). Die NADPH-Oxidase ist ein multimeres Enzym, dass sich aus fünf verschiedenen Untereinheiten (gp91, p22, p40, p47, p67 oder Homologe) und Rac1 zusammengesetzt. gp91 und p22 liegen als Heterodimer in der Membran verankert vor. Bei aktivierendem Stimulus translozieren die drei weiteren Untereinheiten und Rac1 aus dem Zytosol an die Membran und bilden so mit gp91

und p22 ein aktives Enzym. Rac1 interagiert im Komplex mit p67 und vermutlich gp91. Welche Rolle genau es bei der Regulation der NADPH-Oxidase-Aktivität einnimmt, ist jedoch unklar (Werner, 2004). In phagozytotischen Zellen wird die NADPH-Oxidase ausschließlich von Rac2 und nicht durch Rac1 reguliert (Werner, 2004).

1.2. Die p21-aktivierte Kinase 1

1.2.1. p21-aktivierte Kinasen

Übersicht: Bokoch, 2003; Zhao und Manser, 2005; Arias-Romero und Chernoff, 2008. Die p21-aktivierten Kinasen (*p21-activated kinases*, PAKs) sind von der Hefe bis zum Menschen in eukaryotischen Zellen konserviert. In Säugern handelt es sich hierbei um eine Familie von sechs Ser/Thr-Kinasen (PAK1-6). Sie werden in Organismen nahezu ubiquitär exprimiert. Einzige Ausnahme hierbei bildet PAK5, welches primär in Muskelzellen und im Gehirn vorkommt (Arias-Romero und Chernoff, 2008). Die PAK-Proteine sind in einer Vielzahl von biologischen Prozessen involviert und verfügen über eine goßes Spektrum an Substraten. Für PAK1-3 sind z.B. bereits über 30 Effektor-Proteine identifiziert (Arias-Romero und Chernoff, 2008). PAKs werden mit der Regulation des Zytoskeletts, der Zellmorphologie und Zellmotilität in Verbindung gebracht. Des Weiteren spielen sie eine Rolle in Hormon-aktivierten Signalwegen sowie bei der Entscheidung zwischen Zellüberleben und Zelltod. Sie können durch MAPK-Kaskaden Einfluss auf die Transkription nehmen.

PAKs lassen sich auf Grundlage struktureller und biochemischer Eigenschaften in zwei Gruppen einteilen: (1) Gruppe I PAKs (PAK1-3) und (2) Gruppe II PAKs (PAK4-6). Eine schematische Übersicht ist in Abb. 1-5 gezeigt.

Die Mitglieder der **Gruppe I PAKs** verfügen N-terminal über eine konservierte p21-Bindedomäne (*p21 binding domain,* PBD). Dies ist auch die Bindestelle für Rac1-3 und Cdc42. Die Interaktion mit den GTP-gebundenen G-Proteinen führt zur Aktivierung der Kinasen. Die PBD überlappt mit einer autoinhibitorischen Domäne (*autoinihibitory domain*, AID). C-terminal ist die Kinasedomäne lokalisiert (Abb. 1-9). Gruppe I PAKs enthalten zwei SH3 (*Src homology 3*) -Bindestellen, welche die Interaktion mit Nck (Bokoch *et al.*, 1996) und Grb2 (*growth-factor-receptor-bound protein 2*) (Puto *et al*., 2003) ermöglichen, zwei Adapterproteine, die die Translokation zur Plasmamembran und somit auch die Interaktion mit Rac/Cdc42 bewirken können (Schneeberger und Raabe, 2003). Des Weiteren sind PAK1-3 durch eine PIX (*PAK-interacting exchange factor*) -Bindestelle charakterisiert. Bei PIX handelt es sich um einen Rac/Cdc42-GEF.

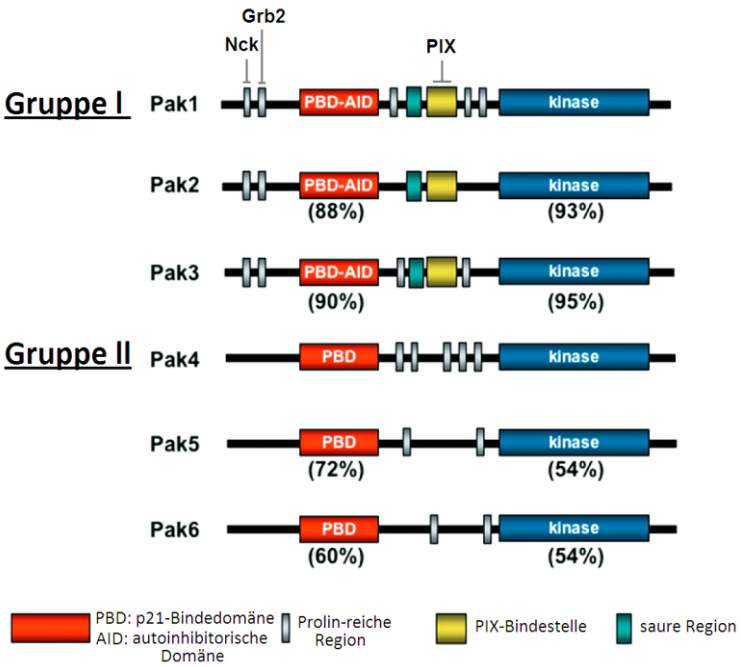


Abb. 1-5: Einteilung in Gruppe I und Gruppe II PAKs. Modifiziert nach Arias-Romero und Chernoff (2008). PAKs werden aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in zwei Gruppen unterteilt: Gruppe I und Gruppe II PAKs. Alle sechs PAKs enthalten eine p21-Bindedomäne (PBD), an welche die GTPasen Rac und Cdc42 binden, und C-terminal eine Kinasedomäne sowie zahlreiche Prolin-reiche Regionen. Bei Gruppe I PAKs überlappt die PBD mit einer autoinhibitorischen Domäne (AID), welche nach Rac/Cdc42-Bindung eine Konformationsänderung durchläuft. Dies führt zur Aktivierung der Gruppe I PAKs. Gruppe II PAKs verfügen über keine solche AID. Die Sequenzhomologien der Kinasedomänen sind für Gruppe I PAKs relativ zu PAK1 und für Gruppe II PAKs relativ zu PAK4 in Prozent angegeben.

Gruppe II PAKs verfügen ebenfalls über eine N-terminale PBD und eine C-terminale Kinasedomäne, unterscheiden sich sonst strukturell allerdings recht stark von den Gruppe I PAKs. So fehlen z.B. die oben erwähnten SH3- und PIX-Bindestellen. PAK4-6 interagieren ebenfalls über die PBD mit aktiviertem Rac und Cdc42, wobei hier die Affinität für Cdc42 höher ist (Arias-Romero und Chernoff, 2008). Des Weiteren hat die Bindung der G-Proteine keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität der Gruppe II PAKs. Es wird vermutet, dass die Interaktion eher eine Rolle bei der Lokalisation der Kinasen spielt (Cotteret *et al.,* 2003; Cotteret und Chernoff, 2006) und der Aktivierungsmechanismus ein anderer ist.

1.2.2. Aktivierung und Deaktivierung von Gruppe I PAKs

Im inaktiven Zustand liegen Gruppe I PAKs als *trans*-autoinhibitorisches Homodimer vor, d.h. die C-terminale Kinasedomäne des einen interagiert mit der N-terminalen AID des jeweils anderen Monomers, wodurch sie sich gegenseitig inhibieren (Parrini *et* al., 2002) (Abb. 1-6). Die Bindung von aktivem Rac/Cdc42 an der PBD führt zu einer Konformationsänderung in der AID, woraufhin das Homodimer dissoziiert. Die Kinasedomänen sind nun frei und es

kommt zur *trans*-Autophosphorylierung an den Positionen Thr423, Ser144 und Ser198/203 (alle in PAK1) (Parrini *et al.*, 2002; Pirruccello *et al.*, 2006).

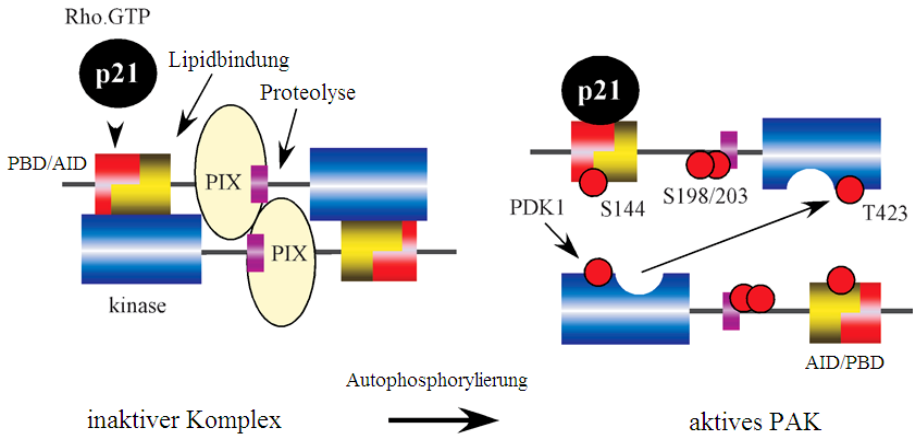


Abb. 1-6: Aktivierungsmechanismus von Gruppe I PAKs. Modifiziert nach Zhao und Manser (2005). Dargestellt ist die schematische Aktivierung von PAK1. Im inaktiven Zustand bilden Gruppe I PAKs ein *trans*-inhibitorisches Homodimer, wobei die Kinasedomäne (blau) des einen Monomers mit der autoinhibitorischen Domäne (AID, gelb) des anderen Monomers interagiert. Dieser inaktive Zustand wird durch die Bindung von PIX-Dimeren unterstützt. Nach Bindung von aktiviertem Rac1 oder Cdc42 an der p21-Bindedomöne (PBD), Proteolyse oder Lipidbindung durchläuft PAK1 eine Konformationsänderung, was zur Autophosphorylierung führt (rote Kreise). Hierdurch wird die PAK1-PAK1-Interaktion aufgehoben und es liegen zwei aktive Monomere vor. Die Phosphorylierung des Thr423 der Aktivierungsschleife geschieht entweder ebenfalls durch *trans*-Autophosphorylierung, möglicherweise allerdings auch durch eine dritte Kinase wie z.B. die PDK1 (Phosphoinositid-abhänige Kinase 1).

Die Autophosphorylierung an Thr423, einer Aminosäure innerhalb des Aktivierungsloops von PAK1, verhindert zum einen die Re-Assoziation der Monomere, zum anderen ist sie, ebenso wie die Autophosphorylierung an Ser144, wichtig zur Erlangung der vollständigen katalytischen Aktivität (Zhao und Manser, 2005). Die Modifikation von Ser198/203 vermindert die Interaktion mit PIX (Zhao und Manser, 2005).

Zusätzlich existieren für die Gruppe I PAKs noch weitere, G-Protein-unabhängige Aktivierungsmechanismen, wie z.B. durch Proteolyse durch Caspase-3 (Lee *at al.*, 1997; Rudel und Bokoch, 1997). Die Translokation an die Plasmamembran durch Interaktion mit Nck oder Grb2 führt ebenfalls zur Aktivierung von PAK1 (Lu *et al.,* 1997; Daniels *et al.,* 1998), möglicherweise durch Phosphorylierung durch PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent kinase-1*) an Thr423 (King *et al.*, 2000) oder Sphingolipidbindung (Zhao und Manser, 2005). Des Weiteren kann PAK1 durch die Phosphorylierung durch die PIX-assoziierte Kinase GIT1 (*G-protein-coupled receptor kinase-interacting target 1*) aktiviert werden (Loo *et al., 2004*).
Die Aktivität von Gruppe I PAKs kann durch verschiedene Interaktionen beendet bzw. reguliert werden. Die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert und inhibiert PAK1 (Howe und Juliano, 2000). POPX1 (*partner of PIX1*) und POPX2 sowie PP2A (*proteine phosphatase*

type 2A) hingegen dephosphorylieren PAK1, was zur Deaktivierung führt (Koh *et al.*, 2002). PP1α und PP2A dephosphorylieren Thr421 im Aktivierungsloop von PAK3 und Ser139 (PAK3), wohingegen PP2B and PP2C nur das Phosphat am Ser139 (PAK3) entfernen (Zhan *et al.*, 2003). Die Interaktion mit hPIP1 (*human PAK1-interacting protein 1*), CRIPAK (*cysteine-rich inhibitor of PAK1*) und Merlin blockiert die Bindung der GTPasen und verhindern somit die Rac/Cdc42-abhängige Aktivierung von PAK1 (Arias-Romero und Chernoff, 2008).

1.2.3. PAK1: Signalwege und Effekte

Übersicht: Bokoch, 2003, Arias-Romero und Chernoff, 2008; Szczepanowska, 2009. Wie bereits erwähnt, verfügen die PAKs über eine Vielzahl von Substraten, wodurch sie in diverse zelluläre Prozesse involviert sind (siehe auch 1.2.1). Eine Auswahl von Effektoren der Gruppe I PAKs ist in Abb. 1-7 dargestellt.

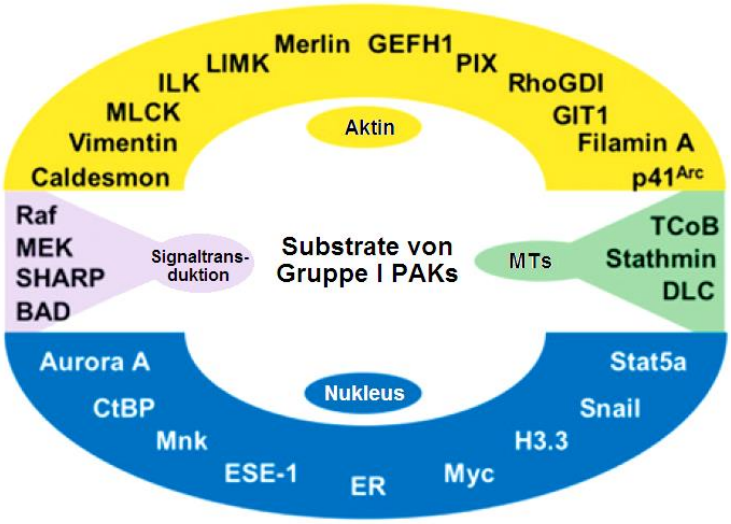


Abb. 1-7: Gruppe I PAKs-Substrate. Modifiziert nach Arias-Romero und Chernoff (2008). Gezeigt ist eine Auswahl der direkten Substrate von Gruppe I PAKs. *BAD: Bcl-2/Bcl-X_L-antagonist of cell death, CtBP: C-terminal binding protein, DLC: dynein light chain, ESE-1: epithelium-specific Ets 1, GEFH1: guanine-nucleotide-exchange factor H1, GIT1: G-protein-coupled receptor kinase interactor 1, H3.3: histone H3.3, ILK: integrin-linked kinase, MLCK: myosin light chain kinase, Mnk: MAPK-interacting kinase, MT: microtubule, Par-1: partitioning defective 1, PDZ-RhoGEF: PDZ domain Rho guanine-nucleotide-exchange factor, RhoGDI: Rho-guanine-nucleotide-dissociation inhibitor, SHARP: SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid receptors)/HDAC1 (histone deacetylase 1)-associated repressor protein, Stat: signal transducer and activator of transcription, TCoB: tubulin cofactor B*

Die am besten charakterisierten Effektor-Proteine für PAK1 und PAK2 sind die MLC (*myosin light chain*)-Kinase (MLCK) (Kaibuchi *et al.*, 1999), die LIM Kinase (LIMK) (Edwards *et al.*, 1999), Merlin (Arias-Romero und Chernoff, 2008), BAD (*Bcl-2/Bcl-X_L-antagonist of cell*

death) (Schurmann *et al*., 2000) sowie Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) -1 (Chaudhary *et al.*, 2000) und MEK (MAPK/ERK Kinase)-1 (Frost *et al.*, 1997).

Drei dieser Substrate sind in die Regulation des Zytoskeletts involviert. **MLCK** phosphoryliert die regulatorische leichte Kette des Myosins (R-MLC). Die Phosphorylierung der R-MLC von Myosin ll induziert die Interaktion mit Aktin, wodurch die ATPase-Aktivität des Myosins stimuliert wird. Dies führt zu einer erhöhten Zellkontraktilität.
Die **LIMK** wird durch Phosphorylierung durch PAK1 aktiviert und phosphoryliert wiederum das Protein Cofilin-1. Aktives Cofilin-1 spielt eine Rolle bei der Depolymerisation von filamentösem Aktin (F-Aktin). Es wird durch die Phosphorylierung deaktiviert, was die Stabilität von F-Aktin steigert (Bamburg, 1999; Zhang *et al*., 2011).
Das Tumorsuppressorprotein **Merlin** ist Mitglied einer Superfamilie von Proteinen, die die Interaktion zwischen Zytoskelett und Plasmamembran regulieren. Es interagiert mit F-Aktin und beeinflusst die Aktin-Ploymerisation. Die Phosphorylierung durch PAK1 inhibiert die Tumorsupressoraktivität von Merlin, sowie seine Translokation zur Plasmamembran (Thaxton *et al.*, 2008).
Ein weiterer Signalweg, der mit der Modulierung des Zytoskeletts einhergeht, wurde von Guo *et al.* (2007) aufgezeigt. PAK1/2 wird hierbei Rac1-abhängig aktiviert und interagiert mit einer membranständigen Guanylatzyklase (GC), welche wiederum zur cGMP-Synthese stimuliert wird. Dieser Effekt wird allerdings nicht durch die Phosphorylierung der GC bedingt. Vielmehr scheint die Aktivität aus einer von der Interaktion mit PAK induzierten Konformations-änderung zu resultieren. Physiologisch kann dieser Signalweg die Ausbildung von Lamellipodien und somit auch die Zellmigration beeinflussen (Guo *et al*., 2007).

Bei **BAD** handelt es sich um einen pro-apoptotischen Faktor. Im nicht-phosphorylierten Zustand bindet es an Bcl-2 oder Bcl-X_L, Mitglieder der Bcl-2-Familie und Proteine, die eine anti-apoptotische Aktivität aufweisen. Die Phosphorylierung durch z.B. PAK1 führt zur Inaktivierung von BAD somit zur Dissoziation von Bcl-2 bzw. Bcl-X_L, was das Überleben der Zelle unterstützt.

Raf-1 und **MEK-1** sind zwei hintereinander geschaltete Kinasen in der MAPK/ERK-Kaskade. Raf-1 agiert als MAPKK-Kinase (MAP3K) und aktiviert MEK1 als MAPK-Kinase (MAP2K). Schließlich induziert MEK-1 ERK (*extracellular signal-regulated kinase)*-1 oder ERK2. Die Aktivierung dieses Signalweges beeinflusst u.a. das Wachstum, die Proliferation und die Differenzierung einer Zelle durch Regulation der Genexpression. Die Phosphorylierung durch PAK1 hat sowohl auf Raf-1 als auch auf MEK-1 einen stimulierenden Einfluss.

1.3. Rac1 und PAK1 in Photorezeptorzellen der Vertebraten-Retina

1.3.1. Anatomie der Vertebraten-Retina

Übersicht: z.B. Kolb (2005). Die primäre Verarbeitung von Lichtreizen erfolgt in der Retina, der inneren Augenhaut. Die Retina ist eine licht-sensitive Gewebeschicht, welche sich über die innere Hinterseite des Augapfels erstreckt. Eine schematische Übersicht der Wirbeltierretina ist in Abb. 1-8 zu finden. Sie besteht aus fünf neuronalen Zelltypen: (1) den Photorezeptorzellen, (2) den Bipolarzellen, (3) den Horizontalzellen, (4) den Amakrinzellen und (5) den Ganglienzellen. Diese bilden ein komplexes neuronales Netzwerk und sind so hintereinander geschaltet, dass sich morphologisch ein schichtartiger Aufbau ergibt. In den drei nukleären Schichten (äußere nukleäre Schicht, ONL; innere nukleäre Schicht, INL und Ganglienzellschicht, GCL) sind die Zellkörper der Neurone zu finden. Die beiden plexiformen Schichten bilden die synaptischen Schichten der Retina. In der äußeren plexiformen Schicht (OPL) verschalten die Photorezeptorzellen auf das zweite Neuron des direkten Signalweges, nämlich die Bipolarzellen (erste Synapse). Diese leiten die Erregung wiederum in der inneren plexiformen Schicht (INL) an die Ganglienzellen weiter (zweite Synapse). Die Axone der Ganglienzellen bilden den optischen Nerv (*Nervus opticus*), über welchen die Informationen an das Gehirn übertragen werden. Im visuellen Cortex der Großhirnrinde werden aus den erhaltenen Impulsmustern Bilder generiert. Bei der Bildung der ersten und zweiten Synapse sind zusätzlich noch weitere Zelltypen beteiligt, nämlich die Horizontalzellen und die Amakrinzellen. Diese verschalten Photorezeptorzellen und Bipolarzellen respektive Bipolarzellen und Ganglienzellen lateral miteinander.

Eine Besonderheit der Vertebraten-Netzhaut ist, dass es sich um eine inverse Retina handelt, d.h. die Photorezeptorzellen sind dem Licht abgewandt angeordnet (siehe auch Abb. 1-8). Photonen müssen also alle Gewebeschichten mit zahlreichen Möglichkeiten zur Streuung und Reflektion passieren, bevor sie in der hinteren Netzhaut detektiert werden können. Dennoch verfügen die meisten Wirbeltiere über ein ausgezeichnetes Sehvermögen. Hierbei spielen nicht-neuronale Zellen, die Müllerzellen, eine zentrale Rolle. Die Müllerzellen sind Gliazellen, die sich von der Netzhautoberfläche bis zur Rückseite erstrecken. Sie übernehmen allgemein Stütz- und Transportfunktionen und fungieren quasi als Lichtleiter, in dem sie das einfallende Licht fokussiert durch die Retina zu den Photorezeptorzellen leiten (Franze *et al.*, 2007).

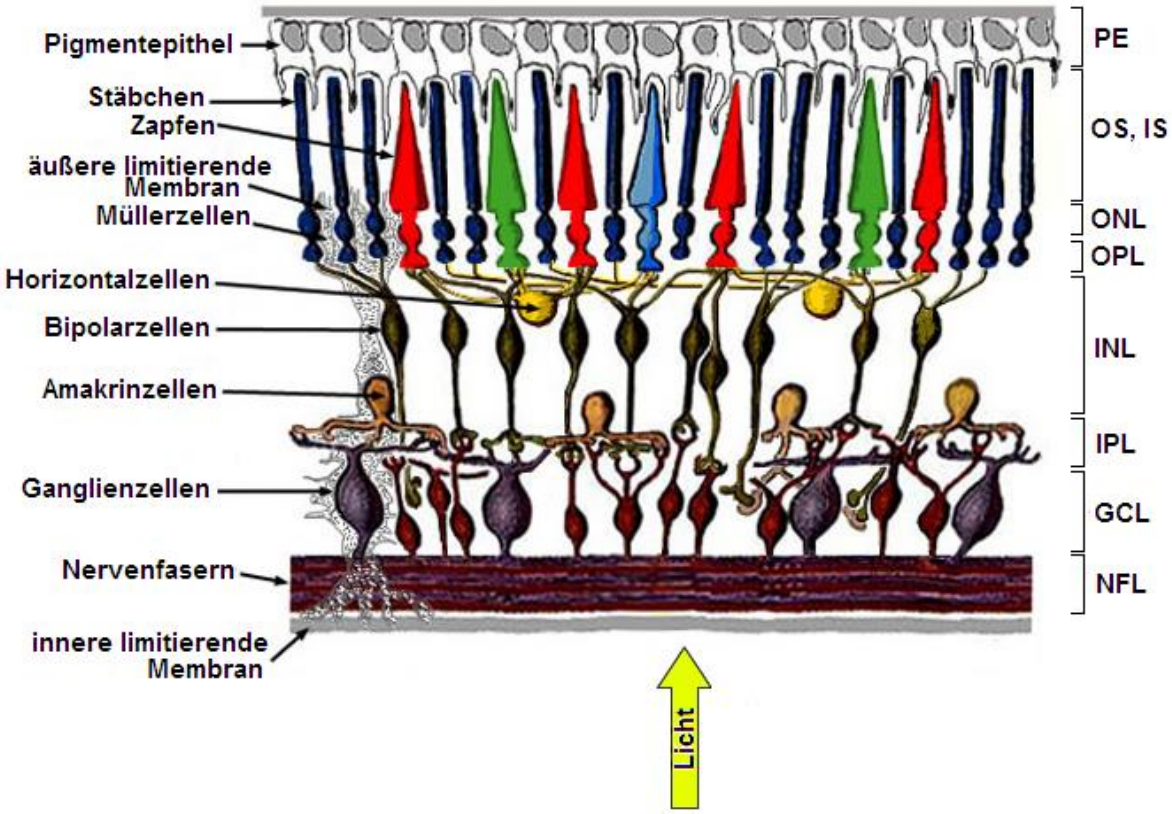


Abb. 1-8: Anatomie der Wirbeltierretina. Modifiziert nach Kolb (2005). Die Wirbeltierretina besteht aus fünf Typen von neuronalen Zellen, die in einem schichtartigen Aufbau miteinander verschaltet sind. Die horizontale Signalweiterleitung beginnt bei den Photorezeptorzellen (Stäbchen und Zapfen), in denen der Lichtreiz in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Über die Bipolarzellen wird diese Erregung an die Ganglienzellen und final über den optischen Nerv ans Hirn weitergeleitet. Lateral werden die Signale durch Amakrin- und Horizontalzellen modifiziert. *PE: Pigmentepithel, OS: äußere Photorezeptorzellsegmente, IS: innere Photorezeptorzellsegmente, ONL: äußere nukleäre Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere nukleäre Schicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht, NFL: Nervenfasernschicht*

1.3.2. Photorezeptorzellen

Bei den Primärvorgängen des Sehens wird Licht in elektrische Signale umgewandelt. Dies geschieht in den Photorezeptorzellen. Hier werden Photonen detektiert und die Lichtreize in ein elektrisches Impulsmuster umgewandelt (siehe 1.3.3.2), welches an die nachgeschalteten Neurone und final an das Gehirn weitergeleitet wird.

Es werden zwei Rezeptortypen unterschieden – die Stäbchen und die Zapfen (Abb. 1-9). Sie verfügen über unterschiedliche Absolutschwellen, was dazu führt, dass sie bei verschiedenen Lichtintensitäten aktiv werden. Stäbchen vermitteln das skotopische Sehen bei geringen Lichtintensitäten. Mit ihnen wird zwischen hell und dunkel unterschieden. Die Zapfen sind weniger sensibel und werden für das photopische also das Farbsehen genutzt. Zusätzlich können mit ihnen auch Hell- und Dunkelwerte unterschieden werden. In der Dämmerung sind sowohl Stäbchen als auch Zapfen aktiv. Die Farbwahrnehmung ist jedoch

eingeschränkt. Man spricht vom mesopischen Sehen. Die Rezeptorschicht der menschlichen Retina besteht aus ca. 120 Millionen Stäbchen und ca. 6 Millionen Zapfen.

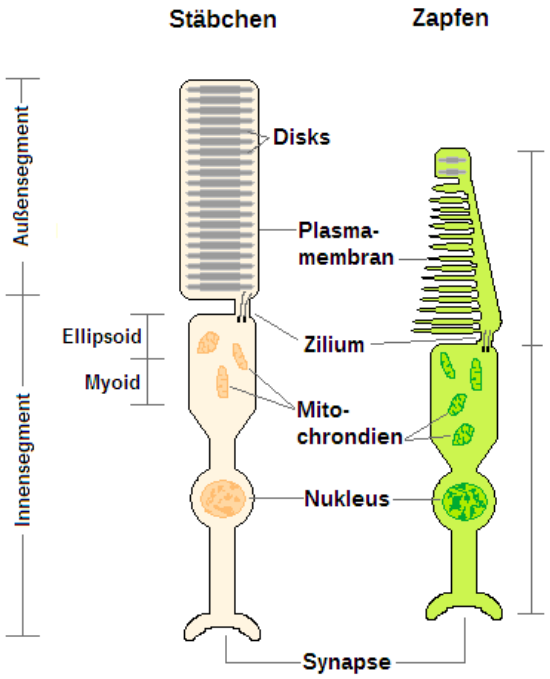


Abb. 1-9: Anatomie von Photorezeptorzellen. Dargestellt ist eine schematische Übersicht der Photorezeptorzelltypen (Stäbchen und Zapfen). Grundsätzlich lassen sich sowohl Stäbchen als auch Zapfen in ein inneres und ein äußeres Segment gliedern. Das Außensegment enthält die Photopigmente. Bei den Stäbchen ist es in abgeschnürte Membranstapel (Disks) eingelagert. Bei den Zapfen bildet die Plasmamembran zahlreiche Einstülpungen, in welchen die Zapfenopsine lokalisiert sind. Das Außensegment ist über ein Zilium mit dem Innensegment verbunden. Das Innensegment beinhaltet den Zellkern sowie sonstige Organellen und schließt mit der Synapse ab, wo die Signalübertragung auf die nachgeschaltete Zelle stattfindet

Die Anatomie von Stäbchen und Zapfen ist recht ähnlich. Beide Zelltypen verfügen über ein äußeres und ein inneres Segment, verbunden über ein unbewegliches Zilium (Abb. 1-9). Im Innensegment befinden sich hauptsächlich die Zellorganellen (Nukleus, ER, Mitochondrien etc.), d.h. dass dort die allgemeinen Stoffwechselvorgänge ablaufen. Es schließt mit der synaptischen Endigung ab, wo die Signalübertragung auf die nachgeschaltete Zelle stattfindet. Das Außensegment ist zum Teil im Pigmentepithel der Retina verankert. Die Morphologie des Außensegments ist namensgebend für den jeweiligen Rezeptortyp (Abb. 1-9). Es besteht aus den so genannten Disks - Membranstapel, die das lichtempfindliche Photopigment enthalten. Bei den Stäbchen handelt es sich hierbei um abgeschnürte Scheiben, deren begrenzende Membran, die Diskmembran, durch den zytoplasmatischen Raum von der Plasmamembran getrennt ist (Abb. 1-9). Diese befinden sich in einem ständigen Zyklus von Abbau im Pigmentepithel und Neubildung an der Basis des Außensegments. Bei den Zapfen wiederum handelt es sich um Einstülpungen der

Plasmamembran (Abb. 1-9). In diesen charakteristischen Strukturen sind, wie bereits erwähnt, die photosensitiven Sehfarbstoffe dicht gepackt eingelagert (in Stäbchen ca. 25.000-50.000 Moleküle pro µm², Pugh und Lamb, 2000; Liang *et al.*, 2003). Diese sind spezifisch für den jeweiligen Rezeptortyp. Man unterscheidet zwischen dem Stäbchenopsin, Rhodopsin (Rh) genannt, und den drei Zapfenopsinen. Sie bestehen jeweils aus einem Glykoproteinanteil, dem Opsin, und einem lichtabsorbierendem Chromophor. Bei dem Chromophor handelt es sich um *11-cis* Retinal, ein Vitamin A Derivat, welches über eine Schiff'sche Base im Opsin verankert ist. Das Opsin beeinflusst das Absorptionsverhalten des Chromophors, was dazu führt, dass alle vier Opsine unterschiedliche Absorptionsspektren und dabei auch verschiedene spektrale Absorptionsmaxima aufweisen. Dunkel-adaptiertes Rh absorbiert bei 500 nm am stärksten. Die Absorptionsmaxima der drei Zapfenopsine liegen bei 420 nm (blau), 535 nm (grün) oder 565 nm (rot). In jeder Zelle wird nur ein Opsin exprimiert, was dazu führt, dass sich blau-, grün- und rot-sensitive Zapfen unterscheiden lassen.

Photorezeptorzellen übertragen ihre Signale über graduierte Potentiale. Erst in den Bipolarzellen wird die Erregung in ein Aktionspotential umgewandelt. Die Synapse zwischen den beiden Zellen ist gutamaterg, d.h. als Neurotransmitter wird die Aminosäure L-Glutamat genutzt. Die Glutamat-Ausschüttung der Photorezeptorzellen findet tonisch statt, wobei sich die Ausschüttungsrate mit steigender Lichtintensität reduziert.

1.3.3. Die Phototransduktion in den Stäbchen von Vertebraten

Wie bereits erwähnt, beginnt der Sehprozess in den Außensegmenten der Photorezeptorzellen. Hier werden die Lichtreize durch eine G-Protein-gekoppelte Signalkaskade in ein elektrisches Signal umgewandelt. Dieser Prozess wird im Allgemeinen auch als Phototransduktion bezeichnet. Da in dieser Arbeit mit Stäbchenproteinen gearbeitet wurde, soll hier der Transduktionsprozess in Stäbchen erläutert werden.

1.3.3.1. Dunkelzustand

Ein „typisches" Neuron hat in Ruhe ein Membranpotential von ca. -60 mV (Berg *et al.*, 2003). Bei Erregung kommt es zur Depolarisation, was final zur Ausschüttung eines Neurotransmitters führt. Photorezeptorzellen verhalten sich genau entgegengesetzt zu diesem bekannten Muster. Im Dunkeln sind sie depolarisiert und haben ein Ruhemembranpotential (RMP) von ca. -40 mV (Schnetkamp, 1989). Hierbei findet eine tonische Glutamat-Ausschüttung statt (siehe 1.3.2). Das RMP wird primär durch einen Na^+-Strom in der Plasmamembran des Außensegments getragen (Abb. 1-10). Hier ist ein cGMP-gesteuerter (*cyclic nucleotide gated*, CNG) Kationen-Kanal lokalisiert. Im Dunkeln ist die

zytosolische cGMP-Konzentration im Außensegment hoch, sodass die CNG-Kanäle geöffnet sind und Na^+ entsprechend seines Konzentrationsgefälles in die Zelle einströmen kann (Dunkelstrom). Zusätzlich befinden sich im Photorezeptorinnensegment ständig geöffnete Kalium-Kanäle, durch welche, auch entsprechend dem Konzentrationsgefälle, K^+ ausströmt (Abb. 1-10). Dieser K^+-Ausstrom wirkt dem Dunkelstrom entgegen, sodass sich in der Summe das genannte RMP von -40 mV ergibt. Die Ionenströme werden durch den $Na^+/Ca^{2+},K^+$-Austauscher (*$Na^+/Ca^{2+},K^+$ exchanger*, NCKX), einem sekundären Ionentransporter im Außensegment, und die im Innensegment lokalisierte Na^+/K^+-Pumpe (ATP-abhängig) im Fluss gehalten.

Neben Na^+ ist der CNG-Kanal des Außensegments auch für Ca^{2+}-Ionen durchlässig, dass bei geöffnetem Kanal ebenfalls in die Zelle einströmt. Die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration beträgt ca. 600 nM (Yau und Hardie, 2009). Dieser Ionenstrom hat zum einen geringen Anteil am depolarisierten RMP der Photorezeptorzelle. Vor allem aber hat die hohe freie Ca^{2+}-Konzentration Konsequenzen für die intrazelluläre Kommunikation und signalisiert einen hohen cGMP-Spiegel und somit auch eine inaktive Signalkaskade. Neben cGMP spielt Ca^{2+} eine wichtige Rolle als sekundärer Botenstoff. Es bindet an Mitglieder der Familie neuronaler Calcium-Sensorproteine (*neuronal calcium sensor proteins,* NCS-Proteine) und sorgt so für die Hemmung zentraler Proteine der Phototransduktion. NCS-Proteine bilden eine Familie innerhalb der Calcium-bindenden Proteine und sind in intrazelluläre Ca^{2+}-abhängige Regulationsprozesse involviert (zur Übersicht: z.B. Burgoyne und Haynes, 2012). Bei hoher freier Ca^{2+}-Konzentration sind die NCS-Proteine mit Ca^{2+} beladen und interagieren mit ihren Effektoren. Zu der Familie der NCS-Proteine gehören zum einen die Guanylatzyklase-aktivierenden Proteine (*guanylate cyclase activating proteins*, GCAPs). Die GCAPs binden an die Guanylatzyklase (*guanylate cyclase*, GC), einem Transmembranprotein, welches cGMP synthetisiert. Ist der cGMP-Spiegel hoch, sind die CNG-Kanäle geöffnet und die mit Ca^{2+}-beladenen GCAPs inhibieren die GC in ihrer katalytischen Aktivität (Abb. 1-10) (Gorczyca *et al.*, 1994; Dizhoor *et al.,* 1995). Ein weiteres wichtiges NCS-Protein ist Recoverin. Im Ca^{2+}-gebundenen Zustand bildet es einen Komplex mit der GPCR-Kinase 1 (GRK1, auch: Rhodopsinkinase) (Abb. 1-10) (Philippov *et al.*, 2006). Die GRK1 spielt eine wichtige Rolle bei der Deaktivierung des Rh (siehe 1.3.3.3). Die Bindung des Recoverins hindert die GRK1 an der Phosphorylierung von Rh und verhindert so die vorzeitige Deaktivierung des Photopigments nach Belichtung (Chen *et al.*, 1995).

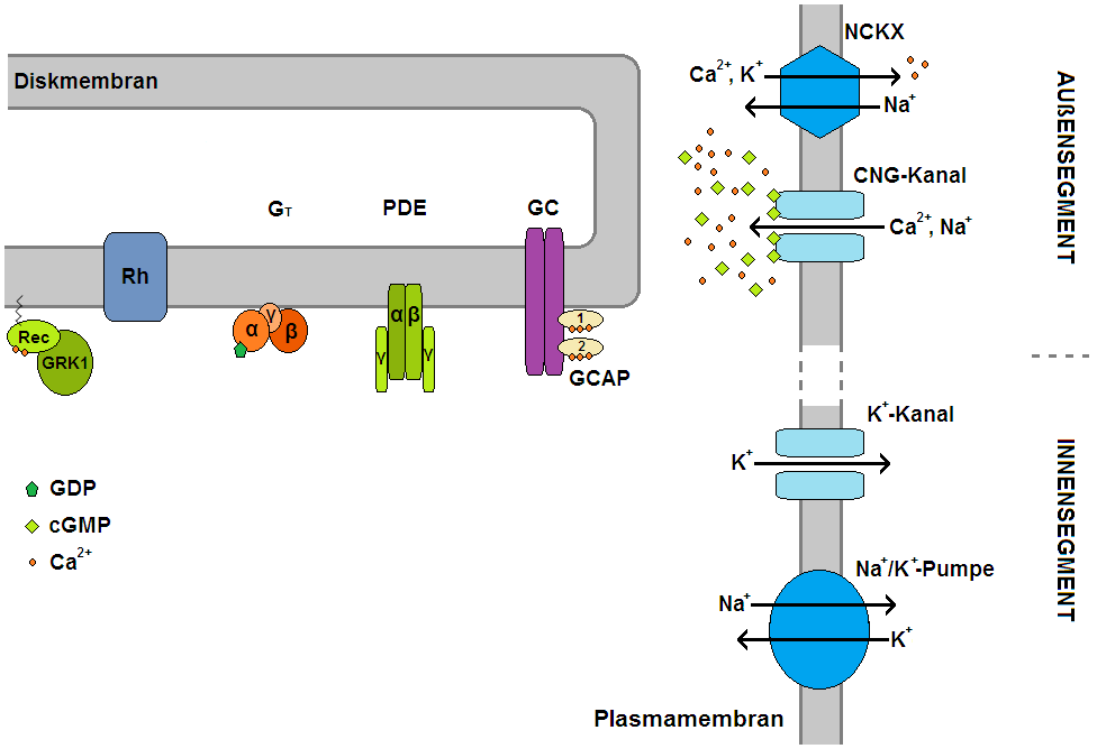


Abb. 1-10: Dunkelzustand der Photorezeptorzelle. In Ruhe, d.h. ohne Lichtreiz, ist der intrazelluläre cGMP-Spiegel hoch, sodass der im Außensegment lokalisierte CNG-Kanal geöffnet ist und Na^+ und Ca^{2+} in die Zelle einströmen können. Der Na^+-Einstrom ist für die Depolarisation der Photorezeptorzellen im Dunkeln verantwortlich. Ausgleichend wirkt diesem ein K^+-Ausstrom im Innensegment entgegen. Die Aktivität der Na^+/K^+-Pumpe hält die Konzentrationsgefälle von Na^+ und K^+ aufrecht. Durch die hohe intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration haben Recoverin (Rec) und die GCAPs (GCAP1 und GCAP2) Ca^{2+} gebunden und interagieren mit ihren Effektor-Proteinen. Das Ca^{2+}-beladene Rec ist in der Diskmembran verankert und inhibiert die GRK1. Die GCAPs liegen an der GC gebunden vor und vermindern so im Ca^{2+}-beladenen Zustand die cGMP-Synthese im Außensegment. Der stetig aktive Na^+/Ca^{2+},K^+-Austauscher befördert das Ca^{2+} wieder aus der Zelle hinaus. *CNG: cyclic nucleotide gated, G_T: Transducin, GC: Guanylatzyklase, GCAP: Guanylatzyklase-aktivierendes Protein, GRK1: Rhodopsinkinase 1, NCKX:* Na^+/Ca^{2+},K^+-Austauscher, *PDE: Phosphodiesterase, Rec: Recoverin, Rh: Rhodopsin*

1.3.3.2. Belichtung

Trifft ein Photon auf Rh so wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die letztendlich die Schließung des CNG-Kanals und so eine Änderung des Membranpotentials bewirkt (Übersicht: z.B. Yau und Hardie, 2009). Der Ablauf dieser Kaskade ist schematisch in Abb. 1-11 dargestellt. Durch das Auftreffen des Lichtquants kommt es zunächst zur Isomerisierung des *11-cis*-Retinals zu all-*trans*-Retinal. Dies bewirkt eine Konformationsänderung im Rh und es wird über mehrere Zwischenzustände aktiviert (Metarhodopsin II, Rh*). Im aktivierten Zustand kann Rh* mit dem heterotrimeren G-Protein Transducin (G_T) interagieren, was zu einem Nukleotidaustausch (GDP zu GTP) an der α-Untereinheit des G_T und somit zu seiner Aktivierung führt (Abb. 1-11). Das aktivierte G-

Protein dissoziiert in α-Untereinheit und βγ-Komplex. $G_T\alpha$ bindet an einer der zwei inhibitorischen Untereinheiten der PDE, was zur Aktivierung des Enzyms führt (Abb. 1-11). Die aktive PDE (PDE*) hydrolysiert cGMP zu GMP, wodurch die zytoplasmatische cGMP-Konzentration sinkt. Daraufhin schließen die CNG-Kanäle in der Plasmamembran und der Na^+- und Ca^{2+}-Einstrom ins Außensegment ist blockiert (Abb. 1-11). Die Zelle hyperpolarisiert und die Glutamat-Freisetzung am synaptischen Terminus nimmt entsprechend der Lichtintensität ab. Die nachgeschalteten Neurone reagieren auf die veränderte Transmitterausschüttung entsprechend ihres Zelltyps und das Signal wird final über den optischen Nerv an den visuellen Cortex im Großhirn weitergeleitet.

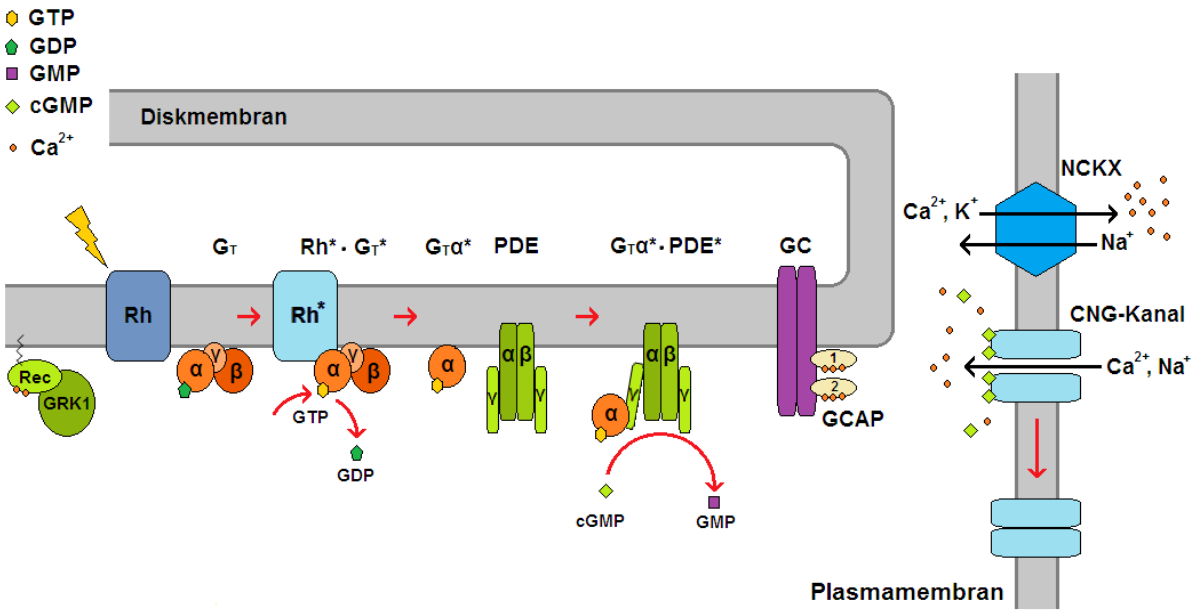


Abb. 1-11: Phototransduktionskaskade in Stäbchen. Durch Lichteinfall wird Rhodopsin (Rh) in mehreren Zwischenstufen zum aktivierten Metarhodopsin II (Rh*). Rh* interagiert nun mit Transducin (G_T) und katalysiert den Nukleotidaustausch (GDP zu GTP) an der α-Untereinheit. Dies führt zur Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins. $G_T\alpha$ bindet an eine inhibitorische γ-Untereinheit der Phosphodiesterase (PDE), wodurch das Enzym katalytisch aktiv wird. PDE* hydrolysiert cGMP zu GMP, was eine Senkung des zytosolischen cGMP-Spiegels mit sich bringt. Dies hat zur Folge, dass cGMP von den CNG-Kanälen dissoziiert und diese in einen geschlossenen Zustand übergehen. Somit sind sowohl der Na^+- als auch der Ca^{2+}-Einstrom blockiert. Da der $Na^+/Ca^{2+},K^+$-Austauscher (NCKX) weiterhin aktiv ist, sinkt die frei Ca^{2+}-Konzentration. Ein * markiert ein aktiviertes Protein. *CNG: cyclic nucleotide gated, G_T: Transducin, GC: Guanylatzyklase, GCAP: Guanylatzyklase-aktivierendes Protein, GRK1: Rhodopsinkinase 1, NCKX: $Na^+/Ca^{2+},K^+$-Austauscher, PDE: Phosphodiesterase, Rec: Recoverin, Rh: Rhodopsin*

Durch das Schließen des CNG-Kanals kann, wie bereits erwähnt, nun auch kein Ca^{2+} mehr in die Zelle einströmen. Da der NKCX noch aktiv ist, sinkt die Ca^{2+}-Konzentration, was das Abschalten der Kaskade und die Rückkehr in den Dunkelzustand (siehe 1.3.3.3) vorbereitet.

1.3.3.3. Abschalten der Kaskade und Regeneration

Für den Sehvorgang ist die Initiation der Kaskade ebenso wichtig wie das Abschalten des Signalwegs und die Rückkehr des Systems in den Dunkelzustand. Wie bereits in 1.3.3.2 angedeutet spielt hierbei Ca^{2+} eine zentrale Rolle. Während der Lichtantwort der Photorezeptorzelle sinkt die freie Ca^{2+}-Konzentration (siehe 1.3.3.2). Dies hat zur Folge, dass Recoverin das gebundene Ca^{2+} verliert. Daraufhin dissoziiert es von der Diskmembran und gibt die GRK1 frei. Die GRK1 phosphoryliert nun das aktive Rh* (Abb. 1-12) (Palczewski und Benovic, 1991; Palczewski, 1997; Ames et al., 2006). Die Phosphorylierung macht Rh* zu einem Interaktionspartner für Arrestin (Abb. 1-12). Die Arrestin-Bindung blockiert die Interaktion zwischen Rh* und G_T, sodass keine weiteren G-Proteine aktiviert werden können (Xu *et al*., 1997). Das all-*trans*-Retinal dissoziiert vom Opsin und wird final wieder durch *11-cis*-Retinal ersetzt. Die bereits aktiven G-Proteine werden durch den Komplex aus RGS (*regulator of G-protein signaling*) 9, R9AP (*RGS9-ancoring protein*) und einer G-Protein β-Untereinheit ohne Bindungspartner ($G_{\beta 5}$) inaktiviert (Makino *et al,.* 1999). RGS9 ist mit der inhibitorischen Untereinheit der PDE assoziiert und stimuliert die GTPase-Aktivität von $G_T\alpha$, sodass GTP zu GDP hydrolysiert wird. $G_T\alpha$ kann nun wieder mit $G_T\beta\gamma$ assoziieren. Als weiterer Effekt der niedrigen freien Ca^{2+}-Konzentration verlieren auch die GCAPs ihr gebundenes Ca^{2+}. Sie durchlaufen eine Konformationsänderung, was den inhibitorischen Einfluss auf die GC aufhebt und darüber hinaus die GC aktiviert (Koch *et al*., 2002; 2010). Die GC-Aktivität nimmt demnach stark zu, sodass die cGMP-Konzentration wieder ansteigt (Abb. 1-12). Dies führt zur erneuten Öffnung der CNG-Kanäle, sodass Na^+ und Ca^{2+} wieder ins Außensegment strömen können (Abb. 1-12).

Zunächst laufen die aktivierenden und deaktivierenden Prozesse gleichzeitig ab. Bei andauernder Belichtung verfügen Photorezeptorzellen über Adaptationsmechanismen, um z.B. die Lichtsensitivität herabzusetzen. Hierzu gehören z.B. die Translokation von Arrestin und G_T. Während Arrestin bei lang andauernder Belichtung vom Innensegment ins Außensegment wandert, transloziert G_T genau entgegengesetzt vom Außensegment ins Innensegment (Slepak und Hurley, 2008; Artemyev, 2008). Dies hat zur Folge, dass die Inaktivierung von Rh* beschleunigt wird. Gleichzeitig verschiebt sich das Rh:G_T-Verhältnis, sodass sich die Wahrscheinlichkeit der G_T-Aktivierung verringert. Nach beendeter Belichtung wird das Rh vollständig regeneriert und die GC synthetisiert entsprechend cGMP bis sie aufgrund des negativen Ca^{2+}-Feedbacks wieder durch die Ca^{2+}-beladenen GCAPs inhibiert wird. Der Dunkelstrom ist wiederhergestellt und die Photorezeptorzelle befindet sich nun wieder im Dunkelzustand.

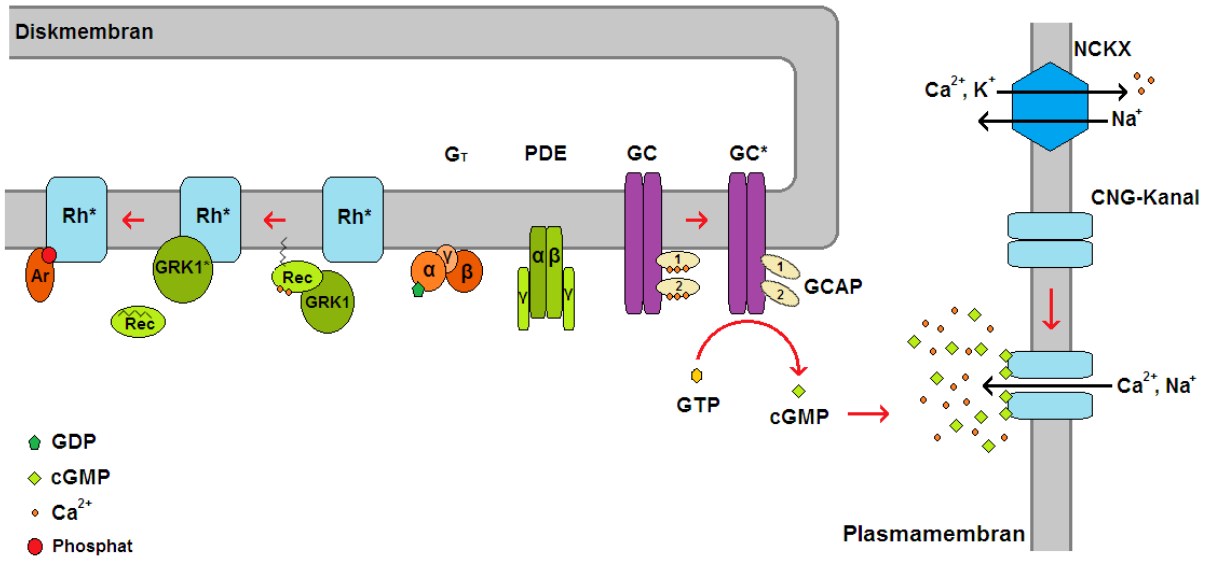


Abb. 1-12: Abschalten der Phototransduktionskaskade und Regeneration. Die durch die Lichtantwort des Photorezeptors verringerte freie Ca^{2+}-Konzentration hat zwei Effekte: Zum einen verlieren die GCAPs ihr gebundenes Ca^{2+}, sodass die die Guanylatzyklase (GC) nicht mehr inhibieren. Die cGMP-Synthese ist gesteigert, was dazu führt, dass sich CNG-Kanäle wieder öffnen. Zum anderen liegt auch das Recoverin (Rec) nun Ca^{2+}-frei vor. Die Inhibition der GRK1 wird aufgehoben, woraufhin diese nun Rh* phosphoryliert. Die Phosphorylierung erhöht deutlich die Affinität für Arrestin (Ar). Die Bindung an Ar verhindert die Aktivierung von weiteren G_T-Molekülen. Bereits aktives $G_T\alpha$ wird durch RGS9 deaktiviert (in dieser Abbildung nicht dargestellt). *Ar: Arrestin, CNG: cyclic nucleotide gated, G_T: Transducin, GC: Guanylatzyklase, GCAP: Guanylatzyklase-aktivierendes Protein, GRK1: Rhodopsinkinase 1, NCKX: $Na^+/Ca^{2+},K^+$-Austauscher*, *PDE: Phosphodiesterase, Rec: Recoverin, Rh: Rhodopsin*

1.3.4. Rac1 in Photorezeptorzellen

In Photorezeptorzellen von Vertebraten zeigt Rac1 eine lichtabhängige Aktivierbarkeit (Balasubramanian und Slepak, 2003; Belmonte *et al.* 2006). Balasubramanian und Slepak (2003) haben außerdem gezeigt, dass Rac1 im Pulldown-Assay mit Rh ko-präzipitiert. Ob durch diese Interaktion allerdings auch eine direkte Aktivierung von Rac1 vermittelt wird und Rac1 somit möglicherweise in die Phototransduktion eingreift, blieb jedoch unklar (Balasubramanian und Slepak, 2003). Ebenfalls ohne Aufklärung blieb der Effekt, den Rac1 in Photorezeptorzellen hat.

Hierzu gibt die Arbeit von Belmonte *et al.* (2006) Hinweise. Die Autoren haben gezeigt, dass in murinen Photorezeptoren, die degenerativen Lichtstimuli ausgesetzt wurden, die Rac1-Expression deutlich gesteigert war. In frühen Stadien der Degeneration (6-24 h nach Lichtstimulus) korrelierten Rac1-Expression und Zelltod (nachgewiesen mittels TUNEL-Assay). Zusätzlich wurde eine erhöhte Rac1-Aktivität in der gesamten Retina gezeigt. Diese war sogar bis 48 h nach Belichtung messbar (Belmonte *et al., 2006)*. Als Effektoren wurden Proteine der PAK-Familie vorgeschlagen (siehe auch 1.3.5). Belmonte *et al.* (2006) ziehen sowohl einen pro- als auch anti-apoptotischen Effekt der Rac1-Aktivität in Betracht.

Die Arbeit von Haruta *et al.* (2009) legt eindeutig eine pro-apoptotische Wirkung von Rac1 in Photorezeptorzellen dar. Ein konditioneller *knock-out* von Rac1 in Photorezeptorzellen von Mäusen reduzierte die degenerative Wirkung von toxischen Lichtstimuli. Der NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin hatte den gleichen Effekt (Haruta *et al.*, 2009). Aus diesem Grund haben Haruta *et al*. (2009) die Hypothese aufgestellt, dass die lichtinduzierte Photorezeptordegeneration auf oxidativem Stress durch O_2^- basiert. Rac1 als Komponente der NADPH-Oxidase in nicht-phagozytotischen Zellen soll dabei eine zentrale Rolle einnehmen.

Zusammenfassend zeigt Rac1 in Photorezeptorzellen eine lichtabhänige Aktivität und ist bei Vertebraten scheinbar pro-apoptotisch in Prozesse der lichtinduzierten Photorezeptor-degeneration involviert. Der Mechanismus ist bisher jedoch noch nicht aufgeklärt.

1.3.5. PAK1 in Photorezeptorzellen

Die Rolle von PAKs und somit auch von PAK1 in Vertebraten-Photorezeptorzellen ist weitestgehend unerforscht. Wie bereits erwähnt, bringen Belmonte *et al.* (2006) Rac1 mit lichtinduzierter Photorezeptordegeneration in der murinen Retina in Verbindung. Dabei stellten sie eine erhöhte Genexpression von PAK3 und PAK4 auf mRNA-Level fest. Das Verteilungsmuster von PAK1 blieb in den immunhistochemischen Untersuchungen jedoch unverändert. Sowohl vor als auch nach intensiver Belichtung war PAK1 in allen Schichten der Retina, mit Ausnahme der äußeren nukleären Schicht, zu detektieren. Aus diesem Grund schließen die Autoren eine Beteiligung von PAK1 an den degenerativen Prozessen aus und favorisieren in diesem Zusammenhang PAK3 und PAK4 als wichtige Rac1-Effektoren, schließen jedoch nicht aus, dass der Effekt auch protektiv sein kann (Belmonte *et al.*, 2006).

Weitere Erkenntnisse beschränken sich auf Photorezeptorzellen von Invertebraten im Speziellen auf *Drosophila melanogaster*. Hing *et al.* (1999) zeigen, dass die Aktivität von *Drosophila* PAK (DPAK) eine Schlüsselrolle bei der Richtungsfindung von Axonen von R-Zellen, den Photorezeptorzellen von *Drosophila*, spielt. Hierbei scheint auch die Interaktion mit Rac/Cdc42 von zentraler Bedeutung zu sein, d.h. DPAK dementsprechend als ausführendes Protein in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts involviert wäre.
Mbt (*mushroom bodies tiny*), ein weiteres PAK-Homolog in *Drosophila*, ist als Cdc42-Effektor an der Morphogenese von R-Zellen beteiligt (Schneeberger und Raabe, 2003; Menzel *et al.*, 2007). Die Lokalisation des Proteins an *adherens junctions* ist essentiell für die korrekte Ausbildung der Photorezeptorzellen. Mutationen von Mbt führen zu morphologischen Defekten der Zellen bzw. sogar zu einer reduzierten Photorezeptorzahl (Schneeberger und

Raabe, 2003), was scheinbar durch eine erhöhte Depolymerisation von F-Aktin und die gestörte Integrität von adhäsiven Zellkontakten bedingt wird (Menzel *et al.*, 2007).

1.4. Ziel der Arbeit

Die kleine GTPase Rac1 und ihr Effektorprotein die Ser/Thr-Kinase PAK1 sind lang bekannte und ubiquitär vorkommende Proteine. Sie wurden in den letzten 20 Jahren ausführlich beschrieben und können in viele zelluläre Vorgänge involviert sein. Die Rolle in Photorezeptorzellen von Wirbeltieren ist jedoch noch nicht aufgeklärt (siehe 1.3.4 und 1.3.5). Aus diesem Grund ist es Ziel dieser Arbeit, die Funktion von Rac1 und PAK1 in Vertebraten-Photorezeptorzellen zu erforschen.

Rac1 zeigt in Photorezeptoraußensegmenten eine lichtabhängige Aktivierbarkeit (Belmonte *et al*., 2006; Balasubramanian und Slepak, 2003), bei der scheinbar auch Rh eine Rolle spielt (Balasubramanian und Slepak, 2003). Des Weiteren schlägt die aktuelle Literatur für Rac1 eine pro-apoptotische Rolle bei der lichtinduzierten Photorezeptordegeneration vor (Belmonte *et al.*, 2006; Haruta *et al.*, 2009) (siehe 1.3.4). Der Mechanismus hierfür ist jedoch nicht aufgeklärt. Guo *et al.* (2007) haben gezeigt, dass Rac1 PAK-abhängig die Synthese von cGMP steigern kann und zwar durch Stimulation von membranständigen GCs. Der Fokus der von Guo *et al.* durchgeführten *in vitro*-Studien lag hierbei auf Effekten von Rac1 auf die Guanylatzyklase Typ E (GC-E auch: ret-GC1 oder ROS-GC1, in dieser Arbeit: GC1) unter Beteiligung von PAK1 und 2. GC-E ist eine der zwei retinalen GCs.

Ebenso wie die gesteigerte Rac1-Aktivität wird auch ein erhöhter cGMP-Spiegel mit dem Zelltod von Photorezeptorzellen in Verbindung gebracht (Lolley *et al.*, 1976). Die Ursache und der Mechanismus wodurch die erhöhte cGMP-Konzentration hervorgerufen wird, sind allerdings ebenfalls noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine gesteigerte Aktivität der retinalen GCs ist naheliegend. So konnte z.B. gezeigt werden, dass eine Mutation in GCAP1 zu einer stärkeren Aktivierung der GCs im Dunkelzustand bei höheren Ca^{2+}-Konzentrationen führt (Olshevskaya *et al.*, 2004). Als Konsequenz des erhöhten cGMP-Spiegels steigt ebenfalls die Ca^{2+}-Konzentration. Dies führt zum Zelltod der Photorezeptoren (Olshevskaya *et al.*, 2004). Die Mutation der GCAPs stellt vermutlich nur eine von vielen Möglichkeiten dar.

In dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass Rac1 durch Interaktion mit Rh lichtabhängig in Photorezeptoren aktiviert wird. Durch die Umsetzung des von Guo *et al.* aufgezeigten Rac/PAK/GC/cGMP-Signalwegs, würde die cGMP-Synthese stimuliert werden. Der erhöhte cGMP-Spiegel würde in einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit der CNG-Kanäle resultieren, was zu einer toxischen Ca^{2+}-Konzentrationen führte. Dadurch würden die Photorezeptorzellen degenerieren (Abb. 1-13).

Alternativ mussten für den Effekt von Rac1 andere nachgeschaltete Signalwege in Betracht gezogen werden. Zum einen wäre es möglich, dass Rac1 auch in Photorezeptorzellen klassisch die Organisation des Zytoskeletts beeinflusste und dadurch z.B. wichtige Transportvorgänge gestört würden. Zum anderen, war es denkbar, dass Rac1, wie von Haruta *et al.* (2009) vorgeschlagen, als Komponente der NADPH-Oxidase die Produktion von O_2^- stimulierte. Der erhöhte oxidative Stress könnte zur Apoptose von Photorezeptorzellen führen. Eine schematische Übersicht der Arbeitshypothese ist in Abb. 1-13 gezeigt.

Wie bereits in Abschnitt 1.3.3 dargestellt, ist die Aktivität der retinalen GCs (ret-GC1 bzw. GC-E und ret-GC2 bzw. GC-F) abhängig von der vorherrschenden Ca^{2+}-Konzentration. Die Stimulation der GC-Aktivität durch PAKs würde einen neuen Ca^{2+}-unabhängigen Regulationsmechanismus der retinalen GCs darstellen.

Zur Charakterisierung von Rac1 und PAK1 in Photorezeptoraußensegmenten sollten verschiedene Aspekte mit nativen und rekombinanten Proteinen untersucht werden:

Um die Anwesenheit der Proteine sicherzustellen, sollte die Lokalisation von Rac1 und PAK1 in der bovinen Retina immunhistochemisch geprüft werden. Des Weiteren wurde geplant verschiedene Isolationen von Retinaschichten (z.B. der OPL und Stäbchenaußen-segmenten) bzw. Retinakomponenten (z.B. Solubilisat der Membranproteine von Stäbchenaußensegmenten) mittels Immunblotanalyse auf die Anwesenheit von Rac1 und PAK1 zu untersuchen.

Da bekannt ist, dass Rac1 bei Aktivierung in organisierte Membranbereiche (Lipid-Rafts) translozieren kann (Kumanogoh *et al.*, 2001; Navarro-Lérida *et al.*, 2012), sollten die Lipid-Rafts boviner Stäbchenaußensegment (*rod outer segment(s),* ROS)-Membranen isoliert und immunologisch auf die Anwesenheit von Rac1 überprüft werden. Ebenfalls sollte das Solubilisationsverhalten von Rac1 in einer Extraktionsreihe mit verschiedenen Detergenzien getestet und mit den bekannten Solubilisationsmustern der bovinen Guanylatzyklase 1 (bGC1) und Rh verglichen werden. Es wurde geplant die Interaktion von Rh und Rac1 mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie zu untersuchen. Hierzu sollte natives Rh mit Hilfe eines hochspezifischen Antikörpers auf der Oberfläche eines Sensorchips immobilisiert werden. Rekombinantes Rac1 sollte dann als Analyt injiziert werden. In diesem Rahmen waren auch Experimente zur lichtabhängigen Aktivierbarkeit von Rac1 beabsichtigt. Diese Eigenschaft von Rac1 sollte zusätzlich mit nativem Protein aus bovinen ROS in einem Pulldown-Assay getestet werden.

Zur Untersuchung der Rolle von PAK1 in Photorezeptorzellen, war es notwendig das *hPAK1*-Gen zunächst in einen entsprechenden Expressionsvektor zu klonieren, anschließend das Protein heterolog zu exprimieren und chromatografisch zu reinigen. Da geplant wurde PAK1 mit einem Polyhistidin (His_6)-Tag zu markieren, musste ebenfalls die Charakterisierung des

rekombinanten Proteins und der Einfluss des His_6-Tags angedacht werden. So sollte z.B. der Dimerisierungszustand und die Kinaseaktivität überprüft werden. Es wurde beabsichtigt, die generelle Aktivität vom rekombinanten PAK1 im radioaktiven Kinaseaktivitätsassay zu klären. Mit dem gleichen experimentellen Ansatz sollte ebenfalls überprüft werden, ob PAK1 unter den ROS-Proteinen Substrate phosphoryliert. Diese sollten per massenspektrometrischer Analyse identifiziert werden.

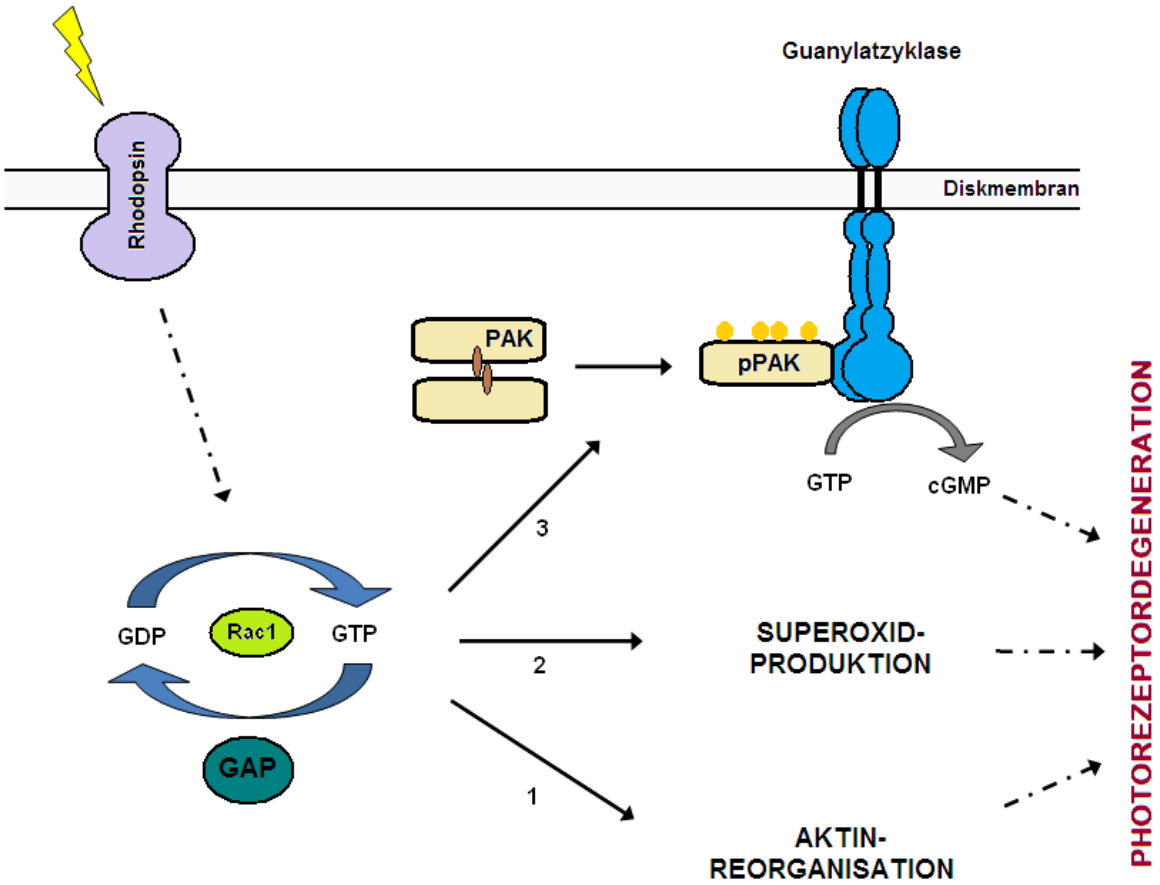


Abb. 1-13: Schematische Darstellung der Arbeitshypothese. Rac1 wird in Photorezeptorzellen lichtabhängig aktiviert. Möglicherweise geschieht dies durch Interaktion mit Rh. Die Aktivität von Rac1 führt zu Photorezeptordegeneration. Der genaue Mechanismus hierfür ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Es werden drei Signalwege in Betracht gezogen: (1) Rac1 könnte klassisch das Aktin-Zytoskeletts beeinflussen, was z.B. wichtige Transportvorgänge in der Zelle stören könnte. (2) Das aktive Rac1 könnte als Komponente der NADPH-Oxidase zu einem erhöhten oxidativen Stress führen, der durch die Zelle nicht kompensiert werden kann. (3) Rac1 stimuliert möglicherweise PAK-abhängig die retinalen Guanylatzyklasen, was zu einer erhöhten cGMP-Konzentration und final z.B. in einer zelltoxischen Ca^{2+}-Konzentration resultieren würde. *GAP: GTPase-aktivierendes Protein*

Final war geplant die Existenz des in Photorezeptorzellen hypothetischen Rac/PAK1/GC-Signalwegs zu überprüfen und den Effekt auf die bovinen GCs mittels GC-Aktivitätsassay festzustellen und gegebenenfalls zu quantifizieren.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Biacore
Biacore X2000, *Biacore AB*
Software: Biacore control Software 3.2, BIAevaluation 4.1

Blotkammer
Semidry-blot: Transblot SD Semi-Dry Transfer cell, *BioRad*
Tankblot: Mini-Transblot Cell, *BioRad*

FPLC-Anlagen
ÄKTA-FPLC, *Amersham Biosciences*;
Software: Unicorn 5.01
ÄKTA prime plus, *Amersham Biosciences*
Schreiber: REC112
Säulen:
GSTrap FF, 1ml
HiTrap ANX FF, 1ml
HiTrap DEAE FF, 1ml
HiTrap Q XL, 1ml
HiTrap SP XL, 1ml
HisTrap FF, 1ml
alle *GE Healthcare/ Amersham Biosciences*
Superdex 200 10/300, 25 ml, *Pharmacia*

Glasfiltertiegel
Duranglas, Größe 3, *Schott*

Geldokumentationsanlage
AlphaImager, *AlphaInnotech/Biozym*
Software: AlphaImager
Scanner: Canonscan 4200F, *Canon*

Gelelektrophorese
Kammern:
Mini-Protean 3, *BioRad*
Mini-Protean Tetra, *BioRad*
MGV-402, *CBS Scientific*
iMy Run, *CosmoBio*
Spannungsquelle: E835, *Consort*

Geltrockner
SLab Dryer, Model 443, *BioRad*

Heizblöcke
Mixingblock MB 102, *BIOER*
Thermomixer Comfort, *Eppendorf*

Homogenisator
Homogenisatoren mit Glas- oder Teflonpistill, verschiedene Größen, *Braun*

HPLC
HPLC-System, *Waters*
Software: Millenium
Säule: Bio-Sept SEC2000 Säule, 250 x 4 mm, *Phenomenex*
HPLC-System LaChrom ELITE, *Merck Hitachi*
Software: EZChrom ELITE
Säule: LiChrospher 100 RP-18 (5µm), *Millipore*

Inkubatoren
Brutschrank: Wärmeschrank, *Binder*
Rollinkubator: Rotator SB3, *Stuard*
Schüttelinkubator: Certomat IS, *Sartorius* und Multitron, *Infors HT*
Zellkultur: HERA cell 150, *Heraeus Instruments*

Kryostat
Leica CM1850, *Leica*

Lampe
KL 150B, *Schott*

Laser
Grüner Laser, 532 nm, keine weiteren Informationen bekannt

Mikroskope
Stereomikroskop: Axiophot2, *Zeiss*
Software: MRGrab; digitale Kamera

Neubauer-Zählkammer
Neubauer Improved, Tiefe 0,100 mm, *Assistent Germany*

Peristaltikpumpe
Varioperpex Peristaltic Pump, *LKB*

pH-Meter
Metrohm 632 Sentix 20, *WTW*
Elektrode: Sentix 20, *WTW*
InoLab 720, *WTW*
Elektrode: Sentix 41, *WTW*

Photometer
FoodAlyt, *Omnilab*

Präparierbesteck
Schere, Aesculap BC 343R, *Braun*
Federschere, Fine Science Tools
Pinzetten: Inox 55, Fine Science Tools

Sonifizierer
Sonifier celldisrupter B15, *Branson*

Spritzenpumpe
PUMP-500, *Pharmacia*

Sterilbank
HERASafe, *Heraeus Instruments*

Szintillationszähler
Wallac 1415 Liquid Scintillation Counter, *Wallac*

Tischzentrifugen
Centrifuge 5415D, *Eppendorf*
Centrifuge 5415R, *Eppendorf*
Heraeus Biofuge fresco, *Thermo Scientific*
Pico 17, *Heraues Instruments*

Thermocycler
T3000 Thermocycler, *Biometra*

Ultraschallbad
Sonorex RK 100, *Bandelin*

Vakuumkonzentrator
Concentrator 5301, *Eppendorf*

Vakuumpumpen
Vakuumpumpe*, Vacuubrand*
KNF Laboport Mini-Pump, *Sigma*
PIZ 100, *Saskia Hochvakuum*

Waagen
Acculab ALC 210.4, *Sartorius*
1106, *Sartorius*

Wärmeplatte
Medax Präzithem, *LMG*

Wasserbäder
Laktotherm 1, *Dinkelberg-Labortechnik*
Wasserbad, *Memmert*

Zentrifugen
Avanti J-E Centrifuge, *Beckmann Coulter*
Rotoren: JLA-10.500, JA-14, JA25.50
Biofuge Stratos, *Heraeus Instruments*
Rotor: # 3332
Biofuge Primo R, *Heraeus Instruments*
Rotor: # 7588 Sorvall*, Heraeus Instruments*
Heraeus Labofuge 400, *Thermo Scientific*
Rotor: # 8172
Ultrazentrifugen:
WX Ultra Series Centrifuge, *Sorvall*
Rotor: Surespin 630
Discovery M120 SE, *Sorvall*
Rotoren: S100AT4, S100AT3, S45A, S525T

2.1.2. Verbrauchsmaterialien und Medien

Tab. 2-1: Verbrauchsmaterialien und Medien.

Bezeichnung	Bezugsquelle/ Hersteller
Agarosegelfarbstoff, RotiSafe Gel Stain	*Roth*
Biospin Disposable Chromatography Columns	*BioRad*
Chill out Liquid Wax, rot	*BioRad*
CM5 Sensorchip	*GE Healthcare*
CNBr-aktivierte Sepahrose 4B	*GE Healthcare*
Deckgläser, 24x60 mm	*Roth*
Dialyseschlauch, VISKING dialysis tubing, 21 mm, 12k-16k MWCO	*Serva*
Dialyseschlauch, Membra-Cel Dialysis Membrane, 16 mm, 3,5k MWCO	*Serva*
ECL-Hyperfilm	*Amersham Biosciences*
ECL-Reagenz, Immun-Star HRP Luminol/ Enhancer	*BioRad*
ECL-Reagenz, Immun-Star HRP Peroxide Buffer	*BioRad*
ECL-Reagenz, WesternBright ECL	*advansta*
ECL-Reagenz, WesternBright Peroxide	*advansta*
Einbettmedium, Tissue Tek OCT compound	*Sakura Finetech*
Eindeckelmedium, Aqua Polymount	*Poly sciences Inc.*
Einmach-Haut, extra schwere Qualität	*Alba*
FastRed-Tabletten	*Roche*
Fettstift: Liquid Blocker Super PAP Pen	*EM Sciences*
Fixierer, GBX fixer and replenisher	*Kodak*
Gel-Blotting-Papier, Whatmann, 3MM	*Roth*
Halbmikroküvetten, PS, 1 ml	*Ratiolab*
Konzentrator (20 ml / 9k MWCO)	*Pierce*
Konzentrator (20 ml/ 50k MWCO)	*Pierce*
Kultivierungsschalen: 10 cm	*TPP*
Nitrocellulosemembran, Roti-NC	*Roth*
Nitrocellulosemembranfilter, 0,45 µm	*Millipore*
Ni-Sepharose 6 Fast Flow	*GE Healthcare*
Objektträger, Menzel-Gläser Super Frost Plus	*Thermo Scientific*
PD-10 Säule	*GE Healthcare*
Pierce Spin Columns, Snap Cap	*BioRad*
Polypropylenfilter, GH Polypro, 0,2 µm	*Pall Corporation*
PVDF-Membran, Immun-Blot PVDF Membrane for Protein Blotting	*BioRad*
S-Sepharose Fast Flow	*Pharmacia*
Spritzenvorfilter, Rotilabo Spritzenfilter, PVDF, steril, 0,22 µm	*Roth*

Fortsetzung Tab. 2-1

Bezeichnung	**Bezugsquelle/ Hersteller**
Szintillationscocktail, IRGA-SAFE PLUS	*PerkinElmer*
UV-Küvetten, Einmal-Küvetten, 70 µl	*Brand*
Window Color, Glas Design, Glow-in-the-dark	*C.Kreul*
Zellschaber	*TPP*
Medien und Lösungen	**Bezugsquelle/ Hersteller**
Antibiotic/antimycotic,100x, liquid	*Gibco*
DMEM (1x) + GlutaMAX-I, Dulbeco's modified Eagle Medium	*Gibco*
Fetales Kälberserum, FKS	*Gibco*
LB-Agar (Lennox)	*Roth*
LB-Medium (Lennox)	*Roth*
Phosphate buffered saline pH 7,4, PBS,10x	*Gibco*
RNase Cocktail (500 U/ml RNase A, 20k U/ml Rnase T1)	*Ambion*
Roti-Blue, 5x	*Roth*
Trypsin/EDTA, 1x	*Gibco*

2.1.3. Antibiotika und Chemikalien

Tab. 2-2: Verwendete Antibiotika und Chemikalien.

Antibiotikum	**Arbeitskonzentration/ Bezugsquelle**
Ampicilin, Amp	0,1 mg/ml / *Roth*
Chloramphenicol, Cam	18 µg/ml / *Sigma, OmniLifeScience*
Kanamycin, Kan	30 µg/ml / *Sigma*
Tetracyclin, Tet	13,5 µg/ml / *OmniLifeScience*
Chemikalie	**Bezugsquelle/ Hersteller**
9-cis-Retinal	*Sigma*
Aceton, p.a.	*Roth*
Acrylamidfertiglösung 40%ig (Acrylamid: Bis-acrylamid 37,5: 1)	*Roth*
Adenosintriphosphat, ATP	*Sigma*
Adenosintriphosphat, radioaktiv markiert, 9,25 MBq, 10 mCi/ml, 400 Ci/mmol, [γ-32P]-ATP	*Hartmann analytic*
Agarose, SeaKem LE agarose	*Cambrex*

Fortsetzung Tab. 2-2

Chemikalie	Bezugsquelle/ Hersteller
Amidoschwarz B10	*Merck*
Ammoniumhydrogencarbonat, NH_4HCO_3	*Roth*
Ammoniumperoxodisulfat, APS	*Roth*
N,N-bis-(2-Hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure, BES	*Calbiochem*
Bromphenolblau	*Serva*
Calciumchlorid Dihydrat, $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	*Fluka, Roth*
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonathydrat, CHAPS	*Roth, Serva*
Coomassie Brilliant Blau R250	*Serva*
cyclisches Guanosinmonophosphat, cGMP	*Sigma*
Dimethylsulfoxid, DMSO	*Roth*
Di-Natrumhydrogenphosphat Dihydrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	*Roth*
Dithothreiotol, DTT	*Applichem*
n-Dodecyl-β-D-maltosid, DM	*Roth*
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid 400 mM, EDC	*Biacore AB*
Ethylendiamintetraacetat, EDTA	*Sigma*
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat, EGTA	*Roth*
Essigsäure 100%, CH_3COOH	*VWR Chemicals*
Ethanol, vergällt, EtOH	*BI-Lager*
Ethanol 100%, p.a.	*Fisher Chemical*
Ethanolamin, 1M	*GE Healthcare*
Glutathion (reduziert)	*Roth*
Glycin	*VWR Chemicals*
Glycerin	*Scherlau*
Guanosindiphosphat, GDP	*Fluka*
Guanosintriphosphat, GTP	*Roth*
Guanosin 5'-[γ-thio] triphosphat, GTPγS	*Sigma*
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, HEPES	*Roth*
L-Histidin, His	*Sigma*
Imidazol	*Biomol*
Isobutanol	*Roth*
Isopropanol, vergällt	*BI-Lager*
Isopropanol, p.a.	*VWR Chemicals*
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, IPTG	*Roth*
Kaliumacetat, KH_3COOH	*Roth*
Kaliumchlorid, KCl	*Roth*
Kaliudihydrogenphosphat, KH_2PO_4	*Roth*
Kaliumhydroxid, KOH	*Roth*

Fortsetzung Tab. 2-2

Chemikalie	Bezugsquelle/ Hersteller
Magermilchpulver	*Roth*
Magnesiumchlorid Hexahydrat, $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	*Fluka*
β-Mercaptoethanol	*Roth*
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, MES	*Roth*
Methanol analytical grade, MeOH	*Fisher Chemical*
Methanol, HPLC-grade	*Fisher Chemical*
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure, MOPS	*Roth*
Myelin basisches Protein, MBP	*Millipore*
Natriumacetat, NaH_3COOH	*Roth*
Natriumazid, NaN_3	*Merck*
Natriumchlorid, NaCl	*VWR Chemicals*
Natriumdeoxycholat	*Sigma, Serva*
Natriumdodecylsulfat, SDS	*Roth*
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat, $NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$	*Roth*
Natriumhydroxid, NaOH	*Roth*
N-Hydroxysuccinimid 100 mM, NHS	*Biacore AB*
Normal goat serum, NGS	*Sigma*
Paraformaldehyd granular, PFA	*Electron Microscopy Science*
Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF	*OmniLifScience*
Phosphataseinhibitorcocktail 3, PIC3	*Sigma*
Proteaseinhibitorcocktail, mPIC	*Sigma*
Rinderserumalbumin, BSA	*Roth*
D(+)-Saccharose	*Roth*
Salzsäure 37%, HCl	*VWR Chemicals*
N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin/HCl, TEMED	*Roth*
Trichloressigsäure, TCA	*VWR Chemicals*
N-Tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropansulfonsäure, TAPS	*Sigma*
Tris	*Roth*
Triton X-100	*Roth*
Tween-20	*Roth*
Urea	*OmniLifeScience, Roth*
Xylencyanol FF	*Sigma, Applichem, OmniLifeScience*
Zaprinast	*Sigma*

2.1.4. Bakterienstämme

Tab. 2-3: Bakterienstämme. Angegeben sind die verwendeten *E. coli*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Resistenz	Bezugsquelle
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' *proAB* *lacI*^{q}*Z*Δ*M15* Tn*10* (Tet^r)]	Tetracyclin	*Stratagene*
BL21-CodonPlus (DE3)-RP	*E. coli* B F$^-$ *ompT hsdS*($r_B^-m_B^-$) *dcm*$^+$ Tet^r *gal* λ(DE3) *endA endA* Hte [*argU* *proL* Cam^r]	Tetracyclin Chloramphenicol	*Stratagene*
Rosetta (DE3) pLysS	*E. coli* BL21 F$^-$ *ompT hsdS*$_B$(r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3) pLysSRARE (Cam^R)	Chloramphenicol	A. Baumann, Forschungs-zentrum Jülich

2.1.5. Plasmide und Primer

Tab. 2-5: Plasmid-Vektoren.

Plasmid-Vektor	Resistenz	Bezugsquelle
pET21a(+)	Ampicilin	*Novagen*
pET30a(+)	Kanamycin	*Novagen*
pGEX-4T-1	Ampicilin	*GE Healthcare*

Tab. 2-6: Zur Verfügung gestellte Plasmid-Konstrukte. Angegebene Konstrukte wurden freundlicherweise von Dr. Alexander Scholten (Universität Oldenburg) zur Verfügung gestellt. Die hRac1 Konstrukte wurden in in *E. coli* BL21-CodonPlus transformiert als Glycerolstock übergeben.

Plasmid-Konstrukt	Verwendungszweck
pET21a(+) hRac1 WT	Proteinexpression in *E. coli*
pET21a(+) hRac1(G12V)	Proteinexpression in *E. coli*
pET21a(+) hRac1 T17N	Proteinexpression in *E. coli*
pET21a(+) hPAK1 (#27)	Polymerasekettenreaktion

Tab. 2-7: Sequenz und Länge der verwendeten Primer. Angegeben sind Sequenz und Länge der Primer. In der Sequenz hervorgehoben sind die die eingeführten Schnittstellen.

Name	(5'→3')	Primer-länge	Eingeführte Schnittstelle
#092	TCAAATAACGGCCTAGACATTC	22	
#097	GGCCGCTTAGTGATTGTTCTTTGTTGCC	28	
#153	ACA**GAATTC**AAGAAAGAGAAAGAGCGGCC	29	*EcoRI*
#154	AGC**CTCGAG**ATTCAAGGCATTAGAAG	26	*XhoI*

Alle Primer wurden von *Invitrogen* über *Fisher Scientific* (Schwerte) bezogen.

2.1.6. Antikörper

Tab. 2-8: Verwendete Antikörper. Angegeben sind sie in dieser Arbeit verwendeten Antikörper. *rb: Kaninchen, ms: Maus, gt: Ziege, p: polyklonal, m: monoklonal, NGS: normal goat serum, BSA: bovines Serumalbumin, MP: Magermilchpulver, H: Immunhistologie, IB: Immunblot, C: Immunzytologie*

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Blockier-mittel	Verwendungs-zweck	Bezugsquelle
anti-Rac1	rb (p)	1:100	NGS	H	*Santa Cruz*
anti-Rac1, 23A8	ms (m)	1:5.000; 1:20.000; 1:300	BSA, NGS	IB, H	*Milipore*
anti-Rhodopsin 1D4	ms (m)	1:10.000-1:25.000	BSA, MP	IB, Biacore	*Cell Essentials.* P. Garriga, Uni Terassa, Spanien
anti-PAK1	rb (p)	1:1.000 - 1:3.000; 1:100	MP, NGS	IB, H	*Santa Cruz*
anti-bGC1 #3†	rb (p)	1:7.500	MP	IB	Helten *et al.* (2007)
anti-Caveolin-1	rb (p)	1:2.000	BSA	IB	*Santa Cruz*
anti-Transducin	rb (p)	1:1.000-1:3.000	BSA, MP	IB	*Thermo Scientific, ABR*
anti-ms IgG AP	gt	1:200	NGS	H	*Dianova*
anti-ms IgG HRP	gt	1:20.000-1:30.000	BSA, MP	IB	*DankoCytomation*
anti-rb IgG AP	gt	1:200	NGS	H	*Santa Cruz*
anti-rb IgG HRP	gt	1:5.000	BSA, MP	IB	*Dianova*

2.1.7. Enzyme und Reaktionspuffer

Tab. 2-9: Verwendete Restriktionsenzyme und ihre Erkennungssequenzen. Aufgeführt sind die verwendeten Restriktionsenzyme mit jeweiliger Erkennungssequenz und Puffer, in dem die Restriktion durchgeführt wurde. Die Spaltstellen innerhalb der Erkennungssequenz sind gekennzeichnet.

Enzym	Sequenz (5'→3')	Enden	Verwendeter Puffer	Bezugsquelle
ApaI (10 U/µl)	GGGCC_C	kohäsiv	Puffer A	*Promega*
BglI (10 U/µl)	GCCNNNN_NGGC	kohäsiv	NEB3	*Promega*
EcoRI (20 U/µl)	G_AATTC	kohäsiv	Puffer H	*NEB*
NcoI (10 U/µl)	C_CATGG	kohäsiv	NEB3	*NEB*
NotI (10 U/µl)	GC_GGCCGC	kohäsiv	NEB3	*NEB*
SmaI (10 U/µl)	CCC_GGG	stumpf	NEB3	*NEB*
XhoI (20 U/µl)	C_TCGAG	kohäsiv	Puffer H	*NEB*

<u>10x NEB3-Puffer</u>
0,5 M Tris-HCl (pH 7,9 bei 25°C)
0,1 M $MgCl_2$
1 M NaCl
10 mM DTT

<u>10x Puffer A</u>
0,33 M Trisacetat (pH 7,9 bei 37°C)
0,66 $MKCH_3COO$
0,1 M $Mg(CH_3COO)_2$
5 mM DTT

<u>10x Puffer H</u>
0,5 M Tris/HCl (pH 7,5 bei 37°C)
0,1 M $MgCl_2$
1 M NaCl

Tab. 2-10: Weitere Enzyme und verwendete Reaktionspuffer.

Enzym	Reaktionspuffer	Bezugsquelle
KOD *Hot Start* Polymerase (1 U/µl)	Polymerase-Puffer[1]	*Novagen*
DNA Polymerase I (Klenow, 5 U/ml)	NEB3	*NEB*
rAPid Alkaline Phosphatase (1 U/µl)	Phosphatase-Puffer	*Roche*
T4 Polynukleotidkinase (PNK)	Ligationspuffer[1]	*Roche*
T4 DNA-Ligase (5 U/µl)	Ligationspuffer[1]	*Roche*
DNase (1000 U/ml)	Jeweiliger Reinigungsgspuffer	*Applichem*
Lysozym, Pulver	Jeweiliger Reinigungsgspuffer	*Roth*
Enterokinase, bovin (0,01 U/µl)	Enterokinase-Puffer	*Sigma*

[1] Zusammensetzung nicht bekannt

10x Phosphatase-Puffer

0,5 M Tris/HCl pH 8,5 (bei 20°C)

1 mM EDTA

Enterokinase-Puffer

50 mM Tris/HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

2 mM $CaCl_2$

2 mM DTT

2.1.8. Marker

Proteinmarker:

Precision Plus Protein All Blue-Standard, *BioRad*
Precision Plus Protein Unstained-Standard, *BioRad*
Prestained Protein Molecular Weight Marker, *Pierce*

DNA-Marker:

λ-DNA/ *EcoRI* + *HindIII* Marker, *Fermentas*
2-Log DNA Ladder, *NEB*
QuickLoad 100bp DNA Ladder, *NEB*
QuickLoad 1kb DNA Ladder, *NEB*

2.1.9. Kits

Agarosegelextraktion:

High Pure PCR Produkt Purification Kit (*Roche*)

Dephosphorylierung und Ligation:
Rapid DNA Dephos & Ligation Kit (*Roche*)

Plasmidisolierung:

PureYield Miniprep System (*Promega*)
PureYield Maxiprep System (*Promega*)

2.2. Methoden

2.2.1. Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Zellen

E. coli verfügt über keine natürliche Kompetenz, d.h. es ist von sich aus nicht in der Lage Nukleinsäuren aus der Umgebung aufzunehmen. Dennoch ist es möglich durch Inkubation mit $CaCl_2$ und Hitzeschock die Zellen transformierbar zu machen. Da die $CaCl_2$-Behandlung recht zeitaufwändig ist, wurde diese in größerem Maßstab durchgeführt und so vorbehandelte Bakterien in Arbeitsaliquots bei -80°C gelagert.
Zunächst wurde eine Vorkultur von Zellen des entsprechenden Stamms angelegt, d.h. 5 ml steriles LB-Medium mit Tetracyclin (Tet) wurden mit Bakterien aus dem Grundstock angeimpft und über Nacht (ü.N.) bei 37°C im Rollinkubator inkubiert. Mit 0,5 ml dieser Vorkultur wurden weitere 50 ml LB-Medium mit Tet angeimpft. Diese Hauptkultur wurde bei 37°C und 180 rpm bebrütet bis sie eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,4 erreicht hatte. Anschließend wurden die Zellen mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Ab diesem Schritt wurden nur noch vorgekühlte Gefäße und Lösungen verwendet. Durch Zentrifugation (10 min, 5.000 xg, 4°C) wurden die Bakterien pelletiert und somit das Medium entfernt. Das Pellet wurde in ca. 1 ml eiskaltem 0,1 M $CaCl_2$ resuspendiert und anschließend ebenfalls mit eiskaltem 0,1 M $CaCl_2$ auf ca. 25 ml aufgefüllt. Die Suspension wurde mindestens 2 h auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut pelletiert (10 min, 5.000 xg, 4°C) und der Überstand verworfen. Die Bakterien wurden in ca. 1 ml 0,1 M $CaCl_2$/ 25% (v/v) Glycerin (eiskalt) resuspendiert und mit gleicher Lösung auf ein Volumen von 5 ml aufgefüllt. Nach erneuter Inkubation für 2 h auf Eis, konnten die Zellen aliquotiert, bei -80°C eingefroren und bei Bedarf mittels Hitzeschock transformiert werden.

2.2.2. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) stellt eine Methode zur selektiven Amplifikation von Nukleinsäuren dar. In diesem Fall wurde sie genutzt, um die Inserts für die Generierung der Plasmidkonstrukte pGEX-4T-1 PAK-PBD und pET30a(+) hPAK1 herzustellen und zu amplifizieren. Die zur PCR verwendeten Primer sowie die Reaktionsbedingungen sind den Tabellen 2-11 bis 2-13 zu entnehmen. Nachdem die Komponenten pipettiert waren, wurden die PCR-Ansätze mit 20 µl Chill-out-Wachs überschichtet. Nach beendeter Reaktion, wurde der Erfolg der PCR elektrophoretisch geprüft (siehe 2.2.3). Die Produktbande wurde mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und die DNA mit Hilfe des High Pure PCR Product Purification Kits (*Roche*) aus dem Gelstück isoliert und gereinigt. Dies geschah wie in der Vorschrift angegeben. Die Elution fand in 20-25 µl DNase-freiem H_2O statt.

Tab. 2-11: Bei der PCR verwendete Primer. Angegeben sind die verwendeten Primer und das Template sowie die Größe des Zielfragments.

Zielplasmid	Fw-Primer	Rv-Primer	Template	Fragmentgröße
pGEX-4T-1 PAK-PBD	#153	#154	pET21a(+) hPAK1 (# 27)	281 bp
pET30a(+) hPAK1	#092	#097	pET21a(+) hPAK1 (# 27)	1634 bp

Tab. 2-12: Reaktionsbedingungen zur Insertamplifikation.

Komponente	Volumen/ Reaktionsansatz [µl]
pET21a(+) hPAK1 #27 (~10ng/µl)	1
Fw-Primer (10 ng/µl)	1,4
Rv-Primer (10 ng/µl)	1,4
dNTPs (je 2 mM)	2,5
$MgSO_4$ (25 mM)	1,5
10x Polymerase-Puffer	2,5
KOD Hot Start Polymerase (1 U/µl)	0,5 -1
H_2O_{dd}	*ad.* 25 µl

Tab 2-13: Thermisches Profil der PCR.

		pGEX-4T-1 PAK-PBD	pET30a(+) hPAK1
	Initiale Denaturierung	94°C/ 2 min	94°C/ 2 min
30x	**Denaturierung**	94°C/ 15 sec	94°C/ 15 sec
	Annealing	55°C/ 30 sec	56°C/ 30 sec
	Elongation	72°C/ 20 sec	72°C/ 1 min 40 sec

2.2.3. Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse und zum Teil auch zur Reinigung von DNA bzw. von DNA-Fragmenten wurde die Agarosegelelektrophorese genutzt. Alle Anwendungen wurden je nach Fragmentgröße in 1%igen (w/v) oder 2%igen (w/v) Agarose-Horizontalgelen durchgeführt. Die Agarose wurde in 1x TAE durch Aufkochen im Mikrowellenherd gelöst. Um die Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar machen zu können, wurden 5 µl RotiSafe Gel Stain (*Roth*) pro 100 ml gelöster Agarose hinzupipettiert. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proben mit 10x DNA-Probenpuffer (Endkonzentration 1x) versetzt. Für die Trennung der Fragmente wurde für 20-30 min eine konstante Spannung von 100 V angelegt. Als Referenz wurde ein DNA-Marker

mit aufgetragen. Je nach Fragmentgröße und Verwendungszweck handelte es sich hierbei um den λ-DNA/ *EcoRI* + *HindIII* Marker (*Fermentas*) oder die 2-Log DNA Ladder (*NEB*). Die Dokumentation der Gele wurde mit dem AlphaImager (*AlphaInnotech/Biozym*) durchgeführt.
Bei präparativem Einsatz der Agarosegelelektrophorese wurde nach der Trennung die entsprechende DNA-Bande unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Um die DNA aus dem Gel zu isolieren, wurde das High Pure PCR Product Purification Kit (*Roche*) verwendet und die Extraktion wie in der Vorschrift angegeben durchgeführt. Abweichend vom Protokoll wurde die Dauer des letzten Zentrifugationschrittes vor der Elution von 2 min auf 4 min erhöht, um sicherzustellen, dass tatsächlich alle Ethanolreste entfernt wurden. Die Elution fand in 20-25 µl DNase-freiem Wasser statt.

50x TAE	10x DNA-Probenpuffer
2 M Tris	10x TAE
1 M CH_3COOH	50% (v/v) Glycerin
50 mM EDTA	0,25% Xylencyanol

2.2.4. Enzymatische DNA-Restriktion

Unter DNA-Restriktion versteht man die enzymkatalysierte Fragmentierung von doppelsträngiger DNA (dsDNA). Diese Methode wurde zum einen eingesetzt, um Vektor und PCR-Produkte für die Klonierung vorzubereiten (präparative Restriktionsanalyse). Zum anderen wurden analytische Restriktionen durchgeführt, um Ligationsprodukte aufgrund des bei der Restriktion entstehenden spezifischen Bandenmusters als Zielplasmid identifizieren zu können.

2.2.4.1. Präparative Restriktion

Um Vektor und Insert für die Ligation vorzubereiten, wurden sie im präparativem Maßstab geschnitten. Hierbei wurde zum einen der Vektor im Polylinker geöffnet und zum anderen durch Schneiden mit den gleichen Restriktionsenzymen die Enden des PCR-Produkts kompatibel gemacht.
Bei der Planung der Klonierung zum Plasmid pET30a(+) hPAK1 konnten leider keine Restriktionsenzyme gefunden werde, welche sich zum Schneiden von Vektor und PCR-Produkt eignen, ohne große Veränderungen im zu klonierenden Gen einzuführen. Aus diesem Grund wurde beschlossen, das Insert mit stumpfen Enden in den Vektor zu bringen, weshalb das PCR-Produkt zum Konstrukt pET30a(+) hPAK1 nicht geschnitten wurde.

Bei der Herstellung des Konstruktes pGEX-4T-1 PAK-PBD zeigte sich nach erster Transformation des halben Ligationsansatzes und Analyse einiger Klone, dass scheinbar viel ungeschnittener Vektor enthalten war, sodass die zweite Hälfte des Ligationsansatzes ein zweites Mal verdaut wurde und zwar mit *SmaI*. Eine Schnittstelle für dieses Enzym war ausschließlich im Plasmid ohne Insert vorhanden.

Die einzelnen Komponenten wurden wie in Tabelle 2-14 angegeben pipettiert und anschließend mindestens 1,5 h bei 37°C inkubiert.

Tab. 2-14: Reaktionsbedingungen zur präparativen Restriktion. Angegeben sind die Reaktionsbedingungen beim präparativen Verdau. Abhängig von den eingesetzten Restriktionsenzymen, wurde der Reaktionspuffer gewählt und der Ansatz gegebenenfalls durch BSA komplementiert.

Komponente	**Volumen [µl]**			
	pGEX-4T-1 PAK-PBD			**pET30a(+) hPAK1**
	Vektor		***PCR-Produkt***	***Vektor***
	1	**2**		
Plasmid-DNA	10 µg	---	---	1,4 µg
Ligationsansatz	---	10	---	---
PCR-Produkt	---	---	20	---
EcoRI (20 U/µl)	1	---	1	---
XhoI (20 U/µl)	1	---	1	---
SmaI (10 U/µl)	---	1	---	---
NcoI (10 U/µl)	---	---	---	1
NotI (10 U/µl)	---	---	---	1
BSA (10x)	2	---	2,75	2
Puffer H (10x)	2	---	2,75	---
NEB 3 (10x)	---	1,2	---	2
H_2O_{dd}	11,5	---	---	---

Nachfolgend wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe der präparativen Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.3) getrennt und gereinigt. Gegebenfalls wurden vor der Reinigung weitere Reaktionen zur Vorbereitung der Fragmente durchgeführt (siehe 2.2.5).

2.2.4.2. Restriktionsanalyse

Um die jeweiligen Zielplasmide zu identifizieren, wurden Restriktionsanalysen durchgeführt, d.h. die isolierte Plasmid-DNA geschnitten und die Fragmente anhand des zu erwartenden Bandenmuster in der Gelelektrophorese analysiert. Die Restriktionsenzyme wurden dabei so gewählt, dass mindestens zwei deutlich trennbare Fragmente entstanden und sowohl im Vektor, als auch im Insert geschnitten wurde. Bei der Klonierung des Zielplasmids pET30a(+) wurde der bei der PCR verwendete Rückwärtsprimer (Primer #097) so entworfen, dass bei Ligation mit dem Insert in der richtigen Orientierung, die *NotI*-Schnittstelle rekonstruiert würde. Leider war es jedoch nicht möglich dies für die Restriktionsanalyse auszunutzen, da insgesamt im Plasmidkonstrukt zu viele *NotI*-Schnittstellen vorhanden sind, sodass bei Verdau mit dieser Endonuklease zu kleine und nicht-trennbare Fragmente entstanden wären.

Nach Transformation des Ligationsprodukts in *E. coli* wurden mehrere Kolonien gepickt und die DNA amplifiziert und isoliert (siehe 2.2.9). Die Ansätze wurden wie in Tabelle 2-15 angegeben pipettiert und für mindestens 1,5 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben mit 10x DNA-Probenpuffer versetzt und komplett auf ein Agarosegel (siehe 2.2.3) aufgetragen. Klone, welche nach Bandenmuster positiv waren, wurden zum Sequenzieren verschickt (siehe 2.2.10)

Tab. 2-15: Ansätze zur Restriktionsanalyse. Angegeben sind die Reaktionsbedingungen beim analytischen Verdau.

Komponente	Volumen [µl]	
	pGEX-4T-1 PAK-PBD	***pET30a(+) hPAK1***
Plasmid-DNA	3	3
ApaI (10 U/µl)	0,5	---
NcoI (10 U/µl)	---	0,3
BglI (10 U/µl)	---	0,3
RNase-Cocktail	---	0,3
NEB3 (10x)	---	1
Puffer A (10x)	1	---
H_2O_{dd}	*ad.* 10 µl	*ad.* 10 µl

2.2.5. Glättung von kohäsiven DNA-Fragmentenden

Da bei der Konstruktion des Plasmids pET30a(+) hPAK1 keine passenden Restriktionsenzyme gefunden werden konnten, um Vektor und Insert kompatibel zu machen, wurde das PCR-Produkt mit stumpfen Enden in den Vektor gebracht. Dieser wurde

allerdings so geöffnet, dass kohäsive Fragmentenden entstanden sind, die vor der Ligation noch geglättet werden mussten. Dies wurde mit Hilfe des Klenow-Fragments bewerkstelligt. Hierbei handelt sich um das größere der Proteinfragmente der DNA-Polymerase I aus *E. coli*, welche entstehen, wenn man das Enzym mit der Protease Subtilisin verdaut. Das Klenow-Fragment verfügt noch über die 5'→3' Polymerase-Aktivität und die 3'→5' Exonuklease-Aktivität (*proof reading*) der DNA-Polymerase I, jedoch nicht mehr über ihre Funktion als 5'→3' Exonuklease.

Die Komponenten wurden wie in Tabelle 2-16 angegeben pipettiert und der Ansatz für 15 min bei 25°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 0,3 µl 0,1 M EDTA hinzugefügt. Im Anschluss wurde das Klenow-Fragment durch Inkubation bei 75°C für 20 min hitzeinaktiviert. Danach erfolgte die Reinigung der Vektor-DNA mittels präparativer Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.3).

Tab. 2-16: Reaktionsansatz zur „Klenow-Glättung“.

Komponente	Volumen [µl]
Restriktionsverdau	20
dNTPs (je 2 mM)	1
DNA Polymerase I (Klenow, 5 U/ml)	1
NEB3 (10x)	1
H_2O_{dd}	7

2.2.6. Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Dephosphorylierung:

Da bei der Restriktion freie 5’-PO_4^{2-} und 3’-OH-Enden entstehen, können bei der Ligation im Prinzip alle vorhandenen Molekülspezies miteinander verknüpft werden, wobei es auch zu intra- oder intermolekularen Verbindungen von gleichen Spezies kommen kann. Um besonders die Re-Ligation des Vektors zu verhindern, wurde dieser vor der Ligation mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase (AP) dephosphoryliert. Hierzu wurde das Rapid DNA Dephos & Ligation Kit (*Roche*) verwendet. Die pipettierten Komponenten sind in Tab. 2-17 zu finden. Die Ansätze wurden mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die AP für 2 min bei 72°C hitzeinaktiviert.

Tab. 2-17: Reaktionsansatz zur Dephosphorylierung von Vektor-Fragmenten. Angegeben sind die pipettierten Volumina zur Dephosphorylierung der Vektor-DNA mit der SAP. *SAP: shrimp alkaline phosphatase*

Komponente	pGEX-4T-1	pET30a(+)
Vektor	16,1 µl (100 ng/µl)	17 µl (64 ng/µl)
rAPid Alkaline Phosphatase (1 U/µl)	1 µl	1 µl
Phosphatase-Puffer (10x)	2 µl	2 µl
H_2O_{dd}	*ad.* 20µl	*ad.* 20 µl

Phosphorylierung:

Das PCR-Produkt bei der Herstellung des Plasmidkonstrukts pET30a(+) hPAK1 wurde ungeschnitten als Insert verwendet. Um eine Ligation mit dem dephosphorylierten Vektor zu ermöglichen, musste das Insert daher erst phosphoryliert werden. Obwohl es einfacher wäre, das ungeschnittene PCR-Produkt und den phosphorylierten Vektor direkt zu ligieren, bevorzugt man in einer solchen Situation die Durchführung einer Phosphorylierung und einer Dephosphorylierung, weil die Re-Ligation des Vektors zu falsch positiven Klonen auf der LB-Agar-Platte führen kann, da nur der Vektor ohne Insert natürlich auch über die Antibiotikumresistenz verfügt. Inter- oder Intramolekulare Insertverknüpfungen hingegen führen zu keinem Effekt bei der nachfolgenden Selektion. Die Phosphorylierung wurde mit Hilfe einer Polynukleotidkinase (PNK) durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 2-18- zu finden. Er wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die PNK für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

Tab. 2-18: Reaktionsansatz zur Insertphosphorylierung.

Komponente	Volumen [µl]
Insert (12 ng/µl)	12,5
T4 Polynukleotidkinase (10 U/µl)	1
Ligationspuffer (10x)	1,5

2.2.7. Ligation

Nach Vorbereitung des Vektors und des Insert-Fragments (Amplifikation, Restriktion, Glättung, etc.) wurden die Komponenten zusammengebracht und enzymkatalysiert verknüpft. Hierzu wurde die DNA-Ligase des T4-Phagen eingesetzt. Diese kann sowohl

stumpfe als auch überhängende Enden ligieren. Die für die Reaktion benötigte Energie wird aus der Spaltung von ATP gewonnen.

Für eine erfolgreiche Ligation wird das Insert in der Regel je nach Größe im sechs- oder dreifachen molaren Überschuss bezogen auf den Vektor eingesetzt. Hier wurde mit einem sechsfachen Überschuss gearbeitet. Die einzusetzenden Mengen wurden anhand der Größenverhältnisse der Fragmente bestimmt. Die generellen Reaktionsbedingungen einer Ligation sind in Tabelle 2-19 dargestellt. Hierbei werden im Ansatz A zunächst die Pufferbedingungen eingestellt. In Ansatz B wird die Ligase hinzupipettiert. Es wurde mindestens 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der halbe Ligationsansatz in XL1 Blue-Zellen transformiert (siehe 2.2.8). Die andere Hälfte wurde bei 4°C gelagert. Die Ligase wird durch die erniedrigte Temperatur zwar inhibiert, jedoch nicht vollständig inaktiviert, sodass sie dennoch weiterarbeiten kann.

Neben den eigentlichen Ligationen wurden in weiteren Ansätzen die Leervektorligation (Tab. 2-19, K1) festgestellt, sowie der Anteil ungeschnittenen Vektors geprüft (Tab. 2-19, K2). Nach Transformation gibt das Koloniezahlverhältnis zwischen Ligationsansatz und Kontrollen Auskunft über die Effizienz der Ligation.

Tab. 2-19: Ligationsansätze. Dargestellt ist das generelle Pipettierschema für die durchgeführten Ligationen. Es wurden zusätzlich zu den eigentlichen Reaktionen Kontrollansätze zur Prüfung der Leervektorligation (K1) und der quantitativen Vektoröffnung (K2) angesetzt. *K: Kontrolle, L: Ligation*

ANSATZ A	**Volumen [µl]**		
	L1	**K1**	**K2**
Vektor: ~ 30 ng			
Insert: 6x Überschuss		---	---
Verdünnungspuffer (5x)	1,8	1,8	1,8
H_2O_{dd}	*ad.* 9 µl	*ad.* 9 µl	*ad.* 9 µl
ANSATZ B			
Ansatz A	9	9	9
T4 DNA-Ligase (10 U/µl)	1	1	---
Ligationspuffer (10x)	2	2	2
H_2O_{dd}	*ad.* 20 µl	*ad.* 20 µl	*ad.* 20 µl

2.2.8. Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

2.2.8.1. Transformation eines Ligationsansatzes

Zur Selektion des Zielplasmids wurden chemisch kompetente *E. Coli*-Zellen des Stamms XL-1 Blue mit dem Ligationsprodukt transformiert. Hierzu wurden 10 µl des Ligationsansatzes mit 5 µl 10x CM und 35 µl H_2O_{dd} gemischt und zu 150 µl XL1 Blue-Zellen pipettiert. Da die Zellen durch die Vorbehandlung mit $CaCl_2$ (siehe 2.2.1) recht instabil sind, ist es ratsam, sie langsam auf Eis auftauen zu lassen. Der Transformationsmix wurde mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte der Hitzeschock (1min, 42°C) und weitere 20–30 min Inkubation auf Eis. Zur Regeneration der Zellen wurden 800 µl LB-Medium ohne Antibiotikum dazugegeben und für 20–30 min bei 37°C bebrütet. Im letzten Schritt wurden die Zellen auf LB-Agar-Platten ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert. Je nach transformiertem Plasmid wurden Ampicilin (Amp)- oder Kanamycin (Kan)-haltige Platten verwendet.

<u>10x CM</u>
0,1 M $CaCl_2$
0,4 M $MgCl_2$

2.2.8.2. Re-Transformation von Plasmid-DNA

Nachdem durch DNA-Sequenzierung bestätigt wurde, dass es sich bei dem selektierten Klon tatsächlich um das Zielplasmid handelt, wurde dieses zur Expression in BL21-CodonPlus-Zellen transformiert. Dies geschah analog zum unter 2.2.8.1 beschriebenem Transformationsprotokoll. Da nun allerdings die entsprechende DNA in gereinigter und konzentrierter Form vorlag, konnten die Inkubationszeiten verkürzt werden. Es wurden 1 µl Plasmid-DNA mit 44 µl H_2O_{dd} und 5 µl 10x CM (siehe 2.2.8.1) gemixt und zu 50 µl chemisch kompetenter Zellen pipettiert. Der Transformationsmix wurde mindestens 10 min auf Eis inkubiert und anschließend der Hitzeschock (1 min bei 42°C) durchgeführt. Es folgten 10 min Inkubation auf Eis. Zur Regeneration der Zellen wurden 800 µl LB-Medium ohne Antibiotikum hinzugefügt und die Zellsuspension mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten ausplattiert und ü.N. bei 37°C bebrütet. Je nach Plasmid wurden Amp- oder Kan-haltige Platten verwendet.

2.2.9. Plasmidvermehrung und –isolierung

Vermehrung:

Um eine Aussage über den tatsächlichen Klonierungserfolg treffen zu können, musste für weitere Analysen zunächst ausreichend Material produziert werden. Hierfür wurden auf selektiv Agar gewachsene Kolonien (d.h. sie waren zumindest für den Vektor positiv) vermehrt werden und somit auch das Plasmid, das sie enthielten. Hierzu wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechendem Antibiotikum oder Antibiotika versetzt (Amp oder Kan und Chloramphenicol (Cam)) und mit einer Kolonie angeimpft. Die Mini-Kultur wurde ü.N. bei 37°C im Rollinkubator inkubiert. Anschließend folgten Plasmidisolierung (siehe unten) und Restriktionsanalyse (siehe 2.2.4.2).

Isolierung:

„Quick and dirty“:

Um schnell an eine geeignete Menge Plasmid-DNA für die Restriktionsanalyse zu gelangen, wurden die *E. coli*-Zellen zunächst im Mini-Maßstab vermehrt (siehe oben). 2 ml dieser ü.N.-Kultur wurden mindestens 2 min bei 17.000 xg und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Lösung 1 resuspendiert und gevortext. Anschließend wurden 120 µl Lösung 2 und 150 µl Lösung 3 hinzupipettiert. Nach jeder Zugabe wurde invertiert. Im Anschluss wurden die gefällte chromosomale DNA und die präzipitierten Proteine durch Zentrifugation (10 min, 17.000 xg, RT) grob entfernt. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 1 ml 100%iger Ethanol (EtOH) hinzugefügt. Die Probe wurde für mindestens 15 min bei 4°C und 17.000 xg. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 750 µl eiskaltem 70%igem EtOH gewaschen (5 min, 17.000 xg, 4°C). Der Überstand wurde erneut verworfen und der restliche EtOH bei 37°C im Brutschrank abgedampft. Das DNA-Pellet wurde in 20 µl DNase-freiem H_2O resuspendiert.
Es ist zu beachten, dass die isolierte Plasmid-DNA von geringer Qualität und noch nicht vernachlässigbar stark z.B. mit RNA verunreinigt ist.

Lösung 1	Lösung 2	Lösung 3
25 mM Tris/HCl, pH 7,5	0,2 M NaOH	3 M KCH_3COO pH 4,8 – 5,5
10 mM EDTA	1% SDS	

Mini-Maßstab:

Um Plasmid DNA in höherer Qualität und Menge zu erhalten wurde eine Mini-Präparation durchgeführt. Hierfür wurde das PureYield Miniprep System (*Promega*) genutzt. Gegebenenfalls wurde auf den Rest der Mini-Kultur, welche zur „Quick and dirty"-Reinigung angesetzt wurde, zurückgegriffen. Die Reinigungen wurden wie vom Hersteller angegeben durchgeführt.

2.2.10. DNA-Sequenzierung

Um den Erfolg der Klonierung zu prüfen, wurden aus der Restriktionsanalyse positiv hervorgegangene Klone sequenziert. Die Sequenzierung wurde bei der Firma *LGC Genomics* (Berlin) in Auftrag gegeben. Hierbei wurden für die Plasmid-Vektoren spezifische Standard-Primer gewählt. Das versandte Probenvolumen betrug 25 µl mit maximaler Konzentration.

2.2.11. Proteinexpression in *E. coli* BL-21

Zur Gewinnung großer Mengen von rekombinanten Proteinen wurden diese heterolog in *E. coli* BL21 exprimiert. Hierzu wurden die entsprechenden Plasmidkonstrukte standardmäßig zunächst in BL21-CodonPlus-Zellen transformiert (siehe 2.2.8). Bei ausbleibendem Expressionserfolg wurden weitere Zellstämme ausgetestet, sodass His_6-hPAK1 abweichend in BL21 Rosetta-Zellen exprimiert wurde. Nach erster Vermehrung der Zellen wurde ein Glycerinstock (20-50% Glycerin) angelegt, welcher dann zukünftig zum Animpfen genutzt wurde. Für hRac1 Wildtyp (WT), hRac1(G12V) und hRac1(T17N) wurden diese bereits freundlicherweise von Dr. Alexander Scholten (Universität Oldenburg) zur Verfügung gestellt.

Zur Expression in großem Maßstab, wurde zunächst eine über Nacht (ü.N.)-Kultur der entsprechenden Zellen angelegt, d.h. 5 ml steriles Selektiv-LB-Medium wurden mit *E. coli*-Zellen angeimpft und ü.N. bei 37°C im Rollinkubator bebrütet. Diese ü.N.-Kultur wurde in 500 ml Selektiv-LB-Medium überführt. Es erfolgte weiterhin die Inkubation bei 37°C, nun im Schüttelinkubator bei 180 rpm. Bei einer OD_{600} von ca. 0,6 wurde die Expression mit dem synthetischen *Lac*-Operon-Induktor Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) gestartet. Anschließend wurde die Suspension für 2-3 h unter gleichen Bedingungen weiter inkubiert. hRac1 (WT und Mutanten) und hPAK1 wurden abweichend bei 30°C exprimiert. Nach der Expression wurden die Bakterien durch Zentrifugation (10 min, 5.000, 4°C) geerntet. Die Zellpellets wurden im entsprechenden Reinigungspuffer resuspendiert und in ein 50 ml-

Röhrchen überführt. Die Zellen wurden erneut pelletiert (10 min, 5.000 xg, 4°C) und bis zur Reinigung bei -80°C gelagert.

2.2.12. Proteinreinigung

2.2.12.1. Reinigung von hRac1 aus *E. coli*

Das Reinigungsprotokoll wurde von Werner Säftel (Universität Oldenburg) etabliert. Da die Reinigung für den WT von hRac1 und die Mutanten hRac1(G12V) und hRac1 T17N genau gleich verlief, wird im Folgenden nicht zwischen diesen drei Proteinen unterschieden.

Zellaufschluss:

Das nach der Expression bei -80°C gelagerte Bakterienpellet wurde in 6 ml Rac1-Reinigungspuffer pro 500 ml *E. coli*-Expressionskultur resuspendiert und durch drei Zyklen von Auftauen bei Raumtemperatur und Einfrieren bei -20°C vor-lysiert. Die Zellen wurden bei 10.000 xg und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut im gleichen Volumen Rac1-Reinigungspuffer aufgenommen. Der endgültige Zellaufschluss wurde durch Behandlung mit Ultraschall erreicht. Hierbei wurde die Bakteriensuspension auf Eis fünfmal 1 min beschallt (Duty Cycle: 50%, Output Control: 3) Zwischen den Beschallungen wurde jeweils 1 min pausiert, um die Suspension nicht zu überhitzen. Grobe Zelltrümmer wurden durch 10 min Zentrifugation bei 10.000 xg und 4°C entfernt. Feinere Zellpartikel wurden anschließend durch Ultrazentrifugation des Überstands sedimentiert (30-60 min, 346.000 xg, 4°C).

Reinigung:

Nachfolgend konnte Rac1 mittels Kationenaustauschchromatografie gereinigt werden. Falls nicht anders erwähnt, wurden hierbei alle Schritte bei 4°C durchgeführt. Es wurde entweder eine S-Sepharose-Säule (Bettvolumen ca. 1 ml) und eine Peristaltikpumpe genutzt oder eine kommerzielle HiTrap SP XL Säule (*Amersham Biosciences*) mit einer FPLC-Anlage. Die entsprechende Säule wurde mit Rac1-Reinigungspuffer äquilibriert und anschließend mit dem Überstand nach Ultrazentrifugation beladen. Bei der HiTrap SP XL-Säule wurde hierbei eine Spritze mit einer Spritzenpumpe zur Hilfe genommen. Im Anschluss wurde die Säule mit Rac1-Reinigungspuffer gewaschen bis das UV-Signal bei 280 nm auf nahezu Null gesunken war, d.h. keine Proteine mehr von der Säule gespült werden konnten. Die Elution des an die Sepharose gebundenen Proteins fand für die HiTrap SP XL-Säule mit einem linearen Salzgradienten von 0-1 M NaCl in Rac1-Reinigungspuffer in 20 min bei einem Fluss von 1 ml/min statt. Hierbei wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt. Von der S-Sepharose-Säule

wurde mit einem Stufengradienten von 0,1-0,5 M in 100 mM-Schritten und einem Volumen von 2 ml pro Fraktion eluiert. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde photometrisch bestimmt und jene mit höchster Proteinkonzentration vereinigt

Pufferwechsel:

Im Anschluss wurde die Proteinlösung in 50 mM NH_4HCO_3 umgepuffert und zwar mit Hilfe eines Pierce Concentrator mit einem Größenausschluss (*molecular weight cut-off*, MWCO) von 9.000 Da. Hierbei wurde die Lösung zunächst durch Zentrifugation (4.194 xg, 4°C) eingeengt und anschließend 4- bis 5-fach mit 50 mM NH_4HCO_3 verdünnt. Diese Prozedur wurde mindestens dreimal (in der Regel fünfmal) wiederholt bis schließlich final auf ein Volumen von ca. 1 ml eingeengt wurde. Die Proteinkonzentration wurde erneut photometrisch bestimmt und das gereinigte Protein aliquotiert. Das NH_4HCO_3 wurde unter Vakuum abgedampft und das lyophylisierte Protein bei -80°C gelagert. Abschließend wurde der Reinigungserfolg mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.13.1.1) geprüft.

<u>Rac1-Reinigungspuffer</u>
20 mM HEPES/KOH pH 7,4
1 mM $MgCl_2$
0,1 mM PMSF
1 mM DTT

2.2.12.2. Reinigung von His_6-hPAK1 aus *E. coli*

Das Gen *hPAK1* wurde so in den Vektor pET30a(+) kloniert, dass bei der Expression das Protein N-terminal mit einem Polyhistidin (His_6-)-Tag versehen wird. Zur Reinigung von His_6-markierten Proteinen wird eine spezielle Form der Affinitätschromatografie angewandt und zwar die immobilisierte Metallchelat-Affinitätschromatografie (IMAC). Als Säulenmaterial wird hierbei Nitrioltriessigsäure (NTA) gebunden an Sepharosebeads verwendet (HisTrap FF, 1ml, *Amersham Biosciences*). NTA chelatiert Ni^{2+} welches wiederum mit dem His_6-Tag in Wechselwirkung tritt.

Zellaufschluss:

Die nach der Expression pelletierten Zellen wurden in 10 ml Lysepuffer plus 2 mM DTT und 0,2 mM PMSF resuspendiert. Zum Aufschluss der Bakterien wurden diese mit DNase (5 U/ml) und Lysozym (100 µg/ml) versetzt und 30 min bei 30-35°C schüttelnd im Wasserbad inkubiert. Alternativ wurden die Zellen durch zweimal 2 min Ultraschall (Output: Stufe 3,

effektive Beschallungszeit: 50%) auf Eis aufgeschlossen. Zwischen den Beschallungen wurde die Suspension 2 min auf Eis abgekühlt. Im Anschluss wurde mit Lysepuffer auf ca. 25 ml aufgefüllt. Durch 10 min Zentrifugation bei 8,500 xg und 4°C wurden grobe Zelltrümmer und Organellen entfernt. Um weitere unlösliche Bestandteile zu sedimentieren, wurde danach für mindestens 30 min bei 30.000 xg (Rotor: Surespin 630, *Sorvall*) und 4°C zentrifugiert.

Reinigung:

Die Reinigung wurde in Anlehnung an ein Protokoll aus einem Handbuch von *QIAGEN* (2002) durchgeführt. Es wurden HisTrap FF–Säulen (*Amersham Biosciences*) benutzt. Diese wurden vor Applikation des Lysats mit Lysepuffer äquilibriert. Da die Proteinmenge die Ladekapazität einer Säule überschritt, wurde, um die Ausbeute zu erhöhen, der Überstand nach Ultrazentrifugation (siehe oben) auf fünf hintereinander geschraubte HisTrap-Säulen injiziert. Dies geschah mit Hilfe einer Spritzenpumpe bei einem Fluss von 0,5-1 ml/min. Durch Interaktion der Imidazolringe des His_6-Tags mit dem chelatierten Ni^{2+} bindet das Protein an der Säulenmatrix. Nach Injektion wurden die Säulen einzeln und nacheinander an der FPLC-Anlage mit Waschpuffer gewaschen und anschließend das His_6-hPAK1 mit Elutionspuffer eluiert. Dies geschah bei einem Fluss von 0,5-1 ml/min. Es wurden 500 µl-Fraktionen gesammelt. Anhand des aufgezeichneten Chromatogramms wurden jene Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration ausgewählt und vereinigt. Der Reinigungserfolg wurde im SDS-Polyacrylamidgel geprüft (siehe 2.2.13.1.1).

Pufferwechsel:

Für nachfolgende Experimente wurde das gereinigte Protein in 2x hPAK1-Puffer umgepuffert. Dies geschah entweder mittels Dialyse oder Zentrifugation. Bei der Dialyse wurde ein Dialyseschlauch mit einem MWCO von 12-16 kDa verwendet. Er wurde zunächst in 5-10 mM EDTA aufgekocht. Nach 22-24 h wurde die Dialyse gestoppt. Der Dialysepuffer wurde in dieser Zeit mindestens zweimal gewechselt. Das gereinigte Protein wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zuvor wurde die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 2.2.15.1). Das Umpuffern mittels Zentrifugation geschah mit Hilfe eines Pierce-Concentrators (MWCO 50 kDa). Hierbei wurde die Lösung zunächst bei 4.194 xg, 4°C eingeengt und anschließend 4- bis 5-fach mit 2x hPAK1-Puffer ohne Triton X-100 verdünnt. Diese Prozedur wurde fünfmal wiederholt bis schließlich final auf ein Volumen von ca. 1 ml eingeengt wurde. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt (siehe 2.2.15.1) und die Proteinlösung anschließend zur Stabilisation mit 50% (v/v) Glycerin versetzt. Das Protein wurde in Arbeitsaliquots von 50 µl bei -80°C gelagert.

Lysepuffer
50 mM NaH_2PO_4, pH 8,0
300 mM NaCl
20 mM Imidazol

Elutionspuffer
50 mM NaH_2PO_4, pH 8,0
300 mM NaCl
250 mM Imidazol

Waschpuffer
50 mM NaH_2PO_4, pH 8,0
500 mM NaCl
40 mM Imidazol
1% (v/v) Glycerin

2x hPAK1-Puffer
50 mM Tris/HCl, pH 7,5
150 mM NaCl
0,5 mM EDTA
2 mM DTT
(0,02% Triton X-100)

2.2.12.3. Reinigung von hPAK1 aus *E. coli*

Der pET30a(+)-Vektor ist so konstruiert, dass sich der His_6-Tag abdauen lässt. Demnach wurde hPAK1 dahingehend in den Vektor kloniert, dass sich genau vor dem eigentlichen Protein eine Erkennungssequenz für die Enterokinase befindet. Theoretisch enthält PAK1 selbst keine Schnittstellen, sollte also nicht proteolysiert werden. Um die optimalen Bedingungen für die Reaktion herauszufinden, wurde zuerst ein Testverdau durchgeführt. Das beste Ergebnis wurde anschließend zur Reinigung im großen Maßstab genutzt.

Testverdau in kleinem Maßstab:

Zunächst wurde der Zellaufschluss wie unter 2.2.12.2 beschrieben mit Ultraschall durchgeführt. Der Überstand wurde auf 500 µl Ni-Sepharose (*GE Healthcare*), welche zuvor mit Lysepuffer äquilibriert wurde, gegeben und ü.N. bei 4°C über Kopf drehend inkubiert. Anschließend wurde der Input durch Zentrifugation entfernt (3000 xg, 4°C, 3 min) und die Säule zweimal mit Waschpuffer und einmal mit Enterokinase-Puffer gewaschen. Danach wurde in 2 ml Enterokinase-Puffer mit 0,004 U Enterokinase bei RT das hPAK1 von der Säule gedaut. Nach 5 min sowie 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h wurde das Säulenmaterial sedimentiert und eine Probe des Überstands genommen. Nach 7 h wurde die Inkubation ü.N. bei 4°C fortgesetzt und am nächsten Tag erneut eine Probe genommen. Das Ergebnis der Zeitreihe wurde im SDS-Polyacrylamidgel (siehe 2.2.13.1.1) analysiert.

Reinigung in großem Maßstab:

Anmerkung: Falls nicht anders erwähnt, wurde grundsätzlich bei 4°C gearbeitet.

Zunächst wurde der Zellaufschluss wie unter 2.2.12.2 beschrieben mit Ultraschall durchgeführt. Der Überstand wurde auf fünf hintereinander geschraubte 1 ml-HisTrap-Säulen (*Amersham Biosciences*) mit Hilfe einer Spritzenpumpe injiziert. Anschließend wurden die

Säulen einzeln an der FPLC-Anlage (ÄKTA prime plus, *Amersham Biosciences*) zuerst mit Waschpuffer, dann mit Enterokinase-Puffer gewaschen. Je 0,004-0,007 U der Enterokinase wurden in 1 ml Enterokinase-Puffer mit Hilfe einer Spritze auf die Säulen gebracht und ü.N. bei 4°C auf dem Kippschüttler inkubiert. Die Elution fand mit 2x hPAK1-Puffer ohne Triton X-100 und ohne DTT oder nur mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 bei einer Flussrate von 0,5-1 ml/min statt. Hierbei wurden 0,5-1 ml-Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen mit höchstem Proteingehalt (nach UV-Signal bei 280 nm) wurden vereinigt und mit Hilfe eines Pierce-Concentrators (MWCO 50 kDa) bei 4°C und 10.000 xg auf ein Volumen von 0,5-1 ml eingeengt. Im nächsten Schritt sollte zum einen die Enterokinase entfernt, zum anderen die beim Verdau entstandenen Produkte (siehe 3.7.3.2) voneinander getrennt werden. Hierzu wurde sowohl eine Größenausschlusschromatografie (*size exclusion chromatography*, SEC) als auch die Anionenaustauschchromatografie (*anion exchange chromatography*, AEC) versucht.

Für die **SEC** wurde die Säule Superdex 200 10/300 (Säulenvolumen 25 ml) eingesetzt. Nach Äqulibrierung mit 2x hPAK1-Puffer (ohne DTT und Triton X-100) wurde das eingeengte Eluat der HisTrap-Säulen (siehe oben) injiziert und mit 2x hPAK1-Puffer (ohne Triton X-100) bei einer Flussrate von 0,4 ml/min eluiert. Hierbei wurden zunächst 1 ml- ab Fraktion 10 0,5 ml-Fraktionen gesammelt. Das UV-Signal bei 280 nm wurde aufgezeichnet und jene Fraktionen mit der höchsten Extinktion vereinigt und auf ca. 250 µl mit einem Pierce-Concentrator (MWCO 50 kDa) bei 4°C und 10.000 xg eingeengt. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Protein-Assay-Farbreagenz (siehe 2.2.15.1) bestimmt und die Proteinlösung anschließend zur Lagerung bei -80°C mit 50% (v/v) Glycerin versetzt. Der Reinigungserfolg wurde mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.13.1.1) geprüft.

Für die **AEC** wurden verschiedene Säulen mit unterschiedlichen Eigenschaften getestet: (1) ANX FF, (2) DEAE FF und (3) QXL (alle von *GE Healthcare* und mit einem Säulenvolumen von 1 ml). Abweichend von der oben beschriebenen Vorschrift wurde mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 von den His-Trap-Säulen (siehe oben) eluiert. Das Eluat wurde vereinigt und mit 50 mM Tris/HCl pH 7,5 auf 50 ml verdünnt. Anschließend wurde die Lösung mit Hilfe einer Spritzenpumpe auf die drei hintereinander geschraubten AEC-Säulen injiziert (Flussrate: 9 ml/h). Danach wurde ohne zu waschen direkt mit der Elution begonnen. Hierbei wurde ein linearer Salzgradient benutzt (0-1M NaCl in 20 ml bei 1 ml/min). Es wurden 1 ml-Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen mit dem höchsten UV-Signal (bei 280 nm) wurden vereinigt und mit Hilfe eines Pierce-Concentrators (MWCO 50 kDa) in 2x hPAK1-Puffer (ohne Triton X-100) umgepuffert und eingeengt (siehe 2.2.12.2). Die Proteinkonzentration wurde mit dem Protein-Assay-Farbreagenz (siehe 2.2.15.1) bestimmt und die Proteinlösung anschließend zur Lagerung bei -80°C mit 50% (v/v) Glycerin versetzt. Abschließend wurde der Reinigungserfolg elektrophoretisch analysiert (siehe 2.2.13.1.1).

Waschpuffer	Enterokinase-Puffer	2x hPAK1-Puffer
50 mM NaH_2PO_4, pH 8,0	50 mM Tris/HCl, pH 7,5	50 mM Tris/HCl, pH 7,5
500 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
40 mM Imidazol	2 mM $CaCl_2$	0,5 mM EDTA
1% (v/v) Glycerin	2 mM DTT	2 mM DTT
		(0,02% Triton X-100)

2.2.12.4. Reinigung von GST-PAK-PBD aus *E. coli*

Die DNA-Sequenz der p21-bindenden Domäne (PBD) von hPAK1 (aa 67-160) wurde in den Plasmid-Vektor pGEX-4T-1 kloniert und zwar so, dass das exprimierte Peptid N- terminal einen GST-Tag trägt, d.h. ein GST-Fusionsprotein synthetisiert wird. Der GST-Tag wurde zur Reinigung des Expressionsprodukts genutzt. Hierbei wird das Zelllysat über eine mit Glutathion gekoppelte Sepharose gegeben, wobei die Glutathion-S-Tranferase (GST) mit ihrem Substrat interagiert, und GST-markierte Proteine auf der Säule verbleiben. Sie können durch einen Überschuss an Glutathion in der mobilen Phase eluiert werden. Die Reinigung wurde in Anlehnung an das Reinigungshandbuch von *GE Healthcare* (2012) durchgeführt.

Zellaufschluss:

Das Zellpellet nach Expression wurde aufgetaut und in 10 ml PBD-Reinigungspuffer pro 500 ml *E. coli*-Expressionskultur resuspendiert. Die Bakterien wurden durch Ultraschall (5 x 1 min, Duty Cycle: 50%, Output Control: 3) aufgeschlossen. Um ein starkes Erwärmen des Lysats zu verhindern, fand die Beschallung auf Eis statt und wurde nach 1 min für ebenfalls 1 min unterbrochen. Durch Zentrifugation (10 min, 10.000 xg, 4°C) wurden grobe Zelltrümmer entfernt.

Reinigung und Pufferwechsel:

Der Überstand nach Zentrifugation (siehe oben) wurde mit PBD-Reinigungspuffer auf 50 ml eingestellt und ü.N. mit Hilfe einer Spritze und Spritzenpumpe auf eine Glutathion-Säule (GSTrap FF, *Amersham Biosciences*) injiziert. Die Säule wurde zuvor mit PBD-Reinigungspuffer äquilibriert. Im Anschluss an die Injektion wurde an einer FPCL-Anlage mit PBD-Reinigungspuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Das GST-Fusionsprotein wurde mit 10 mM Glutathion (reduziert) in PBD-Reinigungspuffer von der Säule eluiert. Hierbei wurden 1 ml-Fraktionen gesammelt. Das UV-Signal bei 280 nm wurde während des gesamten Vorgangs aufgenommen. Jene Elutionsfraktionen mit dem größten Proteingehalt (höchstes UV-Signal) wurden vereinigt und gegen PBD-Reinigungspuffer dialysiert, um das Glutathion wieder zu entfernen. Hierbei wurde ein

Dialyseschlauch mit einem Größenausschluss von 3,5 kDa verwendet. Er wurde zunächst in 5-10 mM EDTA aufgekocht. Nach 22-24 h wurde die Dialyse gestoppt, Der Dialysepuffer wurde in dieser Zeit mindestens zweimal gewechselt. Das gereinigte Protein wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert. Der Reinigungserfolg wurde abschließend mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.13.1.1) geprüft.

PBD-Reinigungspuffer
50 mM Tris/HCl pH 7,5
100 mM NaCl
1 mM DTT

2.2.12.5. Reinigung von bovinem Transducin aus ROS

Das heterotrimere G-Protein Transducin (G_T) wurde nativ als Trimer nach dem Protokoll von Komolov und Koch (2010) direkt aus Stäbchenaußensegmenten (*rod outer segment(s),* ROS*)* gereinigt. Hierzu wurde zunächst 1 ml ROS-Präparation für mindestens 5 min auf Eis mit weißem Licht belichtet. Hierbei wird G_T an Rh gebunden. Anschließend wurde die ROS-Präparation mit 5 ml hypotonischem Puffer gemischt und in zehn Zügen mit einem Handhomogenisator homogenisiert. Das Homogenisat wurde auf zwei Ultrazentrifugenröhrchen aufgeteilt und für mindestens 10 min bei 100.000 xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet, ohne es zu resuspendieren, fünfmal mit je 3 ml hypotonischem Puffer gewaschen (Zentrifugation: 100.000 xg, 4°C, mindestens 10 min). Im Anschluss folgte die Elution des G_T vom Rh. Hierzu wurde das Pellet in insgesamt 2,5 ml hypotonischem Puffer + 20 µM GTP für 5 min auf Eis inkubiert. Lösliche und unlösliche Proteine wurden durch Zentrifugation voneinander getrennt (15 min, 150.000 xg, 4°C). G_T befindet sich nun im Überstand. Um das GTP zu entfernen und das Protein in einem für die folgenden Experimente geeigneten Puffer vorliegen zu haben, wurde G_T mit Hilfe einer PD-10-Säule (*GE Healthcare*) umgepuffert. Die PD-10-Säule wurde zuvor mit SPR-Laufpuffer äquilibriert. Beim Trennen mit der PD-10-Säule ist es aufgrund des charakteristischen Elutionsprofils wichtig, dass ein genaues Volumen von 2,5 ml aufgetragen wird. Der Durchfluss wurde verworfen und G_T mit genau 3,5 ml SPR-Laufpuffer eluiert. Das Protein wurde schnellstmöglich aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung fand bei -80°C statt. Eine Probe wurde zuvor zur Proteinquantifizierung mittels Protein-Assay-Farbreagenz (siehe 2.2.15.1) abgenommen. Der Reinigungserfolg wurde im SDS-Gel geprüft (siehe 2.2.13.1.1). Hierbei ist zu beachten, dass ausschließlich die α- und β-Untereinheit zu sehen sind, da die γ-Untereinheit mit 8 kDa zu klein ist, um in dem

angewandten System mit der Coomassie-Färbung (siehe 2.2.14.1) detektiert werden zu können.
Die PD-10-Säule wurde mit H_2O_{dd} gründlich gespült und zur Wiederverwendung in 20% EtOH p.a. gelagert
Ohne einen Stabilisator wie z.B. Glycerin ist G_T sehr instabil. Aus diesem Grund wurde für die Experimente kein Protein verwendet, dessen Reinigung länger als maximal sechs Monate zurück lag.

Hypotonischer Puffer	SPR-Laufpuffer
5 mM Tris/HCl, pH 7,4	20 mM Tris/HCl, pH 7,4
0,4 mM $MgCl_2$	150 mM NaCl
0,4 mM EDTA	3 mM $MgCl_2$
1 mM DTT	

2.2.13. Proteinauftrennung mittels Polyacrylamidgelelektrophorese

2.2.13.1. Proteinauftrennung mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese

2.2.13.1.1. Proteinauftrennung in der ersten Dimension

Zur Proteinauftrennung wurde die Methode der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970), Ornstein (1964) und Davis (1964) eingesetzt. Hierbei werden Proteine mit dem Detergens SDS denaturiert und in unterschiedlich konzentrierten, übereinander geschichteten Polyacryamidgelen elektrophoretisch getrennt.
Standardmäßig wurde in einem Tris/ Glycin-Puffersystem gearbeitet. Die SDS-PAGE wurde je nach Molekulargewicht des interessanten Proteins in Trenngelen mit einer Polyacrylamidkonzentration von 7-15% durchgeführt. Das dem Trenngel aufgesetzte Sammelgel war jeweils 5%ig. Es wurden Mini-Protean 3-Kammern (*BioRad*), Mini-Protean Tetra-Kammern (*BioRad)* oder MGV-402-Kammern (*CBS Scientific*) verwendet. Vor Auftrag auf das Gel wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer (Endkonzentration 1x) versetzt und für mindestens 2 min bei 95°C denaturiert. Im Kinaseassay und bei der Untersuchung von Rh wurde mindestens 10 min bei RT inkubiert. Die Trennung erfolgte bei konstanten 200V in 1x SDS-Laufpuffer und dauerte ca. 40 min. Als Referenz wurde jeweils ein Größenstandard mit aufgetrennt. Für Gele, die für einen Westernblot oder ein Autoradiogramm vorgesehen waren, wurde der Precision Plus Protein All Blue-Standard (*BioRad*) oder der Prestained Protein Molecular Weight Marker *(Pierce*) verwendet. Für Gele, die nach der Trennung mit

Coomassie gefärbt wurden (siehe 2.2.14.1), wurde der Precision Plus Protein Unstained-Standard (*BioRad)* eingesetzt.

Sammelgel
5% (v/v) Acrylamid, 40%ig
125 mM Tris/HCl, pH 6,8
1,2% (w/v) APS
0,2% TEMED

Trenngel
7-15% (v/v) Acrylamid, 40%ig
375 mM Tris/HCl, pH 8,8
0,05% (w/v) APS
0,1% TEMED

4x SDS-Probenpuffer
8% SDS
200 mM Tris/HCl pH 6,8
50% Glycerin
4% β-Mercaptoethanol
0,04% Bromphenolblau

10x SDS-Laufpuffer
250 mM Tris
1% SDS
1,92 M Glycin

2.2.13.1.2. Proteinauftrennung in der zweiten Dimension

Um eng beieinander laufende Proteinbanden für die massenspektrometrische Analyse weiter zu separieren, wurde eine zweite SDS-PAGE durchgeführt. Radioaktive und nicht-radioaktive Proben aus dem Kinaseassay (siehe 2.2.27.2) wurden zunächst wie in 2.2.13.1.1 beschrieben in der ersten Dimension vertikal getrennt. Anschließend wurde das Gel wie in 2.2.27.3 geschildert (ohne es zu färben!) getrocknet und ein Autoradiogramm erstellt. Mit Hilfe des entwickelten ECL-Films, auf dem sowohl der Proteinmarker als auch die Signale der radioaktiven Proben zu sehen waren, wurden Gelstücke auf Höhe der Kinase hPAK1 und des unbekannten hPAK1-Substrats bei ca. 20 kDa aus den Spuren der radioaktiven und nicht-radioaktiven Proben ausgeschnitten und um 90° gedreht in Taschen eines zweiten Polyacrylamidgels (Zusammensetzung siehe 2.2.13.1.1) gebracht, wobei Gelstücke gleicher Proben in die gleiche Tasche des zweiten Gels transferiert wurden. Vor der eigentlichen Elektrophorese, wurden die Gelstücke in den Taschen für ca. 15 min bei RT in 1x SDS-Probenpuffer (Zusammensetzung siehe 2.2.13.1.1) inkubiert. Hierbei konnten sie wieder aufquellen und gleichzeitig wurden die Proteine erneut mit SDS beladen.
Die Elektrophorese in der zweiten Dimension fand im 5%igen Trenn- und 12%igen Sammelgel statt. Es wurden MGV-402- Kammern (*CBS Scientific*) benutzt. Die Trennung erfolgte bei konstanten 180 V in 1x SDS-Laufpuffer (Zusammensetzung siehe 2.2.13.1.1) und dauerte ca. 40 min. Als Referenz wurde der Precision Plus Protein All Blue-Standard (*BioRad*) aufgetragen. Die Gelspuren der radioaktiven Proben wurden im Anschluss mit

Coomassie gefärbt (siehe 2.2.14.1), getrocknet und ü.N. ein ECL-Film exponiert. Die Spur der nicht-radioaktiven Probe wurde mit kolloidalem Coomassie gefärbt (siehe 2.2.14.2), die entsprechenden Proteinbanden ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse verschickt (siehe 2.2.28)

2.2.13.2. Proteinauftrennung mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese

2.2.13.2.1. Anionische native Polyacrylamidgelelektrophorese

Unbekannte Proteinbanden von ROS-Membranproteinen sollten zur massenspektrometrischen Analyse isoliert werden. Um eine größtmögliche Trennung zu erzielen, wurde zunächst versucht in der ersten Dimension eine native PAGE durchzuführen, bevor die Proteine in der zweiten Dimension mittels SDS-PAGE weiter nach ihrer Größe getrennt werden sollten. Für die native PAGE wurden verschiedene Varianten der Probenvorbereitung ausprobiert. Entweder wurden die Membranpellets (siehe 2.2.27) in 1x Probenpuffer aufgenommen oder aber in 1x Probenpuffer mit Zusatz verschiedener nicht-denaturierender, nichtionischer oder anionischer Detergenzien: 1) 1% Triton X-100, 2) 1% n-Dodecyl-β-D-maltosid (DM), 3) 4 mM Natriumdeoxycholat oder 4) zur Kontrolle 1% SDS. Anschließend folgte eine mindestens 20 minütige Inkubation auf Eis mit mehrmaligem Vortexen. Zur Trennung wurden 7,5%ige oder 15%ige Trenngele (Zusammensetzung siehe 2.2.13.1.1) ohne aufgesetztes Sammelgel verwendet. Es wurden MGV-402-Kammern (*CBS Scientific*) benutzt. Die Trennung erfolgte in 1x Laufpuffer entweder bei konstanten 180 V für ca. 45 min oder zunächst für 30 min bei 150V und anschließend für weitere 30 min bei 180V. Danach wurden die Gele mit Coomassie Blau gefärbt (siehe 2.2.14.1) wie in 2.2.27 beschrieben getrocknet und ein Autoradiogramm erstellt.

4x Probenpuffer	10x Laufpuffer
200 mM Tris/HCl pH 6,8	250 mM Tris
50% Glycerin	1,92 M Glycin
0,04% Bromphenolblau	

2.2.13.2.2. Kationische native Polyacrylamidgelelektrophorese

Da die Trennung der ROS-Membranproteine in der anionischen nativen PAGE (siehe 2.2.13.2.1) leider ohne Erfolg blieb, wurde als Alternative eine native PAGE nach Säftel *et al.* (1999) ausgetestet, bei der primär basische Proteine getrennt werden.

Die Membranpellets aus dem Kinaseaktivitätsassay (siehe 2.2.27) wurden in 9 µl Probenpuffer aufgenommen und mit 1) 1% Triton X-100 oder 2) 1% DM versetzt. Anschließend wurde 40 min auf Eis inkubiert. Zur Trennung wurde ein 10%iges Trenngel

ohne aufgesetztes Sammelgel verwendet. Es wurden MGV-402-Kammern (*CBS Scientific*) benutzt. Die Trennung erfolgte in Laufpuffer bei konstanten 180 V für ca. 60 min. Hierbei wurde die Polung umgekehrt, sodass sich die Kathode, zu der die Proteine wandern, am Boden der Kammer befand. Im Anschluss wurde das Gel mit Coomassie Blau (siehe 2.2.14.1) gefärbt, wie in 2.2.27.3 beschrieben getrocknet und ein Autoradiogramm erstellt.

Trenngel	Probenpuffer	Laufpuffer
375 mM TAPS/KOH, pH 7,5	150 mM TAPS, pH 7,5	20 mM TAPS
10% (v/v) Acrylamid, 40%ig	50% (v/v) Glycerin	100 mM Histidin
0,06% (v/v) TEMED	0,1% Cytochrom C	
0,06% (w/v) APS		

2.2.14. Coomassie Blau-Färbung

2.2.14.1. Standardfärbung

Nach der Auftrennung (siehe 2.2.13) wurde das Proteinbandenmuster mittels Coomassie Blau-Färbung sichtbar gemacht. Hierzu wurden die Proteine zunächst durch Inkubation in Entfärbelösung (mindestens 5 min bei RT) im Gel fixiert. Anschließend wurde für mindestens 20 min bei RT schüttelnd in Färbelösung inkubiert. Da die Färbelösung mehrfach verwendet wurde, war häufig eine längere Inkubationszeit notwendig. Danach wurde der Gelhintergrund bis zum gewünschten Grad entfärbt. Dies geschah unter ständigem Schütteln und bei RT. Die Entfärbelösung wurde hierbei mehrfach gewechselt.
Die gefärbten Gele wurden mit der AlphaImager-Dokumentationsanlage (*AlphaInnotech/ Biozym*) dokumentiert. Bis dahin wurden sie bei RT in H_2O gelagert.

Coomassie-Färbelösung	Coomassie-Entfärbelösung
0,2% Coomassie Brillant Blue R250	40% Ethanol, vergällt
40% Ethanol, vergällt	10% CH_3COOH
10% CH_3COOH	

2.2.14.2. Kolloidal-Färbung

Da Essigsäure die massenspektrometrische Analyse von Proteinen stören würde, wurden jene Polyacrylamidgele, welche Banden enthielten, die zur Analyse verschickt werden sollten, nicht mit der Standardfärbemethode gefärbt. Stattdessen wurde ein kolloidales Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G250) verwendet und die Proteine statt mit Essigsäure mit MeOH fixiert. Hierzu wurde das Gel ü.N. in Färbelösung unter ständigem Schütteln und

bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde der Hintergrund unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung bis zum gewünschten Grad entfärbt.

Kolloidal-Färbelösung	Entfärbelösung
20% Roti-Blue 5x Konzentrat (*BioRad*)	20% Methanol p.a.
25% Methanol p.a.	

2.2.15. Proteinquantifizierung

2.2.15.1. Quantifizierung löslicher Proteinen mit Coomassie-Brilliantblau

Lösliche Proteine oder Proteingemische wurden in Anlehnung an den Bradford-Assay (Bradford, 1976) quantifiziert. Hierzu wurde das Protein-Assay-Farbreagenz (*BioRad*) nach Herstellerangaben angewendet. Die Proben wurden vor der Vermessung bei 595 nm standardmäßig für 15 min mit dem Reagenz inkubiert.

2.2.15.2. Quantifizierung von Membranproteinen mit Amidoschwarz

Hohe Detergenz-Konzentrationen stören den Bradford-Assay. Ihr Einsatz ist jedoch unabdingbar, um Membranproteine aus der Membran zu lösen. Aus diesem Grund wurde zur Konzentrationsbestimmung membranhaltiger Proteingemische eine Methode mit Amidoschwarz nach Schaffner und Weissmann (1973) angewandt.
Die Proben wurden mit H_2O_{dd} auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und zur Solubilisation der Membranproteine mit 10 µl 10% SDS versetzt. Anschließend wurden 15 µl 1% SDS/1M Tris/HCl pH 7,5 hinzupipettiert. Durch Zugabe von 30 µl 104% (w/v) TCA erfolgte die Fällung der Proteine. Zwischen den einzelnen Pipettierschritten wurde durch Vortexen gemischt. Die Proben wurden 20 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden sie auf einen Nitrozellulosemembranfilter (0,45µm/ *Millipore*) jeweils auf eine Fläche von ca. 1 cm² unter Vakuum aufgetragen. Der Filter wurde vor und nach dem Auftragen mit 6% TCA gewaschen. Danach wurde die Membran mindestens 5 min in Färbelösung gefärbt. Anschließend wurde mit H_2O_{VE} gespült und bis zum gewünschten Grad der Hintergrund des Filters unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung wieder entfärbt. Nach erneutem Spülen mit H_2O_{VE} wurde der Filter bei RT getrocknet. Die gefärbten Felder wurden ausgeschnitten und in 1 ml Elutionslösung überführt. Der Farbstoff wurde so unter ständigem Schütteln 20 min bei RT eluiert. Die Lösungen wurden bei 630 nm photometrisch vermessen und anhand mitgeführter BSA-Proben definierter Menge eine Kalibriergerade als Referenz erstellt und die Proteinkonzentration der zu bestimmenden Proben errechnet.

Färbelösung:	Entfärbelösung:	Elutionslösung:
0,5% Amidoschwarz B10	45% 2-Propanol, p.a.	50% Ethanol
45% 2-Propanol, p.a.	10% CH_3COOH	25 mM NaOH
10% CH_3COOH		50 µM EDTA

2.2.15.3. Photometrische Proteinquantifzierung

Wenn möglich wurden Proteine photometrisch quantifiziert. Hierzu wurde die Extinktion der Proteinlösung bei 280 nm gemessen und die Konzentration mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes berechnet. Es gilt:

$$A = c \cdot \varepsilon \cdot d \qquad (1)$$

wobei A der Extinktion (aus dem Englischen *absorbance,* A), c der Konzentration in mol/l (=M), ε dem Extinktionskoeffizienten in $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ und d der Schichtdicke der Küvette in cm entspricht. Die Schichtdicke der Küvette lag grundsätzlich bei 1 cm. Der Extinktionskoeffiezient von hRac1 beträgt 26.018 $M^{-1}cm^{-1}$, für nmzGCAP1 14.830 $M^{-1}cm^{-1}$ und für Rh 42.000 $M^{+1}cm^{-1}$.
Zur Vermessung wurde die Proteinlösung entsprechend im Lösungsmittel verdünnt. Außerdem wurde der gemessene Wert durch die zuvor bestimmte Hintergrundextinktion des Puffers korrigiert.

2.2.15.4. Densitometrische Proteinquantifizierung

Um den Rac1-Gehalt in bovinen Stäbchenaußensegmenten abschätzen zu können, wurden Westernblots von ROS-Proben und einer aufsteigenden Reihe von rekombinantem hRac1 angefertigt und diese densitometrisch ausgewertet. Hierzu wurde der Schwärzungsgrad auf den ECL-Filmen mit Hilfe der AlphaImager-Software (*AlphaInnotech/ Biozym*) bestimmt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die zur Bestimmung der Pixelintensität genutzten Flächen für die verschiedenen Signale eines ECL-Films exakt die gleiche Größe hatten. Ebenso wurden die Pixelintensitäten durch Abzug des entsprechenden Hintergrunds in der jeweiligen Spur korrigiert. Anschließend wurde mit den Werten des rekombinanten hRac1 eine Kalibriergerade erstellt und mit Hilfe dieser die Menge des nativen Rac1 in den ROS-Proben berechnet.

2.2.16. Größenbestimmung von Proteinen

Um festzustellen, ob das rekombinante His_6-hPAK1 als Mono- oder Dimer vorliegt, sollte die Molmasse des Proteins bestimmt werden. Dies wurde zum einen mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese versucht, zum anderen über eine analytische SEC.

2.2.16.1. Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Das gereinigte His_6-hPAK1 wurde in Polyacrylamidgelen mit 7%, 9% und 10% Acrylamid getrennt. Neben verschiedenen His_6-hPAK1-Proben, wurde als Referenz 3 µg und 5 µg BSA aufgetragen. Es wurden Mini-Protean 3-Kammern (*BioRad*) verwendet. Vor Auftrag auf das Gel wurden die Proben mit Probenpuffer (Endkonzentration 1x) versetzt. Die Trennung erfolgte bei konstanten 100V in 1x Laufpuffer und dauerte für alle Gele genau 50 min. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie gefärbt (siehe 2.2.14.1). Zur Analyse wurde zunächst die relative Mobilität R_m der Proteine bestimmt. Es gilt

$$R_m = \frac{A}{B} \tag{2}$$

wobei A die Laufstrecke des Proteins und B die zurückgelegte Strecke der Laufmittelfront ist. Die Molmasse wurde dann mit Hilfe eines Fergusonblot ermittelt. Hierzu wurden die $100[\log(R_m 100)]$-Werte berechnet und gegen die Polyacrylamidkonzentration aufgetragen. Es wurde jeweils ein Graf für His_6-hPAK1, für das BSA-Monomer, das BSA-Dimer und für das BSA-Trimer erstellt. Die Steigungen dieser Geraden wurden bestimmt und Werte für die verschiedenen BSA-Spezies gegen die Molmasse aufgetragen. So wurde eine Kalibriergerade erhalten, aus der die Molmasse für His_6-hPAK1 berechnet oder abgelesen werden konnte.

Trenngel	4x Probenpuffer	10x Laufpuffer
7-10% (v/v) Acrylamid, 40%ig	200 mM Tris/HCl pH 6,8	250 mM Tris
375 mM Tris/HCl, pH 8,8	50% Glycerin	1,92 M Glycin
0,05% (w/v) APS	0,04% Bromphenolblau	
0,1% TEMED		

2.2.16.2. Analytische Größenausschlusschromatografie

Bei der analytischen SEC werden neben His_6-hPAK1 verschiedene Referenzproteine/-substanzen über die Säule gegeben, von denen die Retentionszeit (R_t) bestimmt wird.

Anschließend wird eine Kalibriergerade erstellt (R_t → logMW) aus der dann die Molmasse für His_6-hPAK1 ermittelt werden kann.

Die eingesetzten Referenzsubstanzen (*Sigma* und *Serva*) sind in Tab. 2-21 aufgeführt. Sie wurden in 1x PAK-Puffer (Zusammensetzung siehe 2.2.12.2) mit und ohne Triton X-100 und/ oder 50% Glycerin aufgenommen und entsprechend verdünnt. Der gleiche Puffer diente gleichzeitig auch immer als Laufpuffer. Zunächst wurde die SEC an einem HPLC-System (*Waters*) mit der Bio-Sept SEC2000-Säule (250 x 4 mm, *Phenomenex*) durchgeführt. Die Säule wurde zuvor ü.N. mit Laufpuffer äquilibriert. Die Flussrate bei den Läufen betrug 0,4 ml/min. Zusätzlich zu den in Tab. 2-21 aufgeführten Injektionen, wurde auch immer mindestens einmal entsprechend Puffer injiziert, um zu testen, ob dieser gegebenenfalls einen Effekt auf das UV-Signal hat.
Da mit der Bio-Sept SEC2000-Säule der keine gute Auftrennung im entsprechenden Molmassenbereich erzielt werden konnte, wurde eine weitere SEC-Säule (Superdex 200 10/300, *Pharmacia*) getestet, welche ein höheres Auflösungsvermögen im hochmolekularen Bereich hat. Hierbei musste auf die ÄKTA-FPLC (*Amersham Biosciences*; Software: Unicorn 5.01) gewechselt werden. Bis auf das erhöhte Injektionsvolumen (siehe Tab. 2-21) wurden die Bedingungen beibehalten. Zusätzlich wurde für die Superdex 200 10/300 ein Fluss von 0,3 ml/min und 0,2 ml/min ausgetestet.

Tab. 2-21: Injektionsbedingungen zur analytischen SEC.

Protein/ Substanz	Molmasse	Konzentration	Injektionsvolumen	
			Bio-Sept SEC2000	***Superdex 200***
Blue Dextran	2 MDa	0,3-2,5 mg/ml	25 µl	100 µl
Katalase	240 kDa	0,3-4 mg/ml	25 µl	100 µl
β-Amylase	200 kDa	0,3 mg/ml	25 µl	---
ADH	150 kDa	0,3-3,3 mg/ml	25 µl	100 µl
BSA	66 kDa	0,3-3,6 mg/ml	25 µl	100 µl
Aceton	58 Da	5-10%	25 µl	100 µl
His_6-hPAK1	?	0,3-1,1 mg/ml	25 µl	100-260 µl

2.2.17. Proteinnachweis mittels Immunblot

2.2.17.1. Elektrophoretische immobilisation der Proteine (Westernblot)

2.2.17.1.1. Semidryblot

Die Proben wurden zunächst mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.13.1.1) aufgetrennt und dann ebenfalls elektrophoretisch auf eine Polyvenylidenfluorid (PVDF)- oder Nitrocellulose (NC)-

Membran transferiert. Das Blotsandwich, bestehend aus einer Lage Blotpapier (*Roth*), der Membran, dem Gel und einer weiteren Lage Blotpapier (von Anode nach Kathode gestapelt), wird hierbei zwischen zwei Plattenelektroden geschichtet. Vor dem Transfer wurden alle Lagen in Transferpuffer äquilibriert. Für das Polyacrylamidgel wurde hierbei eine Inkubationszeit von zweimal 7,5 min gewählt, wobei der Puffer einmal erneuert wird. Die PVDF-Membran muss vor Gebrauch zunächst in MeOH, p.a. aktiviert werden. Nach dem Auflegen jeder Schicht wurden eventuell entstandene Luftblasen entfernt. Für den Transfer wurde eine konstante Spannung von 10V angelegt und ein maximaler Strom von 5,5 mA/cm² Gelfläche. Er dauerte 30 min.

Transferpuffer (nach Towbin *et al.*, 1979)
25 mM Tris
192 mM Glycin
20% Methanol p.a.

2.2.17.1.2. Tankblot

Der Tankblot ist im Vergleich zum Semidryblot ein etwas aufwändigeres Verfahren, verspricht aber einen quantitativ besseren Transfer (zur Übersicht siehe z.B. Mahmood und Yang, 2012). Diese Methode wurde vor allem beim Nachweis von Rac1 angewandt.
Die Proteine wurden zunächst mittels denaturierender Gelelektrophorese (siehe 2.2.13.1.1) im Polyacrylamidgel getrennt und anschließend ebenfalls elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran transferiert. Anders als beim Semidryblot wurde hierbei das luftblasenfreie Blotsandwich (von Anode zu Kathode: Blotpapier, Membran, Gel, Blotpapier) nicht horizontal, sondern vertikal zusammengebaut und zwischen zwei puffergetränkte Schwämme in ein Gitter gespannt. Vor dem Transfer wurden alle Lagen in Transferpuffer (siehe 2.2.17.1.1) äquilibriert. Das Polyacrylamidgel wurde 15 min inkubiert, wobei der Puffer nach 7,5 min gewechselt wurde. Die PVDF-Membran wurde vor Gebrauch mit MeOH, p.a. aktiviert. Der Tank wurde vollständig mit Transferpuffer gefüllt und zu Kühlung in ein Eisbad gestellt. Das für gewöhnlich übliche Kühlelement wurde nicht in den Tank eingesetzt, da es sich gezeigt hatte, dass es die Qualität des Transfers beeinflusste. Zur Pufferumwälzung wurde während des gesamten Blotvorgangs mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt. Die Übertragung der Proteine fand bei 90-100V und maximal 5,5 mA/cm² Gelfläche statt und dauerte 60 min.

2.2.17.2. Immunologischer Nachweis

Nach Immobilisation auf der Membran lassen sich Proteine mittels eines immunologischen Bindungsassays spezifisch nachweisen. Um die unspezifische Bindung der Antikörper an dem Trägermaterial zu verhindern, wurde die Membran zunächst mit einem Blockiermedium blockiert. Anschließend wurde mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert, welcher spezifisch an sein Epitop bindet. Nach ausgiebigem Waschen mit TBST, wurde der Sekundärantikörper auf die Membran gebracht. Dieser war spezifisch für den Primärantikörper und war mit der Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) gekoppelt, welche die Detektion der Antikörperbindung ermöglicht. Hierzu wurde ein Substrat auf die Membran gegeben, bei dessen Umsetzung durch die HRP Licht emittiert, welches mit einem lichtempfindlichen Fotofilm (ECL-Hyperfilm/ *Amersham Biosciences*) detektiert wurde. Als Substrat wurden die ECL-Reagenzien von *BioRad* oder *advansta* verwendet. Die einzelnen Arbeitschritte sind in Tabelle 2-22 aufgeführt. Die einzelnen Antikörper und entsprechende Arbeitskonzentrationen sind in Tabelle 2-23 zu finden.

TBS
20 mM Tris/HCl, pH 7,4
154 mM NaCl

TBST
0,05% Tween-20 in TBS

Tab. 2-22: Arbeitsschritte eines immunologischen Bindungsassays.

Arbeitsschritt	Dauer	Inkubationslösung
Blockieren	min. 1 h bei RT oder ü.N. (4°C, schüttelnd)	1-2% Magermilchpulver oder 1% BSA in TBST
Primärantikörper	1-2h bei RT oder ü.N. (4°C, schüttelnd)	Antikörper in Blockierlösung
Waschschritt 1	3 x 5 min	TBST[2]
Sekundärantikörper	0,5-1 h	Antikörper in Blockierlösung
Waschschritt 2	4 x 5 min	TBST[2]
	2 x 5 min	TBS
Photoreaktion	1-2 min	ECL-Reagenz-Komponenten 1:2
Belichtung des Fotofilms[1]	1 sec – 30 min	
Entwicklung[1]	1-3 min	Entwicklerlösung
Stoppen der Reaktion[1]	1 min	2%ige Essigsäure
Fixierung[1]	3-4 min	Fixierlösung
Waschen	-	VE-Wasser

[1]Arbeitschritt wurde bei Rotlicht durchgeführt.

Tab. 2-23: Primär- und Sekundärantikörper. Die angegebenen Primär- und zugehörigen Sekundärantikörper (*rb: Kaninchen, ms: Maus*) wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt:

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
anti-PAK1	1:1.000 - 1:3.000	anti-rb IgG HRP	1:5.000
anti-Rac1, 23A8	1:3.000; 1:5.000; 1:20.000	anti-ms IgG HRP	1:5.000; 1:20.000
anti-Rhodopsin 1D4	1:10.000-1:25.000	anti-ms IgG HRP	1:20.000-1:30.000
anti-bGC1 #3†	1:7.500	anti-rb IgG HRP	1:5.000; 1:10.000
anti-Caveolin-1	1:2.000	anti-rb IgG HRP	1:20.000
anti-Transducin	1:1.000-1:3.000	anti-rb igG HRP	1:5.000

2.2.17.3. Amidoschwarz-Färbung

Um das Bandenmuster nach abgeschlossener ECL-Raktion auf der PVDF-Membran sichtbar zu machen, wurde diese für mindestens 20 min bei RT schüttelnd in Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde der Hintergrund bis zum gewünschten Grad unter fließendem H_2O_{VE} entfärbt und die Membran an der Luft getrocknet.

<u>Färbelösung</u>
0,5% Amidoschwarz B10
45% 2-Propanol
10% CH_3COOH

2.2.18. Immunhistologischer Proteinnachweis in Rinderretinae

2.2.18.1. Gewebepräparation und Herstellung von Kryogewebeschnitten

Rinderaugen wurden von einem örtlichen Schlachthof gekauft. Nach der Entnahme der Augen aus dem Tier wurden sie direkt in einer dunklen Box unter Lichtausschluss gelagert, sodass die Photorezeptorzellen den Dunkelzustand wieder herstellen konnten und finaler Ausgangspunkt eine dunkel-adaptierte Retina war. Präpariert wurde sowohl dunkeldapiertes als auch belichtetes Gewebe. Zur Belichtung wurden die Augen vor der Präparation mit zum Licht exponierter Pupille 1-2 h bei RT und Tageslicht gelagert. Bei dunkel-adaptierten Retinae wurde bis nach der Fixierung unter Rotlicht gearbeitet.
Zuerst wurde der Augenbecher mit einer Schere unterhalb der Iris kreisförmig geöffnet und Linse und Glaskörper entfernt. Um den Schaden an den Photorezeptorzellen möglichst gering zu halten, wurde versucht die Netzhaut auf dem Pigmentepithel zu belassen. Aus diesem Grund wurden, wenn möglich, alle Schichten des Augenbechers (Sclera, Choroidea

und Retina) zusammen in kleine Stücke geschnitten. Diese wurden zunächst in PBS gelagert. Anschließend wurde mit 4% PFA (w/v) in PBS für 30 min bis 5 h bei RT fixiert. Das überschüssige Fixativ wurde durch dreimaliges Waschen für je 5 min mit PBS bei RT entfernt. Danach wurde das Gewebe in 30% (w/v) Saccharose in PBS bei 4°C ü.N. inkubiert. Im Anschluss folgte die Inkubation für mindestens 30 min bei RT in der Kryomatrix (33% Tissue Tek/ 20% Saccharose (w/v) in PBS). Das Gewebe wurde final in quaderförmigen Förmchen aus Alufolie möglichst luftblasenfrei in die Kryomatrix eingebettet. Damit die Matrix schnell gefriert, wurden die Aluförmchen hierbei auf einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Metallblock gestellt. Die fertigen Blöcke wurden bei -20°C gelagert.
Bei Bedarf wurden Kryogewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 20-40 µm mit einem Kryostat (Leica CM1850, *Leica*) hergestellt. Die Schnitte wurden bei einer Temperatur von -21°C angefertigt. Sie wurden direkt auf Objektträger aufgenommen, bei 37°C auf einer Wärmeplatte getrocknet und bis zur Färbung (siehe 2.2.18.2) bei -80°C gelagert

<u>PBS</u>
2 mM KH_2PO_4, pH 7,4
8 mM NaH_2PO_4
137 mM NaCl
2,7 mM KCl

2.2.18.2. Immunologischer Nachweis

Der immunologische Nachweis in Kryogewebeschnitten wurde nach dem Protokoll von Fries *et al.* (2012) durchgeführt.
Die histologischen Kryoschnitte (siehe 2.2.18.1) wurden aufgetaut, anschließend auf dem Objektträger mit einem Fettstift umrandet und mindestens 30 min auf der Wärmeplatte getrocknet. Die Schnitte wurden durch TBS rehydriert (3 x 5 min). Die endogene alkalische Phosphatase (AP) wurde durch 5 min Inkubation in 20 mM HCl deaktiviert. Anschließend wurde erneut dreimal für 5 min in TBS gewaschen. Die Schnitte wurden für mindestens 1 h in TBST + 5% NGS bei RT in einer feuchten Kammer blockiert und im Anschluss ü.N. bei 4°C mit dem Primärantikörper verdünnt in Blockierlösung ebenfalls in einer feuchten Kammer inkubiert (Antikörper und Verdünnung siehe Tab. 2-24). Nachdem zweimal für 2 min mit TBS gewaschen wurde, folgte die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (siehe Tab. 2-24) verdünnt in Blockierlösung in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT. Danach wurden die Schnitte zweimal für 2 min in TBS gewaschen. Um die Bedingungen für die AP, mit der der Sekundärantikörper gekoppelt war, einzustellen, wurden die Schnitte dreimal für 5 min in NTM inkubiert. Zur Detektion wurden als Substrat für die AP FastRed-Tabletten

(*Roche*) verwendet. Hierzu wurde eine entsprechende Menge an Tablette in 2 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,2 pro Tablette gelöst und die Lösung durch Filtration mit einem Spritzenvorfilter (Ø 0,45 µm) von Schwebeteilchen befreit. Durch Umsatz mit der AP entsteht ein roter, wasserunlöslicher Farbniederschlag. Bei Erreichen des gewünschten Färbegrads, wurde die Reaktion durch kurzes mehrmaliges Eintauchen in steriles H_2O_{dd} gestoppt. Anschließend wurden die Schnitte für 30 min in frischem H_2O_{dd} bei RT inkubiert, dann getrocknet und mit Aqua Polymount (*Polysciences*) eingedeckelt. Nach dem Trocknen bei RT wurden die Objektträger bei 4°C gelagert. Zur Analyse wurde ein Axiophot 2 – Fluoreszenzmikroskop (*Zeiss*) im Durchlichtmodus, welches mit einer Digitalkamera verbunden war, verwendet.

Tab. 2-24: Antikörper für die Immunhistochemie. Angegeben sind die verwendeten Antikörper und ihre eingesetzten Verdünnungen. Die Sekundärantikörper waren mit der alkalischen Phosphatase (AP) gekoppelt. Nähere Angaben zu den Antikörpern sind in Abschnitt 2.1.6 zu finden. *Ms: Maus, rb: Kaninchen*

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
anti-Rac1, 23A8	1:300	anti-ms IgG-AP	1:200
anti-Rac1	1:100	anti-rb IgG-AP	1:200
anti-αPAK	1:100	anti-rb IgG-AP	1:200

TBS	TBST	NTM
50 mM Tris/HCl, pH 7,6	TBS	100 mM Tris/HCl, pH 9,5
1,5% NaCl (w/v)	0,3% Tween-20	100 mM NaCl
		50 mM MgCl

2.2.19. Kultivierung und Passagieren von HEK293-Zellen

Die Kultivierung von HEK293 Flp-In-Zellen kultiviert erfolgte in 10 cm-Schalen in Kultivierungsmedium (1x DMEM+ GlutaMAX-I,*Gibco*) bei 37°C, 37% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2-Anteil.

Ein Mediumwechsel wurde bei Bedarf durchgeführt. In der Regel war dies alle 2-3 Tage notwenidg. Zur Erhaltung wurden die Zellen bei 90-100% Konfluenz verdünnt in neue 10 cm-Schalen umgesetzt (passagiert). Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA und kurzer Inkubation bei 37°C auf einer Wärmeplatte lösen sich die adhärenten Kontakte der Zellen am Schalenboden. Die Zellsuspension wurde mit 9 ml frischem Medium aufgefüllt und die restlichen Zellen vom Boden abgespült. Durch mehrmaliges vorsichtiges auf- und abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt, wobei zu beachten ist, dass eine zu grobe Vorgehensweise zum Verlust von Zellen führt, da diese aufgrund der hohen Scherkräfte platzen. 1-0,5 ml der Zellsuspension

wurden in 10 ml Medium auf einer neuen Schale ausgesät und weiter wie oben beschrieben bebrütet. Bei Behandlung der Zellen wurden alle Lösungen im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt und es wurde grundsätzlich unter einer Sterilbank gearbeitet.

2.2.20. Zellernte und Membranpräparation

Die Präparation der Membranen wurde nach Helten (2005) durchgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden im Kultivierungsmedium abgeschabt und bei 200 xg für 5 min und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde anschließend mit 8 ml PBS/ Schale gewaschen und die Zellen erneut sedimentiert (200 xg, 5 min, RT). Final wurden sie in 100 µl Lysepuffer/ Schale aufgenommen. Die Suspension wurde aliquotiert und bis zur Isolation der Membranfraktion bei -80°C weggefroren. Um die Plasmamembran zu präparieren, wurden die Zellen zunächst durch Sonifizierung aufgeschlossen. Sie wurden viermal 5 sec mit Hilfe der Ultraschalllanze (Output: Stufe 3, effektive Beschallungszeit 50%) beschallt. Zelltrümmer und Organelle wurden durch 5 min Zentrifugation bei 500 xg und 4°C entfernt. Die Membranen verbleiben hierbei im Überstand. Dieser wurde Anschließend in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und für 15 min bei 125.000 xg und 4°C zentrifugiert. Das Membranpellet wurde in 40-80 µl Resuspensionspuffer/ Schale aufgenommen und zur Resuspension für 30-60 min auf Eis inkubiert. Kurz vor Einsatz wurden die Membranen durch kurze Beschallung mit Hilfe der Ultraschalllanze erneut homogenisiert.

<u>Lysepuffer</u>
10 mM HEPES/KOH, pH 7,4
1 mM DTT

<u>Resuspensionspuffer</u>
50 mM HEPES/KOH, pH 7,4
50 mM KCl
20 mM NaCl
1 mM DTT

2.2.21. Isolierung von Stäbchenaußensegmenten aus Rinderretinae

Die ROS wurden wie in Koch *et al.* (1994) beschrieben durchgeführt, wobei jedoch nicht über einen Zuckergradienten zentrifugiert wurde. Die Kälberaugen wurden vom örtlichen Schlachthof gekauft. Nach der Entnahme der Augen aus dem Tier wurden sie direkt in einer dunklen Box unter Lichtausschluss gelagert, sodass die Photorezeptorzellen den Dunkelzustand wieder herstellen konnten und finaler Ausgangspunkt eine dunkel-adaptierte Retina war. Um diesen Zustand beizubehalten, wurden alle Arbeitschritte im Dunkeln bzw. unter Rotlicht durchgeführt. Die Retinen wurden aus den Augen präpariert und in 100 ml kaltem Puffer C gesammelt. Anschließend wurde für 90 sec kräftig geschüttelt und für 7 min bei 5.524 xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette in einen

Kunsstoffmeßzylinder überführt und 1:2 mit Puffer D verdünnt. Danach wurde erneut zentrifugiert (10 min, 12.557 xg, 4°C). Das Pellet (P1) wurde in 50 µl/ Retina Puffer E resuspendiert. Der Überstand wurde in neue Zentrifugenbecher abgegossen und ein weiteres Mal bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das zweite Pellet (P2) wurde ebenfalls in Puffer E aufgenommen und mit P1 vereinigt, wobei das Gesamtvolumen an Puffer E für die Resuspension für P1 und P2 10 ml betrug. Die isolierten ROS wurden in 1 ml-Aliquots lichtgeschützt in Alufolie bei -80°C gelagert. Eine Probe der Präparation wurde zur Bestimmung des Rhodopsingehalts genutzt. Hierzu wurden 50 µl ROS mit 900 µl H_2O_{dd} und 50 µl Triton X-100 (10%ig, finale Konzentration: 0,5%) gemischt und gevortext. Anschließend wurde die Extinktion bei 500 nm zunächst im Dunkeln und dann im belichteten Zustand bestimmt und aus der Differenz mit Hilfe des Extinktionskoeffizient (ε_{500}=42.000 $M^{-1}cm^{-1}$) die Konzentration des dunkel-adaptierten Rh berechnet.

Puffer C	Puffer D	Puffer E
10 mM HEPES/KOH, pH 7,4	10 mM HEPES/KOH, pH 7,4	10 mM HEPES/KOH, pH 7,4
115 mM NaCl	115 mM NaCl	1mM DTT
2,5 mM KCl	2,5 mM KCl	0,1 mM PMSF
1 mM $MgCl_2$	1 mM $MgCl_2$	
1 mM DTT	1 mM DTT	
1,5 M Sucrose		

2.2.22. Schrittweise Solubilisation von Membranproteinen aus ROS

Um das Solubilisationsprofil von Rac1 aus bovinen ROS zu prüfen, wurde dieses aus ROS-Membranen in einer Solubilisationsreihe mit Triton X-100 und DM nach einem Protokoll von Koch (1991) bzw. Koch und Helten (2008) extrahiert.

Um die löslichen Proteine zu entfernen, wurde 1 ml ROS-Präparation im Dunkeln (Rotlicht) mit 20 ml hypotonischem Puffer gewaschen. Durch 30 min Zentrifugation bei 21.000 rpm (Rotor: JA 25.50, *Beckmann*) wurden die Membranen pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und eine Probe (Ü1) zur späteren Analyse aufbewahrt. Alle weiteren Schritte wurden im Licht durchgeführt. Das Pellet wurde in 2,5 ml Triton-Puffer pro 10 mg Rh resuspendiert und für 10 min auf Eis mit einem Homogenisator mit einem Teflonpistill homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Eine Probe wurde als Triton-Solubilisat (TS) für die spätere Analyse abgenommen. Die Triton X-100-löslichen Proteine wurden durch Ultrazentrifugation (165.000 ×g, 15 min, 4°C) von den unlöslichen Komponenten getrennt und der Überstand als Triton-Extrakt (TE) aufbewahrt. Das Pellet wurde in 4 ml DM-Puffer pro 10 mg Rh resuspendiert und für 1 h auf

Eis inkubiert mit kurzer Homogenisation alle 15 min. Erneut wurde eine Probe zur späteren Analyse abgenommen (DM-Solubilisat, DS) und die solubilisierten Proteine von den nicht-löslichen Proteinen durch Ultrazentrifugation (165.000 ×g, 15 min, 4°C) getrennt. Der Überstand wurde als DM-Extrakt aufbewahrt. Das Pellet wurde erneut in DM-Puffer (1 ml/10 mg anfänglichem Rh) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Alle 10 min wurde mit einem Handhomogenisator homogenisiert. Der finale Extrakt wurde durch 15 min Zentrifugation bei 100.000 xg und 4°C erhalten (Nachextrakt, NE). Das Pellet (Nachextrakt Pellet, NEP) wurde im gleichen Volumen DM-Puffer wie zuvor resuspendiert. Die während der Durchführung gesammelten Proben wurden mittels Westernblot und Immunassay (siehe 2.2.17) auf Anwesenheit von Rh, bGC1 und Rac1 untersucht.

Hypotonischer Puffer	Triton-Puffer	DM-Puffer
10 mM HEPES/KOH pH 7,4	10 mM HEPES/KOH pH 7,4	10 mM HEPES/KOH 7,4
0,1 mM EGTA	2 mM $MgCl_2$	1 M NaCl
0,1 mM PMSF	0,1 mM EGTA	0,1 mM EGTA
1 mM DTT	1 mM DTT	1 mM DTT
	5% (v/v) Triton X-100	20 mM DM

2.2.23. Lipid-Raft-Isolation

Die Isolation der Lipid-Rafts (oder Detergens-resistenten Membranen, DRMs) wurde nach einem Protokoll von Senin *et al.* (2004) durchgeführt.

Zunächst wurden entsprechende Salzbedingungen eingestellt. Hierzu wurden 100 µl ROS-Präparation mit 100 µl Puffer A gemischt. Anschließend wurde die Suspension mit 800 µl Puffer B versetzt. Zur Solubilisation der Membranproteine wurde 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 1 ml 80%ige (w/v) Saccharose in H_2O_{dd} hinzugefügt. 1680 µl der Probe wurden als erste Stufe eines Zuckergradienten in ein Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert. Diese wurden vorsichtig mit 1550 µl 30%iger (w/v) und 770 µl 5%iger (w/v) Saccharose überschichtet. Zur Separation der Detergens-löslichen und -unlöslichen Membranfraktionen wurde der Gradient 17 h bei 100.000 xg und 4°C im Ausschwingrotor (S525T, *Sorvall*) zentrifugiert. Die Probe wurde unter Zuhilfenahme einer Metallkapillare und einer Peristaltikpumpe von unten nach oben fraktioniert. Es wurden ca. 20 Fraktionen mit 200 µl/Fraktion gesammelt. Die Methode wurde entweder bei Licht oder unter Lichtausschluss (Rotlicht) durchgeführt.

Puffer A	Puffer B
20 mM HEPES/KOH pH 7,4	12,5 mM Tris/HCl pH 7,4
200 mM KCl	1,25 mM $CaCl_2$
4 mM $MgCl_2$	0,63% Triton X-100
2 mM DTT	Proteaseinhibitorcocktail (1:500, *Sigma*)

2.2.24. Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

2.2.24.1. Generelles Prinzip der Experimente

Um die Bindung von hRac1 an Rh zu untersuchen wurde die Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance,* SPR)-Spektroskopie genutzt. Hierfür wurde zunächst ein Antikörper gegen Rh kovalent an der Dextranmatrix eines Sensorchips immobilisiert. Anschließend wurde Rh aus ROS-Membranen solubilisiert. Mit Hilfe des Antikörpers wurde Rh aus dem Solubilisat gefischt und somit ebenfalls auf der Chipoberfläche immobilisiert, jedoch nicht-kovalent. hRac1 und G_T wurden nun in der mobilen Phase als Analyt in verschiedenen Konzentrationen über die so präparierte Chipoberfläche gespült und das SPR-Signal (gemessen in *resonance units*, RU) in Abhängigkeit von der Zeit als Sensorgramm aufgezeichnet. Anhand des SPR-Signals lässt sich erkennen, ob der Analyt auf dem Sensorchip verbleibt oder nicht. 1 RU entspricht hierbei ungefähr 1 ng Protein/mm². Des Weiteren wurden aus den Sensorgrammen die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation (k_a und k_d) sowie die Dissoziationskonstante K_D der Interaktion von Rac1 und Rh ermittelt. Die Messungen wurden an einem Biacore 2000 (*Biacore AB*) mit CM5 Sensorchips (*GE Healthcare*) durchgeführt. Vor Verwendungen wurden alle Laufpuffer entgast und gefiltert (Polypropylenfilter, 0,2 µm). Es wurden sowohl Experimente mit dunkel-adaptiertem als auch mit belichtetem Rh gemacht.

2.2.24.2. Immobilisation des Antikörpers auf der Chipoberfläche

Der anti-Rh 1D4-Antikörper (im Folgenden: 1D4-Antikörper) wurde über eine so genannte Aminkopplung an die Dextranmatrix des Chips gebunden. Hierbei wird der Antikörper über eine primäre Aminogruppe, die z.B. im Lysin vorhanden ist, kovalent an die Oberfläche gebunden. Die Orientierung des Proteins kann dabei nicht beeinflusst werden. Im Prinzip wurde die Immobilisation wie von Komolov *et al.* (2006, 2010) beschrieben, durchgeführt.
Die mit HBS äquilibrierte Oberfläche wurde zunächst durch Injektion von 35µl 200 mM EDC/ 50 mM NHS aktiviert. Danach wurde der Antikörper in einer Konzentration von 0,01 mg/ml, 0,05 mg/ml oder 0,1 mg/ml verdünnt in 10 mM Natriumacetat pH 4,3, pH 5,0 oder pH 6,5 in verschiedenen Volumina über den Chip gegeben. Auf diese Weise wurden 2.300-13.000 RU

1D4-Antikörper immobilisiert. Es wurden immer jeweils eine Messzelle, auf der später auch Rh immobilisiert wurde, und eine Kontrollzelle präpariert. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich auf beiden Zellen ungefähr gleich viel Antikörper befand. Abschließend wurde die Oberfläche durch 2-3 Injektionen von 35 µl 1 M Ethanolamin wieder deaktiviert. Für den gesamten Prozess wurde ein Fluss von 5 µl/min eingestellt und HBS als Laufpuffer verwendet.

HBS
10 mM HEPES/ KOH, pH 7,5
150 mM NaCl
3 mM EDTA
0,005% (v/v) Tween-20

2.2.24.3. Waschen der ROS-Membranen

ROS-Membranen wurden wie von Komolov und Koch (2010) beschrieben von den löslichen Proteinen getrennt. ROS-Präparation wurde mit dem fünffachen Volumen hypotonischem Puffer gemischt und anschließend für 10-15 min bei 125.000 xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und durch das gleiche Volumen frischen Puffer ersetzt, ohne dass das Pellet resuspendiert wurde. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt fünfmal durchgeführt. Final wurden die Membranen in dem gleichen Volumen wie dem Ausgangsvolumen in MES-Puffer resuspendiert und in Arbeitsaliquots unter Lichtausschluss bei -80°C gelagert. Alle Arbeitsschritte fanden im Dunkeln bzw. unter Rotlicht statt.

Hypotonischer Puffer
5 mM Tris/HCl, pH 7,5
0,5 mM $MgCl_2$
0,4 mM EDTA
1 mM DTT

MES-Puffer
50 mM MES, pH 6,0
1 mM $CaCl_2$
1 mM $MnCl_2$

2.2.24.4. Solubilisation und Immobilisation von Rhodopsin

Um das native Rh aus den ROS-Membranen zu lösen, wurden diese mit 25 mM CHAPS oder 1% (w/v) DM versetzt und für mindestens 30 min bei 700 rpm und 4°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die nicht-löslichen Proteine durch Zentrifugation sedimentiert (30 min 16,100 xg, 4°C oder 10 min, 125.000 xg, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und ein Teil zur Injektion 1:6, 1:10 oder 1:15 mit MES-Puffer (siehe 2.2.24.3) verdünnt. Die

Verdünnung des Solubilisats wurde je nach immobilisierter Antikörpermenge auf dem verwendeten Sensorchip angepasst. Der Rest wurde in Alufolie lichtgeschützt auf Eis gelagert. Es wurden zwischen 15 und 35 µl des verdünnten Solubilsats bei einem Fluss von 2 µl/min auf die Messzelle injiziert. Als Laufpuffer wurde MOPS-Puffer verwendet. Die Chipoberfläche wurde vor der Immobilisation für mindestens 30 min mit dem Laufpuffer äquilibriert. Nachdem die Injektion abgeschlossen war, wurde die Chipoberfläche drei- bis fünfmal mit Laufpuffer bei einer hohen Flussrate gespült (Befehl „RINSE“) und anschließend für mindestens 15 min bei einem Fluss von 30 µl/min geprüft, ob sich die Messzelle stabil verhält. Auf diese Weise wurden ca. 1.500-8.000 RU Rh (entspricht ungefähr 1,5-8 ng Rh/mm²) immobilisiert. Alle Arbeitsschritte wurden im Dunkeln oder unter Rotlicht durchgeführt. Rh wurde hierbei ausschließlich an die Oberfläche der Messzelle gebunden. Die Kontrollzelle blieb ohne Rh.

<u>MOPS-Puffer</u>
50 mM MOPS, pH 7,5
3 mM $MgCl_2$
150 mM NaCl
10 µM $CaCl_2$
10 µM $MnCl_2$

2.2.24.5. Regeneration von Rhodopsin mit *9-cis* Retinal

Bei Experimenten zur lichtabhängigen Bindung von Rac1 an Rh war es wichtig, dass Rh dunkel-adaptiert vorlag. Aus diesem Grund wurde vor den Interaktionsstudien gegebenenfalls belichtetes Rh mit *9-cis*-Retinal regeneriert. Hierzu wurde über 1-3 h 20 mM *9-cis*-Retinal (Stock: 100 mM in DMSO) bei einem Fluss von 2 µl/min oder 5 µl/min injiziert. Als Laufpuffer diente hierbei entweder MOPS-Puffer (siehe 2.2.24.4) oder SPR-Laufpuffer (siehe 2.2.24.6). Nach beendeter Injektion wurde die Chipoberfläche einmal mit Laufpuffer gewaschen (Befehl „RINSE“) und anschließend für mindestens 15 min das stabile Verhalten der Oberfläche geprüft (Fluss: 20 oder 30 µl/min). Nachdem klar war, dass die Interaktion zwischen Rh und Rac1 lichtunabhängig ist, wurde auf diesen Schritt weitestgehend verzichtet.

2.2.24.6. Interaktionsstudien

Um die Interaktion von Rac1 und Rh zu untersuchen, wurde rekombinantes Rac1 als Analyt in verschiedenen Konzentrationen auf einen CM5-Sensorchip mit immobilisiertem und gegebenenfalls regeneriertem Rh (siehe 2.2.24.4 und 2.2.24.5) injiziert. Die Bedingungen

hierfür sind in Tab. 2-25 zu finden. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Bindung von Rac1 an Rh lichtabhängig ist. Die Injektionsbedingungen sind ebenfalls in Tab. 2-25 zu finden. Hierbei wurde zunächst eine Rac1-Injektion im Dunkeln durchgeführt. Anschließend wurde Rh mit einem Laser (532 nm) belichtetet und weitere Rac1-Injektionen durchgeführt. Ebenfalls wurde hierbei getestet, ob sich das gebundene Rac1 als G-Protein mit dem schwer-hydrolysierbaren GTP-Analog GTPγS eluieren lässt. D.h. nach jeder Rac1-Injektion wurde 500 µM GTPγS injiziert. Zur Kontrolle wurde das gleiche Experiment mit G_T durchgeführt, für welches sowohl die licht- als auch die nukleotidabhängige Bindung in SPR-spektroskopischen Experimenten bereits gezeigt wurde (Komolov *et al.*, 2006 und 2010).

Tab. 2-25: Injektionsbedingungen zu den Interaktionsstudien. Für weitere Details zu den Experimenten siehe Text.

Experiment	**Bindung von Rac1 an dunkel-adaptiertes Rh**	**Lichtabhängige Bindung von Rac1 an Rh**		**Kompetition Rac1 und G_T**		
Injektion	hRac1	hRac1	GTPγS	hRac1	G_T	GTPγS
Flussrate [µl/min]	10	10		10		
Laufpuffer	SPR-Laufpuffer	SPR-Laufpuffer		SPR-Laufpuffer		
Injektionsvolumen [µl]	40	40	50	40	40	50
Analytkonzentration [µM]	0,3-16	4,5	500	10	0,5 - 2,4	500
Assoziationszeit [min]	4	4	5	4 bzw. 1	4	5 bzw.1
Dissoziationszeit [min]	11	10	3	6 bzw. 2	6	3 bzw. 1

Als letztes wurde getestet, ob bei der Bindung an Rh eine Konkurrenz zwischen Rac1 und G_T existiert. Die Injektionsbedingungen sind in Tab. 2-25 aufgeführt. Hierfür wurde die Chipoberfläche zunächst mit zwei vierminütigen Injektionen von 10 µM Rac1 mit dem kleinen G-Protein abgesättigt und anschließend G_T in aufsteigender Konzentration injiziert. Nach jeder G_T-Injektion wurden 50 µl 500 µM GTPγS injiziert. Um sicherzustellen, dass Rac1 auf der Oberfläche stets präsent bleibt, wurden zwischen den G_T/ GTPγS-Zyklen kurze Rac1/ GTPγS-Pulse (je 10 µl) gegeben.

Das lyophylisierte Rac1 (siehe 2.2.12.1) wurde vor der Injektion in 1 µl SPR-Laufpuffer pro µg Protein aufgenommen und anschließend die exakte Konzentration photometrisch

bestimmt (siehe 2.2.15.3). Die Verdünnung wurde erst kurz vor der Injektion hergestellt, da Rac1 in Konzentrationen < 0,3 µg/µl (=12,8 µM) recht instabil ist und Präzipitate bildet. Das GTPγS wurde in H_2O_{dd} aufgenommen und stand in 5 mM Stocks zur Verfügung. Die Verdünnung auf die Arbeitskonzentration fand in SPR-Laufpuffer statt. Das G_T wurde bereits bei der Reinigung in SPR-Laufpuffer umgepuffert (siehe 2.2.12.5). Die Verdünnungen fanden entsprechend im gleichen Puffer statt.

In allen Experimenten wurde der Analyt über mindestens zwei Flusszellen, nämlich eine Messzelle und eine Kontrollzelle, gespült. Die Kontrollzelle entsprach in der Vorbereitung und Behandlung der Messzelle mit dem einzigen Unterschied, dass auf ihr kein Rh immobilisiert wurde.
Die erhaltenen Sensorgramme der Messzelle wurden doppelt korrigiert. Zum einen wurde das Puffersignal auf der gleichen Flusszelle, zum anderen das Signal der Kontrollzelle ohne Rh (ebenfalls bereits um das Puffersignal auf der gleichen Zelle korrigiert) abgezogen. Dies geschah mit Hilfe der BIAevaluation 4.1 Software (*Biacore AB*).

<u>SPR-Laufpuffer</u>
20 mM Tris/HCl, pH 7,4
150 mM NaCl
3 mM $MgCl_2$

2.2.24.7. Kinetische Analyse

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurden die Messungen im Prinzip wie in 2.2.24.6 für die Bindung von hRac1 an dunkel-adaptiertes Rh beschrieben durchgeführt. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation k_a und der Dissoziation k_d wurden mit Hilfe der BIAevaluation 4.1 Software (*Biacore AB*) in separaten Fits berechnet. Hierzu wurden zeitlicher Beginn und Ende von Assoziation oder Dissoziation im Sensorgramm festgelegt sowie die eingesetzte Analytkonzentration angegeben. Alle anderen Variabeln wurden vom Programm gefittet. k_a und k_d wurden aus Interaktionsmessungen mit 1 µM, 1,5 µM, 4,5 µM, 8 µM und 12 µM hRac1 bestimmt. Aus den Geschwindigkeitskonstanten wurde die Dissoziationskonstante K_D berechnet. Es gilt

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} \qquad (3)$$

Aus erhaltenen Daten wurde der Mittelwert gebildet. Der Fehler von K_D wurde mit Hilfe des Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetzes ermittelt.

Die Dissoziationsrate der Dissoziation von G_T von Rh (siehe 3.6.3) wurde ebenfalls mit der BIAevaluation 4.1 Software (*Biacore AB*) ermittelt. Hierbei wurden k_a und k_d simultan gefittet und eine Korrektur aufgrund des Baseline-Drifts eingefügt (Modell: „binding with drifting baseline“). Die Konzentration betrug 0,5 µM G_T.

2.2.24.8. Regeneration des Antikörpers

Nach beendeten Experimenten wurde, um den Chip erneut verwenden zu können, das Rh so gut wie möglich wieder vom Antikörper entfernt. Am effektivsten war hierbei die Injektion von 0,25% (w/v) SDS in H_2O_{dd}. Dies geschah bei einer Flussgeschwindigkeit von 20 µl/min fünfmal für jeweils 1 min. Nach der letzten Injektion wurde der Fluss mit Laufpuffer für einige Minuten aufrecht gehalten und im Anschluss die Chipoberfläche mit Laufpuffer gespült (Befehl „RINSE“). Als Laufpuffer wurde entweder SPR-Laufpuffer (siehe 2.2.24.6) oder H_2O_{dd} verwendet. Abschließend wurde der Sensorchip aus dem Spektrometer entfernt und bis zum nächsten Gebrauch bei 4°C gelagert.

2.2.25. Immobilisation von Proteinen an CNBr-aktivierter Sepharose

Für den Rac1-Aktivitätsassay (siehe 2.2.26) wurde GST-PAK-PBD kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose (*GE Healthcare*) gekoppelt. Die Immobilisation erfolgte nach Herstellerangaben. Hierbei wurden 3,1-5 mg GST-PAK-PBD/1 g Sepharose eingesetzt. Die Bindung des Proteins erfolgte ü.N. bei 4°C. Freie aktive Gruppen wurden mit 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 für 2 h bei RT blockiert. Das fertige Material wurde 1:2 in PBS + 0,004% NaN_3 bei 4°C gelagert.

2.2.26. Rac1-Aktivitätsassay

Lichtabhängige Aktivierbarkeit von Rac1 in ROS:

In Anlehnung an Balasubramanian und Slepak (2003) sollte die lichtabhängige Aktivierbarkeit von endogenem Rac1 in ROS getestet werden. Hierzu wurden zunächst ROS belichtet, mit einem Detergens die Membranproteine solubilisiert und im Anschluss ein Pulldown-Assay mit PAK-PBD-Sepharose (siehe 2.2.25) durchgeführte. Die PBD von PAK1 bindet Rac1 und zwar im GTP-gebundenen Zustand mit höherer Affinität als wenn es GDP gebunden hat. Zusätzlich stabilisiert sie den aktiven Zustand des G-Proteins. Der schematische Versuchsablauf ist in Abb. 2-1 gezeigt

Es wurden 100 µl ROS-Präparation/Ansatz pipettiert und bei 125.000 xg und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets jeweils in 50 µl Assaypuffer

ergänzt mit 0,25 mM oder 0,5 mM GTP oder GTPγS, GDP, ATP oder ohne Nukleotid resuspendiert. Es wurde jeweils im Doppelansatz gearbeitet, wobei eine Probe im Dunkeln verblieb, die andere hingegen für 1-20 min belichtet wurde. Die dunkel-adaptierten Proben wurden für diese Zeit ebenfalls bei RT jedoch lichtgeschützt inkubiert. Zur Solubilisation wurden die Proben mit 200 mM DM (final 20 mM, CMC 0,008% (w/v), MG Mizelle 50.000) oder 600 mM n-Nonyl-β-D-glucopyranosid (final 60 mM, CMC 18-20 mM, MG Mizelle 8.000) versetzt und für 30 min bei 4°C und 500 rpm schüttelnd inkubiert. Durch Zentrifugation für 15-60 min bei 125.000 xg und 4°C wurden die lösliche und unlösliche Fraktion voneinander getrennt. 80-90% des Überstandes wurden mit 200 µl Bindepuffer verdünnt und anschließend 200 µl des Solubilisats auf 20 µl oder 30 µl PAK-PBD-Sepharose (äquilibriert mit Bindepuffer) gegeben. Die Proben wurden für 45-60 min bei 4°C auf dem Kippschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde einmal bis zu 2 min mit Bindepuffer gewaschen (3.000 xg, 2 min, RT). Das gebundene Rac1 wurde mit 25 µl oder 55 µl 1x SDS-Probenpuffer (Zusammensetzung siehe 2.2.13.1.1) durch Kochen der Proben bei 95°C für mindestens 10 min eluiert. Abschließend wurde das Eluat im Immunblot (siehe 2.2.17) auf Anwesenheit von Rac1 geprüft.

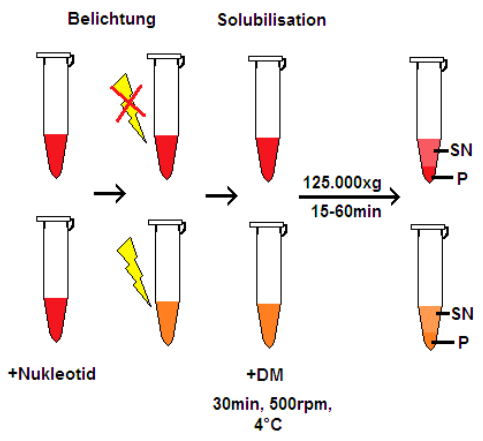
<u>Assaypuffer</u>

10 mM HEPES/KOH, pH 7,4
100 mM KCl
2 mM $MgCl_2$
1 mM DTT

<u>Bindepuffer</u>

50 mM Tris/HCl, pH 7,5
150 mM NaCl
10 mM $MgCl_2$
10% (v/v) Glycerin

1. Belichtung und Solubilisation



2. Pulldown-Assay

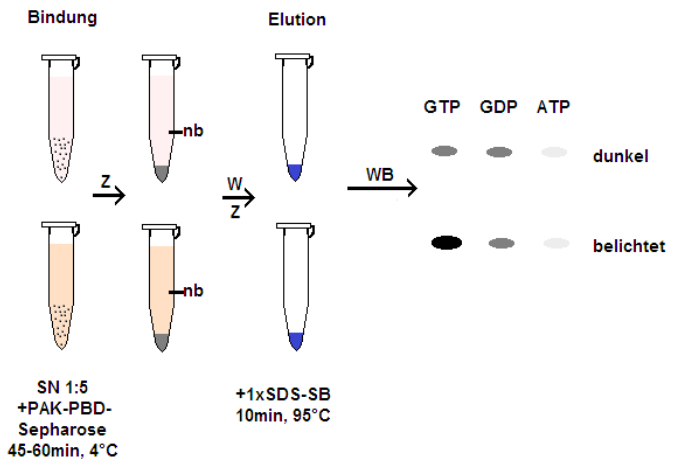


Abb. 2-1: Schematischer Ablauf eines Rac1-Aktivitätsassays. Zwei Proben ROS wurden in Assaypuffer aufgenommen und mit Nukleotid (GTP, GDP oder ATP) versetzt. Anschließend wurde eine Probe belichtet, die andere weiterhin im Dunkeln gehalten. Um das Rac1 in Lösung zu bringen, wurde das Detergens DM zugefügt und für 30 min schüttelnd inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Ultrazentrifugation sedimentiert und befanden sich im Pellet (P). Der Überstand (SN) wurde 1:5 mit Assaypuffer verdünnt und für mindestens 45min mit PAK-PBD-Sepharose inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Sepharose und der *non-bound* (nb) durch Zentrifugation (Z) voneinander getrennt. Der nb wurde verworfen und die PAK-PBD-„Beads“ mit Puffer gewaschen (W). Die Elution wurde in 1x SDS-Probenpuffer (1xSDS-SB) durchgeführt und die gebundenen Proteine durch Kochen von der Sepharose extrahiert. Zum Nachweis von gebundenem Rac1 wurde ein Westernblot durchgeführt. Da die PBD von PAK eine höhere Affinität für GTP- als GDP-gebundenes Rac hat, wäre bei lichtabhängiger Aktivierung von Rac1 im Westernblot das stärkste Signal bei derbelichteten Probe in Anwesenheit von GTP zu erwarten. Bei dunkel-adaptierter Probe bzw. in Anwesenheit von GDP sollte eine deutlich schwächere Bindung an die Sepharose zu detektieren sein. Bei Zugabe von ATP wird keine Interaktion von Rac1 mit PAK-PBD erwartet.

Nukleotidbindung von rekombinantem hRac1:

Um zu prüfen, ob das rekombinante hRac1 bei Expression in *E. coli* tatsächlich aktivierbar ist, wurde die Beladbarkeit mit Nukleotiden im Pulldown-Assay getestet. Hierfür wurde gereinigtes hRac1 in Bindepuffer (ggf. mit 0,05% (v/v) Tween-20 und/oder 1% (w/v) BSA ergänzt) aufgenommen und 10-50 µg in einer Konzentration von 0,016-0,3 µg/µl pro Assay eingesetzt. Zur Beladung wurde die Proteinlösung zunächst mit 150 mM EDTA (Endkonzentration 15 mM) und dann mit GTPγS (Endkonzentration 200 µM oder 1 mM) oder GDP (Endkonzentration 200 µM oder 1 mM) versetzt. Anschließend wurde 5-15 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 600 mM $MgCl_2$ (Endkonzentration 60 mM) und Lagerung auf Eis gestoppt. Das aktivierte hRac1·GTPγS sollte durch Bindung an PAK-PBD-Sepharose (siehe 2.2.25) isoliert werden. Hierfür wurden 10-30 µl PAK-PBD-Sepharosebeads zu den Proben pipettiert und 15-60 min bei 4°C und 700 rpm in einem Thermoblock inkubiert. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation (3.500 xg, 1 min, 4°C) sedimentiert und 90% des Überstands entfernt. Anschließend wurde ein oder zweimal mit Waschpuffer gewaschen (3.500 xg, 3 min, 4°C). Der Überstand wurde jeweils verworfen. Schließlich wurde die Sepharose mit 20-50 µl 1x SDS-Probenpuffer für 2 min bei 95°C ausgekocht und so das gebundene hRac1 eluiert. Anschließend wurden die Proben mittels Westernblot (siehe 2.2.17) auf Anwesenheit von hRac1 geprüft. Der Pulldown-Assay wurde sowohl im batch-Verfahren als auch unter Verwendung von Säulen durchgeführt. Als Kontrolle für die unspezifische Bindung von Rac1 an die Sepharose wurde jeweils ein Ansatz ohne Nukleotid und mit mock-aktiverter Sepharose also ohne gebundene PAK-PBD mitgeführt.

Bindepuffer	Waschpuffer
50 mM Tris/HCl, pH 7,4	25 mM Tris/HCl, pH 7,4
10 mM $MgCl_2$	30 mM $MgCl_2$
500 mM NaCl	50 mM NaCl

2.2.27. Kinaseaktivitätsassay

2.2.27.1. Vorbereitung der putativen Substratproteine

Trennung löslicher und nicht-löslicher ROS-Proteine:

Um lichtinduzierte Interaktionen von löslichen Proteinen und Membranproteinen zu unterbinden, wurde unter Rotlicht bzw. unter Lichtausschluss gearbeitet. Zunächst wurde ROS-Präparation im Ausgangsvolumen oder in 2/3 des Ausgangsvolumens Waschpuffer aufgenommen. Zum Teil war der Waschpuffer mit Proteaseinhibitorcocktail (1:500, mPIC,

Sigma) versetzt. Die Suspension wurde bei 125.000 xg und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde bis zum Kinaseassay auf Eis aufbewahrt. Das Pellet wurde mindestens zweimal mit dem fünffachen des Ausgangsvolumens mit Waschpuffer gewaschen (10 min, 125.000 xg, 4°C) und schließlich im 0,3- bis 0,6-fachen des Ausgangsvolumens in Resuspensionspuffer (z.T. mit 1:500 mPIC) resuspendiert.
Wurden nur die Membranproteine benötigt, wurde bereits im ersten Waschschritt mit dem fünffachen Volumen gewaschen. Die präparierten Membranproteine wurden bis zum Kinaseassay unter Lichtausschluss auf Eis gelagert.

Waschpuffer	Resuspensionspuffer
10 mM HEPES/KOH, pH 7,4	50 mM H
1 mM DTT	50 mM KCl
	20 mM NaCl
	1 mM DTT

Präparation von HEK293-Membranen:

Zwei zu 100% konfluente 10 cm-Schalen von HEK293-Zellen wurden wie in 2.2.20 beschrieben geerntet und die Membranen präpariert. Lyse- und Resuspensionspuffer waren beide mit mPIC (1:500) versetzt. Die finale Resuspension fand in 100 µl Resuspensionspuffer statt. Im Anschluss wurde eine Proteinquantifizierung mit Amidoschwarz (siehe 2.2.15.2) durchgeführt.

Urea-gewaschene ROS-Membranen:

Um auch die endogene Rhodopsinkinase vollständig von den ROS-Membranen zu trennen, wurden diese mit Urea gewaschen. Hierzu wurde nach dem Protokoll von Shichi und Somers (1978) und Komolov *et al.* (2005) gearbeitet.
400 µl ROS-Präparation (7,6 mg Rh/ml) wurden zunächst dreimal mit dem fünffachen Volumen GTP-Puffer gewaschen (15 min, 300.000 xg, 4°C). Anschließend wurde das Pellet in 2 ml Urea-Puffer resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 15 min bei 300.000 xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml isotonischem Puffer aufgenommen und insgesamt dreimal mit diesem Puffer gewaschen (15 min, 300.000 xg, 4°C). Final wurde in 608 µl (ergibt 5 mg Rh/ml) resuspendiert. Die gewaschenen Membranen wurden in Arbeitsaliquots von 40 µl aufgeteilt und bei -80°C gelagert. Alle Arbeitsschritte wurden unter Lichtausschluss bzw. unter Rotlicht durchgeführt. Die Lagerung fand ebenfalls unter Lichtausschluss statt.

Hypotonischer Puffer
10 mM Tris/HCl, pH 7,4
0,5 mM $MgCl_2$
1 mM DTT
0,1 mM PMSF
1:500 mPIC (*Sigma*)

Isotonischer Puffer
10 mM Tris/HCl, 7,4
0,1 M NaCl
5 mM $MgCl_2$
1 mM DTT
0,1 mM PMSF

GTP-Puffer
0,1 M GTP in hypotonischem Puffer

Urea-Puffer
5M Urea in hypotonischem Puffer

2.2.27.2. Kinaseaktivitätsassay

Der Aktivitätsassay wurde angelehnt an Buchwald *et al.* (2001) durchgeführt. Sollten die Proben weiter massenspektrometrisch analysiert werden, wurde nicht-markiertes ATP verwendet, ansonsten wurde radioaktiv markiertes [γ-^{32}P]-ATP eingesetzt. Die Komponenten wurden wie in Tabelle 2-26 angegeben pipettiert. Hierbei wurden pro Ansatz jeweils nur eine Kinase, ein Substrat und ein Phosphat-Donor eingesetzt. Die Aktivität von (His_6)-hPAK1 wurde in Anwesenheit von Protease- und Phosphataseinhibitorcocktail getestet, ebenso wie der Einfluss des PAK1-Aktivators hRac1(G12V). Hierbei handelt es sich um eine konstitutiv aktive Mutante von hRac1. Die Reaktion wurde entweder mit der Zugabe von PAK1, ATP oder [γ-^{32}P]-ATP gestartet. Das Myelin basische Protein (MBP) stellt hierbei ein unspezifisches Substrat für Kinasen dar und diente als Kontrolle der generellen Aktivität von PAK1.

Die Proben wurden für 30 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Je nach geplanter Analysemethode wurde der Assay unterschiedlich abgestoppt. Sollte im Anschluss eine SDS-PAGE folgen, wurde die Reaktion mit 8,33 µl 4x SDS-Probenpuffer (Zusammensetzung siehe 2.2.13.1.1) beendet. Vor einer nativen PAGE oder der quantitativen Analyse wurde die Reaktion mit 1 ml eiskaltem 1x Assaypuffer gestoppt. Anschließend wurden die Proben direkt auf Eis gestellt.

10x Assaypuffer
400 mM HEPES/NaOH, 7,5
1M NaCl
50 mM $MgCl_2$
10 mM DTT

Tab. 2-26: Reaktionsbedingungen des Kinaseaktivitätsassay.

Komponente		Zielkonzentration
Assaypuffer:	10x Assaypuffer	1x
	10x Assaypuffer + Proteaseinhibitorcocktail (1:50)	1x
Kinase:	His_6-hPAK1	0,1-0,44 mg/ml
	hPAK1	0,17 mg/ml oder 0,44 mg/ml
Substrat:	MBP (5 mg/ml)	1 mg/ml
	ROS	verschiedene Konzentrationen, eingesetztes Volumen: 5 µl (oder ein Vielfaches)
	ROS-Membranen	
	lösliche ROS-Proteine	
	HEK293-Membranen (10,7 mg/ml)	2,1 mg/ml
	Urea-gewaschene ROS-Membranen (5 mg Rh/ml)	1 mg Rh/ml
Phosphat-Donor:	ATP (25 µM)	2,5 µM
	[γ-^{32}P]-ATP (25 µM, 100 µCi/ml)	2,5 µM, 10 µCi/ml
Kinaseaktivator:	hRac1(G12V)	0,2-0,8 mg/ml
Inhibitoren:	Phosphataseinhibitorcocktail	1:5-1:25
	Proteaseinhibitorcoktail	siehe oben
mit H_2O_{dd} oder 1x Assaypuffer		*ad.* 25 µl (oder ein Vielfaches)

2.2.27.3. Analyse

Qualitative Analyse:

SDS-PAGE:

Die Proben wurden in einem 12%igen Polyacrylamidgel wie in 2.2.13.1.1 beschrieben getrennt. Als Referenz wurde der Precision Plus Protein All Blue-Standard (*BioRad*) oder Prestained Protein Molecular Weight Marker (*Pierce*) aufgetragen. Um eng beieinander laufende Proteinbanden für die massenspektrometrische Analyse weiter zu separieren, wurde zum Teil eine zweite SDS-PAGE durchgeführt (siehe 2.2.13.1.2). In der Regel wurde nach der ersten Dimension allerdings ein Autoradiogramm erstellt (siehe unten).

Native PAGE:

Nach Stoppen der Phosphorylierungsreaktion mit 1x Assaypuffer wurden die Proben bei 13.000 xg bei 4°C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wie in 2.2.13.2 beschrieben behandelt. Im Anschluss wurde eine anionische oder kationische native PAGE durchgeführt (siehe 2.2.13.2) und ein Autoradiogramm erstellt (siehe unten)

Autoradiogramm:

Zur Erstellung eines Autoradiogramms wurden die Polyacrylamidgele zunächst mit Coomassie Blau gefärbt (siehe 2.2.14.1). Anschließend wurden sie für ca. 10 min in H_2O_{dd} gewässert und dann bei 80°C für mindestens 50 min zwischen zwei Lagen Einmachhaut (*Alba*) getrocknet. Sollten die Proben vor der massenspektrometrischen Analyse noch in der zweiten Dimension in der SDS-PAGE getrennt werden, wurde auf die Coomassie Blau-Färbung und jedwede Fixierung mit Essigsäure verzichtet. In diesem Fall wurden die Gele lediglich für ca. 10 min in H_2O_{dd} inkubiert. Im Anschluss wurde ü.N. ein ECL-Film aufgelegt, welcher wie in 2.2.17.2 beschrieben entwickelt wurde. Die Banden des Proteinmarkers wurden mit einem aushärtendem, phosphoreszierendem Gel (Window Colour, *C.Kreul*) markiert, sodass sie auch auf dem entwickelten ECL-Film sichtbar waren.

Quantitative Analyse:

Diese Analysemethode wurde ausschließlich für ROS-Membranproteine angewandt. Nach Stoppen der Phosphorylierungsreaktion mit 1x Assaypuffer wurden die Proben bei 13.000 xg und 4°C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml eiskaltem 1x Assaypuffer gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 4°C, 13.000 xg). Die Proben wurden in je 5 ml Szintillationscocktail (*PerkinElmer*) aufgenommen und anschließend für 60 sec im Rb86-Modus die Zählimpulse/min (*counts per minute*, cpm) im Szintillationszähler (*Wallac*) gemessen.

2.2.28. Massenspektrometrische Proteinanalyse

Im Kinaseaktivitätsassay mit ROS-Membranproteinen (siehe 2.2.27) war im Autoradiogramm eine unbekannte Bande bei ca. 20 kDa als Substrat von His_6-hPAK1 aufgetaucht. Diese wurde in zwei Dimensionen über die SDS-PAGE (siehe 2.2.13.1) getrennt und mit kolloidalem Coomassie (siehe 2.2.14.2) gefärbt. Da zwei Banden sehr dicht beieinander liefen und nicht ganz klar war, welche das Signal im Autoradiogramm erzeugte, wurden beide mit einem sauberen Skalpell unter einer Standlupe ausgeschnitten und zur Identifizierung zur massenspektrometrischen Analyse verschickt. Diese wurde am Institut für Klinische Chemie des Universitäts-Klinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Dort wurden die in den Banden enthaltenden Proteine zunächst mittels tryptischem Verdau in Peptide zerlegt. Die Aminosäuresequenz der Peptide wurde mithilfe eines Elektrospray-Q-TOF-Tandem-Massenspektrometers oder mittels LC/MS ermittelt und die Proteine mit Hilfe von Proteindatenbanken identifiziert.

2.2.29. Guanylatzyklaseaktivitätsassay

Um zu prüfen inwiefern die ROS-Guanylatzyklasen (GCs) durch PAK1 beeinflusst werden, wurden GC-Aktivitätsassays durchgeführt. Hierfür wurden ROS-Membranen von den löslichen Proteinen getrennt und anschließend mit dem putativen Aktivator *in vitro* in einem GTP-haltigen Puffer zusammengebracht. Anschließend wurde die synthetisierte Menge cGMP mittels reversed phase HPLC-Analyse festgestellt. Die Experimente wurden angelehnt an Koch (1991) durchgeführt.

2.2.29.1. Waschen der ROS-Membranen

Um die löslichen Proteine (u.a. auch die endogenen GCAPs und endogenes PAK1) der ROS-Präparationen zu entfernen, wurde zweimal mit dem fünffachen Volumen ROS-Waschpuffer gewaschen. Die Membranen wurden bei 125.000 xg und 4°C für 10 min zentrifugiert. Beim Wechsel des Waschpuffers wurde das Pellet nicht resuspendiert. Final wurden die Membranen in 10 µl/Ansatz ROS-Resuspensionspuffer aufgenommen. Die Suspension wurde bis zum Einsatz unter Lichtausschluss auf Eis gelagert. Alle Arbeitsschritte fanden im Dunkeln bzw. unter Rotlicht statt. Das initiale Volumen ROS-Präparation wurde anhand der Rh-Konzentration und der Anzahl der geplanten Ansätze berechnet, wobei 70-100 µg Rh/ Ansatz pipettiert wurden.

<u>ROS-Waschpuffer</u>
10 mM HEPES/KOH, pH 7,4
1 mM DTT

<u>ROS Resuspensionspuffer</u>
50 mM HEPES/KOH, pH 7,4
50 mM KCl
20 mM NaCl
1 mM DTT

2.2.29.2. Aktivitätsassay

Im ersten Schritt wurde der Aktivator (nmzGCAP1 oder His_6-hPAK1) wie in Tab. 2-27 angegeben pipettiert. Neben dem Einfluss von His_6-hPAK1 in An- und Abwesenheit von PIC3, wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt, wie die Inkubation von ROS ohne Aktivator und mit nicht-myristyliertem zGCAP1 (nmzGCAP1) unter Ca^{2+}- und Ca^{2+}-freien-Bedingungen. Als nächstes wurden 10 µl der gewaschenen ROS-Membranen (siehe 2.2.29.1) zugefügt und die Proben 5 min bei RT inkubiert, Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl 2,5x GC-Puffer gestartet, gefolgt von einer 5- bis 15-minütigen

Inkubation bei 30°C. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden 50 µl 0,1 M EDTA (eiskalt) zugefügt und die Proben für 5 min bei 95°C hitzedenaturiert. Wurde die GC-Aktivität in ROS-Membranen bestimmt, wurde bis zum Kochen der Proben im Dunkeln unter sehr schwachem Rotlicht gearbeitet. Abschließend wurde das restliche Volumen der gewaschenen ROS-Membranen bestimmt, um die genaue Rh-Menge pro Ansatz berechnen zu können. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Tab. 2-27: Pipettiertabelle zu den GC-Aktivitätsassays. Die Konzentrationsangaben beziehen sich hierbei auf das Gesamtprobenvolumen von 50 µl.

Komponente	**Aktivator/ Bedingungen**				
	nmzGCAP1/ Ca^{2+}	*nmzCGAP1 /EGTA*	*His_6-hPAK1/ PIC3*	*His_6-hPAK1*	*Kontrolle*
nmzGCAP1	10 µM	10 µM	---	---	---
His_6-hPAK1	---	---	2 nM–1 µM	1 µM	---
K_2H_2EGTA, 10 mM	---	10 µl	---	---	---
$K_2CaEGTA$, 10 mM (33 µM $Ca^{2\#}$)	10 µl	---	---	---	---
PIC3		(0,5 µl)	0,5 µl	---	0,5 µl
1x PAK-Puffer (inkl. 50% (v/v) Glycerin)	---	---	---	---	µl wie 1 µM His_6-hPAK1
H_2O_{dd}	*ad.* 20 µl	*ad.* 20 µl	*ad.* 20 µl	*ad.* 20 µl	*ad.* 20 µl

<u>2,5x GC-Puffer</u>

75 mM MOPS/KOH, pH 7,2

150 mM KCl

10 mM NaCl

2,5 mM DTT

8,75 mM $MgCl_2$

2,5 mM GTP

0,75 mM ATP

0,4 mM Zaprinast

2.2.29.3. RP-HPLC-Analyse

Die ROS-Membranen wurden für mindestens 10 min bei 16.100 xg und RT pelletiert. Der Überstand wurde zur Ermittlung der synthetisierten cGMP-Menge über eine RP-Säule

(LiChrospher 100 RP-18 (5µm), *Millipore*) gegeben. Als Laufpuffer wurde 5 mM KH_2PO_4 eingesetzt. Die Elution fand mit einem MeOH-Gradienten statt. Als Kontrolle und zum Vergleich wann das cGMP eluiert, wurde ebenfalls ein cGMP-Standard (500 pmol cGMP) über die Säule gegeben. Die Analyse der entstandenen Peaks fand mit Hilfe der EZChrom ELITE Software (*Merck/ Hitachi*) statt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Rac1 in der bovinen Retina

3.1.1. Lokalisation von Rac1

Damit der Rac1/PAK1/GC/cGMP-Signalweg in den Photorezeptorzellen umgesetzt werden kann, ist hierfür die erste Vorraussetzung, dass die Schlüsselproteine präsent sind. Die Verteilung von Rac1 wurde zwar bereits für z.B. die porcine und murine Retina gezeigt (Kiel *et al.*, 2011; Belmonte *et al.*, 2006; Haruta *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2014), für die Rinderretina, welche in dieser Arbeit primär für Experimente genutzt wurde, sind jedoch nur wenige Publikationen zu finden.

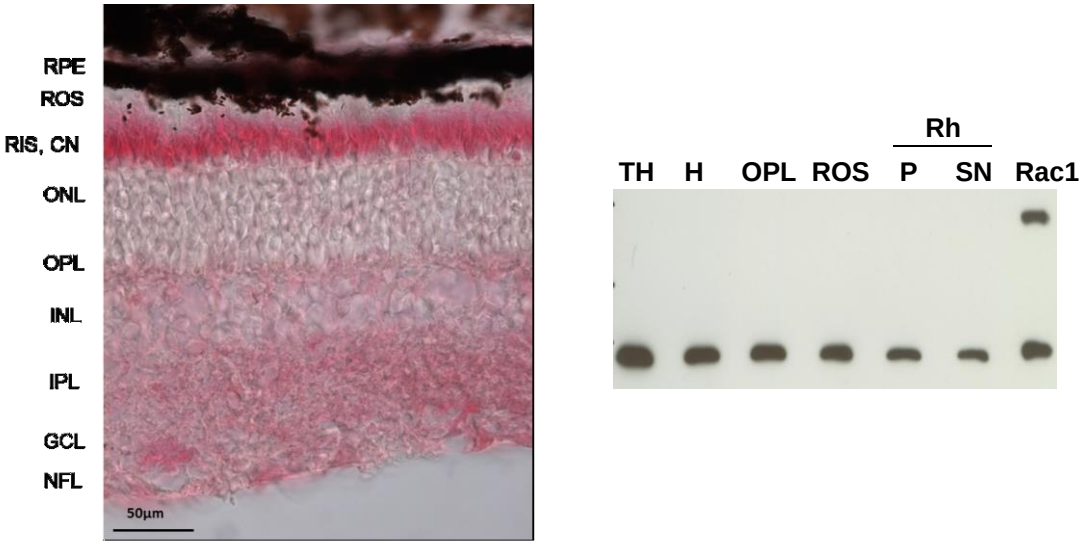


Abb. 3-1: Lokalisation von Rac1 in der bovinen Retina. ***Links:*** Kryogewebeschnitte von belichteten bovinen Retinen wurden immunhistochemisch gegen Rac1 gefärbt. *RPE: retinales Pigmentepithel, ROS: Stäbchenaußensegmente, RIS: Stäbcheninnensegmente, CN: Zapfen, ONL: äußere nukleäre Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere nukleäre Schicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht, NFL: Nervenfaserschicht;* ***Rechts*****:** Um die Anwesenheit von Rac1 in den Stäbchenaußensegmenten zu bestätigen, wurde ein Westernblot mit verschiedenen retinalen Fraktionen angefertigt. Für die Proben TH und Rh-P wurden je 15 µg, für die Proben H, OPL ROS und Rh-SN je 5 µg Gesamtprotein aufgetragen. Als Positivkontrolle wurden 30 ng rekombinantes hRac1 eingesetzt. *TH: Totalhomogenat inkl. ROS, H: Homogenat ohne ROS, OPL: äußere plexiforme Schicht, ROS: Stäbchenaußensegmente, Rh: ROS-Solubilisat mit CHAPS (P: Pellet, SN: Überstand), Rac1: rekombinantes hRac1*

Aus diesem Grund wurden Kryogewebeschnitte von bovinen Retinen hergestellt und diese immunhistochemisch gegen Rac1 gefärbt (siehe Abb. 3-1, links). Es ließ sich eindeutig ein Signal in der gesamten Retina mit Ausnahme der äußeren nukleären Schicht erkennen. Zusätzlich war auch die innere nukleäre Schicht eher schwach gefärbt. Die stärkste Expression lag in den Photorezeptorzellen und hier eindeutig in den Zapfen und Stäbcheninnensegmenten vor. Ob die Stäbchenaußensegmente ebenfalls Rac1 enthalten,

war nicht ganz eindeutig, da diese Zellabschnitte durch das Pigmentepithel verdeckt wurden. In Schnitten bei denen das Pigmentepithel nicht mehr vorhanden war, waren die Außensegmente zum Teil stark beschädigt, sodass in diesem Fall ein Signal eine falsch positive Reaktion bzw. kein Signal ein falsch negatives Ergebnis hätte bedeuten können. Aus diesem Grund wurde im Westernblot die Anwesenheit von Rac1 in verschiedenen retinalen Präparationen getestet (Abb. 3-1, rechts). Hierbei wurde das kleine G-Protein in Retinahomogenaten mit und ohne ROS, in der äußeren plexiformen Schicht und in isolierten ROS detektiert. Zusätzlich wurden ROS-Membranen mit dem zwitterionischen Detergens CHAPS wie in 2.2.24.4 beschrieben solubilisiert. Hierbei blieb interessanterweise ein Teil des Rac1-Pools mit der Membran assoziiert (Abb. 3-1, rechts, vgl. Spur Rh/SN mit Rh/P). Als Kontrolle wurde rekombinantes hRac1 auf das Gel aufgetragen. In dieser Spur ließ sich eine zweite Bande (Abb. 3-1, rechts, Spur Rac1) bei ca. 37 kDa beobachten. Hierbei handelte es sich mit größter Wahrscheinlichkeit um das Dimer, da Rac1 in niedrigen Konzentrationen instabil wird und Präzipitate bildet. Scheinbar ist dieser Effekt resistent gegenüber SDS.

Neben belichteten Retinen wurden auch dunkel-adaptierte Netzhäute präpariert (sie Abb. 3-2). Im direkten Vergleich zeigte sich das gleiche Verteilungsmuster von Rac1. Es war demnach keine lichtabhängige Translokation zu beobachten.

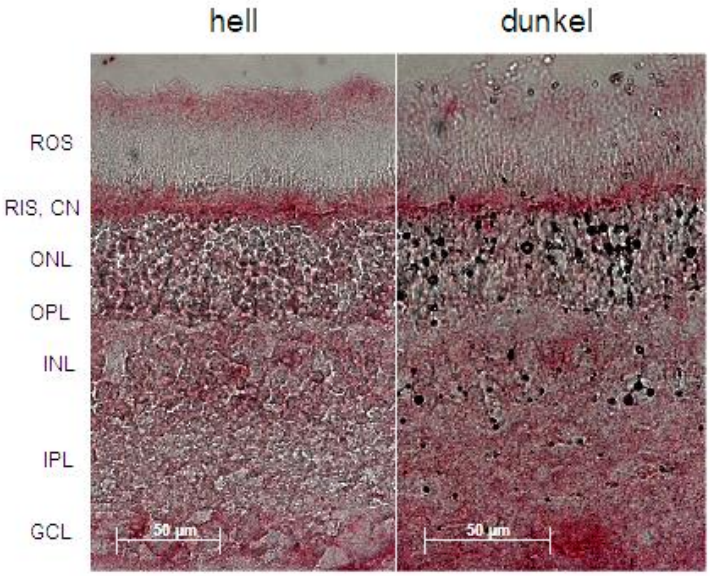


Abb. 3-2: Lichtabhängige Lokalisation von Rac1 in der bovinen Retina. Kryogewebeschnitte von belichteten (*links*) und dunkel-adaptierten (*rechts*) Rinderretinen wurden immunhistochemisch gegen Rac1 gefärbt. *RPE: retinales Pigmentepithel, ROS: Stäbchenaußensegmente, RIS: Stäbcheninnensegmente, CN: Zapfen, ONL: äußere nukleäre Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere nukleäre Schicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht*

3.1.2. Rac1-Konzentration in Stäbchenaußensegmenten

Da der Rac1-Gehalt in Photorezeptorzellen bisher noch nicht quantifiziert wurde, habe ich in dieser Arbeit die ungefähre Rac1-Konzentration relativ zu Rh in bovinen ROS mittels semi-quantitativem Westernblot bestimmt. Hierbei wurden als Referenz verschiedene Mengen von rekombinantem hRac1 neben Proben von ROS-Präparation mit bekanntem Rh-Gehalt aufgetragen und die Signalintensitäten per Auge verglichen. Eine densitometrische Auswertung wurde ebenfalls versucht, es stellte sich jedoch heraus, dass diese Form der Analyse in diesem Fall keinen Vorteil bezüglich der Genauigkeit aufwies (Daten nicht gezeigt). Ein exemplarischer Blot ist in Abb. 3-3 gezeigt.

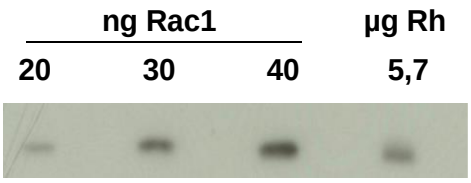


Abb. 3-3: Westernblot zur Konzentrationsbestimmung von Rac1 in ROS. Um die Konzentration von Rac1 in Stäbchenaußensegmenten relativ zu Rh zu bestimmen, wurden Westernblots mit verschiedenen Mengen von rekombinantem hRac1 neben einer ROS-Probe mit definiertem Rh-Gehalt hergestellt und die Signale verglichen.

Hieraus ergab sich ein Wert von ca. 30 ng Rac1 pro 5,7 µg Rh in 1 µl ROS. Mit Molmassen von 42 kDa für Rh und 23 kDa für Rac1 entspricht dies einem molaren Verhältnis von 105:1 (Rh:Rac1).

3.2. Solubilisationsprofil von Rac1

Da sich Rac1 mit CHAPS nicht vollständig aus ROS-Membranen solubilisieren ließ (siehe 3.1.1), wurde das Solubilisationsverhalten von Rac1 genauer untersucht. Hierzu wurde zum einen die Assoziation mit Lipid-Rafts im Dunkeln und bei Belichtung überprüft. Zum anderen wurde eine drastischere Solubilisation durch Behandlung mit 5% Triton X-100 und anschließend zweifacher Extraktion mit 20 mM DM durchgeführt.

3.2.1. Assoziation mit Lipid-Rafts in Stäbchenaußensegmenten

Lipid-Rafts (LRs) oder Detergens-resistente Membranen (DRMs) wurden durch Solubilisation mit 0,5% Triton X-100 und Separation der Detergens-löslichen und -unlöslichen Anteile über einen Zuckergradienten aus bovinen ROS isoliert. Der Gradient wurde anschließend von unten nach oben fraktioniert und die einzelnen Fraktionen mittels Westernblot auf Rac1 getestet. Die LR-haltigen Fraktionen wurden durch die Anwesenheit des Markerproteins Caveolin-1 (Cav-1) identifiziert. Cav-1 ließ sich hauptsächlich in den Fraktionen 11-14

nachweisen (Abb. 3-4). Ein Teil des Rac1 war ebenfalls in diesen Fraktionen zu finden, d.h. also mit LRs assoziiert (Abb. 3-4). Der Großteil des G-Proteins befand sich allerdings in den ersten Fraktionen (Fraktion 1-8) und wurde somit mit Triton X-100 solubilisiert (Abb. 3-4).

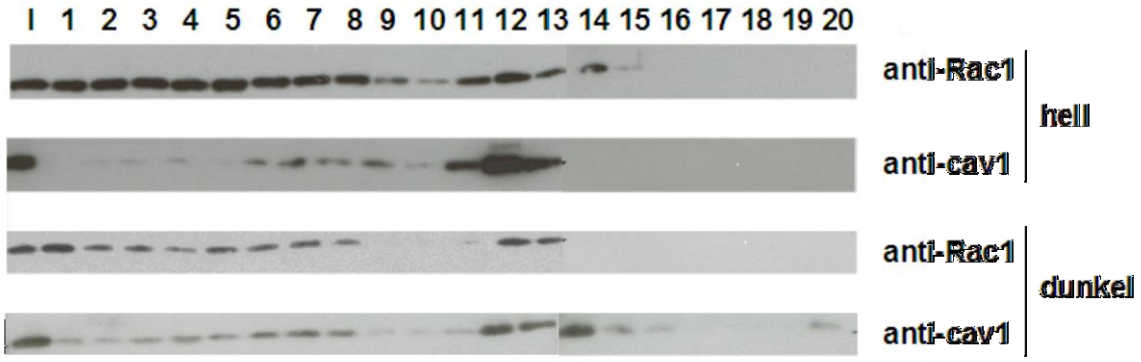


Abb. 3-4: Assoziation von Rac1 mit Lipid-Rafts aus ROS-Membranen. Detergens-unlösliche Membranfraktionen (DRMs oder Lipid-Rafts) wurden durch Zentrifugation über einen Saccharose-Gradienten aus ROS-Membranen isoliert. Die Gradienten wurden von unten nach oben fraktioniert und die einzelnen Fraktionen auf Anwesenheit von Rac1 und Caveolin-1 (Cav-1), einem Lipid-Raft-Markerprotein, untersucht. Es wurden jeweils 7,5 µl einer Fraktion aufgetragen. *I: Probe vor Zentrifugation, 1-20: Fraktionen 1-20 des Saccharose-Gradienten*

Die LR-Isolation wurde sowohl im Dunkeln als auch mit belichteten ROS bei Tageslicht durchgeführt. Die Verteilungsmuster von Cav-1 und Rac1 war in beiden Fällen nahezu gleich (Abb. 3-4, vgl. „hell“ mit „dunkel“).

3.2.2. Schrittweise Solubilisation aus Stäbchenaußensegmenten

ROS-Membranen wurden schrittweise zunächst mit 5% Triton X-100 und anschließend zweimal mit 20 mM DM unter Hochsalzbedingungen behandelt und so die Membranproteine extrahiert. Die während der Durchführung genommenen Proben wurden im Westernblot auf Anwesenheit von Rac1, Rh und bGC1 geprüft. Das Ergebnis ist in Abb. 3-5 dargestellt. Rac1 blieb bei Inkubation mit Triton X-100 unlöslich (Abb. 3-5, Spur TE), konnte jedoch bereits im ersten DM-Extraktionsschritt (DE_1) nahezu vollständig in Lösung gebracht werden, sodass sich im zweiten DM-Extrakt (DE_2) und in der unlöslichen Fraktion (DE_2P) kaum noch Rac1 detektieren ließ (Abb. 3-5). Dieses Muster ähnelt stark dem Solubilisationsverhalten der bGC1, welche ebenfalls bei Behandlung mit Triton X-100 im Extrakt nicht nachzuweisen war (Abb. 3-5, Spur TE), obwohl die Membranintegrität durch dieses Detergens sehr stark beeinträchtigt wird. bGC1 konnte ebenfalls erst durch Inkubation mit DM und hohen Salzkonzentrationen in Lösung gebracht werden (Abb. 3-5, Spur DE_1), blieb zu einem gewissen Teil jedoch auch nach dem zweiten DM-Extraktionsschritt in der unlöslichen

Fraktion lokalisiert (Abb. 3-5, Spur DE_2P). Rh zeigte ein völlig anderes Solubilisationsverhalten und löste sich bereits nahezu vollständig mit Triton X-100 aus der Membran (Abb. 3-5, Spur TE). In allen weiteren Schritten war es nur noch geringfügig nachzuweisen (Abb. 3-5, Spur DE_1, DE_2 und DE_2P)

Abb. 3-5: Schrittweise Solubilisation aus ROS-Membranen. ROS-Membranen wurden zunächst mit Triton X-100 und anschließend mit DM unter Hochsalzbedingungen behandelt. Das Solubilisationsverhalten von Rac1 wurde hierbei mittels Westernblot untersucht und mit dem von Rhodopsin und der bovinen Guanylatzyklase 1 (bGC1) verglichen. Für den Nachweis von Rhodopsin wurden 27 ng Gesamtprotein pro Probe aufgetragen, für den Nachweis von bGC1 und Rac1 je 4,8 µg Gesamtprotein pro Probe. *TS: Solubilisat mit Triton X-100, TE: Extrakt nach Solubilisation mit Triton X-100, DS: Solubilisat mit DM, DE_1: 1. Extrakt nach Solubilisation mit DM, DE_2: 2. Extrakt nach Solubilisation DE_2P: Pellet zum 2. Extrakt mit DM (finales Pellet)*

3.3. Lichtabhängige Aktivierung von Rac1 in Stäbchenaußensegmenten

Balasubramanian und Slepak (2003) haben gezeigt, dass sich Rac1 in ROS durch Belichtung und in Anwesenheit von GTP aktivieren lässt. Um weitere Erkenntnisse bezüglich der Bedingungen für diese Aktivität zu erhalten (z.B. Einfluss der Belichtungsdauer) bzw. die lichtabhängige Aktivierung von Rac1 gegebenenfalls in weiterführenden Experimenten nutzen zu können und dadurch Informationen über den physiologischen Nutzen dieser zu erhalten, habe ich in meiner Arbeit ebenfalls ein Aktivitätsassay in Anlehnung an das von Balasubramanian und Slepak (2003) beschriebene Protokoll durchgeführt (siehe 2.2.26).

Ein Teil der Ergebnisse ist in Abb. 3-6 dargestellt. Als genereller Trend zeigte sich eine Bestätigung der lichtabhängigen Aktivierbarkeit von Rac1 in ROS in Anwesenheit von GTP (vgl. Abb. 3-6, A-C Spuren GTP/l und GTP/d). Betrachtet man allerdings die Kontrollansätze mit GDP, war die Ergebnislage nicht sehr eindeutig. In einigen Experimenten war die Bindung an die Sepharose stärker bei Belichtung (Abb. 3-6, A, Spuren GDP/l und GDP/d), in anderen hingegen bei jenen Proben, die im Dunkeln gehalten wurden (Abb. 3-6, C und D, Spuren GDP/l und GDP/d). Dann wiederum waren die Signale für die belichtete und die dunkel-adaptierte Probe ähnlich intensiv (Abb. 3-6, B; Spuren /l und GDP/d). Weiter gab es

Ansätze, bei denen die Signale für belichtete und dunkel-adaptierte Probe vergleichbar waren (Abb. 3-6, B; Spuren /l und GDP/d). In jedem Fall waren die präzipitierten Mengen des belichteten Rac1/GTP (potentiell aktives Rac1) des belichteten Rac1/GDP (inaktives Rac1) bei vergleichbarem Input recht ähnlich (Abb. 3-6), obwohl PAK-PBD eine deutlich höhere Affinität für das aktive als für das inaktive Rac1 hat.

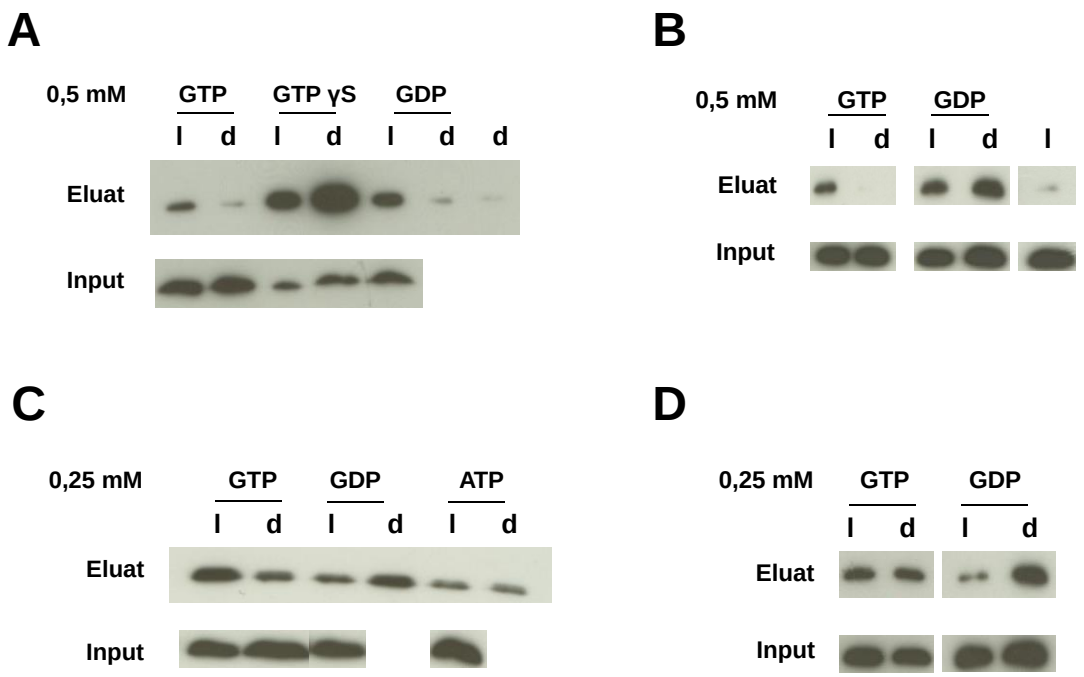


Abb. 3-6: Lichtabhängige Aktivität von Rac1 in ROS. Gewaschene ROS-Membranen wurden in Anwesenheit von GTPγS, GTP oder GDP belichtet (l), anschließend die Membranproteine mit DM solubilisiert und das aktivierte G-Protein mit Hilfe von PAK-PBD-Sepharose, welche eine höhere Affinität für Rac1·GTP als Rac1·GDP hat, gefischt. Zur Kontrolle wurden jeweils Proben ohne Belichtung (d) mitgeführt. Um unspezifische Interaktion mit der Sepharose auszuschließen, wurde ebenfalls die Bindung des solubilisierten Rac1 in Anwesenheit von ATP oder ganz ohne Nukleotid getestet. Es wurden jeweils 6 µl Input und 10 µl Eluat aufgetragen.

Im Zuge der Experimente war bei der Durchführung aufgefallen, dass nach der Solubilisation trotz hoher Drehzahl bei der Zentrifugation offensichtlich Membranpartikel der ROS, deutlich zu erkennen an der roten Farbe, als Kontamination mit auf die Sepharose gebracht wurden. Hierdurch ließ sich die inhomogene Ergebnislage sehr gut erklären. Aufgrund dessen wurde versucht die Methode in mehreren Aspekten zu optimieren (Detergens, Zentrifugationsdauer etc.). Dies blieb jedoch ohne Erfolg (Daten nicht gezeigt).

3.4. Heterologe Expression und Reinigung von hRac1

Um für verschiedene *in vitro*-Experimente eine ausreichende Menge an Protein zur Verfügung zu haben, wurde das kleine G-Protein hRac1 in *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-

RP heterolog exprimiert und anschließend über einen Kationenaustauscher chromatografisch wie in 2.2.12.1 beschrieben gereinigt. Die Ergebnisse der Reinigung sind in Abb. 3-7 und 3-9 dargestellt. Es zeigte sich, dass sich hRac1 nach dem Aufschluss zum größeren Teil in der löslichen Fraktion befand (vgl. Proben soni/P und soni/SN sowie UZ/P und UZ/SN Abb. 3-6 und Abb. 3-7).

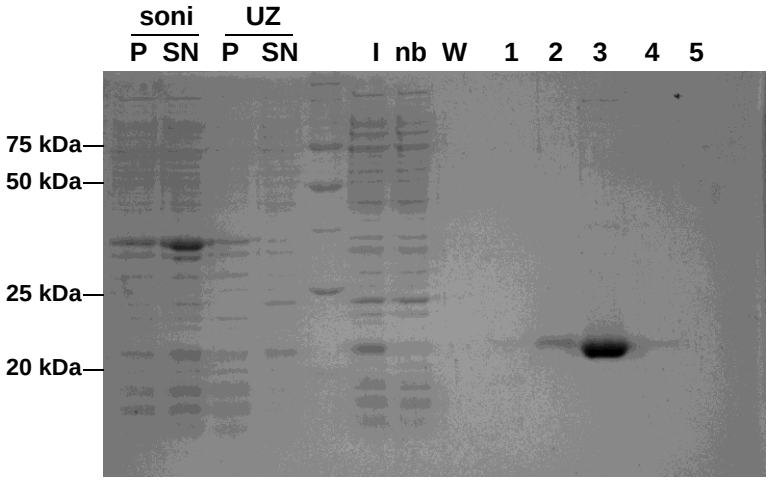


Abb. 3-7: Chromatografische Reinigung von hRac1 mit S-Sepharose. Während der Reinigung genommene Proben wurden im 12%igen SDS-Gel getrennt und anschließend mit Coomassie angefärbt. Die Proben soni/ P, SN und UZ/P, SN, ebenso wie die Proben I, nb und 1-5 sind vom Auftrag her miteinander vergleichbar. *soni: nach Sonifikation, UZ: nach Ultrazentrifugation, P: Pellet. SN: Überstand, I: Input, nb: Durchfluss, 1-5: Elutionsfraktion 1-5*

Zur Reinigung wurde entweder eine S-Sepharose-Säule (Säulenvolumen ca. 1 ml) verwendet und mit einem Stufengradienten über fünf Fraktionen eluiert (Abb. 3-7) oder es wurde eine HiTrap SP XL-Säule (Säulenvolumen 1ml) mit einer FPLC-Anlage genutzt, wobei mit einem linearen Salzgradienten über 20 Fraktionen eluiert wurde (Abb. 3-8). Beide Reinigungsstrategien sind vom Reinigungserfolg und der Ausbeute her vergleichbar (2-5 mg/l Bakterienkultur). Ebenfalls ließen sich in den SPR-spektroskopischen Experimenten keine Unterschiede zwischen den Reinigungen ausmachen.

Neben dem Wildtyp (WT) wurde auch eine Rac1-Mutante gereinigt (siehe Anhang). Der Aminosäureaustausch von Glycin zu Valin an der Position 12 führt hierbei zur konstitutiven Aktivität des G-Proteins (Best *et al.,* 1996) Bei der Reinigung wurde genauso wie beim WT verfahren. Einsatz fand Rac(G12V) primär bei der Überprüfung der hPAK1-Aktivität (siehe 2.2.27).

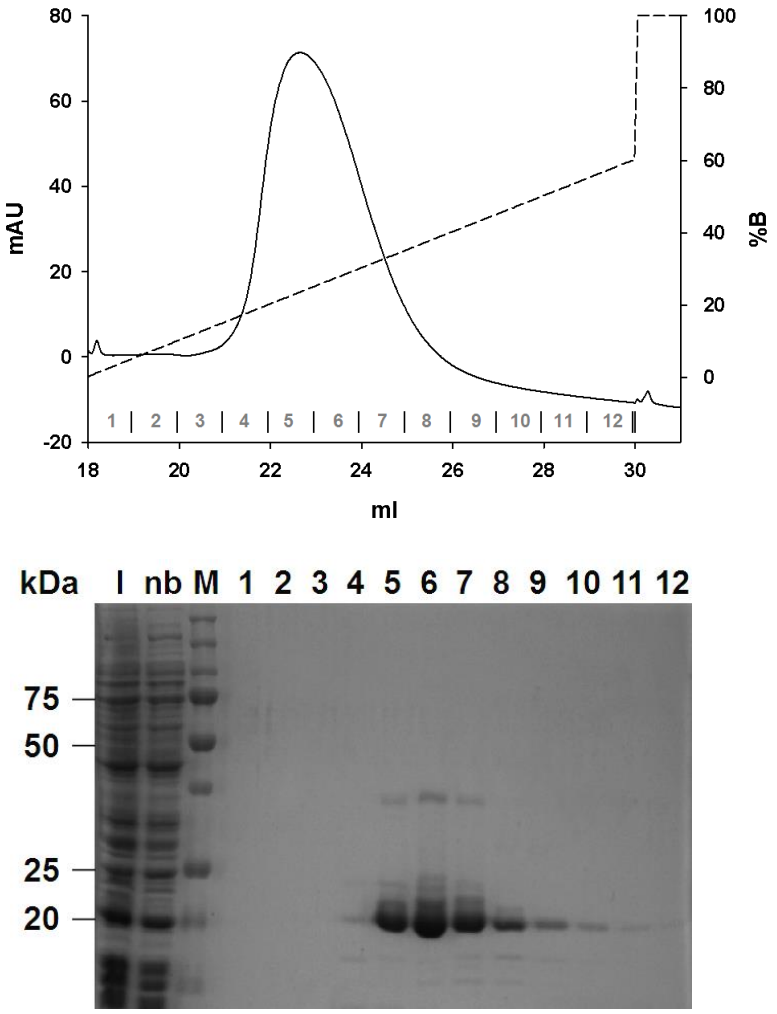


Abb. 3-8: Chromatografische Reinigung von hRac1 an der FPLC. hRac1 wurde an der FPLC-Anlage mit einer HiTrap SP XL-Säule gereinigt. Im Chromatogramm (*oben*) war bei der Elution ein klarer Peak zu erkennen, der sich von Fraktion 4-8 zog. Die bei der Reinigung genommenen Proben wurden im 12%igen SDS-Gel analysiert (*unten*). Das stärkste Signal in den Elutionsfraktionen (Fraktion 4-8) deckt sich mit dem Auftreten des Peaks im Chromatogramm. *I: Input, nb: Durchfluss, M: Proteinmarker, 1-12: Elutionsfraktionen 1-12*

3.5. Nukleotidbindung von rekombinantem hRac1

Die p21-bindende Domäne (PBD) in PAKs ist gleichzeitig auch die Bindedomäne für Rho-GTPasen. Die PBD bindet sowohl aktive als auch inaktive Rho-GTPasen, die GTP-gebundene Form jedoch mit deutlich höherer Affinität. Gleichzeitig stabilisiert die Interaktion auch den aktivierten Zustand des G-Proteins.

Um sicherzustellen, dass das rekombinante hRac1 als G-Protein funktionell ist und trotz heterologer Expression in der richtigen Faltung vorliegt, wurde die Beladbarkeit mit GTP getestet. Hierzu wurde das Protein unter Magnesium-freien Bedingungen mit dem schwer-hydrolysierbaren GTP-Analogon GTPγS oder mit GDP inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von Magnesium gestoppt. Anschließend wurde ein Pulldown-Assay mit PAK-PBD-Sepharose durchgeführt und nachfolgend die Bindung von hRac1 mittels Westernblot

nachgewiesen. Das Ergebnis ist in Abb. 3-9 gezeigt. Es war zu erwarten, dass das GTPγS-beladene hRac1 deutlich stärker mit der PAK-PBD-Sepahrose interagiert als jenes, welches mit GDP inkubiert wurde. Da hier jedoch kein Unterschied in der Signalstärke auszumachen war (Abb. 3-9) wurde das Experiment ebenfalls mit mock-aktivierter CNBr-Sepharose durchgeführt. Hieraus ergab sich, dass hRac1 unspezifisch an die Sepharose gebunden hatte, somit mit Hilfe dieser Methode leider keine Aussage über die Beladbarkeit des rekombinanten Proteins mit Nukleotiden getroffen werden konnte.

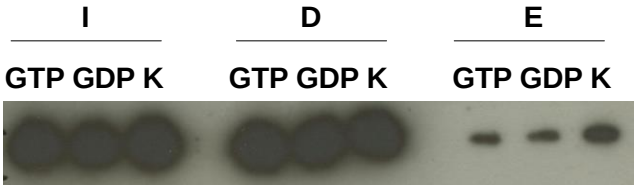


Abb. 3-9: Nukleotidbindung von hRac1. Die Beladbarkeit vom rekombinanten hRac1 wurde im Pulldown-Assay mit PAK-PBD-Sepharose getestet. Hierbei wurde hRac1 zunächst mit GTP oder GDP inkubiert und anschließend das aktivierte G-Protein, also hRac1·GTP, mit der PAK-PBD-Sepharose gefischt. Die Bindung wurde mittels Westernblot überprüft. Als Kontrolle wurde der Versuch ohne Nukleotid und mit mock-aktivierter CNBr-Sepharose durchgeführt. Für den Input wurden je 34,5 ng hRac1 aufgetragen. Vom Durchfluss wurden je 1,5 µl und vom Eluat je 2 µl eingesetzt. *I: Input, D: Durchfluss, E: Eluat, K: Kontrolle*

3.6. Interaktion von Rac1 und Rhodopsin

Die Arbeit von Balasubramanian und Slepak (2003) hat gezeigt, dass Rac1 im Pulldown-Assay mit an Concanavalin A (ConA) gebundenem Rh kopräzipitiert werden kann, d.h. Rac1 und Rh miteinander interagieren. Des Weiteren haben sie gezeigt, dass diese Interaktion lichtunabhängig ist (Balasubramanian und Slepak, 2003). Um die Bindung von Rac1 an Rh durch Bestimmung der kinetischen Parameter weiter zu charakterisieren, wurden oberflächenplasmonresonanz-spektroskopische Experimente durchgeführt. Hierbei wurde die Bindung von rekombinantem hRac1 an immobilisiertes dunkel-adaptiertes oder belichtetes Rh untersucht. Zusätzlich wurde geprüft, ob eine Kompetition zwischen Rac1 und dem bereits etablierten Bindungspartner, dem heterotrimeren G-Protein G_T. besteht. Im Pulldown-Assay mit ConA-Sepharose oder mittels Koimmunpräzipitation mit anti-Rh 1D4-Sepharose konnte kein Ergebnis erzielt werden, da ein hoher unspezifischer Hintergrund durch Bindung von hRac1 an die Sepharosen zu beobachten war (Daten nicht gezeigt).

3.6.1. Bindung von hRac1 an Rhodopsin und Kinetik der Interaktion

Mittels SPR-Spektroskopie wurde zunächst generell die Bindung von hRac1 an dunkel-adaptiertes Rh untersucht. Hierzu wurde Rh aus ROS-Membranen mit einem nicht-

denaturierendem Detergens (DM oder CHAPS) solubilisiert und anschließend auf der Oberfläche eines CM5-Sensorchips immobilisiert. Auf die Sensorchipoberfläche wurde zuvor mittels Aminkopplung der 1D4-Antikörper kovalent gebunden. Rac1 wurde in der mobilen Phase als Analyt in Konzentrationen zwischen 0,3-16 µM injiziert. Exemplarische Sensorgramme sind in Abb. 3-10 gezeigt.

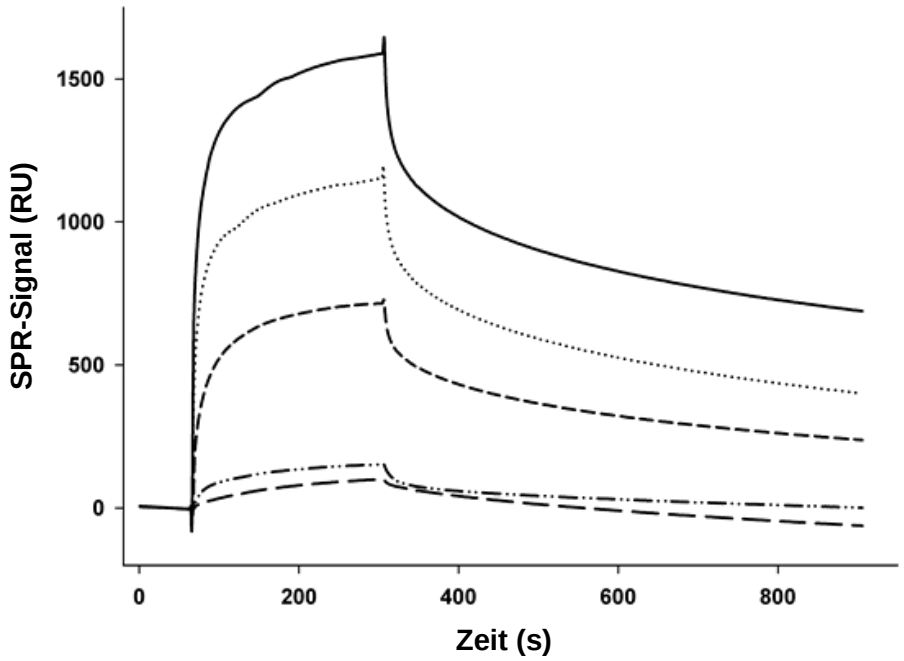


Abb. 3-10: Konzentrationsabhängige Interaktion von dunkel-adaptiertem Rh und hRac1. Die Interaktion von hRac1 und Rh wurden mit Hilfe von SPR-spektroskopischen Experimenten untersucht. Hierzu wurden ca. 10,4 ng/mm² (10.400 RU) des Rh-spezifischen 1D4-Antikörper auf der Chipoberfläche immobilisiert. Daran wurde dunkel-adaptiertes Rh gebunden (ca. 5,2 ng/mm², 5.180 RU). hRac1 wurde in der mobilen Phase in folgenden Konzentrationen injiziert: 15 µM (▬), 12 µM (····), 4,5 µM (---) und 0,3 µM (-··- und – –)

Aus diesen Experimenten ging eindeutig hervor, dass Rac1 und Rh miteinander interagierten. Diese Interaktion war konzentrationsabhängig, jedoch nicht in linearer Weise. In Abb. 3-10 ergibt sich z.B. bei Injektion von 4,5 µM hRac1 eine maximale Amplitude von ca. 700 RU, bei der Injektion von 15 µM hRac1 von ca. 1.600 RU. Bei einer linearen Abhängigkeit zur Konzentration sollte hier jedoch eine maximale Amplitude von ungefähr 2.300 RU erreicht werden.

Aus den erhaltenen Daten wurden die kinetischen Parameter ermittelt. Exemplarische Sensorgramme der Auswertung sind in Abb. 3-11 gezeigt. Diese ergab eine apparente Assoziationsrate von $(2{,}8\pm0{,}86)\cdot10^{3}$ $M^{-1}s^{-1}$ und eine apparente Dissoziationsrate von $(3{,}6\pm0{,}95)\cdot10^{-3}$ s^{-1}. Hieraus errechnete sich eine Dissoziationskonstante K_D von (1,3 ± 0,51) µM.

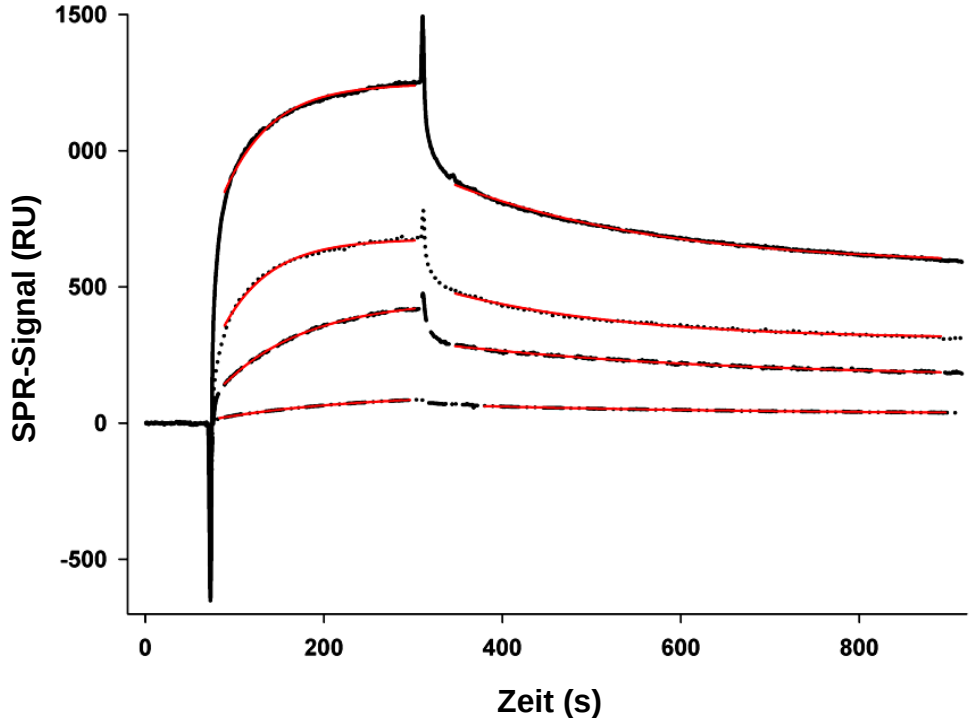


Abb. 3-11: Bestimmung der kinetischen Parameter der Interaktion Rh/hRac1. Die kinetischen Parameter der Interaktion von Rh und hRac1 wurden aus den Sensorgrammen der SPR-spektroskopischen Experimente berechnet. Exemplarisch sind vier Sensorgramme von Messungen mit verschiedenen hRac1-Konzentrationen (12µM (**–**), 4,5 µM (····), 1,5 µM (- - -) und 1 µM (-·-·-) dargestellt. Die Daten der hierzu erstellten Fits sind in rot hervorgehoben. Es wurde eine Assoziationsrate von ($2{,}8 \cdot 10^3 \pm 0{,}86 \cdot 10^3$) $M^{-1}s^{-1}$ und eine Dissoziationsrate von ($3{,}6 \cdot 10^{-3} \pm 0{,}95 \cdot 10^{-3}$) s^{-1} erhalten. Hieraus ergab sich eine Dissoziationskonstante K_D von (1,3 ± 0,51) µM. Auf der Chipoberfläche waren 10,4 bzw. 3,0 ng/mm² (10.400 bzw. 3000 RU) 1D4-Antikörper und 8,0 bzw. 2,0 ng/mm² (8.000 bzw. 2.000 RU) Rh immobilisiert.

3.6.2. Lichtabhängigkeit der Interaktion zwischen Rac1 und Rhodopsin

Da für G_T bekannt ist, dass es in SPR-spektroskopischen Experimenten sowohl licht- als auch nukleotidabhängig an Rh bindet (Komolov *et al.*, 2006 und 2010), wurde als nächstes die Lichtabhängigkeit der Bindung von Rac1 getestet. Hierzu wurde 0,5 µM hRac1 zunächst an dunkel-adaptiertes Rh gebunden (Abb. 3-12, A, oben). Während der zweiten Injektion wurde Rh mit Hilfe eines Lasers (532 nm) für ca. 10 s belichtet (Abb. 3-12, A, Mitte).

Die beiden Sensorgramme unterscheiden sich nicht in ihrer Form und auch die Kinetiken der beiden Injektionen sind vergleichbar (Injektion 1: $k_a=2{,}99 \cdot 10^3\ M^{-1}s^{-1}$, $k_d=2{,}62 \cdot 10^{-3}s^{-1}$ vs. Injektion 2: $k_a=2{,}92 \cdot 10^3\ M^{-1}s^{-1}$, $k_d=2{,}70 \cdot 10^{-3}s^{-1}$). Dementsprechend scheint die Bindung von hRac1 an Rh nicht lichtabhängig zu sein. Zur Kontrolle der Aktivierbarkeit von Rh wurde das gleiche Experiment mit nativem G_T (0,8 µM) als Analyt durchgeführt (Abb. 3-12, A, unten). Hierbei zeigte G_T wie erwartet eine gesteigerte Bindung bei Belichtung, womit gezeigt wurde, dass der eingesetzte Versuchsaufbau generell für die Fragestellung geeignet war.

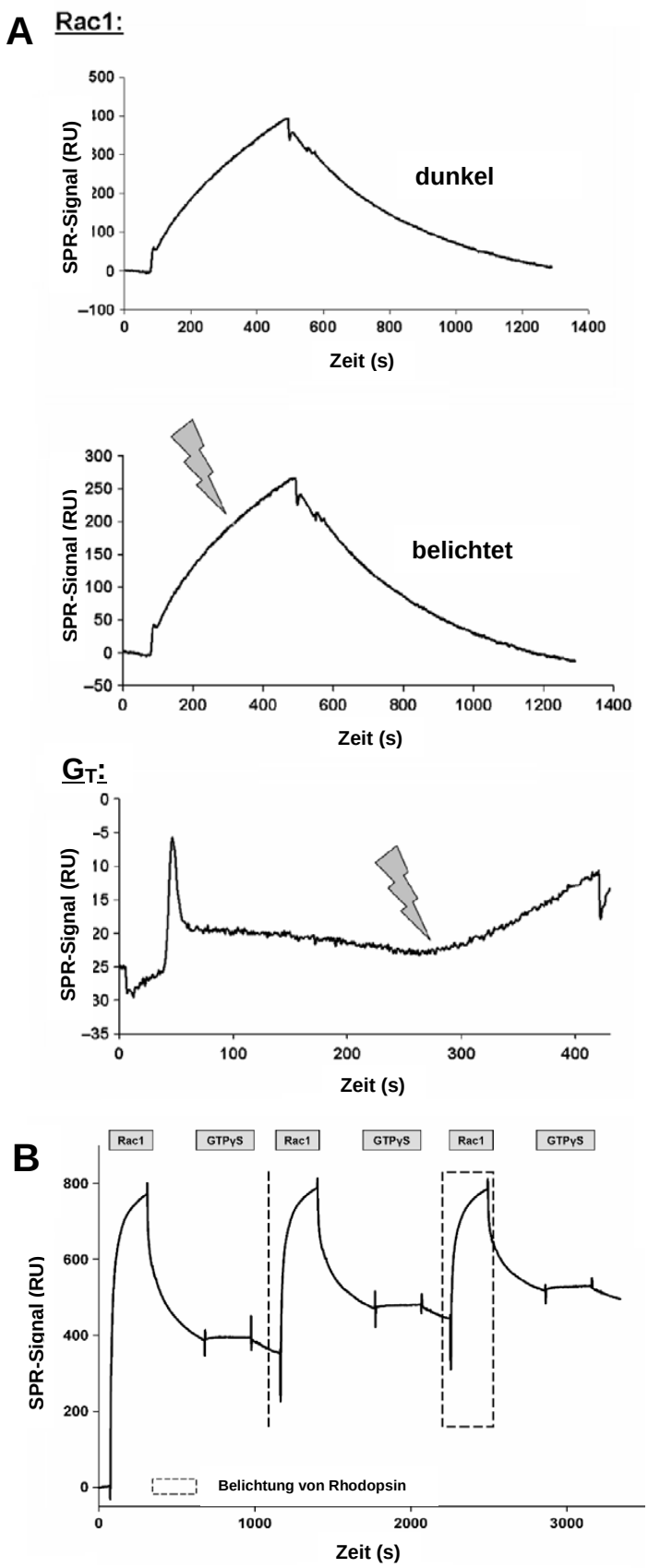


Abb. 3-13: Lichtabhängigkeit der Interaktion zwischen hRac1 und Rhodopsin. Die lichtabhängige Bindung von hRac1 an Rh wurde mittels SPR-Spektroskopie untersucht. Hierzu wurde natives, dunkel-adaptiertes Rh auf der Chipoberfläche mit Hilfe des 1D4-Antikörpers immobilisiert. Zusätzlich wurde Rh mit *9-cis*-Retinal regeneriert, um sicher-zustellen, dass es sich vollständig im inaktiven Dunkelzustand befand.
A: 0,5 µM hRac1 wurde über dunkel-adaptiertes (*oben*) oder belichtetes Rh (*Mitte*) injiziert. Zur Kontrolle der Aktivierbarkeit des Rh wurde G_T in einer Konzentration von 0,8 µM injiziert (*unten*). Auf der Chipoberfläche waren ca. 0,8 ng/mm² (800 RU) 1D4-Antikörper und ca. 3,4 ng/mm² (3.400 RU) Rh immobilisiert.
B: Es wurden ca. 2,3 ng/mm² (2.300 RU) 1D4-Antikörper immobilisert und daran ca. 5,2 ng/mm² (5.200 RU) dunkel-adaptiertes Rh gebunden. hRac1 wurde in einer Konzentration von 4,5 µM injiziert. Nach jeder hRac1-Injektion wurde 500 µM GTPγS injiziert. Rh wurde wie im Sensorgramm gekennzeichnet mit einem grünen Laser (532 nm) belichtet.

Zur Vergleichbarkeit wurden für die G_T-Injektion die gleichen zeitlichen Parameter gewählt wie für die hRac1-Injektionen. Die Injektionszeit reichte allerings nicht aus, um die Sättigung zu erreichen. Da die Bindekinetik von G_T an Rh jedoch bereits hinreichend untersucht wurde (Komolov *et al*., 2006 und 2010, Dell'Orco und Koch, 2011), war dies auch nicht Ziel dieses Experiments.

In einem weiteren Versuch sollte zusätzlich getestet werden, ob andere Belichtungszeitpunkte und -zeiten des Rh einen Unterschied bei der Bindung von hRac1 ergeben. Hierzu wurde erneut hRac1 (4,5 µM) zunächst an dunkel-adaptiertes Rh gebunden. Im Anschluss wurden zwei Injektionen über belichtetes Rh durchgeführt. Bei der ersten Injektion wurde das Rh vorher nur kurz (5-10 s) aktiviert. Bei der zweiten Injektion fand die Belichtung über die gesamte Injektionsdauer statt. Das Ergebnis ist in Abb. 3-12, B gezeigt. Wieder ließ sich bei allen drei Injektionen kein Unterschied in der Form des Sensorgramms erkennen und die Kinetik der Interaktion war ebenfalls die gleiche (Injektion 1: k_a=4,19·10^3 $M^{-1}s^{-1}$, k_d=8,89·$10^{-3}s^{-1}$ vs. Injektion 2: k_a=4,27·10^3 $M^{-1}s^{-1}$, k_d=9,00·$10^{-3}s^{-1}$ vs. Injektion 3: k_a=4,47·10^3 $M^{-1}s^{-1}$, k_d=8,67·$10^{-3}s^{-1}$). Des Weiteren sollte untersucht werden, ob hRac1 als G-Protein nukelotidabhängig von Rh dissoziiert. Hierfür wurde nach jeder Rac1-Injektion das schwer hydrolysierbare GTP-Analogon GTPγS (500 µM) injiziert. Dies führte jedoch zu keiner verstärkten Dissoziation von hRac1 von der Chipoberfläche (Abb. 3-12, B).

Zusammenfassend verlief die Bindung von hRac1 an Rh licht-unabhängig und das kleine G-Protein ließ sich durch GTPγS nicht eluieren.

3.6.3. Kompetition zwischen Rac1 und Transducin

Da der klassische Interaktionspartner des G-Protein-gekoppelten Rezeptors Rh nicht die monomere GTPase Rac1 sondern das heterotrimere G-Protein G_T ist, lag die Vermutung nahe, dass es möglicherweise eine Kompetition dieser beiden Proteine um Rh geben könnte. Diese Hypothese wurde in SPR-spektroskopischen Experimenten überprüft. Das Ergebnis ist in Abb. 3-13 dargestellt. Zunächst wurde 0,5 µM G_T injiziert und über dunkel-adaptiertes Rh gespült. Es ließ sich eine deutliche Bindung beobachten (Abb. 3-13, Sensorgramm A). Anschließend wurde das Rh mit 10 µM hRac1 gesättigt und danach eine weitere G_T-Injektion mit gleicher Konzentration wie der ersten durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass sich G_T nicht mehr auf der Oberfläche binden ließ (Abb. 3-13, Sensorgramm B). Der leichte Signalanstieg während der Injektion war auf eine Drift des Signals zurückzuführen, die bereits bei der ersten G_T-Injektion zu beobachten war (Abb. 3-13, Sensorgramm A). Um zu prüfen, ob hRac1 durch höhere G_T-Konzentrationen wieder verdrängt werden kann, wurde eine Reihe von G_T-Injektionen mit steigender Konzentration

durchgeführt (Abb. 3-13, Sensorgramm B-F). Da hRac1 langsam vom Rh dissoziierte (siehe auch 3.6.1), wurde zwischen den einzelnen G_T-Injektionen die Oberfläche immer wieder mit 10 µM hRac1 gesättigt. Bei Injektion der dreifachen G_T-Konzentration konnte wieder eine leichte Interaktion mit Rh erahnt werden (Abb. 3-13, Sensorgramm E). Erst nachdem 2,4 µM G_T injiziert wurden, war eine Bindung eindeutig zu erkennen. Diese war aber im Vergleich zur G_T-Injektion ohne die vorherige Bindung von hRac1 (Abb. 3-13, Sensorgramm A) immer noch deutlich schwächer (Abb. 3-13, Sensorgramm F).

Bereits im ersten Sensorgramm zeigte sich, dass G_T nach Bindung an dunkel-adaptiertes Rh nicht dissoziierte (Abb. 3-13, Injektion A). Dies ließ darauf schließen, dass der Rezeptor auf der Chipoberfläche gegebenenfalls nicht vollständig mit *9-cis* Retinal regeneriert wurde bzw. dass zumindest ein Teil des Rh nach dem Regenerationsprozess belichtet wurde. Dafür spricht auch die kinetische Auswertung der Dissoziation von G_T ohne vorherige hRac1-Injektion (Abb. 3-13, Injektion A). Das Dissoziationsverhalten von GTP-freiem G_T unterscheidet sich deutlich je nachdem, ob es an Rh, aktiviertes Rh (Rh*) oder nur an das Opsin gebunden hat (Dell'Orco und Koch, 2011). Von Rh dissoziert es deutlich schneller (k_d=(1,48±0,7)·$10^{-1}s^{-1}$)* als von Rh* (k_d=(4,7±1,5)·$10^{-4}s^{-1}$)* oder Opsin (k_d=(1,4±0,6)·$10^{-4}s^{-1}$)* *(Dell'Orco und Koch, 2011). Mit einer ermittelten Dissoziationsrate von 8,82·$10^{-4}s^{-1}$ für Injektion A (Abb. 3-13) entspricht dies also eher der Dissoziation von G_T von Opsin oder Rh*. Zusätzlich konnte das G-Protein nicht durch Injektion von GTPγS eluiert werden, was untypisch für die Bindung von G_T an Rh ist (Komolov *et al.*, 2006 und 2010). Des Weiteren konnte die erneute Bindung des G_T nach Sättigung mit hRac1 nicht jedes Mal reproduziert werden, d.h. die Datenlage ist nicht sehr robust. Aus diesen Gründen können die Ergebnisse nur als Tendenz und nicht als Bestätigung der Hypothese einer Kompetition zwischen G_T und Rac1 gesehen werden.

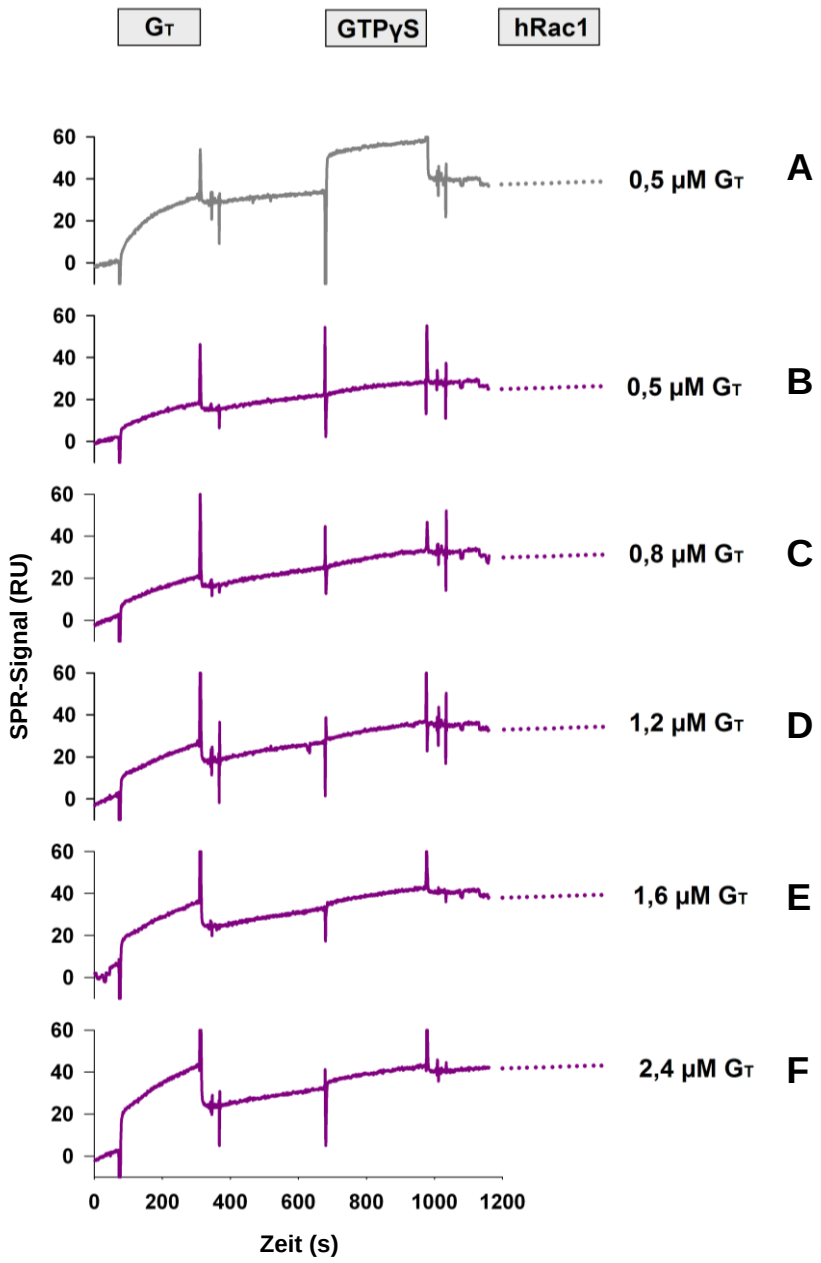


Abb. 3-13: Kompetition von Rac1 und Transducin. Die Kompetition von Rac1 und Transducin (G_T) wurde im SPR-spektrokopischen Experiment untersucht. Hierzu wurden wurden ca. 1,2 ng/mm² (ca. 1.200 RU) 1D4-Antikörper auf der Oberfläche eines CM5-Chips immobilisiert. Daran wurden ca. 3,7 ng/mm² (ca. 3.700 RU) natives dunkel-adaptiertes Rh gebunden. Natives G_T wurde in aufsteigender Konzentration injiziert (0,5-2,4 µM). Nach der ersten G_T-Injektion (A, grau), wurde die Oberfläche zwischen den folgenden G_T-Injektionen immer wieder mit 10 µM hRac1 abgesättigt.

3.7. Klonierung, heterologe Expression und Reinigung von hPAK1

3.7.1. Klonierung von hPAK1 in pET30a(+)

Zur Expression in *E. coli* wurde das Gen *hPAK1* in den Expressionsvektor pET30a(+) kloniert und zwar so, dass hPAK1 bei der Expression N-terminal mit einem Polyhistidin (His_6)-Tag versehen wurde. Zwischen Tag und Protein wurde für eine Schnittstelle der Enterokinase

codiert, d.h. der Tag ließ sich proteolytisch abdauen. Theoretisch enthält hPAK1 selbst keine Schnittstellen für diese Protease. In Abbildung 3-15 ist das Ergebnis einer Restriktionsanalyse zur Selektion positiver Klone gezeigt.

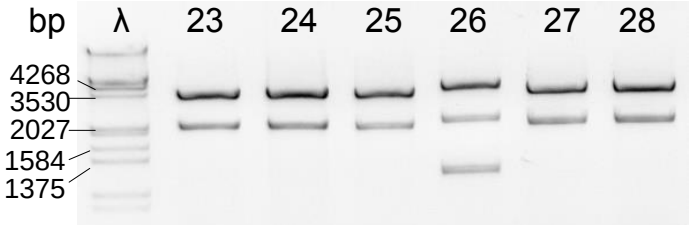


Abb. 3-14: Ergebnis einer Restriktionsanalyse. Zur Selektion positiver Klone des Zielplasmids pET30a(+) hPAK1 wurde die isolierte Plasmid-DNA mit *NotI* und *BglI* geschnitten. Die DNA-Fragmente wurden im 1%igen Agarosegel getrennt.

Beim Schneiden der Plasmid-DNA mit *NotI* und *BglI* waren für einen Vektor mit entsprechendem Insert in der korrekten Orientierung drei Fragmente der Größe 2136 bp, 1163 bp und 3711 bp zu erwarten. Bei der Restriktion des Leevektors ergaben sich lediglich zwei Fragmente (2032 bp und 3344 bp). Bei der Analyse von 32 Klonen war nur ein nach Bandenmuster positiver Klon zu erkennen (Klon #26, siehe Abb. 3-14). Dieser wurde zur Sequenzierung verschickt. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte, dass der Vektor das Gen in der richtigen Orientierung enthielt (siehe Anhang). Zusätzlich wurden zwei Punkmutationen an den Positionen 1201 und 1546 gefunden, welche zu den Aminosäureaustauschen G401S und L516I führten. Hierbei handelte es sich um Austausche, die bereits im ursprünglichen Klon (pCMV6M hPAK1 WT, der AG Biochemie zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. H.-G. Nothwang, Universität Oldenburg) enthalten waren (mündl. Mitteilung Dr. A. Scholten, Universität Oldenburg), weshalb der Klon #26 zur Expression von His_6-hPAK1 genutzt wurde.

3.7.2. Heterologe Expression von His_6-hPAK1

Das Plasmid pET30a(+) hPAK1 #26 (siehe auch 3.7.1) wurde in *E coli*-Zellen des Stamms Rosetta (DE3) pLysS transformiert und zunächst die Expressionsbedingungen ausgetestet. Die Transkription und somit letztendlich auch die Proteinsynthese wurde nach Erreichen der entsprechenden OD_{600} mit IPTG induziert und die Kulturen für maximal 72 h bei 25°C oder 30°C schüttelnd inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben genommen, die mittels SDS-PAGE analysiert wurden (Abb. 3-15).

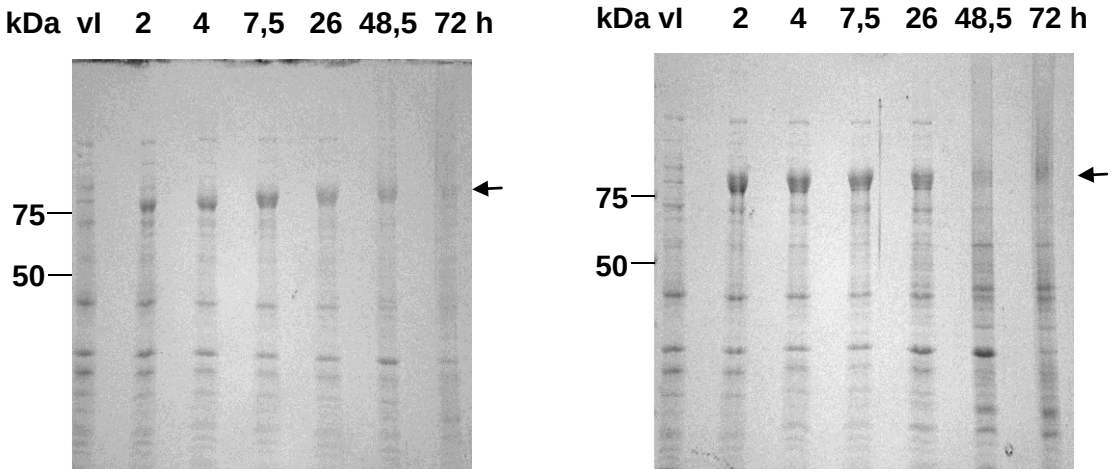


Abb. 3-15: Testexpression von His_6-hPAK1 in *E. coli*. E. *coli* Rosetta wurden mit pET30a(+) hPAK1 transformiert und die optimalen Expressionsbedingungen ausgetestet. Hierfür wurde bei 25°C (*links*) oder 30°C (*rechts*) für maximal 72 h inkubiert und in regelmäßigen Abständen Proben genommen. Diese wurden elektrophoretisch analysiert. Es zeigt sich bei beiden Temperaturen bereits nach 2 h eine Bande zwischen 75 kDa und 100 kDa, bei der es sich um His_6-hPAK1 handelte (*Pfeil*). Pro Spur wurden 5 µl Probe aufgetragen. *vI: vor Induktion*

Für beide Temperaturen zeigte sich bereits nach 2 h eine prominente Bande zwischen 75 kDa und 100 kDa, welche vor Induktion nicht zu beobachten war (Abb. 3-15, Spur vI und 2). Ein späterer Westernblot zeigte, dass es sich hierbei um His_6-hPAK1 handelte (siehe 3.7.3.1, Abb. 3-16). Bis zu einer Inkubationszeit von 26 h war in beiden Gelen eine deutliche Bande zu beobachten (Abb. 3-15), jedoch ohne erkennbaren Signalzuwachs. Demnach konnte durch längere Inkubationszeit der Expressionserfolg nicht nennenswert gesteigert werden. Nach 48,5 h bei 30°C und 72 h bei 25°C nahm die Expression ab und das synthetisierte Protein wurde vermutlich wieder abgebaut. Dementsprechend wurde His_6-hPAK1 für die folgenden Experimente bei 30°C und mit einer Inkubationszeit von 2-3 h exprimiert.

3.7.3. Reinigung von hPAK1

hPAK1 wurde mit einem N-terminalen His_6-Tag exprimiert. Dieser wurde zur Reinigung der Kinase mittels Affinitätschromatografie genutzt. Da sich der Tag theoretisch abdauen ließ, wurde hPAK1 sowohl mit als auch ohne Polyhistidin-Markierung gereinigt.

3.7.3.1. Reinigung mit His_6-Tag

Zur Reinigung von hPAK1 wurde der N-terminale His_6-Tag genutzt. Dieser bindet an Ni^{2+}-beladene NTA-Sepharose, wodurch sich das markierte Protein weitestgehend spezifisch aus dem Lysat fischen ließ. Die Elution fand mit 250 mM Imidazol statt. Zunächst wurde eine

Testreinigung im kleinen Maßstab mit einer Ni/NTA-Säule (Säulenvolumen ca. 1 ml) durchgeführt. Der Reinigungserfolg wurde im SDS-Gel geprüft (Abb. 3-16, links). Es zeigte sich, dass die im Lysat enthaltene Menge an His_6-hPAK1 die Kapazität der Säule deutlich überschritt, da im Durchfluss immer noch eine Bande auf entsprechender Höhe und mit nahezu gleicher Intensität zu beobachten war (Abb. 3-16, vgl. Spur I und D). Der Hauptteil des gebundenen His_6-hPAK1 eluierte bereits in den ersten beiden Fraktionen von der Säule, war jedoch auch nach insgesamt 6 ml Elutionspuffer noch in geringen Mengen detektierbar (Abb. 3-16, Spur 1-6). Beim Auftrag einer größeren Proteinmenge, zeigten sich noch deutliche Verunreinigungen unterhalb von 50 kDa und zwischen 37 und 25 kDa (Abb. 3-16, links, Spur 1 und 2). Dass es sich bei der Bande knapp unter 100 kDa um His_6-hPAK1 handelte, wurde mittels Westernblot eindeutig nachgewiesen (Abb. 3-16, rechts). Der Blot zeigte außerdem, dass die Kinase nach Aufschluss der Zellen vollständig löslich blieb, da in der unlöslichen Fraktion trotz starkem Hintergrund auf entsprechender Höhe kein Signal zu erkennen war (Abb. 3-16, rechts, Spur P)

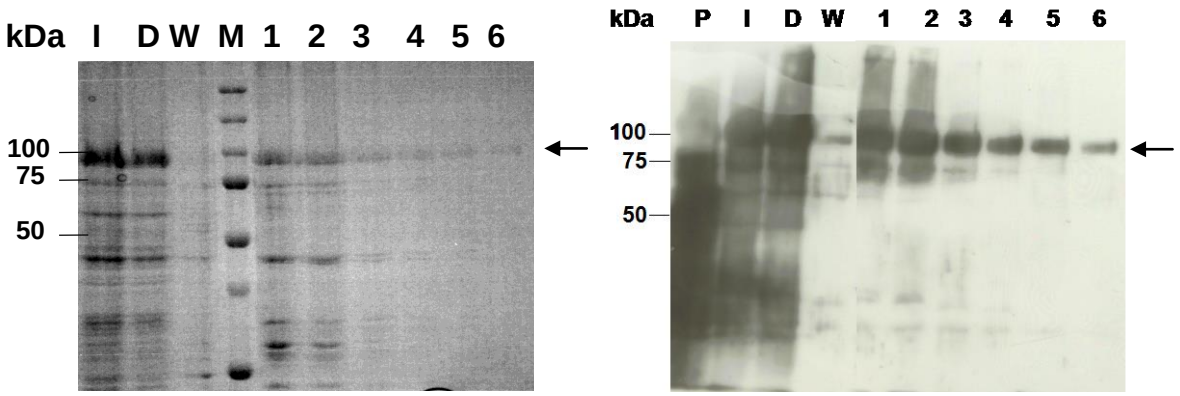


Abb. 3-16: Testreinigung von His_6-hPAK1. Die Reinigung von His_6-hPAK1 wurde zunächst mit einer Ni-Sepharose-Säule in kleinem Maßstab getestet. Der Reinigungserfolg wurde im 10%igen SDS-Gel (*links*) und im Westernblot (*rechts*) untersucht. Die His_6-hPAK1-Bande ist mit einem Pfeil markiert. Pro Spur wurden 5 µl Probe aufgetragen. *P: Pellet nach Aufschluss, I: Input, D: Durchfluss, W: Waschfraktion, 1-6: Elutionsfraktionen 1-6, M: Proteinmarker*

Im größeren Maßstab wurde His_6-hPAK1 über mehrere HisTrap-Säulen (Säulenvolumen je 1 ml) an der FPLC-Anlage gereinigt. Ein exemplarisches Chromatogramm und Reinigungsgel einer Säule sind in Abb. 3-17 gezeigt.

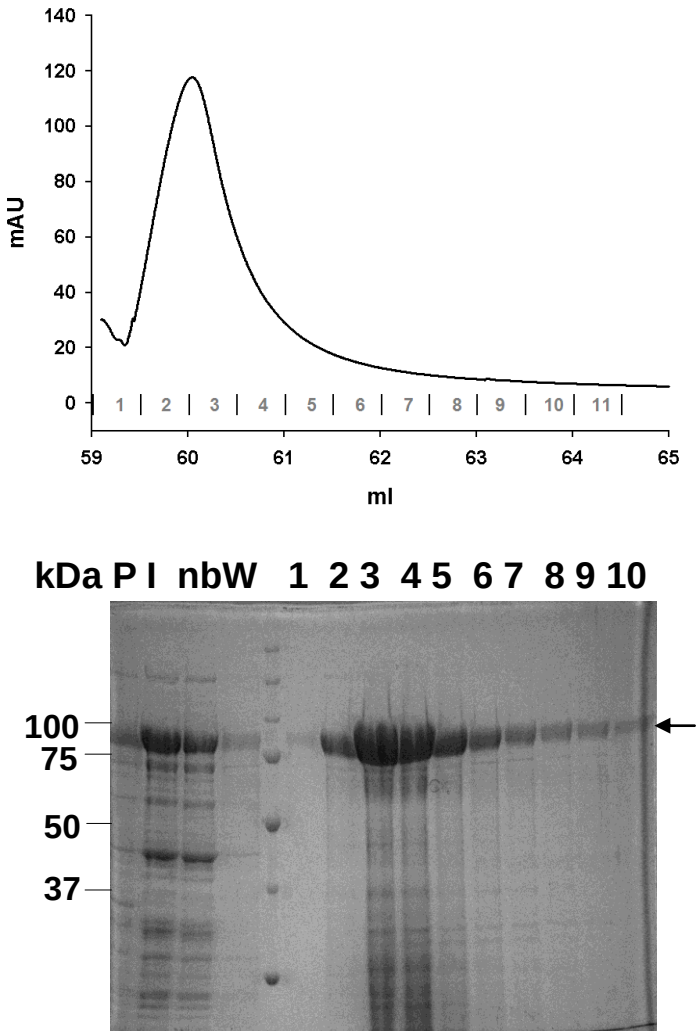


Abb. 3-17: Chromatografische Reinigung von His_6-hPAK1. His_6-hPAK1 wurde an der FPLC-Anlage mit einer HisTrap-Säule gereinigt. Im Chromatogramm (*oben*) war bei der Elution ein klarer Peak zu erkennen, der sich von Fraktion 15-18 zog. Die bei der Reinigung genommenen Proben wurden im SDS-Gel (10%) analysiert (*unten*). Die His_6-hPAK1-Bande ist mit einem Pfeil markiert. Für die Probe P wurden 5 µl für alle weiteren Proben 9 µl aufgetragen. *P: Pellet nach Aufschluss, I: Input, nb: Durchfluss, W: Waschfraktion, 1-10: Elutionsfraktion 1-10*

Wie bereits bei der Reinigung im kleineren Maßstab (siehe oben) zeigte sich auch hier, dass das exprimierte Protein nicht vollständig an die Säulen gebunden hatte, obwohl das doppelte bis fünffache Säulenvolumen eingesetzt wurde (Abb. 3-17, unten, Spur I und nb). Anders als bei der Testreinigung waren hier im unlöslichen Teil der Zellen und in der Waschfraktion vom Waschen der Säule im Coomassie-Gel schwache Signale auf der Höhe von His_6-hPAK1 zu erkennen (Abb. 3-17, rechts, Spur P und W). Bei der Elution zeigte sich im Chromatogramm ein klarer Peak (Abb. 3-17, oben), der sich von Fraktion 15-18 zog. Im Coomassie-Gel sind dies übereinstimmend die Fraktionen mit den stärksten Signalen. Die in der Testreinigung beobachteten Verunreinigungen hatten sich relativ zur aufgetragenen Menge His_6-hPAK1 stark reduziert, sodass auf weitere Reinigungsschritte verzichtet wurde.

3.7.3.2. Reinigung ohne His_6-Tag

Um auszuschließen, dass der His_6-Tag die Aktivität von hPAK1 in nachfolgenden Experimenten beeinflusst, wurde versucht diesen proteolytisch zu entfernen. Der Verdau wurde zunächst im kleinen Maßstab getestet. Hierbei wurde hPAK1 im Batch-Verfahren über den His_6-Tag an Ni/NTA-Sepharose gebunden und nicht mit Imdidazol eluiert, sondern durch Inkubation mit der Enterokinase wieder von dem Säulenmaterial geschnitten. Um die optimalen Bedingungen hierfür zu bestimmen, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten eine Probe des Überstands genommen. Das Ergebnis der Zeitreihe wurde im SDS-Gel analysiert (Abb. 3-18). Bereits nach 30 min Inkubationszeit ließen sich vier Banden zwischen ca. 50 kDa und 75 kDa erkennen (Abb. 3-18, Spur 30'). Da diese mit längerer Inkubationszeit in ihrer Menge zunahmen, war davon auszugehen, dass es sich hierbei um hPAK1-Fragmente handelte, obwohl lediglich eine Schnittstelle für die Enterokinase zwischen Protein und His_6-Tag eingeführt wurde und hPAK1 durch sie theoretisch nicht verdaut werden sollte. Dennoch zeigt sich wie erwartet ein Laufunterschied zwischen der His_6-hPAK1-Bande und der größten Fragmentbande nach Verdau (Abb. 3-18, vgl. Spur I und z.B. Spur 4h). Dies spricht dafür, dass der Tag durch die Enterokinase entfernt wurde, da diese ca. 0,7 kDa kleiner ist und eine reduzierte positive Ladung hat.

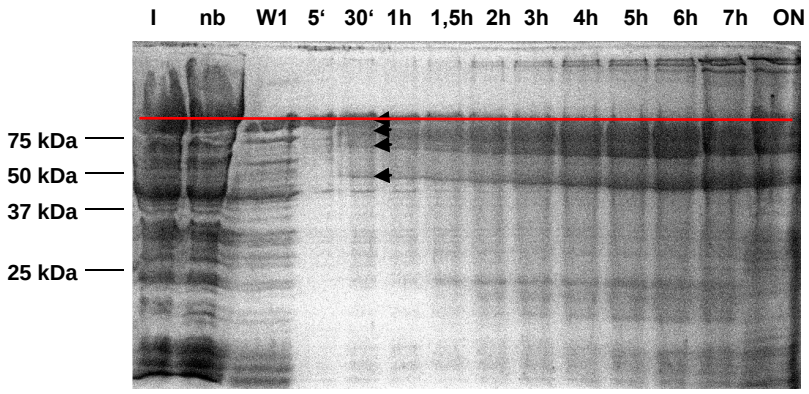


Abb. 3-18: Testverdau zur Entfernung des His_6-Tags. hPAK1 wurde im Batch-Verfahren über den His_6-Tag an Ni/NTA-Sepharose gebunden und mit Hilfe der Enterokinase wieder runter geschnitten. Um die optimalen Bedingungen für den Verdau zu bestimmen, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten das Säulenmaterial sedimentiert und eine Probe des Überstands genommen. Das Ergebnis der Zeitreihe wurde elektrophoretisch analysiert (Gel 10%). Bereits nach 30 min sind mindestens vier Fragmente zwischen ca. 50 kDa und 75 kDa zu erkennen (*Pfeile*). Die Laufhöhe von His_6-hPAK1 ist durch eine rote Linie markiert. Pro Spur wurden 14 µl Probe aufgetragen. *I: Input, nb: non-bound, W1: Waschfraktion 1, ON: über Nacht*

Die Reinigung im größeren Maßstab wurde mit HisTrap-Säulen an der FPLC-Anlage durchgeführt. Um den Tag zu entfernen wurde die Inkubation mit der Enterokinase ü.N. gewählt. hPAK1 wurde anschließend in 2x hPAK1-Puffer (siehe 2.2.12.2) eluiert. Das Ergebnis wurde elektrophoretisch geprüft (Abb. 3-19). Das Protein eluierte fast vollständig in

den ersten drei Fraktionen (entspricht 3 ml). Wie beim Testverdau waren vier Banden zwischen 50 kDa und 75 kDa zu erkennen, alle mit einer höheren elektrophoretischen Mobilität als His_6-hPAK1 (Abb. 3-19).

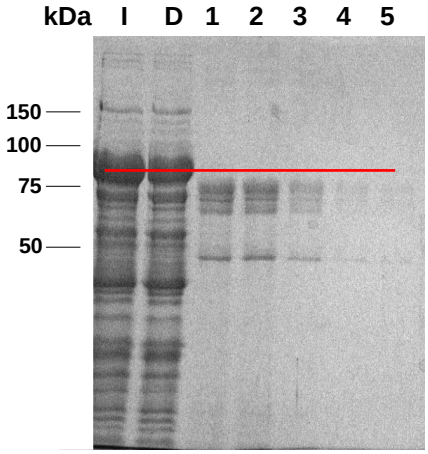


Abb. 3-19: Reinigung von hPAK1. Bei der Reinigung im größeren Maßstab wurde His_6-hPAK1 an eine HisTrap-Säule gebunden und anschließend mit der Enterokinase direkt von der Säule geschnitten. Das abgedaute Protein wurde in 2x hPAK1-Puffer von der Säule eluiert. Der Reinigungserfolg wurde mittels SDS-PAGE (Gel 10%) geprüft. Die Laufhöhe von His_6-hPAK1 ist durch eine rote Linie markiert. Pro Spur wurden 7 µl Probe aufgetragen. *I: Input, D: Durchfluss, 1-5: Elutionsfraktion 1-5*

Um die Enterokinase zu entfernen und gleichzeitig die entstandenen Produkte weiter zu trennen, wurde eine Größenausschlusschromatografie (*size exclusion chromatografy,* SEC) durchgeführt. Hierzu wurde die Superdex 200 10/300 mit einem Säulenvolumen von 25 ml genutzt. Das Chromatogramm und das Reinigungsgel sind in Abb. 3-20 (A und B) gezeigt. Nach Injektion auf die Säule, war die erste Elution von Protein nach ca. 9 ml (Fraktion 9) zu beobachten. Diese zog sich über ca. 8,5 ml bis Fraktion 25 (Gesamtvolumen, dass über die Säule geflossen war: 17,5 ml). D.h. es war ein recht breit gezogener Peak zu erkennen (Abb. 3-20, A), was schon darauf hindeutete, dass keine tatsächliche Trennung stattgefunden hatte.

Als Enterokinase wurde lediglich die enzymatisch aktive leichte Kette des Proteins eingesetzt. Diese hat eine Größe von 28 kDa und sollte relativ zu den hPAK1-Fragmenten erst deutlich später von der Säule eluieren. Allerdings ließ sich nach Fraktion 25 kein eindeutiger Peak mehr erkennen. Das lag vermutlich daran, dass nur sehr wenig Protease eingesetzt wurde (ca. 400-700 ng/Säule), sodass die Menge vermutlich unterhalb der Detektionsgrenze für diesen Versuchsaufbau lag.

Der Erfolg der Fragmenttrennung wurde mittels SDS-PAGE untersucht (Abb. 3-20, B). Wie nach Beurteilung des Chromatogramms vermutet, bestätigte sich, dass die Fragmente nicht weiter getrennt wurden. Selbst die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen war ab Fraktion 11 bis mindestens Fraktion 21 nahezu gleich bleibend. Anschließend wurde im

Westernblot bestätigt, dass es sich bei den erhaltenen Proteolyseprodukten tatsächlich um hPAK1 bzw. Fragmente der Kinase handelte (Abb. 3-20, C). Im Vergleich mit dem His_6-markiertem Protein zeigte sich allerdings durch den deutlichen Laufunterschied auch, dass zumindest der Tag vollständig entfernt wurde. Bei den Signalen oberhalb von 100 kDa handelt es sich vermutlich um hPAK1-Aggegregate.

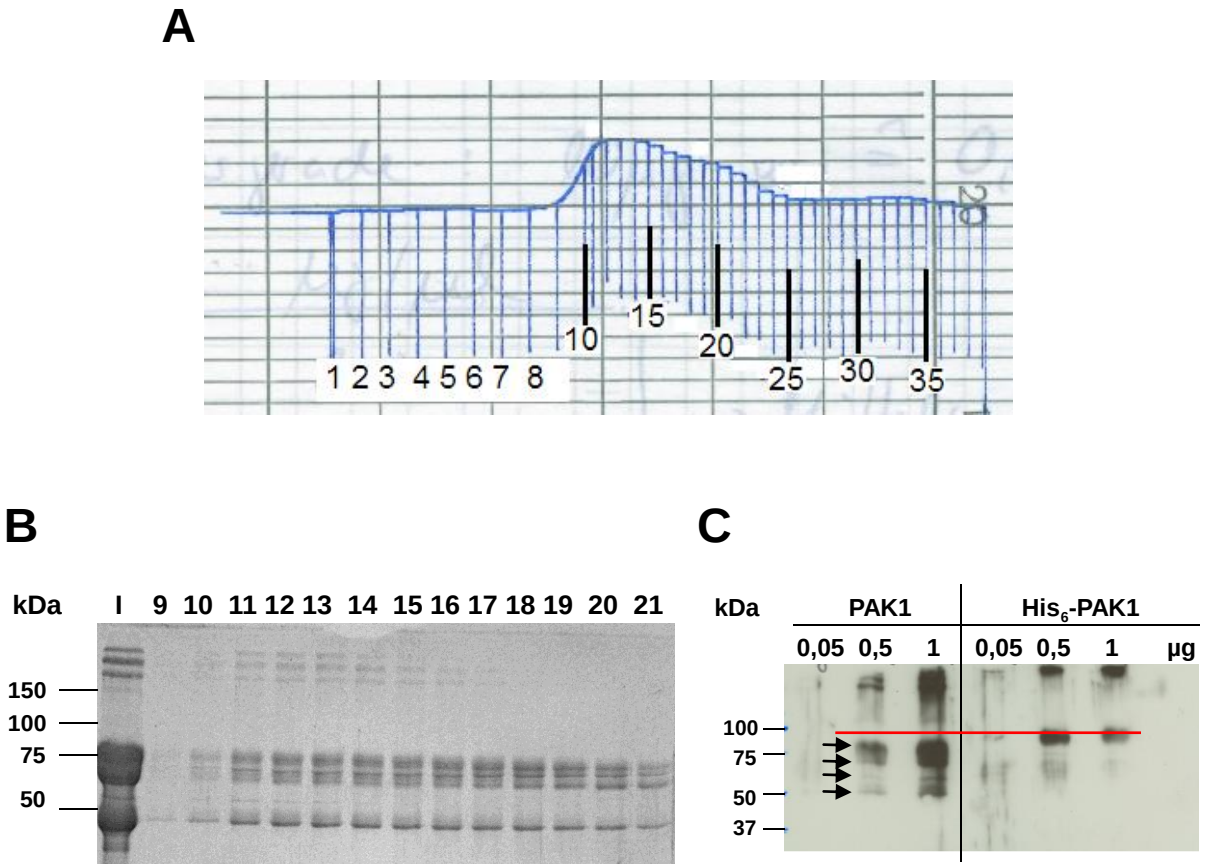


Abb. 3-20: Größenausschlusschromatografie zur weiteren Reinigung von hPAK1. Um die Enterokinase zu entfernen und die beim Verdau entstandenen Fragmente gegebenenfalls weiter zu trennen, wurde eine Größenausschlusschromatografie (SEC) durchgeführt (A). Verschiedene Fraktionen wurden in der SDS-PAGE (Gel 10%) analysiert. Pro Spur wurden 7 µl Probe aufgetragen (B). Zusätzlich wurde im Westernblot gezeigt, dass der His_6-Tag entfernt wurde und es sich bei den zusätzlichen Banden um hPAK1-Fragmente handelt (*Pfeile*). (C). Die Laufhöhe von His_6-hPAK1 ist durch eine rote Linie markiert.

Weiterhin wurde versucht die Fragmente mittels Anionenaustauschchromatografie zu trennen. Hierbei wurden drei verschiedene Säulen ausgetestet. Bei keiner war ein Erfolg zu verzeichnen (siehe Anhang). Da hPAK1 mit einem isoelektrischen Punkt (pI) von 5,55 (ohne Phosphorylierungen) ein eher saures, also anionisches Protein ist, wurde der Kationenaustauscher bei der Trennung der Proteolyseprodukte nicht in Betracht gezogen.

3.8. Dimerisierung von rekombinantem His_6-hPAK1

Inaktive PAKs bilden Homodimere und inhibieren sich so gegenseitig (*trans*-autoinhibitorischer Zustand). Erst ein aktivierender Stimulus führt zur Autophosphorylierung und anschließend zur Dissoziation der beiden PAK-Moleküle (siehe 1.2.2). Um zu prüfen, ob das heterolog exprimierte His_6-hPAK1 sich ebenfalls zu Dimeren zusammenlagert, sollte die Molmasse des Proteins unter nicht-denaturierenden Bedingungen ermittelt werden. Hierfür wurde zunächst die Methode der nativen Gelelektrophorese genutzt.
Die elektrophoretische Mobilität von His_6-hPAK1 sollte in 7%igen, 8%igen und 10%igen Polyacrylamidgelen bestimmt werden. Mit BSA als Referenz hätte die Molmasse aus einem Ferguson-Plot (siehe 2.2.16.1) ermittelt werden können. Ein exemplarisches Gel ist in Abb. 3-21 gezeigt.

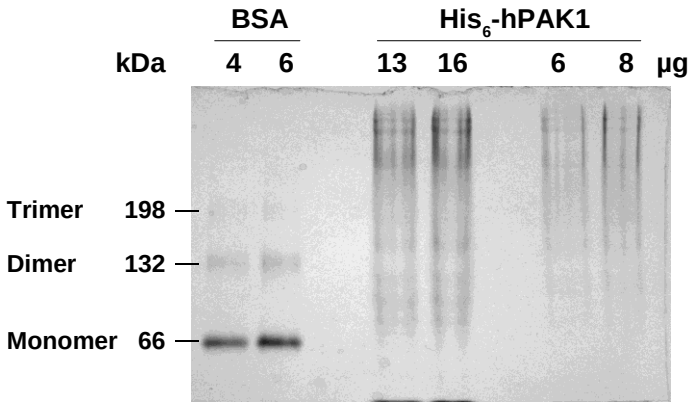


Abb. 3-21: Native PAGE zur Größenbestimmung von His_6-hPAK1. Um die Molmasse von His_6-hPAK1 zu bestimmen und so festzustellen, ob die Kinase als Dimer vorliegt, wurde eine native PAGE mit einem 7%igen, 9%igen und 10%igen Gel durchgeführt. Exemplarisch ist ein 7%iges Gel gezeigt.

Leider waren für His_6-hPAK1 im Polyacrylamidgel keine eindeutigen und scharfen Banden, sondern lediglich nur ein undeutlicher Schmier zu erkennen. Jene Banden, die sich beobachten ließen, waren für die aufgetragene Proteinmenge eindeutig zu schwach (Abb. 3-21, vgl. Spuren BSA mit Spuren His_6-hPAK1). Um auszuschließen, dass die Proteinkonzentration der Reinigung gegebenenfalls fehlerhaft bestimmt wurde, wurde His_6-hPAK1 erneut gereinigt und die Proteinkonzentration mehrfach ermittelt. Hierbei waren nur geringe Schwankungen im Ergebnis zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde das Laufverhalten von frisch gereinigtem Protein, das noch nicht eingefroren war, mit bereits bei -80°C-gelagertem His_6-hPAK1 verglichen. Auch hier war kein Unterschied festzustellen (Daten nicht gezeigt), sodass ausgeschlossen werden konnte, dass eine Beschädigung der Kinase durch die Lagerung bei niedrigen Temperaturen Ursache für das zu beobachtende Resultat war.

Da die native PAGE zur Bestimmung der Molmasse nicht genutzt werden konnte, wurde eine weitere Methode, nämlich die analytische SEC, ausgetestet. Hierbei wurde die Retentionszeit von Referenzproteinen im entsprechenden kDa-Bereich bestimmt und eine Kalibriergerade erstellt, anhand derer die Molmasse von His_6-hPAK1 ermittelt werden sollte. Die eingesetzten Referenzproteine sind der Tab. 2-21 (siehe 2.2.16.2) zu entnehmen. Zunächst wurde an einer HPLC-Anlage mit der Bio-Sept SEC2000-Säule gearbeitet. Hierbei zeigte sich, dass das Auflösungsvermögen der Säule anscheinend nicht für den entsprechenden Größenbereich ausreichend war, obwohl laut Hersteller eine gute Trennung bis 200 kDa möglich sein sollte. Die Kalibriergerade ist in Abb. 3-22 (rechts) dargestellt.

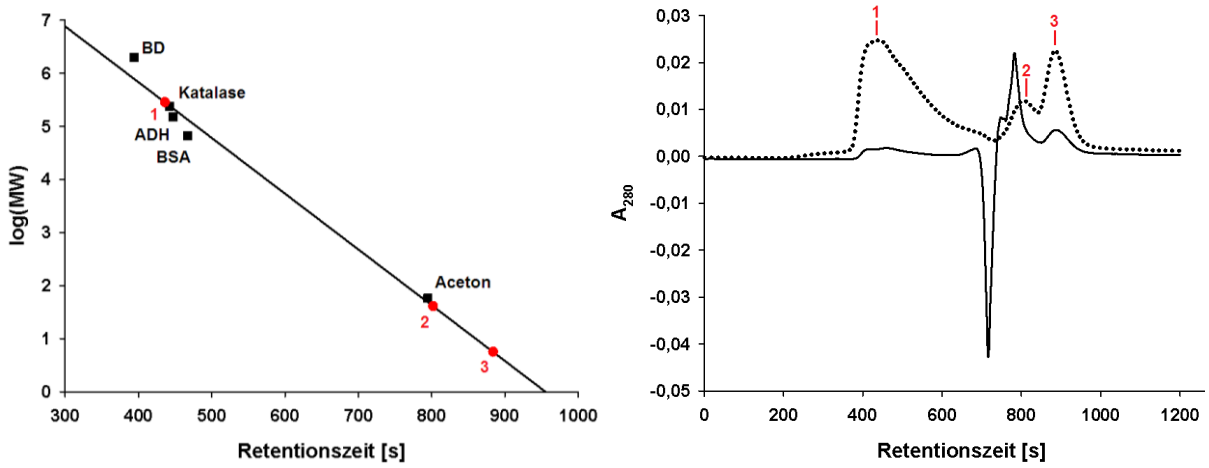


Abb. 3-22: Analytische SEC zur Größenbestimmung von His_6-hPAK1. Die Dimerisierung von His_6-hPAK1 wurde mittels analytischer SEC mit der Säule Bio-Sept SEC 2000 überprüft. Hierzu wurde die Retentionszeit von Referenzproteinen ermittelt und eine Kalibriergerade erstellt, anhand derer die Molmasse von His_6-hPAK1 bestimmt werden kann (*rechts*). Ausgewertete Peaks sind in den Chromatogrammen der His_6-hPAK1-Injektionen (*links*) nummeriert und in der Kalibriergerade eingezeichnet (rot). ── *His_6-hPAK1 dialysiert,* ··· *His_6-hPAK1 nicht dialysiert*

Es zeigte sich, dass die Katalase (240 kDa), ADH (150 kDa) und BSA (66 kDa) kurz nacheinander eluierten, obwohl zwischen den Proteinen jeweils ca. 90 kDa lagen. In den Chromatogrammen der His_6-hPAK1-Injektionen waren mehrere Peaks zu erkennen, sodass sich kein eindeutiger Protein-Peak identifizieren ließ (Abb. 3-22, rechts). Zusätzlich waren die Signale insgesamt eher schwach: so war bei einer His_6-hPAK1-Injektion (110 µg) ein maximaler Ausschlag von 0,025 zu erkennen, für die Referenzproteine allerdings ergab das maximale Signal bei einer Proteinmenge von 50 µg in der Regel. eine Extinktion von ca. 0,2, d.h. um den Faktor 10 höher. Da diese Methode für die Fragestellung scheinbar ungeeignet war, wurde zu einer anderen Säule gewechselt und zwar zur Superdex 200 10/300, welche an einer FPLC-Anlage eingesetzt werden musste. Hiervon wurde sich eine bessere Auftrennung im relevanten kDa-Bereich versprochen. Dies war auch der Fall: statt innerhalb von 25 s wie bei der Bio-Sept SEC2000, eluierten Katalase, ADH und BSA nun innerhalb

von 5 min (siehe Anhang). Dennoch waren die Chromatogramme für His_6-hPAK1 immer noch uneindeutig (Daten nicht gezeigt). Die Signale waren erneut sehr klein (maximaler Ausschlag von 1 mAU), obwohl zum Teil die vollständige Ausbeute einer His_6-hPAK1-Reinigung injiziert wurde. Dies hat zur Konsequenz, dass, falls Protein-Peaks vorhanden waren, sie durch das Hintergrundrauschen überdeckt wurden. Möglich ist, dass His_6-hPAK1 auf der Säule präzipitierte und deswegen nicht im Eluat zu detektieren war.
Zusammenfassend ließ sich durch angewandte Methoden keine Aussage bezüglich der Dimerisierung des rekombinanten His_6-hPAK1 erzielen.

3.9. Lokalisation von PAK1 in der bovinen Retina

Zur Umsetzung des Rac1/PAK1/GC/cGMP-Signalwegs in den Photorezeptorzellen ist es notwendig, dass PAK1 dort auch lokalisiert ist. Um die Verteilung der Kinase in dem Gewebe zu untersuchen, wurden Kryogewebeschnitte von Rindernetzhäuten hergestellt und diese immunhistochemisch gegen PAK1 gefärbt (siehe Abb. 3-23, links).

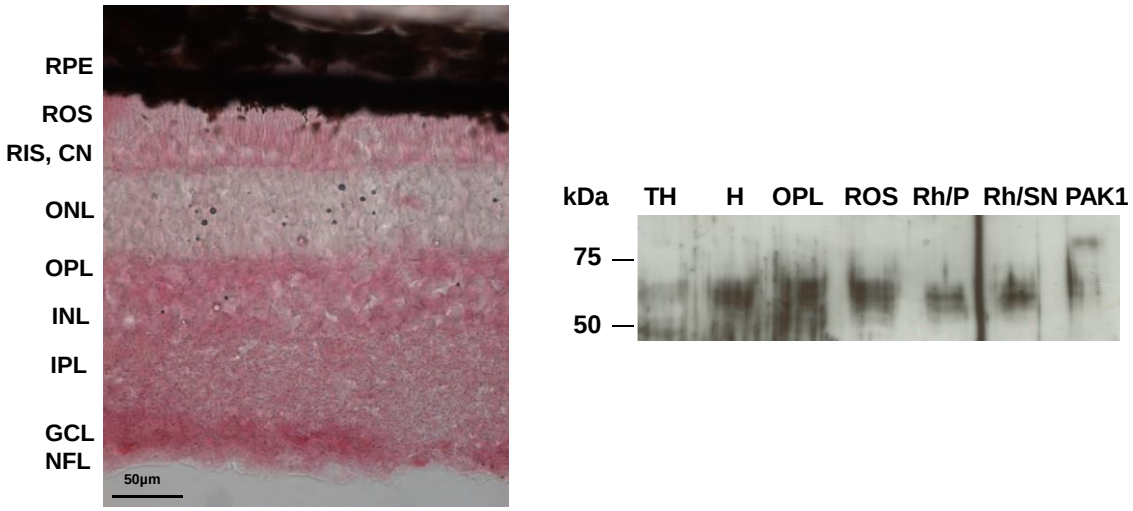


Abb. 3-23: Lokalisation von PAK1 in der bovinen Retina. ***Links:*** Kryogewebeschnitte von belichteten bovinen Retinen wurden immunhistochemisch gegen PAK1 gefärbt. *RPE: retinales Pigmentepithel, ROS: Stäbchenaußensegmente, RIS: Stäbcheninnensegmente, CN: Zapfen, ONL: äußere nukleäre Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere nukleäre Schicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht, NFL: Nervenfaserschicht;* ***Rechts*****:** Um die Anwesenheit von PAK1 in den Stäbchenaußensegmenten zu bestätigen, wurde ein Westernblot mit verschiedenen retinalen Fraktionen angefertigt. Es wurden 20 µg Gesamtprotein pro Probe aufgetragen. *TH: Totalhomogenat inkl. ROS, H: Homogenat ohne ROS, OPL: äußere plexiforme Schicht, ROS: Stäbchenaußensegmente, Rh: ROS-Solubilisat mit CHAPS (P: Pellet, SN: Überstand), PAK1: 0,3 µg rekombinantes hPAK1*

Es ließ sich eindeutig ein Signal in der gesamten Retina mit Ausnahme der äußeren nukleären Schicht (*outer nuclear layer*, ONL) erkennen. Ob die Stäbchenaußensegmente

ebenfalls PAK1 enthalten, war nicht ganz eindeutig, da diese Zellabschnitte durch das Pigmentepithel verdeckt wurden. Ohne Pigmentepithel, waren die Außensegmente zum Teil stark beschädigt, sodass in diesem Fall ein Signal eine falsch positive Reaktion bzw. kein Signal ein falsch negatives Ergebnis hätte bedeuten können. Aus diesem Grund wurde im Westernblot die Anwesenheit von PAK1 in verschiedenen retinalen Präparationen getestet (Abb. 3-23, rechts). Hierbei wurde die Kinase in Retinahomogenaten mit und ohne ROS, in der äußeren plexiformen Schicht und in isolierten ROS detektiert.

3.10. Aktivität von (His_6-)hPAK1

Ob das heterolog exprimierte (His_6-) hPAK1 aktiv war oder nicht wurde im Kinaseaktivitätsassay mit radioaktiv markiertem [γ-^{32}P]ATP und der konstitutiven Rac1-Mutante hRac1(G12V) getestet. Des Weiteren wurde untersucht, ob His_6-hPAK1 Proteine der löslichen oder unlöslichen ROS-Fraktionen phosphoryliert.

3.10.1. Generelle Aktivität des rekombinanten Proteins

Um zu prüfen, ob His_6-hPAK1 aktivierbar ist oder nicht wurde die Kinase mit MBP als unspezifischem Kinasesubstrat und hRac1(G12V) als PAK-Aktivator inkubiert. Die Proben wurden im SDS-Gel getrennt und anschließend ein Autoradiogramm erstellt (Abb. 3-24).
Es ließen sich vier Banden bei ca. 100 kDa, ca. 50 kDa, ca. 37 kDa und ca. 20 kDa erkennen (Abb. 3-24). Aus einem Vergleich mit dem rekombinanten nicht-radioaktiv markierten Protein ging hervor, dass es sich bei dem Signal um 100 kDa um autophosphoryliertes His_6-hPAK1 handelte. Die anderen drei Signale wurden durch phosphoryliertes MBP erzeugt. MBP hat die Eigenschaft pH-abhängig zwischen pH 7,4-9,0 zu oligomersieren, demnach handelte es sich bei den anderen Signalen um das phosphorylierte MBP-Monomer (18,4 kDa), MBP-Dimer (36,8 kDa) und MBP-Trimer (55,2 kDa). Das Ergebnis war unabhängig von der Anwesenheit von hRac1(G12V), d.h. His_6-hPAK1 war ohne einen Aktivator in der Lage sich selbst und MBP zu phosphorylieren. Es zeigte also eine konstitutive Aktivität. Um auszuschließen, dass dieser Effekt durch den His_6-Tag erzeugt wurde, wurde ebenfalls die Kinase ohne Tag getestet. Auch hPAK1 zeigte eine konstitutive Aktivität unabhängig von hRac1(G12V) (Abb. 3-24). Zusätzlich war zu beobachten, dass alle bei der Entfernung des His_6-Tags entstandenen hPAK1-Fragmente autophosphoryliert wurden (Abb. 3-24). Bei Abwesenheit von (His_6)-hPAK1 war entsprechend der Erwartungen kein Signal, also keine Phosphorylierung zu beobachten (Abb. 3-24).

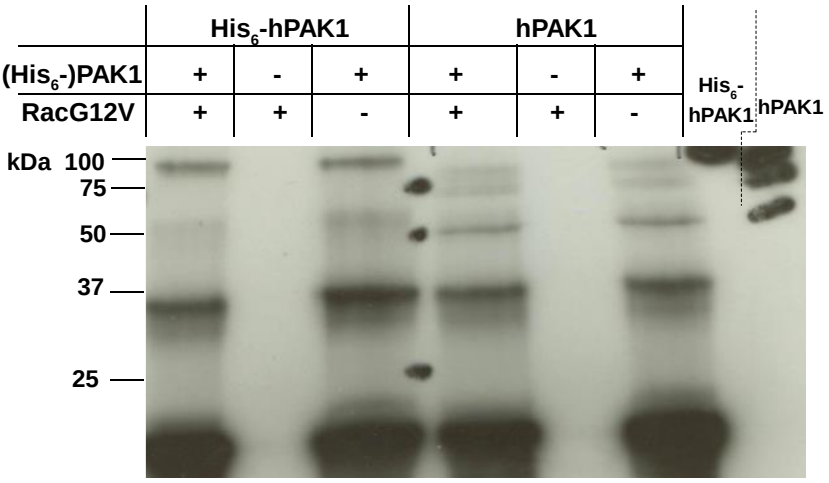


Abb. 3-24: Test der generellen Aktivität von (His_6-) hPAK1. Autoradiogramm eines Kinaseaktivitätsassays zum Test der generellen Aktivität des rekombinanten hPAK1 mit und ohne His_6-Tag. Als unspezifisches Kinasesubstrat wurde das Myelin basische Protein (MBP) eingesetzt. Die Aktivität wurde in An- oder Abwesenheit der konstitutiv aktiven Mutante hRac1(G12V) (RacG12V) getestet. Des Weiteren wurden die nicht-radioaktiv markierten Kinasen His_6-hPAK1 und hPAK1 (je 5 µg) mit auf das Polyacrylamidgel (10%) aufgetragen und vor Belichtung des ECL-Films mit eine phosphoreszierenden Substanz markiert, sodass sie ebenfalls auf dem Autoradiogramm sichtbar waren (Spuren ganz rechts).

3.10.2. Phosphorylierung von ROS-Proteinen

Da der Effekt von PAK1 auf ROS-Proteine bisher unbekannt ist, wurde dies in dieser Arbeit untersucht. Um putative Substrate schneller identifizieren zu können, wurden lösliche und unlösliche ROS-Proteine getrennt und separat voneinander im Kinaseaktivitätsassay mit His_6-hPAK1 zusammengebracht.

3.10.2.1. Lösliche ROS-Proteine

Die löslichen ROS-Proteine wurden in hypotonischem Puffer durch Zentrifugation von den Membranproteinen getrennt und separat als Substrat im Kinaseaktivitätsassay eingesetzt. Wie in Abb. 3-25 gezeigt, war His_6-hPAK1 in Anwesenheit von löslichen ROS-Proteinen aktiv, was sich an der Autophosphorylierung von His_6-hPAK1 erkennen ließ (Abb. 3-25). Weiterhin war diese Aktivität, wie bereits beobachtet (siehe 3.10.1), unabhängig von einem aktivierenden Stimulus (hier: Zugabe der konstitutiv aktiven hRac1-Mutante hRac1(G12V)). Es konnte kein zusätzliches Signal oder eine Intensitätszunahme eines auch in Abwesenheit von His_6-hPAK1 sichtbaren Signals ausgemacht werden, sodass davon auszugehen war, dass His_6-hPAK1 unter den löslichen ROS-Proteinen kein Substrat hat. Ein interessanter Effekt war jedoch, dass sich in Anwesenheit der löslichen ROS-Proteine die elektrophoretische Mobilität von His_6-hPAK1 änderte. Lief His_6-hPAK1 im Kontrollansatz mit MBP als Substrat zwischen 100 kDa und 75 kDa, so war bei Inkubation mit den ROS-Proteinen eine Bande auf der Höhe von 75 kDa zu detektieren. Das Protein war also

schneller, demnach kompakter geworden oder die Ladung hatte sich verändert. Die Beobachtung der erhöhten elektrophoretischen Mobilität wurde durch ein nicht-radioaktives Coomassie-Gel (Abb. 3-26, rechts) und im Westernblot bestätigt (Abb. 3-26, links).

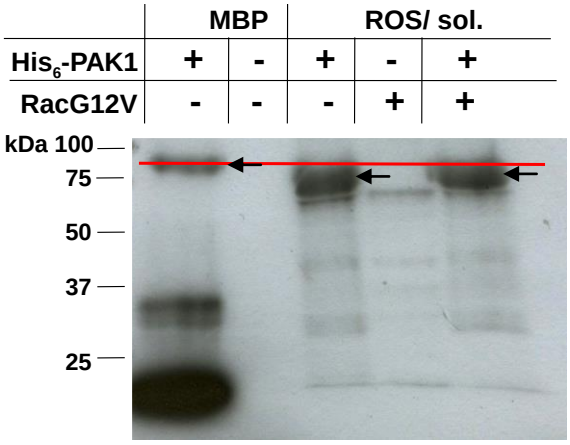


Abb. 3-25: Phosphorylierung von löslichen ROS-Proteinen durch His_6-hPAK1. Der Einfluss von His_6-hPAK1 auf die Phosphorylierung von löslichen ROS-Proteinen (ROS/ sol.) wurde im radioaktiven Aktivitätsassay untersucht. Die durch autophosphoryliertes His_6-hPAK1 erzeugte Bande ist mit einem Pfeil markiert. Als Kontrolle wurde der Kinaseaktivitätsassay mit MBP als Substrat durchgeführt. Die Laufhöhe von His_6-hPAK1 in Abwesenheit der ROS-Proteine ist gekennzeichnet.

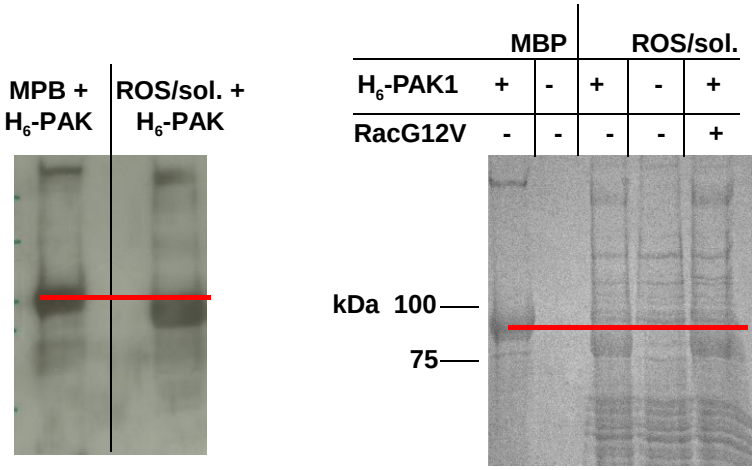


Abb. 3-26: Elektrophoretische Mobilität von His_6-hPAK1 in An- und Abwesenheit von löslichen ROS-Proteinen. Sowohl im Westernblot (*links*) als auch im Coomassie-Gel (7,5%) (*rechts*) zeigte sich ein deutlicher Laufunterschied von His_6-hPAK1 (H_6-PAK1), wenn es mit löslichen ROS-Proteinen (*ROS/sol.*) inkubiert wurde. Die Laufhöhe von His_6-hPAK1 ohne lösliche ROS-Proteine ist markiert (*rote Linie*). Es wurden jeweils 15 µl des Gesamtansatzes aufgetragen (entspricht 2,5 µg His_6-hPAK1).

3.10.2.2. ROS-Membranproteine

Im Kinaseaktivitätsassay wurde ebenfalls der Effekt von His_6-hPAK1 auf die Phosphorylierung von ROS-Membranproteinen getestet. Hierzu wurden, wie beschrieben,

lösliche Proteine und Membranproteine voneinander getrennt und als Substrat für die Kinase getestet. Ein Autoradiogramm ist in Abb. 3-27 gezeigt.

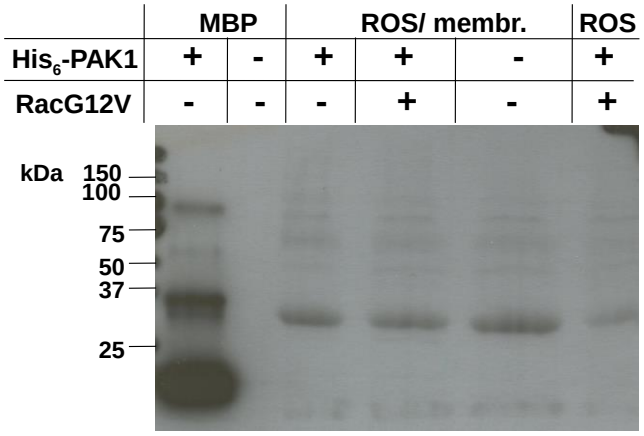


Abb. 3-27: Phosphorylierung von ROS-Membranproteinen durch His_6-hPAK1. Autoradiogramm eines Kinaseaktivitätsassays zum Test der Phosphorylierung von ROS-Membranproteinen (*ROS/ membr.*) durch His_6-hPAK1. Zur Kontrolle der generellen His_6-PAK1-Aktivität wurde der Assay mit MBP und kompletten ROS als Substrat durchgeführt.

Es ließ sich ein deutliches Signal unterhalb von 37 kDa beobachten, das Auftreten war jedoch His_6-hPAK1-unabhängig. Es wurde davon ausgegangen, dass beim Waschen der ROS-Membranen die Rhodopsinkinase (*G-protein-coupled receptor kinase 1*, GRK1) nicht vollständig entfernt wurde und es sich hierbei um phosphoryliertes Rh handelte. Es schien jedoch, als habe His_6-hPAK1 einen inhibierenden Einfluss auf die Reaktion, da das Signal in den beiden Spuren mit rekombinanter Kinase etwas schwächer wirkte als ohne (Abb. 3-27). Dies wurde in weiteren Experimenten geprüft (siehe 3.10.2.3). Weiterhin fiel auf, dass die Autophosphorylierung von His_6-hPAk1 in Anwesenheit von ROS-Membranproteinen ausblieb (Abb. 3-27). Die generelle Aktivität des Proteins wurde in einem parallel durchgeführten Kontrollansatz mit MBP als Substrat sichergestellt (Abb. 3-27), sodass davon auszugehen war, dass dieser Effekt durch Proteine in den ROS-Membranen hervorgerufen wurde. Hierbei handelte es sich jedoch nicht um ein ROS-spezifisches Phänomen. Gleiche Beobachtung wurde auch mit Membranen von HEK293-Zellen gemacht (Abb. 3-28, oben). Wir vermuteten, dass es sich um membranassoziierte Phosphatasen handelte, die His_6-hPAK1 dephosphorylierten. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde ein Phosphataseinhibitorcocktail verwendet, der die Proteinphosphatase Typ 1 (PP1) und Typ 2A (PP2A) sowie die alkalische Phosphatase inhibiert. PP1 und PP2A sind neben den Phosphatasen POPX1 und 2, PP2B und PP2C dafür bekannt PAK durch Dephosphorylierung zu deaktivieren (Arias-Romero und Chernoff, 2008; Zhao und Manser, 2005). Durch Einsatz von PIC3 konnte die Autophosphorylierung von His_6-hPAK1 sowohl für ROS- als auch HEK293-Membranen wieder hergestellt werden (Abb. 3-28, oben).

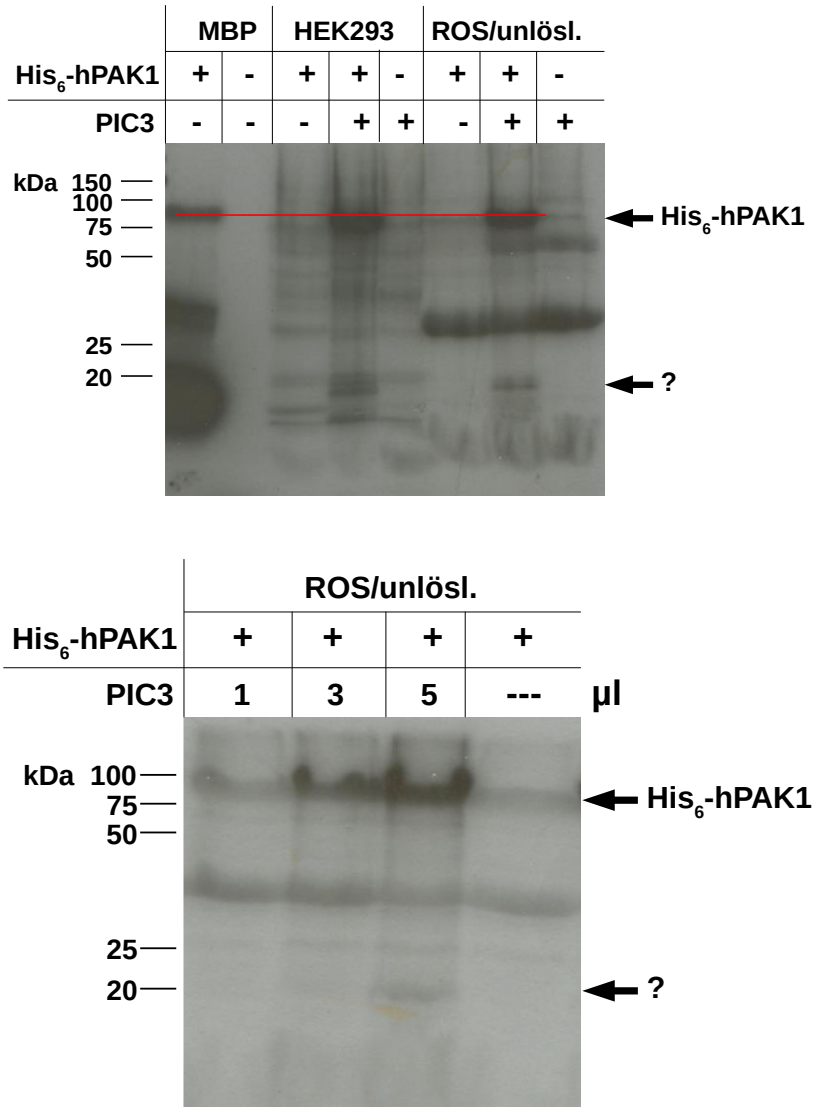


Abb. 3-28: Phosphorylierung von ROS-Membranproteinen durch His_6-hPAK1 in Anwesenheit eines Phosphataseinhibitorcocktails. Der Effekt von PIC3 auf die Phosphorylierung von ROS-Membranproteinen durch His_6-hPAK1 wurde untersucht. ***Oben:*** Um festzustellen, ob die ausbleibende Autophosphorylierung von His_6-hPAK1 ein ROS-spezifisches Phänomen war, wurden ebenfalls Membranen von HEK293-Zellen getestet. His_6-hPAK1 und eine unbekannte Bande auf Höhe von ca. 20 kDa sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Laufhöhe von His_6-hPAK1 ohne ROS-Proteine ist markiert (*rote Linie*). ***Unten:*** Es zeigte sich, dass der Effekt des PIC3 Konzentrationsabhängig war. Die Bande bei ca. 20 kDa tritt deutlich erst bei Zugabe von 5 µl PIC3 in Erscheinung. His_6-hPAK1 und eine unbekannte Bande auf Höhe von ca. 20 kDa wurden mit einem Pfeil markiert.

Auch in diesem Fall war eine leicht erhöhte elektrophoretische Mobilität von His_6-hPAK1 zu beobachten, hier jedoch nicht ganz so deutlich wie in Anwesenheit der löslichen ROS-Proteine (siehe 3.10.2.1). Zusätzlich wurde bei aktiver Kinase ein neues Signal auf einer Höhe von 20 kDa detektiert (Abb. 3-28). Es war davon auszugehen, dass es sich hierbei um ein PAK1-Substrat/ PAK1-Substrate handelte, da das Signal ohne Kinase nicht auftauchte. Dieses Ergebnis war wieder sowohl für ROS- als auch für HEK293-Membranen zu beobachten. Um das ROS-Protein/ die ROS-Proteine zu identifizieren, wurden sie in zwei aufeinander folgenden SDS-PAGEs isoliert und zur massenspektrometrischen Analyse

verschickt (siehe 3.10.2.4). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Wirkung des PIC3 konzentrationsabhängig war. Mit steigender PIC3-Menge wurde das Signal der Autophosphorylierung von His_6-hPAK1 stärker (Abb. 3-28, unten). Das zusätzliche Signal war erst bei einem Einsatz von 5 µl PIC3 deutlich erkennbar (Abb. 3-28, unten).

3.10.2.3. Einfluss auf die Phosphorylierung von Rhodopsin

Bei der Untersuchung von der Phosphorylierung von ROS-Membranproteinen durch His_6-hPAK1 entstand der Eindruck die Anwesenheit von His_6-hPAK1 hätte einen inhibitorischen Einfluss auf die Phosphorylierung von Rh durch die GRK1 (Abb. 3-27). Dies wurde sowohl qualitativ als auch quantitativ geprüft.

Um zu testen, ob His_6-hPAK1 Rh direkt phosphoryliert, wurden ROS-Membranen mit 5 M Urea gewaschen. Hierbei wurden alle Proteine bis auf die integralen Membranproteine entfernt, d.h. auch die durch Farnesylierung membranassoziierte GRK1. Die Membranen wurden im Kinaseassay mit His_6-hPAK1 inkubiert. Im Autoradiogramm waren keine Signale für phosphoryliertes Rh zu beobachten, wobei die Ergebnisse der Kontrollen entsprechend der Erwartungen ausfielen: His_6-hPAK1 war generell aktiv, da es MBP wie gewohnt phosphorylierte und auch in ROS zeigte sich bei Anwesenheit aller Proteine die Phosphorylierung von Rh (Abb. 3-29, links). Demnach kann eine direkte Phosphorylierung von Rh durch His_6-hPAK1 ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu ROS-Membranen, die nicht mit Urea gewaschen wurden, war in diesem Experiment allerdings ein schwaches Signal durch autophosphoryliertes His_6-hPAK1 zu beobachten (vgl. Abb. 3-27 und Abb. 3-29, links). Dass sich Rh in den Urea-gewaschenen Membranen immer noch phosphorylieren lässt, wurde durch Christian Kramer, M. Sc. gezeigt. Er nutzte in seinen Experimenten die gleiche Charge von Urea-gewaschenen ROS-Membranen und hat diese mit frisch präparierten löslichen ROS-Proteinen, in denen auch die native GRK1 enthalten war, inkubiert (Kramer, 2013).

Ein indirekter Einfluss von His_6-hPAK1 auf die Rh-Phosphorylierung wurde durch die quantitative Auswertung der Kinaseaktivitätsassay mit Hilfe eines Szintillationsdetektors geprüft. Sollte die Kinase die Phosphorylierung beeinflussen, wäre eine erhöhte oder erniedrigte Ereignisrate in den verschieden Ansätzen zu erwarten gewesen. Dies war jedoch nicht der Fall (Abb. 3-29, rechts). Sowohl mit Kinase mit oder ohne hRac1(G12V) als Aktivator als auch ohne Kinase waren die Werte im Rahmen der Fehler gleich. Auch das im PAK-Puffer enthaltene Glycerin hatte keinen inhibitorischen Einfluss auf die Reaktion.

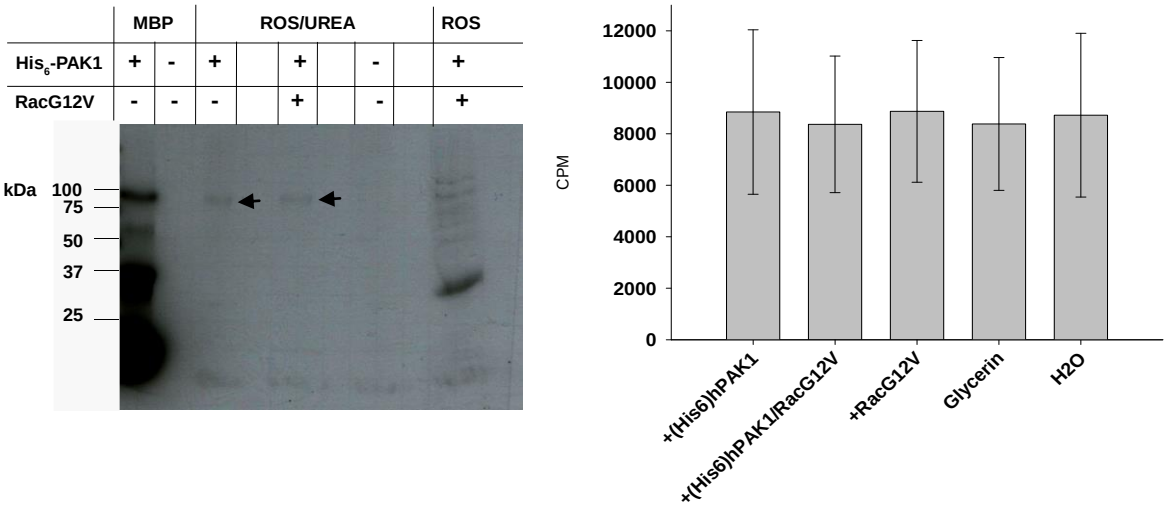


Abb. 3-29: Einfluss von His_6-hPAK1 auf die Phosphorylierung von Rh. Der Einfluss von His_6-hPAK1 auf die Phosphorylierung von Rh wurde sowohl qualitativ als auch quantitativ untersucht. ***Links:*** Gezeigt ist das Autoradiogramm eines Kinaseaktivitätsassays. Als Substrat wurden Urea-gewaschene ROS-Membranen eingesetzt, bei denen die GRK1 vollständig entfernt wurde. Bei Anwesenheit der ROS-Proteine war eine schwache Autophosphorylierung von His_6-hPAK1 erkennbar (*Pfeile*). Als Positivkontrolle wurden ebenfalls MBP und komplette ROS eingesetzt. ***Rechts:*** ROS-Membranen wurden unter verschiedenen Bedingungen mit und ohne His_6-hPAK1 bzw. hPAK1 inkubiert und anschließend die Proben mit einem Szintillationsdetektor ausgezählt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass His_6-hPAK1 die Phosphorylierung von Rh weder direkt noch indirekt beeinflusste.

3.10.2.4. Identifizierung von PAK1-Substraten in ROS-Membranen

Beim Test der Phosphorylierung von ROS-Membranproteinen durch His_6-hPAK1 tauchte in Anwesenheit eines Phosphataseinhibitorcocktails im Autoradiogramm ein zusätzliches Signal auf Höhe von ca. 20 kDa auf (Abb. 3-30, A und Abschnitt 3.10.2.2). Zur Identifikation des Proteins oder der Proteine, sollte die Bande isoliert und zur massenspektrometrischen Analyse verschickt werden. Nach der ersten SDS-PAGE war es jedoch noch nicht möglich die Proteinbande im Coomassie-gefärbten Gel eindeutig zu identifizieren (Abb. 3-30, A, links). Aus diesem Grund sollte die Isolation in zwei Dimensionen erfolgen. Zunächst wurde versucht die Proteine in der ersten Dimension in einer nativen PAGE (kationisch und anionisch) nach Ladung zu trennen. Dies blieb allerdings ohne Erfolg (Daten nicht gezeigt), sodass die Probe wie in 2.2.13.1 beschrieben in beiden Dimensionen mittels denaturierender PAGE isoliert wurde. Zugehörige Autoradiogramme und Coomassie-Gele sind in Abb. 3-30 gezeigt. Im Coomassie-Gel der zweiten Dimension war bei ca. 20 kDa eine Doppelbande zu erkennen (Abb. 3-20, B, rechts).

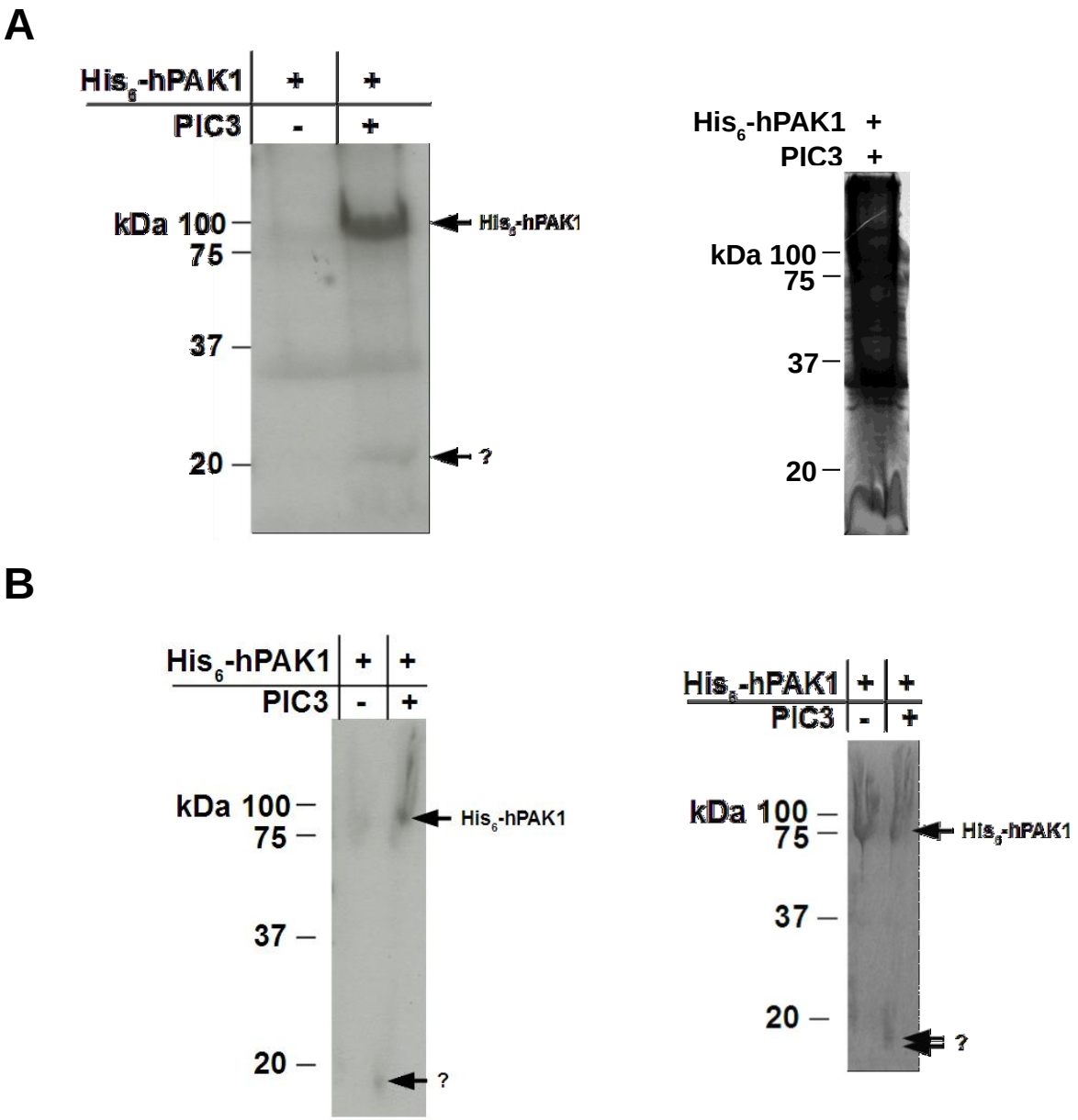


Abb. 3-30: Isolierung der relevanten Proteine aus den ROS-Membranen. Bei Anwesenheit von PIC3 tauchte unter den ROS-Membranproteinen im Autoradiogramm ein zusätzliches Signal bei ca. 20 kDa auf (A, *links*). Die zugehörige Proteinbande ließ sich im Coomassie-Gel (12%) jedoch nicht identifizieren und somit auch nicht isolieren (A, *rechts*). Aus diesem Grund wurde der entsprechende Gelbereich ausgeschnitten und in der zweiten Dimension ein weiteres Mal mittels SDS-PAGE (Gel 12%) getrennt (B). Als Kontrolle wurde zusätzlich His_6-hPAK1 mitgeführt. Im Autoradiogramm sind His_6-hPAK1 und das Signal des unbekannten Proteins eindeutig zu erkennen (B, *links, Pfeile*). Im Coomassie-Gel zeigten sich auf Höhe von 20 kDa jedoch zwei Banden (B, *rechts, Pfeile*), welche beide zur massenspektrometrischen Analyse verschickt wurden.

Im Autoradiogramm war auf entsprechender Höhe jedoch nur ein Signal zu beobachten (Abb. 3-30, B, links). Da mit bloßem Auge nicht zu beurteilen war, welche der beiden Banden das Signal im Autoradiogramm erzeugte, wurden beide aus dem Gel ausgeschnitten und zur Analyse ins Universitätsklinikum Eppendorf (Hamburg) verschickt. Hier wurde die Sequenz einiger Peptide bestimmt und anhand dieser die Identität des Proteins über die

Proteindatenbank UniProtKB/Swiss-Prot (www.expasy.org) ermittelt. Im ersten Schritt wurde ein Q-TOF-Tandem-Massenspektrometer eingesetzt. Auszüge der Ergebnisse sind in Tab. 3-1 gezeigt. Die vollständige Ergebnistabelle ist im Anhang zu finden. Mit dieser Methode wurden zahlreiche Proteine identifiziert, hauptsächlich allerdings solche, die im ER, Nukleus oder in den Mitochondrien lokalisiert sind. Da hier jedoch die Membranproteine der Stäbchenaußensegmente untersucht wurden und sich genannte Organellen im Innensegment der Zelle befinden, mussten diese Proteine als Kontamination durch RIS oder andere retinale Zellen bewertet werden. D.h. es war zwar durchaus möglich, dass sie ein Substrat für His_6-hPAK1 darstellten, waren aber für die Fragestellung, ob es PAK1-abhängige Signalwege in ROS gibt, unerheblich.

Aus diesem Grund wurde der Fokus auf den ROS-Membranproteinen bzw. membranassoziierten Proteinen gehalten. Hierbei wurde bei erster Untersuchung kein eindeutiger Kandidat für eine mögliche Phosphorylierung durch His_6-hPAK1 gefunden. Lediglich die identifizierte **21 kDa-Untereinheit des Arp (*Actin related protein*) 2/3-Komplexes (p21-ARC)** ist entfernt in einen Signalweg mit PAK1 involviert. Der Arp 2/3-Komplex ist verantwortlich für die Bildung verzweigter Aktin-Filament-Netzwerke. Er besteht aus sieben Untereinheiten, wobei die 41 kDa-Untereinheit (p41-ARC) tatsächlich ein direktes Substrat von PAK1 darstellt (Szczepanowska, 2009). Da es sich hierbei um bovine Membranproteine und eine humane Kinase handelte, war es möglich, dass es Spezies-spezifische Unterschiede auftraten, d.h. bei boviner Regulation des Arp 2/3-Komplexes p21-ARC statt p41-ARC phosphoryliert wurde. Alternativ könnte es sein, dass das humane PAK1 nicht das bovine p41-ARC aber p21-ARC erkannt hat, obwohl diese Reaktion ohne physiologische Bedeutung wäre.

Tab. 3-1: Auszug der Ergebnisse der Q-TOF-Analyse. Angegeben ist eine Auswahl jener Proteine, die in der Q-TOF-Analyse identifiziert wurden. Die Subzelluläre Lokalisation und die Einordnung als Phosphoprotein wurde unter angegebener Zugangsnummer der Proteindatenbank UniProtKB/Swiss-Prot (www.expasy.org) entnommen. Der Score gibt an inwiefern die erhaltenen Peptide mit einem theoretischem *in silico*-Verdau des Proteins übereinstimmen. Je höher der Score, desto besser die Übereinstimmung. Putative Substrate sind hervorgehoben.

Ergebnis/Kürzel	MW [kDa]	Subzelluläre Lokalisation	Phospho-protein	Zugangsnr. SwissProt	Score
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B/ PPIase B	23,729	ER, Melanosom	nein	P80311	54
Vesicle-associated membrane protein/ 2VAMP-2	12,641	Zytoplasmatische Vesikel, Synapse	nein	P63026	28

Fortsetzung Tab. 3-1:

Ergebnis/Kürzel	MW [kDa]	Subzelluläre Lokalisation	Phospho-protein	Zugangsnr. SwissProt	Score
NADH-Dehydrogenase [Ubiquinone] 1 β-Unterkomplex Untereinheit 8, mitochondrial	21,639	Innere Mitchondrien-membran	n.b.	Q02372	22
Actin-related protein 2/3 complex Untereinheit 3/ p21-ARC	**20,533**	**Zytoskelett**	**ja**	**Q3T035**	**18**
PRA1 family protein 3	21,651	ER, Zytoplasma	nein	Q5E9M1	22
60S ribosomal protein L11	20,240	Nukleus	ja	Q3T087	47
Histone H2B type 1-N	13,915	Nukleus	ja	Q32L48	22
Tubulin beta-2B chain	49,921	Zytoskelett	n.b.	Q6B856	9
Tubulin alpha-1B chain	50,120	Zytoskelett	ja	P81947	4
ER membrane protein complex subunit 4/ EMC4	20,073	ER-Membran	nein	Q3T0K8	5

Um gegebenenfalls weitere Ergebnisse zu erzielen, wurde die gleiche Probe für eine LC/MS-Analyse genutzt. Mit dieser Methode wurde ein sehr umfangreicher Datensatz generiert. Auszüge sind in Tab. 3-2 gezeigt. Die vollständige Ergebnistabelle ist im Anhang zu finden.

Tab. 3-2: Auszug der Ergebnisse der LC/MS-Analyse. Angegeben ist eine Auswahl jener Proteine, die in der LC/MS-Analyse identifiziert wurden. Die Subzelluläre Lokalisation und die Einordnung als Phosphoprotein wurde unter angegebener Zugangsnummer der Proteindatenbank UniProtKB/Swiss-Prot (www.expasy.org) entnommen. Der Score gibt an inwiefern die erhaltenen Peptide mit einem theoretischem *in silico*-Verdau des Proteins übereinstimmen. Je höher der Score, desto besser die Übereinstimmung. Putative Substrate sind hervorgehoben (Details siehe Text). *MW: Molmasse, n.b.: nicht bekannt*

Ergebnis/Kürzel	MW [kDa]	Subzelluläre Lokalisation	Phospho-protein	Zugangsnr. SwissProt	Score
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 β-Unterkomplex Untereinheit 7	16,4	Innere Mitochondrien-membran	nein	Q02368	308
Apolipoprotein O	22,5	Membranprotein	nein	Q148H0	101
Tubulin beta-4B chain	49,8	Zytoskelett	ja	Q3MHM5	81
Alpha-crystallin A chain	19,8	Zytoplasma, Nukleus	ja	P02470	75
Transmembrane protein 65/ TMEM 65	**25**	**Membranprotein**	**n.b.**	**Q0VCH8**	**64**

Fortsetzung Tab. 3-2:

Ergebnis/Kürzel	MW [kDa]	Subzelluläre Lokalisation	Phospho-protein	Zugangsnr. SwissProt	Score
ADP-ribosylation factor-like protein 8B	**21,5**	**Spätes Endosom, Lysosomen-membran, mitotische Spindel**	**n.b.**	**Q2KI07**	**61**
Vesicle-associated membrane protein 1/ VAMP-1	12,9	Zytoplasmatische Vesikel, Synapse	n.b.	Q0V7N0	50
Protein FAM162A	**17,7**	**Membranprotein, Mitochondrien**	**n.b.**	**Q2NKR7**	**42**
Cofilin-1 (non-muscular)	**18,5**	**Kernmatrix, Zytoskelett, Zellprojektionen, peripheres Membranprotein**	**ja**	**Q5E9F7**	**37**
Hippocalcin-like protein 1	22,3	Zytoplasma	nein	P29105	37
Cytochrome c oxidase subunit 4	19,6	Innere Mitochondrien-membran	nein	P00423	34
Translocon-associated protein subunit delta	18,8	ER-Membran	nein	Q2TBX5	32
Myosin regulatory light chain 12B	**19,7**	**Zytoskelett kontraktiler Zellen**	**ja**	**A4IF97**	**32**
Stathmin	**17,3**	**Zytoskelett**	**ja**	**Q3T0C7**	**29**
Neurocalcin-delta	22,2	Zytoplasma	nein	P61602	29
Nucleoside diphosphate kinase B	17,3	Zytoplasma, Membranprotein, Zellprojektionen	nein	Q3T0Q4	27
Alpha-crystallin B chain	20,0	Zytoplasma, Nukleus	nein	P02510	25
Prefoldin subunit 2	16,6	Nukleus, Zytoplasma, Mitochondrien	n.b.	A1A4P5	25
Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B	**14,7**	**Zytoskelett, Endomembran-system, zyto-plasmatische Vesikel**	**ja**	**O41515**	**24**
Serum albumin	69,2	Sekretiertes Protein	ja	P02769	23
Ragulator complex protein LAMTOR1	**17,7**	**Plasmamembran, spätes Endosom, Lysosom**	**ja**	**Q3T0D8**	**19**
Visinin-like protein 1 (Neurocalcin-alpha)	22,1	Zytoplasma	nein	P62763	19

Fortsetzung Tab. 3-2:

Ergebnis/Kürzel	MW [kDa]	Subzelluläre Lokalisation	Phospho-protein	Zugangsnr. SwissProt	Score
CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1	18,7	Zytoplasma	n.b.	Q17QM9	18
Centrin-2	**19,8**	**Zytoskelett, Nukleus**	**ja**	**Q2TBN3**	**17**
GTP-binding protein Rheb	**20,5**	**Zellmembran**	**ja**	**Q56JV3**	**16**
Prostamide/prosta-glandin F synthase	21,5	Zytoplasma	n.b.	Q58CY6	16
Beta-synuclein	14,3	Zytoplasma	ja	P33567	15
Alpha-synuclein	14,5	Zytoplasma	ja	Q3T0G8	14
Heat shock protein beta-1	**22,4**	**Zytoplasma, Nukleus, Zytoskelett**	**ja**	**Q3T149**	**14**
Serine/threonine-protein kinase PAK 1	60,5	Zytoplasma	ja	Q08E52	13
Regulator of microtubule dynamics protein 3	51,9	Mitochondrien, Nukleus, Zytoskelett	ja	Q1JQC5	13
Adenine phosphoribosyltransferase	19,5	Zytoplasma	ja	Q56JW4	12
Sorting nexin-3	**18,8**	**Frühes Endosom**	**ja**	**Q1RMH8**	**12**
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	17,9	Zytoplasma, sekretiertes Protein	ja	P62935	11
Receptor expression-enhancing protein 5	21,4	Membranprotein	nein	Q29RM3	11
Actin, cytoplasmic 1	41,7	Zytoskelett	nein	P60712	11
Rhodopsin	39	Diskmembran	ja	P02699	8
Protein tyrosine phosphatase type IVA 3	19,5	Zellmembran, frühes Endosom	nein	A2VDT1	8
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	30,7	Mitochondrien-membran, Zellmembran	ja	P45879	8
Transgelin-2	22,4	Zytoplasma	ja	Q5E9F5	7
Peroxiredoxin-1	22,2	Zytoplasma	ja	Q5E947	7
FUN14 domain-containing protein 2	**20,6**	**n.b.**	**ja**	**Q8MJN0**	**7**

Hauptsächlich wurden jedoch erneut Proteine identifiziert, die, wie oben bereits beschrieben, aus dem Stäbcheninnensegment oder anderen Zelltypen stammten. Zusätzlich hatten viele

Ergebnisse einen recht geringen Score, was nicht für eine zuverlässige Identifikation spricht. Die Proteine wurden nach subzellulärer Lokalisation und posttranslationaler Modifikation (PTM) sortiert. Jene Kandidaten, welche vermutlich in ROS-Membranen auftauchen und bekannte Phosphoproteine sind bzw. bei denen die PTM unbekannt ist, wurden als putative His_6-hPAK1-Substrate eingeordnet und geprüft, ob in der Literatur eine Interaktion mit PAK1 bekannt ist (Tab. 3-3).

Tab. 3-3: Auswahl möglicher His_6hPAK1-Substrate. Aufgeführt ist eine Auswahl von Phosphoproteinen und Proteinen bei denen die posttranslationale Modifikation nicht bekannt ist, die nach ihrer subzellulären Lokalisation mit PAK1 in ROS interagieren könnten (Zusammenfassung von Tab. 3-1 und Tab. 3-2). Die Funktion des jeweiligen Proteins und die Interaktion mit PAK1 wurde, falls nicht anders gekennzeichnet, der Proteindatenbank UniProtKB/Swiss-Prot (www.expasy.org) entnommen. *n.b.: nicht bekannt*

Ergebnis/ Kürzel	Subzelluläre Lokalisation	Funktion	Interaktion mit PAK1
Actin-related protein 2/3 complex Untereinheit 3/ p21-ARC	Zytoskelett	- Untereinheit des Actin-related protein 2/3 (Arp 2/3)-Komplexes[1] - Arp 2/3-Komplex spielt eine Rolle bei der Bildung verzweigter Aktin-Filamente im Zellkortex[1]	- Nein, aber p41-ARC[1]
Transmembrane protein 65/ TMEM 65	Membran-protein	n.b.	n.b.
ADP-ribosylation factor-like protein 8B	Spätes Endosom, Lysosomen-membran, mitotische Spindel	- Spielt möglicherweise eine Rolle bei der Motilität von Lysososmen - Eventuelle Beteiligung bei der Teilung der Chromosomen während der Meiose - Interagiert mit Tubulin	n.b.
Protein FAM162A	Membran-protein, Mitochondrien	- Vermutlich an Apoptose-Regulation beteiligt - Möglicherweise an Hypoxie-induziertem Zelltod beteiligt - Interagiert mit HSP90AB1 und VDAC2	n.b.
Cofilin-1 (non-muscular)	**Kernmatrix, Zytoskelett, Zellprojek-tionen, peripheres Membran-protein**	- **Depolymerisation von F-Aktin** - **verhindern der Repolymerisation**	- **Via LIMK1 (reguliert durch PAK1)[2, 3]**

Fortsetzug Tab. 3-3:

Ergebnis/ Kürzel	Subzelluläre Lokalisation	Funktion	Interaktion mit PAK1
Myosin regulatory light chain 12B	**Zytoskelett kontraktiler Zellen**	- **Regulation der Interaktion Aktin/Myosin**	- **direkt mit PAK2[4]** - **via MLCK (reguliert durch PAK1)[4, 5]**
Stathmin	**Zytoskelett**	- **Destabilisation von Mikrotubuli[1]** - **Interagiert mit Tubulin-Dimeren[1]** - **Phosphorylierung durch PAK1 inaktiviert Stathmin[6]**	**Ja[1, 4]**
Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B	Zytoskelett, Endomembransystem, zytoplasmatische Vesikel	- Ubiquitin-ähnliches Protein, welches die Bildung von Autophagosomen beeinflusst - Spielt eine Rolle bei der Mitophagie (Beseitigung von Miochondrien)	nein
Ragulator complex protein LAMTOR1	Plasmamembran, spätes Endosom, Lysosom	- Teil des Ragulator-Komplexes - dient als Membrananker für den Ragulator-Komplex - Ragulator-Komplex aktiviert mTORC1 - mTORC1 ist für Zellwachstum als Antwort auf Wachstumsfaktore, Energielevel der Zelle und freie Aminosäuren	nein
Centrin-2	Zytoskelett, Nukleus	- Spielt eine große Rolle bei Struktur und Funktion des Mikrotubulus-Organisationszentrums (MTOC) - Wichtig bei der Zentriolen-Duplikation und Spindelbidlung - Beteiligt an GG-NER (global genome nucleotide excision repair)	nein
GTP-binding protein Rheb	Zellmembran	- Stimuliert die Phosphorylierung von S6K1 und EIF4EBP1 durch Aktivierung von mTORC1-Signalwege	nein

Fortsetzug Tab. 3-3:

Ergebnis/ Kürzel	Subzelluläre Lokalisation	Funktion	Interaktion mit PAK1
Heat shock protein beta-1/ HSPB1	Zytoplasma, Nukleus, Zytoskelett	- Beteiligt an der Vermittlung zellulärer Stressresistenz und an der Aktin-Organisation - Assoziiert mit α-und β-Tubulin, Mikrotubuli und CRYAB - Interagiert mit HSPB8, HSPBAP1 und TGFB1	n.b.
Sorting nexin-3	Frühes Endosom	- Phosphoinositide-binding protein required for multivesicular body formation. Specifically binds phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns(P3)). Plays a role in protein transport between cellular compartments. Promotes stability and cell surface expression of epithelial sodium channel (ENAC) subunits SCNN1A and SCNN1G. Not involved in EGFR degradation	n.b.
FUN14 domain-containing protein 2	n.b.	- bovin: n.b. - human: Aktivator von Hypoxie-induzierter Mitophagie	n.b.

[1]Szczepanowska, 2009; [2]Bamburg, 1999; [3]Zhang *et al.*, 2011; [4]Bokoch, 2003; [5]Zhao und Manser, 2005; [6]Wittmann *et al.*, 2004

Für drei Proteine war eine Phosphorylierung bei PAK1-Aktivität bekannt. Diese sind im Folgenden aufgelistet:

Cofilin-1 ist ein Zytoskelett-assoziiertes Protein, welches die Aktin-Dynamik beeinflusst. Es wird über einen Rac1/PAK1-Signalweg durch LIMK1 (*LIM domain kinase 1*) phosphoryliert, wobei dies zur Inaktivierung von Cofilin-1 führt (Bamburg, 1999; Zhang *et al.*, 2011).

Die **regulatorische leichte Kette des Myosins (R-MLC)** wird direkt durch PAK2 phosphoryliert (Bokoch, 2003). Des Weiteren wird sie durch MLCK (*MLC kinase*) modifiziert. MLCK wiederum ist durch PAK1 reguliert (Bokoch, 2003; Zhao und Manser, 2005). Die Phosphorylierung von R-MLC führt zu einer Bindung an Aktin, was Grundvoraussetzung für Kontraktilität von Zellen ist bzw. bei nicht-kontraktilen Zellen eine Rolle bei der Ausbildung von Stressfasern spielt.

Stathmin ist das einzige identifizierte Protein, welches direkt durch PAK1 phosphoryliert wird (Szczepanowska, 2009; Bokoch, 2003). Es ist ebenfalls ein Zytoskelett-assoziiertes Protein

und blockiert die Synthese von Mikrotubuli (Szczepanowska, 2009). Die Phosphorylierung durch PAK1 inaktiviert Stathmin (Wittmann *et al.*, 2004).

Zusammenfassend wurden drei bekannte Effektoren von PAK1-Signalwegen gefunden. Dies waren Cofilin-1, R-MLC und Stathmin, wobei ausschließlich Stathmin ein direktes PAK1-Substrat darstellt. Alle diese genannten Proteine sind Regulatoren des Zytoskeletts, sodass anzunehmen ist, dass eine Aktivität von PAK1 in ROS die Dynamik von Mikrotubuli (Stathmin) oder des Aktin-Zytoskeletts (Cofilin-1, R-MLC) beeinflusst. Aufgrund der großen Datenmenge ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese Proteine ebenfalls eine Kontamination durch Innensegmentproteine darstellen.

3.11. Einfluss von hPAK1 auf die Aktivität der Guanylatzyklase

Guo *et al.* (2007) haben gezeigt, dass Rac1 *in vitro* und *in vivo* in COS-Zellen PAK-abhängig die Aktivität von GCs beeinflusst. Hierbei wurde ein Großteil der Aktivitätsmessungen mit der GC-E (entspricht der Ret-GC1 oder ROS-GC1, hier: GC1) bzw. der intrazellulären Domäne der GC-E durchgeführt. Da Guo *et al.* (2007) ausschließlich mit heterolog exprimierten Proteinen gearbeitet haben, habe ich in meiner Arbeit geprüft, ob sich dieser Effekt auch mit der nativen GC1, in diesem Fall der bGC1 in ROS-Membranen, beobachten lässt. GC-Aktivitäten in bovinen ROS lassen sich hauptsächlich auf die Aktivität der bGC1 (ca. 96%) und nur zu einem geringen Teil auf die bGC2 (4%) zurückführen (Helten *et al.*, 2007).
Der Einfluss von His_6-hPAK1 auf die Aktivität der bovinen Guanylatzyklasen (bGC) in ROS-Membranen wurde im Guanylatzyklaseaktivitätsassay (GC-Assay) getestet. Zu diesem Zweck wurden von endogenen GCAPs befreite ROS-Membranen im Dunkeln mit His_6-hPAK1 in einem GTP-haltigen Puffer inkubiert. Anschließend wurde die cGMP-Menge mittels HPLC-Analyse bestimmt. Als interne Kontrollen wurden parallel Assays mit nicht-myristyliertem zGCAP1 (nmzGCAP1) in An- oder Abwesenheit von Ca^{2+} durchgeführt. Da gezeigt wurde, dass es sich bei dem hier eingesetzten His_6-hPAK1 um eine konstitutiv aktive Mutante handelte (siehe 3.10.1), wurde auf den Einsatz von aktiviertem bzw. konstitutiv aktivem Rac1 verzichtet. Aus vorangegangenen Experimenten war allerdings ebenfalls bekannt, dass in Anwesenheit von Zellmembranen (HEK293 oder ROS-Membranen) die Autophosphorylierung der Kinase ausblieb (siehe 3.10.2.2). Diese ist für die Aktivierung der GC durch PAK jedoch essentiell (Guo *et al.*, 2007). Aus diesem Grund wurde ebenfalls der Einfluss eines Phosphataseinhibitorcocktails (PIC3) getestet, welcher zur Wiederherstellung der Autophosphorylierung von His_6-hPAK1 führte (siehe 3.10.2.2).

Es zeigte sich, dass die generelle GC-Aktivität His_6-hPAK1 nicht beeinflusst wurde. Mit und ohne PIC3 ließ sich kein Unterschied zur Basalaktivität der bGC1 erkennen (Abb. 3-31, links,

vgl. His_6-hPAK1 ± PIC3 mit ROS). Auffälligerweise ließ sich allerdings auch mit nmzGCAP1 keine Aktivitätssteigerung beobachten (Abb. 3-31, links, vgl. nmzGCAP1/EGTA mit ROS bzw. ROS/EGTA). Entsprechend der Erwartungen wurde die bGC1 jedoch Ca^{2+}-abhängig durch nmzGCAP1 inhibiert (Abb. 3-31, links, vgl. nzmGCAP1/Ca mit ROS).

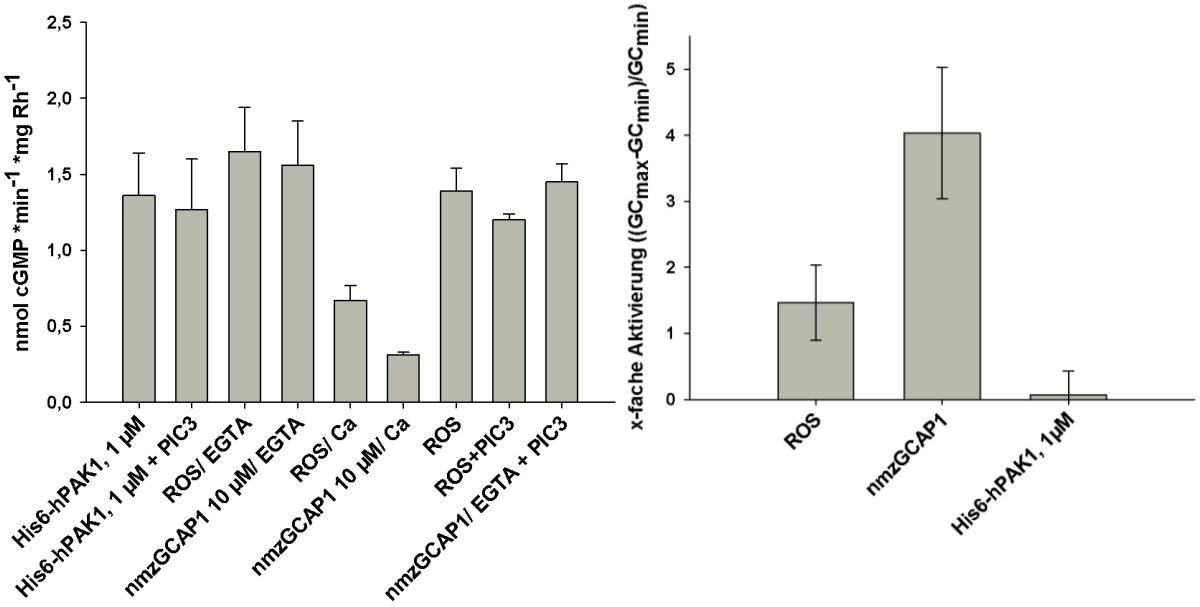


Abb. 3-31: Einfluss von His_6-hPAK1 auf die Aktivität der nativen bGC1. ***Links***: Die generelle Aktivität der bGC1 in ROS-Membranen wurde in Anwesenheit von His_6-hPAK1 gemessen. Um die Aktivität von His_6-hPAK1 sicherzustellen, wurde ein Phosphataseinhibitorcocktail zugefügt (PIC3). Als Kontrollen wurden Ansätze mit nicht-myristyliertem zGCAP1 (nmzGCAP1) und ohne Aktivator (ROS) durchgeführt. Hierbei wurden zum einen aktivierende Ca^{2+}-freie Bedingungen (EGTA) und der inhibierende Einfluss von Ca^{2+} (Ca) überprüft. Zusätzlich wurde der Einfluss von PIC3 auf die cGMP-Synthese getestet. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus 3-8 Messungen dar. Der Fehler ist die Standardabweichung des Mittelwertes. ***Rechts*:** Für angegebene Proben wurde die x-fache Aktivierung berechnet. Die Werte wurden aus den Messungen zur generellen GC-Aktivität ermittelt. Der Fehler wurde mit Hilfe des Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetzes berechnet.

Um dennoch den Einfluss auf die GC-AKtivität quantifizieren zu können, wurde die x-fache Aktivierung berechnet (Abb. 3-31, rechts). Hierbei ergab sich entsprechend der Literatur eine 4(±1)-fache Aktivierung in Anwesenheit von nmzGCAP1 (Scholten und Koch, 2011). Für die endogenen GCAPs wurde nur eine 1,5-fache Aktivierung erhalten. Ein Vergleich der maximalen und minimalen GC-Aktivität in Anwesenheit von His_6-hPAK1 ergab, wie bereits beschrieben, keinen Einfluss der Kinase.

4. DISKUSSION

4.1. Das rekombinante hRac1

4.1.1. Expression und Reinigung

Das rekombinante Protein hRac1 WT sowie die Mutante hRac1(G12V) wurden heterolog in *E. coli* exprimiert und konnten entsprechend des isoelektrischen Punkts von 8,7 recht einfach mit Hilfe eines Kationenaustauschers zufriedenstellend gereinigt werden (Abb. 3-7 und 3-9). Ein kritischer Aspekt bei der Expression in Bakterien ist jedoch, dass es sich hierbei um prokaryotische Zellen handelt, d.h. posttranslationale Modifikationen, wie die C-terminale Geranygeranylierung von Rac1, nicht gegeben sind. Die Prenylierung ist generell ein wichtiger Faktor für die Membranlokalisation von Rac1 (Lam und Hordijk, 2013). Aus der Arbeit von Navarro-Lérida *et al.* (2012) ist bekannt, dass in transfizierten COS-Zellen eine ebenfalls C-terminale Palmitylierung von Rac1 außerdem wichtig für die Beladung des G-Proteins mit GTP ist. Für die Palmitylierung wiederum ist die Prenylierung von Rac1 essentiell (Navarro-Lérida *et al*., 2012). D.h. der Geranylgeranyl-Rest scheint also auch zumindest indirekt wichtig für den GDP/GTP-Austausch an Rac1 zu sein. Dennoch ist auch nicht-prenyliertes Rac1 z.B. in der Lage, Effektorproteine wie die NADPH-Oxidase zu aktivieren (Kreck *et al.*, 1994; Lam und Hordijk, 2013).
Zusammenfassend wäre es also durchaus möglich, dass sich das Fehlen der posttranslationalen Modifikation (PTM) auf die nachfolgenden Experimente mit dem rekombinanten hRac1 ausgewirkt hat.

Der sicherste Weg die Geranylgeranylierung zu erhalten, wäre es die hRac1-Proteine in eukaryotischen Zellen wie z.B. Säugerzellen oder Insektenzellen zu exprimieren. Hierbei eignen sich Insektenzellen deutlich besser, um daraus große Mengen eines Proteins zu reinigen. Allerdings müssten diese zur Expression mit einem Virus infiziert werden. Die Herstellung des Viruskonstrukts kann im Vergleich mit einer klassischen Klonierung deutlich zeitintensiver und aufwändiger sein.
Möglicherweise wäre jedoch auch die Prenylierung in Bakterien realisierbar. GCAPs werden posttranslational N-terminal acyliert, hauptsächlich myristyliert. Durch Kotransformation von *E. coli* mit pBB131 und Füttern mit Myristinsäure ist es möglich myristylierte GCAPs auch aus Bakterien zu reinigen (Duronio *et al.*, 1990; Fries *et al.*, 2012). Bei pBB131 handelt es sich um ein Plasmid, welches für die N-Myristyltransferase (NMT) aus *S. cerevisiae* codiert. Möglicherweise könnte dies auch ein Ansatz zur Geranylgeranylierung von Rac1 in *E. coli* sein. In diesem Fall müssten die Zellen entsprechend mit einem Plasmid, welches das Gen der Geranylgeranyltransferase I (GGTase-I) trägt, kotransformiert und mit Geranylgeranylpyrophosphat gefüttert werden.

Kalinin *et al.* (2001) konnten die Geranylgeranyltransferase II (GGTase-II) als funktionell aktives Protein in *E. coli* exprimieren, reinigen und zellfrei das kleine G-Protein Rab geranylgeranylieren. Die *in vitro*-Prenylierung könnte also eine weitere Option sein, das rekombinante hRac1 entsprechend zu modifizieren.

4.1.2. Nukleotidbindung

Die Beladbarkeit vom rekombinanten hRac1 mit GTP wurde im Pulldown-Assay getestet. Leider konnte keine Aussage über die Nukleotidbindung getroffen werden, da hRac1 nukleotidunabhängig mit der PAK-PBD-Sepharose interagierte (siehe 3.5). Hierbei handelte es sich um eine unspezifische Bindung an das Säulenmaterial, wie der Test mit mock-aktivierter Sepharose zeigte (Abb. 3-9, Spur E/K). Im Fall des nativen hRac1 war diese Interaktion mit der Sepharose jedoch nicht zu beobachten (siehe 3.3). Hierfür sind verschiedene Ursachen denkbar: 1) das rekombinante Protein war aufgrund einer zu geringen Konzentration präzipitiert, 2) das native Rac1 wurde durch die Anwesenheit anderer Proteine und/oder des Detergens DM stabilisiert oder 3) die fehlende Geranylgeranylierung verändert die Eigenschaften von hRac1 so, dass es stärker mit der Sepharose interagiert oder leichter präzipitiert.

Die Rac1-Konzentration war in beiden Experimenten vergleichbar: beim Test der lichtabhängigen Aktivierbarkeit wurden theoretisch ca. 14 ng Rac1/µl eingesetzt, beim Test der Nukleotidbindung wurde sowohl eine entsprechende Konzentrationen (16 ng hRac1/µl) als auch eine deutlich höhere Proteinkonzentration (300 ng hRac1/µl) ausprobiert, jedoch immer mit dem gleichen Ergebnis der unspezifischen Interaktion.

Auch die Stabilisierung des rekombinanten hRac1 mit 0,05% (v/v) Tween-20 und/ oder 1% (w/v) BSA wurde getestet, jedoch ohne Erfolg. Ebenso wie DM ist Tween-20 ein nichtionisches Detergens. Beide Detergenzien wurden deutlich über ihrer kritischen mizellären Konzentration eingesetzt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass das native Rac1 im ROS-Solubilisat durch Interaktion mit bestimmten Proteinen und/ oder Lipiden in Lösung gehalten wurde.

Da es sich bei Sepharose (bestehend aus 4% Agarose) um ein leicht polares Material handelt, wäre nicht auszuschließen, dass die Prenylierung als zusätzliche apolare Komponente die Affinität des nativen Rac1 für das Säulenmaterial reduziert.

4.2. Rac1 in Photorezeptorzellen

4.2.1. Lokalisation in der bovinen Retina und Konzentration in ROS

Um Rac1 in der bovinen Netzhaut zu lokalisieren, wurden Kryogewebeschnitte von belichteten Retinen hergestellt und diese immunchemisch gegen Rac1 gefärbt (siehe 3.1.1). Das hierbei erhaltene Expressionsmuster stimmt mit der von Kiel *et al.* (2011) beschriebenen Verteilung von Rac1 in der ebenfalls (vermutlich) belichteten Schweineretina überein. In der murinen Netzhaut hingegen ist Rac1 in allen retinalen Schichten, also auch der ONL, detektiert worden, wobei das stärkste Signal in den Photorezeptorzellen und den plexiformen Schichten zu erkennen ist (Belmonte *et al*., 2006). Außerdem nahm das Rac1-Signal in der der ONL der murinen Netzhaut anders als in der Rinder- und Schweineretina mit Belichtung zu (Belmonte *et al*., 2006). Die unterschiedlichen Expressionsmuster von Rac1 in Rind/ Schwein und der Mausretina könnten auf Speziesunterschieden beruhen.
Zusätzlich wurden in dieser Arbeit Kryogewebeschnitte von belichteten und dunkel-adaptierten Rinderretinen verglichen. Das Verteilungsmuster von Rac1 war in beiden Fällen gleich, sodass ausgeschlossen werden kann, dass Rac1 lichtabhängig transloziert, wie es z.B. von G_T und Arrestin bekannt ist (Slepak und Hurley, 2008; Artemyev, 2008) (Abb. 3-2).

Die Konzentration von Rac1 in bovinen ROS wurde im semiquantitativen Westernblot relativ zu Rh bestimmt (siehe 3.1.2). Hieraus ergab sich eine molare Konzentration von 1,3 fmol Rac1 zu 136 pmol Rh, was einem molaren Verhältnis von 1:105 (Rac1:Rh) entspricht. Damit ist Rac1 in den Außensegmenten etwa zehnfach niedriger konzentriert als G_T. G_T liegt in ROS im Verhältnis zu Rh 1:10 (G_T:Rh) vor (Pugh und Lamb, 2000).

4.2.2. Solubilisationsprofil

Bei der Solubilisation von ROS-Membranen mit 25 mM CHAPS wurde beobachtet, dass Rac1 nicht vollständig extrahiert werden konnte (siehe 3.1.1). Aus diesem Grund wurde das Solubilisationsverhalten von Rac1 in ROS weiterführend untersucht.
Es zeigte sich, dass Rac1 in bovinen ROS teilweise mit LRs assoziiert war. Der größere Anteil Rac1 ließ sich jedoch mit 0,5% Triton X-100 solubilisieren (siehe 3.2.1). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Befunden von Balasubramanian und Slepak (2003), die bei ähnlicher Isolationsmethode Rac1 nahezu vollständig mit LRs assoziiert fanden. Wie in meiner Arbeit, war das von ihnen beobachtete Verteilungsmuster von Rac1 lichtunabhängig (siehe 3.2.1 und Balasubramanian und Slepak, 2003). Wodurch die Unterschiede zustande kamen, ist unklar. Zu bemerken ist, dass Rac1 laut Literatur nur nach Aktivierung in LRs transloziert (Fujitani *et al.*, 2005, Grande-Garcia *et al.*, 2005; Moissoglu *et al.*, 2014). Es ist davon auszugehen, dass nicht 100% der Rac1-Proteine gleichzeitig aktiv sind, d.h. auch

nicht 100% des Rac1-Pools mit LRs assoziiert ist. Demnach ist das in dieser Arbeit gezeigte Verteilungsmuster konsistent mit den bisherigen Erkenntnissen. Da Photorezeptoren hoch spezialisierte Zellen sind, ist trotzdem in Betracht zu ziehen, dass Rac1 hier ein abweichendes Verhalten zeigt.

In der Extraktionsreihe mit Triton X-100 und DM verhielt sich Rac1 ähnlich wie die bGC1 und blieb bei der Inkubation mit Triton X-100 zunächst unlöslich. Ebenfalls konnte es erst mit DM und 1 M NaCl extrahiert werden. (siehe 3.2.2). Das Solubilsiationsverhalten der bGC1 war wie erwartet und stimmt mit der Literatur überein (Koch, 1991). Die GC1 ist in Photorezeptorzellen mit dem Axonem und dem Zytoskelett assoziiert (Fleischman und Denisevich, 1979; Koch, 1991). Das ähnliche Solubilisationsmuster impliziert für Rac1 eine ähnliche Interaktion.

Interessant ist, dass Rac1 bei der LR-Isolation mit 0,5% Triton X-100 und 4°C teilweise solubilisierte und bei extremeren Extraktionsbedingungen mit 5% Triton X-100 und 4°C hingegen vollständig unlöslich blieb. Neben der Triton X-100-Konzentration waren bei diesen Solubilisationsvorgängen auch die Salzkonzentrationen unterschiedlich. Bei der Solubilisation mit 5% Triton X-100 wurde in einem salzlosen HEPES-Puffer gearbeitet. Bei der LR-Isolation hingegen war die Ionenkonzentration mit 20 mM KCl, 0,4 mM $MgCl_2$ und 1 mM $CaCl_2$ im Solubilisationspuffer höher. Für die Membranlokalisation von Rac1 ist nicht nur die C-terminale Prenylierung wichtig, sondern auch die ebenfalls C-terminal gelegene polybasische Region spielt eine Rolle (siehe 1.1.4), allerdings zum Teil auch bei der Bindung von Effektorproteinen (Lahm und Hordijk, 2013). Es ist also wahrscheinlich, dass eine erhöhte Ionenkonzentration dazu beiträgt, dass Lipid-Protein- oder Protein-Protein-Interaktionen mit der polybasischen Region durch hohe Salzkonzentrationen aufgehoben werden, was die Solubilisation von Rac1 begünstigt. Dafür spricht auch, dass Rac1 mit DM und 1 M NaCl bereits bei der ersten Extraktion vollständig solubilisiert werden konnte. Ebenso zeigte Rac1, wie bereits erwähnt, mit CHAPS und sehr wenig Salz (1 mM $CaCl_2$, 1mM $MnCl_2$) eine deutlich bessere Löslichkeit als mit 5% nicht-ionischem Triton X-100 und ohne Salz. Bei CHAPS handelt es sich um ein zwitterionisches Detergens, d.h. es kann sowohl Membranlipide substituieren, als auch die polybasische Region blockieren. Zu überprüfen wäre, ob Rac1 mit 20 mM DM (wie Triton X-100 ein nicht-ionisches Detergens) und ohne Salz membranassoziiert bleibt.

4.2.3. Lichtabhängige Aktivierbarkeit

Sowohl *in vitro* in bovinen ROS als auch *in vivo* in murinen Retinen zeigt Rac1 eine lichtabhängige Aktivität (Balasubramanian und Slepak, 2003; Belmonte *et al.*, 2006). Um zu untersuchen, ob bei der Aktivierung von Rac1 in bovinen ROS z.B. die Belichtungsdauer

einen Einfluss hat oder eine Kompetition mit G_T vorliegt, habe ich in dieser Arbeit versucht in Anlehnung an das von Balasubramanian und Slepak (2003) durchgeführte Protokoll einen Aktivitätsassay für Rac1 zu etablieren. Leider konnten die Erkenntnisse von Balsubramanian und Slepak (2003) mit diesem methodischen Ansatz nicht überzeugend bestätig werden, da ein großes Problem mit Kontaminationen durch ROS-Membranen vorlag (siehe 3.3). Um weiterführende Experimente durchführen zu können, ist es also notwendig zunächst die Methode zu optimieren.

Unter Umständen könnten Kontaminationen mit Membranpartikeln vermieden werden, indem die Zentrifugationszeit zur Sedimentation der ROS-Membranen erhöht wird. In dieser Arbeit wurden die Proben nach Solubilisation allerdings bereits bis zu 60 min bei 125.000 xg zentrifugiert, ohne die Kontamination vollständig vermeiden zu können. Es ist fraglich ob eine weitere Verlängerung der Zentrifugationsdauer eine Verbesserung mit sich bringen würde, zumal der Rac1·GTP-Komplex eher transient ist. Die Bindung der PAK-PBD hemmt die Dissoziation des GTP. Demnach könnte das aktive Rac1 sicherlich stabilisiert werden, wenn GST-PAK-PBD dem Ansatz, wie von Balasubramanian und Slepak (2003) beschrieben, als lösliches Protein bereits bei der Solubilisation der ROS zugefügt würde. Im Anschluss könnte das aktive Rac1 als Kopräziptat mit GST-PAK-PBD mit Gluthation-Sepharose gefischt werden.

Es ist anzumerken, dass im Zuge dieser Arbeit einige Optimierungsversuche durchgeführt wurden (anderes Detergenz, verändertes Ansatzvolumen etc.). Leider war die Qualität des monoklonalen kommerziellen anti-Rac1 Antikörpers nicht zuverlässig (trotz Reklamation beim Hersteller), sodass diese Experimente ohne klare Ergebnisse blieben.

4.2.4. Interaktion mit Rhodopsin

Um die Interaktion zwischen Rh und Rac1 zu untersuchen, wurden SPR-spektroskopische Experimente durchgeführt. Rh und hRac1 zeigten eine eindeutige Interaktion, die licht-unabhängig war (siehe 3.6). Die erhaltenen Ergebnisse stimmen also mit denen von Balasubramanian und Slepak (2003) überein. Anders als für die Interaktion von G_T und Rh* gezeigt (Komolov *et al*., 2006), ließ sich hRac1 durch die Injektion von GTPγS nicht eluieren. Dies spricht dafür, dass Rac1 durch die Interaktion mit Rh oder Rh* nicht direkt aktiviert wurde.

Die kinetische Auswertung der Daten ergab, dass die Interaktion zwischen Rac1 und Rh von mittlerer Affinität ist. Im Vergleich mit G_T (K_D=(360±60) nM mit Rh, K_D=(1,8±0,7) nM mit Rh*, Dell'Orco und Koch, 2011) hat Rac1 zu dunkel-adaptiertem Rh eine 3,5-fach niedrigere Affinität. Bei Belichtung ändert sich die Kinetik der Interaktion zwischen G_T und Rh stark. Die Dissoziation von GTP-freiem G_T wird deutlich langsamer, anders als bei Rac1. Hier sind die

Kinetik der Bindung an Rh* und der nachfolgenden Dissoziation, wie bereits erwähnt, mit der Interaktion mit Rh vergleichbar (siehe 3.6.2). Somit ist die Interaktion von G_T (ohne GTP) und Rh* sogar ca. 1000-fach stärker als die Interaktion Rh*/Rac1.

Der 1D4-Antikörper bindet Rh am C-Terminus. Geht man davon aus, dass Rh als Monomer an den Antikörper gebunden vorliegt, ist nicht anzunehmen, dass Rac1 ebenfalls C-terminal mit Rh interagiert. Andererseits ist es auch möglich, dass Rh als Dimer oder Oligomer bindet, d.h. auf der Chipoberfläche durchaus freie C-Termini zur Verfügung stehen, zumal auch G_T C-terminal an Rh bindet und die Interaktion durch die Immobilisierungsstrategie nicht beeinflusst wird (Komolov *et al.*, 2010). Außerdem kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Bedingungen auf der Chipoberfläche die Kinetik von Rac1 verändert haben, weshalb, wie bereits erwähnt, apparente Assoziations- und Dissoziationsraten bestimmt wurden. Ein weiterer Faktor, der die Experimente beeinflusst haben könnte, ist die fehlende Prenylierung des rekombinanten hRac1 (siehe 4.1.1). Eine zusätzliche hydrophobe Komponente, könnte die Interaktion mit Rh ändern. Da, wie bereits erwähnt, die Geranylgeranylierung auch eine Rolle bei der GTP-Beladung von Rac1 zu spielen scheint (siehe 4.1.1), ist es möglich, dass durch die fehlende posttranslationale Modifikation Rac1 GTPγS nicht bindet und deswegen nicht von Rh eluieren konnte, obwohl es in prenylierter Form gegebenenfalls aktiviert.

4.2.5. Kompetition mit Transducin

Die Interaktion von Rac1 mit Rh wirft die Frage auf, ob möglicherweise eine Kompetition mit G_T um Rh vorliegen könnte. SPR-spektroskopische Experimente mit Rac1 und G_T deuten an, dass die beiden G-Proteine tatsächlich um Rh konkurrieren (siehe 3.6.3). Dass es sich hierbei tatsächlich um eine Kompetition, d.h. um eine reversible Blockierung der G_T/Rh-Interaktion durch Rac1, handeln könnte, zeigte sich darin, dass durch eine Erhöhung der injizierten Konzentration G_T wieder an Rh binden konnte. Die deutlich stärkere Affinität von G_T für Rh wurde dadurch offensichtlich, dass, um Rac1 zu verdrängen, für G_T nur ca. ein Viertel der eingesetzten hRac1-Konzentration (2,4 µM G_T vs. 10 µM Rac1) injiziert werden musste.
Wie bereits erwähnt, sind die Ergebnisse dieser Experimente als Tendenz einzuordnen. Die Gründe hierfür wurden bereits in 3.6.3 diskutiert.

Um die theoretischen Bedingungen der putativen Kompetition von Rac1 und G_T um Rh festzustellen, hat Dr. Daniele Dell'Orco (Universität Verona, Italien) auf Grundlage der kinetischen Daten für die Bindung von G_T und Rac1 an Rh eine *in silico*-Simulation durchgeführt (Abb. 4-1).

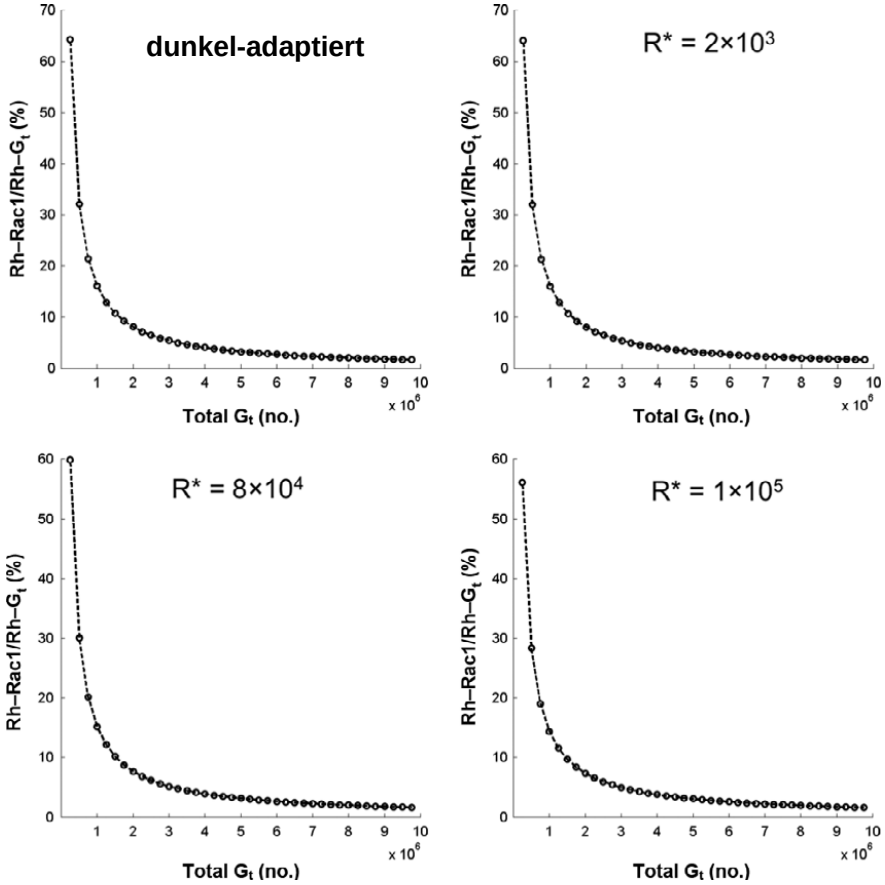


Abb. 4-1: Kompetition zwischen Rac1 und Transducin um Rhodopsin. Modifiziert nach Köster et al. (2014). Die Kompetition zwischen Rac1 und G_T wurde auf Grundlage der kinetischen Daten der Interaktion mit Rh simuliert. Angegeben ist der Anteil von Rac1/Rh-Komplexen relativ zu den gebildeten G_T/Rh-Komplexen in Abhängigkeit von der Anzahl der G_T-Moleküle. Es wurde eine Simulation für dunkel-daptiertes Rh und mit kurzen Lichtstimuli aktiviertes Rh (R*, 2.000, 80.000 oder 100.000 Moleküle) durchgeführt

Hierbei wurde die Bindung von Rac1 und G_T in einem Zeitrahmen von 5 s simuliert. Die anfängliche Menge an G_T konnte von 100-10^7 Molekülen variieren. Die Simulation wurde für dunkel-adaptiertes Rh und unterschiedlich stark aktiviertes Rh ($2 \cdot 10^3$-$1 \cdot 10^5$ Moleküle Rh*) durchgeführt. Es zeigte sich, dass Rac1 in Anwesenheit von G_T nur an Rh binden kann, wenn die Zahl der G_T-Moleküle $<10^6$ ist und selbst dann liegt der Anteil der Rac/Rh-Komplexe lediglich bei 10% der gleichzeitig ausgebildeten G_T/Rh-Komplexe (Köster et al., 2014). Diese Situation wird nur erreicht, wenn G_T ins Innensegment abwandert, also bei hohen Lichtintensitäten und/ oder langen Belichtungszeiten. Der Belichtungszustand von Rh an sich scheint die Kompetition von G_T und Rac1 jedoch nicht zu beeinflussen (Köster et al., 2014).

4.2.6. Fazit

Da G_T, wie mehrfach erwähnt, jenes G-Protein ist, welches klassischerweise durch Rh aktiviert wird und nicht Rac1, macht es Sinn, die Eigenschaften von Rac1 in Photorezeptorzellen mit G_T zu vergleichen.

In der bovinen Retina lässt sich Rac1 in fast allen Schichten detektieren. In den Stäbchen konnte es sowohl in den Außen- als auch Innensegmenten nachgewiesen werden (siehe 3.1.1). G_T hingegen ist im Dunkelzustand ausschließlich in den Photorezeptoraußensegmenten zu finden. Erst bei Belichtung wandert es im Zuge der Lichtadaptation des Auges ins Innensegment ab. Das Verteilungsmuster von Rac1 dagegen war lichtunabhängig (siehe 3.1.1).

Wie G_T interagiert auch Rac1 mit Rh. G_T hat dabei allerdings eine deutlich höhere Affinität für Rh (siehe 3.6.1 und 4.2.4). Während G_T bei Belichtung durch diese Interaktion aktiviert wird und sich dabei die Kinetik dahingehend verändert, dass GTP-freies G_T deutlich langsamer von Rh dissoziiert, ist die Bindung von Rac1 unabhängig vom Belichtungszustand des Rh (siehe 3.6.2). Obwohl Rac1 in belichteten Photorezeptoren ebenfalls eine gesteigerte Aktivität zeigt, wird es dabei scheinbar nicht direkt durch Rh aktiviert (siehe 3.6.2 und 4.2.4). Der Mechanismus der lichtinduzierten Aktivierung von Rac1 in Photorezeptoren bleibt also weiterhin unklar.

SPR-spektroskopische Experimente lieferten Hinweise darauf, dass Rac1 und G_T um Rh konkurrieren (siehe 3.6.3). Aus der Simulation der Kompetition zwischen Rac1 und G_T anhand der kinetischen Daten der Interaktionen mit Rh lässt sich jedoch schließen, dass Rac1 augenscheinlich nicht in die Regulation der Phototransduktion eingreifen kann (siehe 4.2.5). Aufgrund der lichtabhängigen Aktivierbarkeit von Rac1 in ROS, ist trotzdem davon auszugehen, dass die Interaktion mit Rh eine physiologische Bedeutung hat. Vermutlich spielt sie allerdings eher eine Rolle in Prozessen die langsamer sind als die Phototransduktion wie z.B. die O_2^- Produktion durch die NADPH-Oxidase (siehe 1.1.4 und 1.3.4). Des Weiteren wurde Rac1 eine Beteiligung beim post-Golgi Transport von Rh in Rh-tragenden Vesikeln (*Rh-bearing transport carriers*, RTCs) zugeordnet (Deretic *et al.*, 2004). Unklar ist jedoch an welchem Mechanismus Rac1 beteiligt ist, d.h. welche Auswirkung die Aktivität der kleinen GTPase in diesem Vorgang hat (Deretic *et al.*, 2004). Da Rac1 bei intensiver Belichtung und gesteigerter Aktivität ein pro-apoptotischer Effekt in Photorezeptoren hat (siehe 1.3.4), ist zu vermuten, dass übermäßig aktives Rac1 in diesem Zusammenhang den Transportvorgang eher stört.

4.3. Das rekombinante hPAK1

4.3.1. Klonierung

Die Sequenzanalyse des Konstrukts pET30a(+) hPAK1 ergab, dass sich in dem klonierten Gen zwei Punktmutationen befanden (bp 1201 und 1546), die zu den Aminosäureaustauschen G401S und L516I führen. Diese Mutationen waren bereits im Ausgangsplasmid enthalten und sind nicht während der PCR zur Genamplifikation aufgetreten (siehe 3.7.1). Die Mutation L516I ist im Plasmid pCMV6M hPAK1 bereits bekannt und seit ca. 1995 vorhanden (www.addgene.org, Eintrag #12209). Es wird davon ausgegangen, dass sie die Funktion von hPAK1 nicht beeinträchtigt (www.addgene.org, Eintrag #12209). Die Mutation G401S ist in der Literatur bisher nicht erwähnt.

4.3.2. Expression und Reinigung

hPAK1 wurde mit einem N-terminalen Polyhistidin (His_6)-Tag heterolog in *E. coli* exprimiert. Dass die Expression in *E. coli* so unproblematisch verlief, war erstaunlich, da die Synthese von PAK1 für die Bakterien eigentlich letal ist und zur Lyse führt (Buchwald *et al.*, 2001 und persönliche Mitteilung von W. Säftel, Universität Oldenburg). Aus diesem Grund haben Buchwald *et al.* (2001) z.B. die Mutante PAK1(L404S) (in Ratte, entspricht hPAK1(L405S)) exprimiert. Der Austausch von Leucin und Serin führt an dieser Stelle vermutlich zur Repositionierung des Aktivierungsloops und der katalytisch wichtigen Aminosäure D389 (in hPAK1) (Buchwald *et al.*, 2001). Das in dieser Arbeit exprimierte His_6-hPAK1 trug eine ähnliche Mutation, nämlich G401S (siehe 3.7.1 und 4.3.1). Es lässt sich jedoch ausschließen, dass diese auch einen ähnlichen protektiven Effekt aufwies. Werner Säftel (Universität Oldenburg) hatte in Vorversuchen zu dieser Arbeit das gleiche Gen in *E. coli* exprimiert. Er nutzte hierfür allerdings einen anderen Vektor und ließ die Zellen hPAK1 ohne His_6-Tag synthetisieren. Nach Induktion der Expression mit IPTG war zunehmend die Lyse der Zellen zu beobachten. Es entstand ein viskoser Schleim, der nicht zur Reinigung genutzt werden konnte (persönliche Mitteilung von W. Säftel, Universität Oldenburg). Es ist also eher wahrscheinlich, dass entweder die Expression im pET30a(+)-Vektor und/ oder *E. coli* BL21 Rosetta oder der His_6-Tag dazu führten, dass die Bakterien in diesem Fall vital blieben.

Interessanterweise lief His_6-hPAK1 in der SDS-PAGE zwischen 75 und 100 kDa (z.B. Abb. 3-17). Die theoretische Molmasse des hPAK1 Monomers liegt allerdings bei ca. 60 kDa. Obwohl bekannt ist, dass bei der SDS-PAGE lediglich apparente Molmassen bestimmt werden, zeigte das rekombinante Protein auch im Vergleich mit dem nativen PAK1 eine stark reduzierte elektrophoretische Mobilität. Das native PAK1 war entsprechend der theoretischen Molmasse im Westernblot zwischen 75 und 50 kDa zu detektieren (Abb. 3-23,

rechts). Naheliegend ist, dass der Laufunterschied von nativem und rekombinantem PAK1 durch den basischen His_6-Tag am rekombinanten Protein verursacht wurde.

Um auszuschließen, dass der His_6-Tag die Eigenschaften von hPAK1 weitergehend beeinflusste, wurde versucht diesen über einen Verdau mit der Enterokinase zu entfernen. hPak1 sollte durch diese Protease theoretisch nicht verdaut werden. Nach Inkubation mit der Enterokinase im Testverdau tauchten jedoch mindestens vier Proteinfragmente auf, die alle vom anti-PAK1-Antikörper erkannt wurden (Abb. 3-18 und 3-21, C). Das größte der vier Fragmente lief in der SDS-PAGE auf einer Höhe von ca. 75 kDa und zwar knapp unterhalb von His_6-hPAK1 (Abb. 3-19). Da dies auch die prominenteste der vier Banden war, wurde davon ausgegangen, dass es sich hierbei um hPAK1, also die vollständige Kinase ohne His_6-Tag, handelte. Allerdings hatte das nicht-markierte hPAK1 mit einer Laufhöhe von 75 kDa immer noch eine geringere elektrophoretische Mobilität als das native PAK1. Es zeigte sich also, dass der His_6-Tag das Laufverhalten von His_6-hPAK1 zwar beeinflusst hatte, aber nicht die einzige Ursache für den Laufunterschied zum nativen Protein war (siehe oben). Bis auf eine Acetylierung und zahlreiche Phosphorylierungen sind für hPAK1 keine posttranslationalen Modifikationen bekannt. Sowohl die Phosphorylierungen, als auch die Acetylierung würden die elektrophoretische Mobilität eines Proteins aufgrund der zusätzlichen negativen Ladung vermutlich eher steigern. Die zwei Aminosäureaustausche G401S und L516I könnten, die Konformation von hPAK1 beeinflussen und zwar dahingehend, dass es weniger kompakt wird, was das veränderte Laufverhalten in der SDS-PAGE erklären könnte.

4.3.3. Dimerisierung

Im inaktiven Zustand liegt PAK1 als Homodimer vor, welches im Aktivierungsprozess in zwei aktive Monomere dissoziiert (siehe 1.2.2). Um sicherzustellen, dass auch das rekombinante His_6-hPAK1 als Dimer vorlag, sollte der Dimerisierungszustand des Proteins überprüft werden. Hierfür wurden zwei Methoden ausgetestet (native PAGE und analytische SEC), jedoch beide ohne Erfolg. Sowohl in der nativen PAGE als auch bei der analytischen SEC korrelierten die eingesetzte Menge His_6-hPAK1 nicht mit dem beobachteten Signal (siehe 3.8). Es wird vermutet, dass His_6-hPAK1 präzipitierte und aus diesem Grund nicht in das native Polyacrylamidgel einwanderte bzw. nicht von der SEC-Säule eluierte. Hinweis hierfür gibt z.B. der in Abb. 3-20, C gezeigte Westernblot. In diesem Fall waren starke Signale weit oberhalb der 100 kDa-Bande des Proteinstandards zu erkennen. Da diese Signale durch die Bindung eines spezifischen Antikörpers erzeugt wurden, musste es sich hierbei um (His_6)-hPAK1 handeln.

Im Kinaseaktivitätsassay wurde festgestellt, dass die rekombinanten Proteine His_6-hPAK1 und hPAK1 konstitutiv aktiv waren (siehe 3.10.1 und 4.3.4). Da aktive PAKs als Monomere agieren, ist anzunehmen, dass bei den rekombinanten Proteinen keine Dimerisierung stattfindet. Im Zuge der normalen Aktivierung von Gruppe I PAKs kommt es zur Autophosphorylierung an Schlüsselpositionen wie z.B. Thr423 und Ser144. Die Phosphorylierung dieser Aminosäuren sorgt unter anderem dafür, dass aktivierte PAKs nicht wieder dimerisieren. Da auch His_6-hPAK1 und das nicht His_6-markierte hPAK1 im Kinaseaktivitätsassay eine Autophosphorylierung zeigten (siehe 3.10.1), könnte die Untersuchung von Thr423 und Ser144 im Westernblot mit Antikörpern, die die Phosphorylierung an diesen Positionen erkennen (z.B. von *Sigma* oder *AAT Bioquest*), eindeutige Hinweise auf den Dimerisierungszustand des rekombinanten Proteins liefern.

4.3.4. Generelle Aktivität

Im Kinaseaktivitätsassay zeigte sich, dass His_6-hPAK1 auch ohne Zugabe von Rac1(G12V) als Aktivator aktiv war und MBP sowie sich selbst phosphorylieren konnte (siehe 3.10.1). Da hPAK1 das gleiche Verhalten zeigte, ist zunächst davon auszugehen, dass diese konstitutive Aktivität nicht durch den His_6-Tag verursacht wurde. PAK-Proteine können allerdings auch durch Proteolyse aktiviert werden (Zhao und Manser, 2005), d.h. es wäre theoretisch denkbar, dass für His_6-hPAK1 der Tag die Aktivität hervorrief und im Fall des nicht-markierten hPAK1 der proteolytische Verdau durch die Enterokinase als aktivierender Stimulus wirkte. Aufgrund des Aktivierungsmechanismus der Gruppe I PAKs, ist anzunehmen, dass ein recht großer Teil des regulatorischen N-Terminus hätte abgespalten werden müssen. Die mit der Kinasedomäne interagierenden Aminosäuren im N-Terminus von hPAK1 erstrecken sich bis Position L128 (Lei *et al.*, 2000). Dieser Abschnitt würde als Fragment ungefähr einer Größe von 13 kDa entsprechen, was noch knapp innerhalb der im Coomassiegel detektierbaren Größe liegt. Ein entsprechendes Fragment war weder mit SDS-PAGE, noch im Westernblot, noch im Autoradiogramm zu erkennen. Nicht klar ist, ob alle im Autoradigramm erkennbaren hPAK1-Fragmente katalytisch aktiv waren. Möglich ist auch, dass z.B. nur das 50 kDa-Fragment, welches die stärkste Autophosphorylierung zeigte (Abb. 3-24) aktiv war, und dabei die größeren Fragmente phosphorylierte.

Da (His_6)-hpAK1 wie bereits erwähnt zwei Mutationen in der Kinasedomäne trägt (G401S und L516I), könnten diese Veränderungen in der Primärsequenz Ursache für die konstitutive Aktivität von (His_6)-hPAK1 sein. Die Kinasedomäne der katalytisch inaktiven Mutante hPAK1(R299K) ist im Bändermodell in Abb. 4-2 gezeigt.

Bei Leucin und Isoleucin handelt es sich um zwei unpolare Aminosäuren, die sich auch in ihren sterischen Eigenschaften recht ähnlich sind. Daher nehme ich an, dass dieser

Austausch an der Position 516, wenn überhaupt, nur einen geringen Beitrag zur konstitutiven Aktivität leistet. Wie in 4.3.1 erwähnt, ist die Mutation L516I in hPAK1 bereits bekannt und hat vermutlich keinen Effekt auf die Funktion der Kinase.
Der Austausch G401S ist dagegen dramatischer. Hier wurde die kleinste Aminosäure Glycin gegen das deutlich größere und zusätzlich auch noch polare Serin ausgetauscht. Obwohl G401 nicht im Aktivierungsloop (aa 416-425)* liegt (Abb. 4-2), keine wichtige katalytische Seitenkette darstellt (R299, E315, D389 und D407)* und auch nicht zu den Aminosäuren gehört welche mit der AID interagieren (7 aa im Bereich von V436-L472)* (*Lei *et al.*, 2000), könnte die Mutation starke sterische Konsequenzen haben. Zum einen ist Serin, wie bereits erwähnt, größer als Glycin, d.h. die Seitenkette nimmt also mehr Raum ein. Des Weiteren könnte Serin als polare Aminosäure in Wechselwirkung mit anderen polaren oder geladenen Aminosäuren treten und z.B. Wasserstoffbrücken ausbilden, die im WT nicht vorhanden sind und die Tertiärstruktur des Proteins beeinflussen könnten. Da es sich bei den PAKs um Ser/Thr-Kinasen handelte, wäre es ebenfalls möglich, dass 401S eine zusätzliche Autophosphorylierungsstelle sein könnte. Diese Faktoren können durch intramolekulare Verschiebungen die zur Inaktivierung, Aktivierung und Aktivität wichtigen Strukturen in hPAK1 sterisch beeinflussen. Exakt dieser Effekt ist für die Mutante rPAK1(L404S) beschrieben (siehe 4.3.2). Wie oben erwähnt, hat die Mutation den Effekt, dass rPAK1 in *E. coli* exprimiert werden kann, ohne dass es zur Lyse der Zellen kommt. Anders als hPAK1(G401S) zeigt rPAK1(L404S) jedoch keine konstitutive Aktivität, sondern eine Cdc42-abhängige Aktivierung, wenn auch im Vergleich mit dem WT in reduziertem Ausmaß (Buchwald *et al.*, 2001). Ein Sequenzvergleich von hPAK1 und rPAK1 ergab, dass die beiden Proteine zu 99% identisch sind. Speziesunterschiede als Ursache für die unterschiedlichen Effekte der beiden Mutationen können also nicht gänzlich ausgeschlossen werden, sind aber sehr unwahrscheinlich.

Wie bereits erwähnt, war die Mutation G401S in hPAK1 bisher nicht bekannt und wurde aus diesem Grund auch noch nicht charakterisiert. Sie könnte in Zukunft eine Alternative zu den geläufigen konstitutiv aktiven Mutanten hPAK1(T423E) und hPAK1(L107F) darstellen. Diese tragen beide Mutationen in wichtigen Protein-Regionen, nämlich dem Aktivierungsloop (hPAK1(T423E)) und der PBD (hPAK1(L107F)).

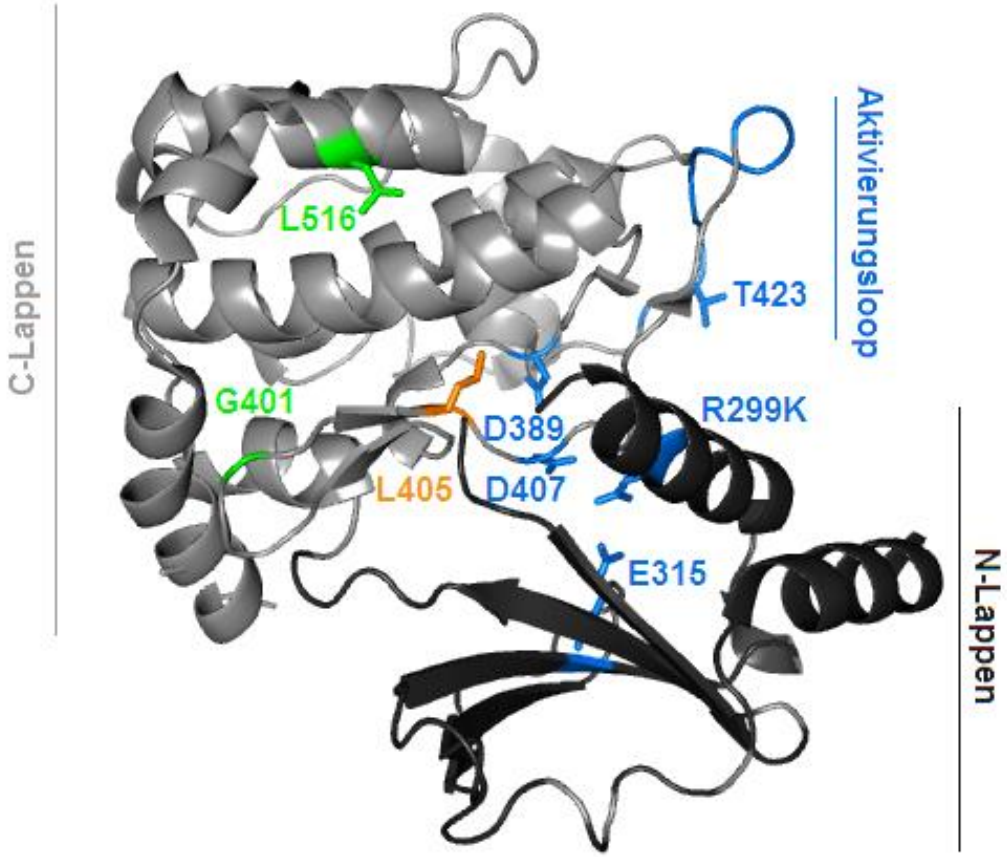


Abb. 4-2: Kinasedomäne von hPAK1(K299R) im Bändermodell (PDB-Eintrag 1YHW). Die Kinasedomäne von hPAK1 K299R ist im Bändermodell dargestellt. Der N-terminale und der C-terminale Lappen sind dunkelgrau und hellgrau dargestellt. Der Aktivierungsloop ist in blau eingefärbt ebenso wie katalytisch wichtige Aminosäuren. Dies sind R299, E315, D389 und D407 (Lei *et al.*, 2000). Die beiden in His_6-hPAK1 mutierten Positionen G401 und L516 sind in grün dargestellt. Des Weiteren ist die Position L405 (analoge Position zu L404 in Ratte) markiert (*orange*).

4.4. PAK1 in Photorezeptorzellen

4.4.1. Lokalisation in der bovinen Retina

Die Lokalisation von PAK1 in der bovinen Retina wurde durch die immunhistochemische Färbung von retinalen Kryogewebeschnitten und Westernblotanalysen verschiedener retinaler Präparationen getestet (siehe 3.9). Das hierbei beobachtete Expressionsmuster entspricht der Verteilung von PAK1 wie sie in der murinen Retina gezeigt wurde (Belmonte *et al.*, 2006).

Unerwartet war die Detektion von PAK1 in der Detergens-unlöslichen Fraktion nach der Behandlung von ROS mit dem zwitterionischen Detergens CHAPS (Abb. 3-23, rechts, Spur Rh/P). PAK ist ein zytosolisches Protein, welches in keinem direkten Kontakt mit der Plasmamembran steht. Es kann jedoch z.B. durch die Interaktion mit Rac/Cdc42 oder

Adapterproteinen wie Nck oder Grb2 an die Membran rekrutiert werden (Bokoch *et al.*, 1996; Puto *et al*. 2003). Möglich wäre, dass der gebildete Proteinkomplex gegenüber CHAPS resistent ist und PAK1 deshalb nach Extraktion mit dem Detergens im unlöslichen Pellet enthalten war. Das denaturierende SDS und das Aufkochen der Probe bei 95°C würden diesen Komplex jedoch auflösen, sodass PAK1 in der unlöslichen Fraktion im SDS-Gel die gleiche elektrophoretische Mobilität zeigte wie in der löslichen Fraktion.

4.4.2. Phosphorylierung von Proteinen im Stäbchenaußensegment

Der Effekt von His_6-hPAK auf lösliche und unlösliche ROS-Proteine wurde im Kinaseaktivitätsassay getestet (siehe 3.10.2).
Es wurde überzeugend gezeigt, dass His_6-hPAK1 mit unlöslichen ROS-Proteinen und HEK-Membranen durch endogene membran-assoziierte Phosphatasen deaktiviert wurde. In Anwesenheit von aktivem His_6-hPAK1 tauchte im Autoradiogramm ein zusätzliches Signal in der Höhe von ca. 20 kDa auf. Die zugehörige Bande im SDS-Gel wurde isoliert und massenspektrometrisch untersucht (siehe unten). Da PAK1 durchaus auch einen pro-apoptotischen Effekt haben kann (Arias-Romero und Chernoff, 2008), ist es für Zellen vermutlich äußerst wichtig die Aktivität von PAK1 genau zu regulieren, was die effektive Deaktivierung des eigentlich konstitutiv aktiven His_6-hPAK1 erklären kann.

Interessanterweise hatte phosphoryliertes His_6-hPAK1 in Anwesenheit von ROS-Proteinen (löslich und unlöslich mit PIC3) eine höhere elektrophoretische Mobilität als ohne ROS-Proteine (Abb. 3-25, 3-27 und 3-29, oben). Da bei gleicher Menge His_6-hPAK1 mit ROS-Proteinen zusätzlich auch die Signalstärke im Autoradiogramm zunahm (Abb. 3-25 und 3-29, oben), ist davon auszugehen, dass eine erhöhte Phosphorylierung von His_6-hPAK1 vorlag. Dies erklärt auch das veränderte Laufverhalten von His_6-hPAK1 in der SDS-PAGE. Nicht ganz klar ist, ob die ROS-Proteine die Autophosphorylierung von His_6-hPAK1 gesteigert haben oder ob vielleicht native Kinasen wie die PDK1 (siehe 1.2.2) zur Phosphorylierung und vermutlich weiteren Aktivierung von His_6-hPAK1 beitrugen.
Um herauszufinden welches Protein bzw. welche Proteine in ROS-Membranen durch His_6-hPAK1 phosphoryliert wurden (siehe oben), wurde die entsprechende Bande aus dem Polyacrylamidgel isoliert und massenspektrometrisch analysiert. Bei der MS/MS- als auch der LC/MS-Analyse wurden sehr viele Proteinfragmente gefunden, die zu einer Vielzahl von potentiell phosphorylierten Proteinen führten (siehe 3.10.2.4 und 6.7). Bei einem Großteil handelte es sich jedoch um Proteine, die in subzellulären Organellen (ER, Mitochondrien, Lysosomen etc.) oder dem Zellkern lokalisiert sind. Im Fall von Photorezeptorzellen bedeutet dies, dass diese Proteine aus dem Innensegment stammten, also eine Kontamination darstellten. Dies ist nicht gänzlich unerwartet. So ist z.B. bekannt, dass beim Schütteln von

Retinen, um die Außensegmente am Zilium abzutrennen, drei Spezies von ROS entstehen: 1) ROS, die sich nach dem Abreißen, nicht wieder geschlossen haben („*leaky*“ ROS), 2) intakte, geschlossene ROS und 3) ROS, die noch mit dem Ellipsoid des Innensegments verbunden sind (Biernbaum und Bownds, 1985). Koch *et al*. (1994) haben beschrieben, dass bei der grob gereinigten Präparation von ROS („*crude*“ ROS), so wie sie auch in meiner Arbeit durchgeführt wurde, zwei dieser drei ROS-Spezies zu finden sind: 1) intakte, geschlossene ROS („*pure*“ ROS, pROS) und 2) ROS verbunden mit dem Ellipsoid des Innensegments (ROS-eRIS). Die Anwesenheit des Zellkörpers, sowie die Anwesenheit intakter Innensegmente wurden ausgeschlossen (Koch *et al*., 1994). Die Kontamination mit Bipolarzellen wurde ebenfalls ausgeschlossen (Abwesenheit der Proteinkinase C) (Koch *et al*., 1994). Dies erklärt vor allem die Anwesenheit der mitochondrialen Proteine bei den MS-Analysen. Das Auftreten von nukleären Proteinen und ER-Proteinen ist demnach jedoch immer noch unschlüssig. Zu beachten ist allerdings, dass LC/MS eine sehr sensitive Methode ist und dadurch Proteine aus der SDS-PAGE im unteren ng-Bereich detektiert werden können. Es ist also nicht vollständig auszuschließen, dass die grobe ROS-Präparation nicht doch weitere Innensegmentbestandteile enthält. Und zwar in sehr geringen Mengen, die unterhalb der Detektionsgrenze der von Koch *et al*. (1994) angewandten Methoden liegen. Z.B. wurden auch Proteine, die im Vergleich der Bandenmuster im Comassiegel der beiden ROS-Spezies zusätzlich nur in ROS-eRIS vorhanden waren mit der sensitiveren Silberfärbung auch im Bandenmuster der pROS nachgewiesen (Koch *et al*., 1994).

Die aus den massenspektrometischen Analysen erhaltenen Daten wurden nach folgenden Kriterien ausgewertet und klassifiziert: 1) subzelluläre Lokalisation im Außensegment, 2) Status als Phosphoprotein und 3) direkte oder indirekte Interaktion mit PAK1. Hierbei wurden drei Proteine identifiziert, die in der ROS-Membranfraktion durch PAK1-Signalwege phosphoryliert werden können, nämlich Cofilin-1, R-MLC und Stathmin (siehe 3.10.2.4). Alle diese Proteine sind in irgendeiner Weise an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt (siehe 3.10.2.4). Da das Zytoskelett auch mit der Disk- oder Plasmamembran assoziiert ist (Horst *et al.*, 1987; Cook *et al*, 1989; Molday *et al*., 1990), ist die Identifizierung dieser zum Teil zytosolischen Proteine in ROS-Membranen nicht überraschend. Die putativen Signalwege auch in Kombination mit Rac1 und die möglichen zellulären Effekte werden in 4.5 diskutiert. Aufgrund der Vielzahl der Daten ist nicht komplett auszuschließen, dass die Detektion dieser Proteine mittels LC/MS nicht auch aus der Innsensegmentkontamination resultiert.

4.4.3. Aktivierung der Guanylatzyklase

Die Aktivierung der bovinen Guanylatzyklasen 1 und 2 (bGC1 und 2) in ROS durch His_6-hPAK1 wurde im GC-Assay untersucht. Da sich, wie bereits in 3.11 erwähnt, ca. 96% der GC-Aktivität in bovinen ROS auf bGC1 zurückführen lassen, wird bGC2 nachfolgend vernachlässigt.

Es ließ sich kein Einfluss von His_6-hPAK1 auf die bGC1 feststellen (siehe 3.11). Als Positivkontrolle sollte bGC1 durch nicht-myristyliertes zGCAP1 (nmzGCAP1) unter Ca^{2+}-freien Bedingungen aktiviert werden. Im Vergleich zu ROS-Membranen ohne Aktivator ließ sich jedoch keine gesteigerte cGMP-Synthese beobachten. Da in Anwesenheit von Ca^{2+} die bGC1 allerdings durch nmzGCAP1 trotzdem deutlich inhibiert wurde, konnte dennoch eine x-fache Aktivierung von 4±1 errechnet werden, was mit dem Literaturwert übereinstimmt (Scholten und Koch, 2011). Beim Waschen der ROS-Membranen während der Assayvorbereitung wurde das Membranpellet nach Zentrifugation nicht resuspendiert, um im Dunkeln den Verlust von Material zu vermeiden und sicherzustellen, dass am Ende des Experiments der Rh-Gehalt der eingesetzten Membransuspension genau berechnet werden konnte. Nun ist es aber möglich, dass aus diesem Grund die löslichen Proteine nicht vollständig entfernt wurden und bGC1 noch endogene GCAPs gebunden hatte. Mit einer 3-fachen Aktivierung der GC ist das bovine GCAP1 (bGCAP1) ein ebenso starker Aktivator wie zGCAP1 (Scholten und Koch, 2011). bGCAP2 übertrifft zGCAP1 mit einer x-fachen Aktivierung von 9 deutlich. Mit EC_{50}-Werten[1] von 0,9 µM* (bGCAP1) und 0,2 µM* (bGCAP2) haben die endogenen GCAPs zusätzlich eine deutlich höhere Affinität zu bGC1 als zGCAP1 (EC_{50}=3,0 µM*, *Scholten und Koch, 2011). Dies bedeutet, dass die bGCAPs den Einfluss von nmzGCAP1 in der Aktivierung von bGC1 vermutlich überdeckt haben. Dennoch hat die Inhibition der bGC1 durch nmzGCAP1 in Anwesenheit von Ca^{2+} funktioniert, wodurch die mit der Literatur übereinstimmende x-fache Aktivierung zustande kam.

Dass kein Effekt von His_6-hPAK1 auf die Aktivität von bGC1 zu beobachten war, kann verschiedene Ursachen haben. Es ist zum einen möglich, dass His_6-hPAK1 die native bGC1 grundsätzlich nicht aktiviert. Speziesbedingte Unterschiede (humanes PAK1 und bovine GC1) sind hierbei auszuschließen, da hPAK1 und bPAK1 zu 99% identisch sind. Ebenso stimmen bGC1 und hGC1 zu 83% und, viel wichtiger, die katalytischen Domänen sogar zu 98% überein (siehe unten).

Wie bGCAP2 interagiert PAK1 mit der katalytischen Domäne (*catalytic cyclase domain*, CCD) der GC1 (Duda *et al.*, 2005; Guo *et al.* 2007). Demnach wäre es denkbar, dass eine Kompetition dieser beiden Proteine um die GC1 vorliegt. Laut Guo *et al.* (2007) sollen PAK1 und PAK2 sehr starke Aktivatoren von GC1 sein. Für aktives PAK2 wurde eine 8-fache

[1] Der EC_{50}-Wert beschreibt die mittlere effiziente Konzentration, d.h. in diesem Fall jene GCAP-Konzentration bei der die Aktivierung der GC halbmaximal ist.

Aktivierung der GC1 ermittelt und für PAK1 ähnliche Werte (Guo *et al.,* 2007). Der EC_{50}-Wert von PAK2 liegt bei 42 nM (Guo *et al.,* 2007), sodass eine 5- bis 21-fach höhere Affinität für GC1 besteht als bei den bGCAPs. Sollte für PAK1 eine ähnliche Affinität vorliegen, wäre zu erwarten, dass in einer Kompetition der Einfluss von His_6-hPAK1 gegenüber bGCAP2 überwiegt. Der EC_{50}-Wert von PAK1 wurde allerdings nicht angegeben und kann sich durchaus von dem Wert für PAK2 unterscheiden, da auch für unterschiedliche GCAP-Isoformen unterschiedliche EC_{50}-Werte ermittelt wurden (Scholten und Koch, 2011). Weiterhin ist auch zu beachten, dass Guo *et al.* bei der Bestimmung der Daten nur die intrazelluläre Domäne der rekombinanten GC1 eingesetzt haben. D.h. die Werte der GCAPs und PAK2 wurden unter verschiedenen Bedingungen ermittelt und sind unter Umständen nicht deckungsgleich. Sollte der Effekt von His_6-hPAK1 durch die endogenen GCAPs überdeckt werden, ist davon auszugehen, dass die Aktivierung der GC1 durch PAKs physiologisch keine Rolle spielt.

4.4.4. Fazit

Die immunhistochemischen und immunchemischen Untersuchungen haben gezeigt, dass PAK1 in den Stäbchenaußensegmenten lokalisiert ist (siehe 3.9 und 4.4.1). Somit ist die Grundvoraussetzung für die PAK-abhängige Aktivierung von GC1 in Photorezeptorzellen erfüllt, nämlich, dass beide Proteine dort auch exprimiert werden. Die GC-Assays haben allerdings gezeigt, dass PAK1 die native GC1 in bovinen ROS zumindest in Anwesenheit der endogenen GCAPs nicht stimulieren konnte (siehe 3.11). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wird eine physiologische Relevanz in Photorezeptorzellen für die von Guo *et al*. (2007) gezeigte Aktivierung membranständiger GCs durch PAK1 ausgeschlossen. Da PAK1 wie bGCAP2 an die CCD von GC1 bindet, vermute ich eine kompetitive Situation zwischen den beiden Proteinen, bei der der Einfluss von bGCAP2 auf bGC1 überwiegt (siehe 4.4.3). Laut Literatur hat PAK2 eine deutlich höhere Affinität für GC1 als bGCAP1 und bGCAP2 (siehe 4.4.3). Außerdem ist nicht bekannt, ob PAK2 ebenfalls mit der CCD von GC1 interagiert oder gegebenenfalls an eine andere Stelle in der Zyklase bindet. Möglicherweise könnte PAK2 die GCAPs in nativen ROS im Gegensatz zu PAK1 verdrängen, sodass ein Rac/PAK/GC-Signalweg in Vertebraten-Photorezptorzellen an dieser Stelle noch nicht vollständig ausgeschlossen werden kann.

4.5. Mögliche Rac1/PAK1-Signalwege in Photorezeptorzellen von Vertebraten

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein Rh/Rac1/PAK1/GC-Signalweg in Signalvorgängen in Photorezeptorzellen nicht beteiligt ist. Für Rac1 und PAK1 müssen somit andere Signalwege in Betracht gezogen werden. Anhaltspunkte hierfür wurden im Kinaseassay bei der Phosphorylierung von ROS-Membranproteinen durch PAK1 erhalten. Aus der Auswertung der umfangreichen Daten der LC/MS-Analyse, wurden drei verschiedene putative Effektorproteine von PAK1 identifiziert: Coflin-1, R-MLC und Stathmin. Hieraus ergeben sich drei mögliche Rac1/PAK1-Signalwege:

1. Rac1→PAK1→LIMK1→Cofilin-1→F-Aktin

Rac1·GTP aktiviert PAK1. PAK1 wiederum phosphoryliert LIMK1, was zu einer Aktivitätssteigerung von LIMK1 führt. Ein Substrat von LIMK1 ist das in der LC/MS-Analyse identifizierte Cofilin-1. Cofilin-1 ist an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt. Die Interaktion mit F-Aktin führt zur Depolymerisation und Destabilisierung der Aktinfilamente, Länger bestehende Aktinfilamente werden durch Cofilin-1 stärker depolymerisiert als neu synthetisiertes F-Aktin, womit es auch eine Rolle bei gerichteten Prozessen wie der Ausbildung von Membranausstülpungen spielt (Weber, 1999). Die Phosphorylierung von Cofilin-1 durch LIMK1 inaktiviert dieses, wodurch die Stabilität von F-Aktin gesteigert wird (Bamburg, 1999; Zhang *et al.*, 2011). Anders könnte man allerdings auch sagen, dass die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts reduziert wird.

2. Rac1→PAK1→MLCK→R-MLC→Aktin/Myosin

Die Aktivierung von PAK1 durch Rac1 kann zur Aktivierung von MLCK und somit zur Phosphorylierung von R-MLC führen. Die phosphorylierte R-MLC bewirkt eine stärkere Interaktion mit Aktin. Hierdurch erhöht sich die Kontraktilität. Alternativ kann R-MLC auch durch PAK2 direkt phosphoryliert werden (Bokoch, 2003).

3. Rac1→PAK1→Stathmin→Mikrotubuli

Stathmin bindet αβ-Tubulin-Dimere, sodass sie der Mikrotubulisynthese nicht mehr zur Verfügung stehen und verhindert somit die Neubildung bzw. Erweiterung von Mikrotubuli (Szczepanowska, 2009). Die Phosphorylierung durch PAK1 führt zur Inaktivierung von Stathmin (Wittmann *et al.*, 2004), was die Dynamik der Mikrotubuli steigert.

Mikroskopische Analysen des Aktin-Zytoskeletts haben gezeigt, dass F-Aktin in Stäbchen von Vertebraten vornehmlich im Innensegment und im Zilium lokalisiert ist, wobei sich Teile des ziliären Axonems (Struktur aus Mikrotubuli) und des Aktin-Zytoskeletts bis ins Außensegment erstrecken und zwar zu der Zone, in der die Diskmorphogenese stattfindet

(Del Priore *et al.*, 1987; Vaughan und Fisher, 1987; Chaitin und Burnside, 1989). Myosine sind Motorproteine, die zum einen eine große Rolle bei der Kontratktilität von Zellen spielen. Dieser Mechanismus ist vermutlich bei der Neubildung von Disks wichtig (Williams, 1991; Wlliams *et al.*, 1992). In Photorezeptoren ist Myosin Vlla allerdings auch an Transportprozessen beteiligt. So wird das Opsin unter anderem mittels Myosin Vlla vom Innensegment durch das Zilium zur Zone der sich neu bildenden Disks transportiert (Williams, 2002).
Zusammenfassend könnten Signalwege, die das Zytoskelett und/ oder Myosine beeinflussen mit großer Wahrscheinlichkeit Effekte auf die Stabilität des ziliären Axonems, Transportvorgänge durch das Zilium oder auf die Diskmorphogenese haben. Zytoskeletale Prozesse sind sowohl räumlich als auch zeitlich genauestens auf entsprechende Anforderungen abgestimmt. Die erhöhte oder reduzierte Dynamik einer beteiligten Komponente (F-Aktin oder Mikrotubuli) könnte in erheblichen Störungen resultieren. In diesem Fall könnte das bedeuten, dass möglicherweise Proteine nicht mehr transportiert werden oder gegebenenfalls fehl-lokalisiert sind. Unter Umständen könnte, wie bereits erwähnt, auch die Neubildung von Disks beeinträchtigt sein.

Es ist nicht auszuschließen, dass mehrere der möglichen Signalwege parallel ablaufen. Dennoch ist auch zu beachten, dass es sich bei dem durchgeführten Kinaseassay um ein *in vitro*-Experiment handelte. D.h. es ist durchaus denkbar, dass, obwohl die Proteine in der LC/MS-Analyse identifiziert und die Regulation der genannten Proteine durch PAK1 möglich ist, diese *in vivo* in Photorezeptorzellen jedoch nicht umgesetzt wird. Auch die Beteiligung von Rac1 bei den beschriebenen Signalwegen ist rein hypothetisch. Die Aktivierung von PAK1 durch Rac1 in Photorezeptoren wurde in dieser Arbeit experimentell nicht überprüft. Möglich ist, dass PAK1 auch durch die Rho-GTPase Cdc42 oder andere Stimuli aktiviert wird (Bokoch, 2003; Szczepanowska, 2009). Ebenfalls könnte Rac1 in Vertebraten-Photorezeptoren unabhängig von PAK1 agieren, z.B. bei der O_2^--Produktion durch die NADPH-Oxidase (Haruta *et al.*, 2008) oder in anderen Signalwegen mit Effektorproteinen, die ebenfalls das Zytoskelett beeinflussen (Takai, 2001).

4.6. Ausblick

Um die Ergebnisse der SPR-spektroskopischen Experimente (Interaktion mit Rh und Kompetition mit G_T), die mit rekombinanten hRac1 durchgeführt wurden, zu bekräftigen, ist es erforderlich die Versuche mit prenyliertem Rac1 zu wiederholen, da sich, wie bereits erwähnt, die fehlende PTM auf das Verhalten von Rac1 ausgewirkt haben könnte. Neben der Immobilisation von Rh über den 1D4-Antikörper, sollte dabei zusätzlich eine weitere

Immobilisationsstrategie für Rh angewendet und die Ergebnisse verglichen werden. Hierfür würde sich z.B. die Bindung von Rh an ConA eignen. ConA bindet an die N-terminalen und extrazellulär gelegenen Zuckerreste des Rh. Stimmen die Daten der beiden Immobilisierungsmethoden nicht überein, würde dies zusätzlich Hinweise auf die Interaktionsstelle von hRac1 in Rh geben.

Zudem ist es erforderlich die Annahme der Kompetition zwischen Rac1 und G_T weiter zu untersuchen bzw. die Ergebnisse der numerischen Simulation im Experiment zu bestätigen. Hierzu könnte z.B. der beschriebene Rac1-Aktivitätsassay genutzt werden (siehe 2.2.26). G_T könnte zunächst durch Waschen der ROS-Membranen entfernt und anschließend in gereinigter Form und in unterschiedlicher Konzentration dem Assay wieder zugefügt werden. Zu erwarten wäre, dass mit zunehmender G_T-Konzentration die Rac1-Aktivierung deutlich abnimmt. Wie in 4.2.3 erwähnt, müsste die Methode jedoch zunächst in ihrer Durchführung optimiert werden. Um Auskunft über die generelle Komplexbildung Rac1/Rh vs. G_T/Rh unabhängig von der Rac1-Aktivierung zu erhalten, könnte ein Pulldown-Assay oder eine Koimmunpräzipitation durchgeführt werden, bei denen, ähnlich wie bei den SPR-spektroskopischen Experimenten, Rh über ConA oder den 1D4-Antikörper an einer Sepharose immobilisiert wird und die Bindung von Rac1 und G_T anschließend im Westernblot nachgewiesen wird.

Um abzusichern, dass ein Effekt von His_6-hPAK1 auf bGC1 nicht durch endogene GCAPs überdeckt wurde, sollten die Experimente also unbedingt erneut mit ROS-Membranen durchgeführt werden, die nach einem erweiterten Protokoll gewaschen wurden. Des Weiteren sollte auch PAK2 als potenter Aktivator in Betracht gezogen und in zukünftigen Experimenten berücksichtigt werden (siehe 4.4.3).

Leider konnte in dieser Arbeit weder die Rolle für Rac1 noch für PAK1 in Photorezeptorzellen aufgeklärt werden. Es gibt Hinweise, dass die Aktivierung von PAK1 klassischerweise das Zytoskelett beeinflussen könnte (siehe 3.10.2.4 und 4.4.2). Ob dies jedoch tatsächlich so umgesetzt wird und wenn ja, welche vorgeschalteten Signalwege existieren (z.B. Aktivierung durch Rac1 oder anderen Stimulus) ist unklar. Um die zellulären Effekte von Rac1 und PAK1 weiter zu untersuchen, könnten z.B. Zelllinien wie Y-79-Zellen (humane Zelllinie mit Eigenschaften von Stäbchen) oder 661W-Zellen (murine Zelllinie mit Eigenschaften von Zapfen) eingesetzt werden. Rac1 und PAK1 sowie die putativ durch PAK1 beeinflussten Proteine Cofilin-1, R-MLC und Stathmin könnten durch den Einsatz von siRNA (*small interfering RNA*) in ihrer Expression vermindert werden und die Effekte auf Zytoskelett, Proteintransport und O_2^--Produktion entsprechend durch adäquate Methoden analysiert werden.

5. LITERATURVERZEICHNIS

AMES JB, LEVAY K, WINGARD JN, LUSIN JD und SLEPAK VZ (2006) *Structural basis for calcium-induced inhibition of rhodopsin kinase by recoverin*, J Biol Chem 281 (48): 37237-45

ARIAS-ROMERO LE und CHERNOFF J (2008) *A tale of two Paks,* Biol Cell 100: 97-108

ARTEMYEV NO (2008) *Light-dependent compartementalization of Transducin in rod photoreceptors*, Mol Neurobio 37: 44-51

BALASUBRAMANIAN N und SLEPAK V (2003) *Light-mediated activation of Rac-1 in photoreceptor outer segments*, Curr Biol 13 (15): 1306-9

BAMBURG JR (1999) *Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics*, Annu Rev Cell Dev Biol 15: 185-230

BERG JM, TYMOCZKO JL und STRYER L (2003) *Biochemie*, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg/ Berlin

BELMONTE MA, SANTOS MF, KIHARA AH, YAN CYI und HAMASSAKI DE (2006) *Light-induced photoreceptor degeneration in the mouse involves activation of the small GTPase Rac1,* Invest Ophthalmol Vis Sci 47 (3): 1193-210

BEST A, AHMED S, KOZMA R und LIM L (1996) *The Ras-related GTPase Rac1 binds tubulin*, J Biol Chem 271: 3756-52

BIERNBAUM MS und BOWNDS MD (1985) *Frog rod outer segments with attached inner segment ellipsoids as an in vitro model for photoreceptors on the retina*, J Gen Physiol 85: 83-105

BOKOCH GM (2000) *Regulation of cell function by Rho Family GTPases*, Immunol Res 21 (2-3):139-48

BOKOCH GM (2003) *Biology of the p21-activated kinases*, Annu Rev Biochem 72: 743-81

BOKOCH GM, WANG Y, BOHL BP, SELLS MA, QUILLIAM LA und KNAUS UG (1996) *Interaction of the Nck adapter protein with p21-activated kinase (PAK1),* J Biol Chem 271: 25746-8

BOSCO EE, MULLOY JC und ZHENG Y (2009) *Rac1 GTPase: A "Rac" of all trades*, Cell Mol Life Sci 66: 370-4

BRADFORD MM (1976) A *rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Anal Biochem 72: 248-54

BRANDT DR und ROSS EM (1985) *GTPase activity of the stimulatory GTP-binding regulatory protein of adenylate cyclase, Gs. Accumulation and turnover of enzyme-nucleotide intermediates*, J Biol Chem 260 (1): 266-62

BUCHWALD G, HOSTINOVA E, RUDOLPH MG, KRAEMER A, SICKMANN A, MEYER HE, SCHEFFZEK K und WITTINGHOFER A (2001) *Conformational switch and role of phosphorylation in PAK activation,* Mol Cell Biol 21 (15): 5179-89

BURGOYNE RD und HAYNES LP (2012) *Understanding the physiological roles of the neuronal calcium sensor proteins*, Mol Brain 5 (1): 2

CHAITIN MH und BURNSIDE B (1989) *Actin filament polyrity at the site of rod outer segment disk morphogenesis*, Invest Ophthalmol Vis Sci 30 (12): 2461-9

CHAUDHARY A, KING WG, MATTALIANO MD, FROST JA, DIAZ B, MORRISON DK, COBB MH, MARSHALL MS und BRUGGE JS (2000) *Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338*, Curr Biol 10: 551–4

CHAVIER P und GOUD B (1999) *The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport,* Curr Opin Cell Biol 11: 466-65

CHEN CK, INGLESE J, LEFKOWITZ RJ und HURLEY JB (1995) *Ca2+-dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase,* J Biol Chem 270 (30): 18060-6

CHIEN UH, LAI M, SHIH TY, VERMA IM, SCOLNICK EM, ROY-BURMAN P und DAVIDSON N (1979) *Heteroduplex analysis of the sequence relationships between the genomes of Kirsten and Harvey sarcoma viruses, their respective parental murine leukemia viruses and the rat endogenous 30S RNA,* J Virol 31: 752-60

COOK NJ, MOLDAY LL, REID D, KAUPP UB und MOLDAY RS (1989) *The cGMP-gated channel of bovine rod photoreceptors is localized exclusively in the plasma membrane*, J Biol Chem 264 (12): 6996-9

COTTERET S und CHERNOFF J (2006) *Nucleocytoplasmic shuttling of Pak5 regulates its antiapoptotic properties*, Mol Cell Biol 26: 3215-30

COTTERET S, JAFFER ZM, BEESER A und CHERNOFF J (2003) *p21-activated kinase 5 (Pak5) localizes to mitochondria and inhibits apoptosis by phosphoryltating BAD*, Mol Cell Biol 23: 5526-29

DANIELS RH, HALL PS und BOKOCH GM (1998) *Membrane targeting of p21-activated kinase 1 (PAK1) induces neurite outgrowth from PC12 cells*, EMBO J, 17 (3): 754-64

DAVIS BJ (1964) *Disc electrophoresis. ll. Method and application to human serum proteins*, Ann N Y Acad Sci 121: 404-27

DEL POZO MA, PRICE LS, ALDERSON NB, REN XD und SCHWARTZ MA (2000) *Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK*, EMBO J 19: 2008–14

DEL POZO MA, KIOSSES WB, ALDERSON N, MELLER N, HAHN KM und SCHWARTZ MA (2002) *Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of RhoGDI,* Nat Cell Biol 4: 232–9

DEL PRIORE LV, LEWIS A, TAN S, CARLEY WW und WEBB WW (1987) *Fluorescence light microscopy of F-Actin in retinal rods and glial cells,* Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 633-9

DELL'ORCO D und KOCH K-W (2011) *A dynamic scaffolding mechanism for rhodopsin and transducin interaction in vertebrate vision*, Biochem J 440: 263-271

DER CJ, KRONTIRIS TG und COOPER GM (1982) *Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma virsuses,* Proc Natl Acad Sci USA 79: 3637-40

DERETIC D, TRAVERSO V, PARKINS N, JACKSON F, RODRIGUEZ DE TURCO EB und RANSOM N (2004) *Phosphoinositides, ezrin/ moesin, and rac1 regulate fusion of rhodopsin transport carriers in retinal photoreceptors*, Mol Biol Cell 15 (1): 359-70

DIDSBURY J, WEBER RF, BOKOCH GM, EVANS T und SNYDERMAN R (1989) *Rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates*, J Biol Chem 264: 16378-82

DIZHOOR AM, OLSHEVSKAYA EV, HENZEL WJ, WONG SC, STULTS JT, ANKOUDINOVA I und HURLEY JB (1995) *Cloning squencing and expression of a 24-kDa Ca^{2+}-binding protein activating photoreceptor guanylyl cyclase*, J Biol Chem 270 (42): 25200-6

DUDA T, FIK-RYMARKIEWICZ E, VENKATARAMAN V, KRISHNAN R, KOCH K-W und SHARMA RK (2005) *The calcium-sensor guanylate cyclase activating protein type 2 specific site in rod outer segment membrane guanylate cyclase type 1,* Biochemistry 44: 7336–7345

DURONIO RJ, JACKSON-MACHELSKI E, HEUCKEROTH RO, OLINS PO, DEVIE CS, YONEMOTO W, SLICE LW, TAYLOR SS und GORDON JI (1990) *Proetin N-myristoylation in Escherichia coli: Reconstitution of a eukaryotic protein modification in bacteria*, Proc Natl Acad Sci USA 87: 1506-10

EDWARDS DC, SANDERS LC, BOKOCH GM und GILL GN (1999) *Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics*, Nat Cell Biol 1: 253–9

EHRLICH JS, HANSEN MD und NELSON WJ (2002) *Spatio-temporal regulation of rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion*, Dev Cell 3: 259-70

FLEISCHMAN D und DENISEVICH M (1979) *Guanylate cyclase of isolated bovine retinal rod axonmes*, Biochemistry 18: 5060-6

FRANZE K, GROSCHE J, SKATCHKOV AN, SCHINKINGER S, FOJA C, SCHILD D, UCKERMANN O, TRAVIS K, REICHENBACH A und GUCK J (2007) *Müller cells are living optical fibers in the vertebrate retina*, Proc Natl Acad Sci 104 (20): 8287-92

FRIES R, SCHOLTEN A, SÄFTEL W und KOCH K-W (2012) *Operation profile of zebrafish guanylate cyclase-activating protein 3*, J Neurochem 121 (1): 54-65

FROST JA, STEEN H, SHAPIRO P, LEWIS T, AHN N, SHAW PE und COBB MH (1997) *Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins*, EMBO J 16: 6426–38

FUJITANI M, HONDA A, HATA K, YAMAGISHI S, TOHYAMA M und YAMASHITA T (2005) *Biological activity of neurotrophins is dependent on recruitment of Rac1 to lipid rafts*, Biochem Biophys Res Commun 327: 150–4

GE HEALTHCARE (2012) *Recombinant Protein Purification - Principles and Methods*, Handbuch 18-1142-75 AE, Download auf: www.gelifesciences.com

GORCZYCA WA, GRAY-KELLER MP, DETWILER PB und PALCZEWSKI K (1994) *Purification and physiological evaluation of a guanylaze cyclase activating protein from retinal rods*, Proc Natl Acad Sci USA 91 (9): 4014-8

GRANDE-GARCÍA A, ECHARRI A und DEL POZO MA (2005) *Integrin regulation of membrane domain trafficking and Rac targeting*, Biochem Soc Trans 33 (Pt 4): 609-13

GUO D, TAN Y-C, WANG D, MADHUSOODANAN K.S., ZHENG Y, MAACK T, ZHANG JJ und HUANG X-Y (2007) *A Rac-cGMP signaling pathway*, Cell 128: 341-55

HALL A, MARSHALL CJ, SPURR NK und WEISS RA (1983) *Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1*, Nature 303: 396-300

HARUTA M, BUSH RA, KJELLSTROM S, VIJAYASARATHY C, ZENG Y, LE Y-Z und SIEVING PA (2008) *Depleting Rac1 in mouse rod photoreceptors protects them from photo-oxidative stress without affecting their structure or function*, PNAS 106 (23): 9397-402

HELTEN A (2005) *Dynamik der cGMP-Synthese in Sehzellen - Regulation membranständiger Guanylatzyklasen durch modifizierte Kalzium-Sensor-Proteine*, Dissertation, Universität Köln

HELTEN A, SÄFTEL W und KOCH K-W (2007) *Expression level and activity profile of membrane bound guanylate cyclase type 2 in rod outer segments*, J Neurochem 103: 1439–46

HIGASHIJIMA T, FERGUSON KM, STERNWEIS PC, SMIGEL MD und GILMAN AG (1987) *Effects of Mg^{2+} and the beta gamma-subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins,* J Biol Chem 262 (2): 762-6

HING H, XIAO J, HARDEN N, LIM L und LAWRENCE ZIPURSKY S (1999) *Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in Drosophila*, Cell 97: 853-63

HORST CJ, FORESTNER DM und BESHARSE JC (1987) *Cytoskeletal-membrane interactions: a stable interaction between cell surface glycoconjugates and doublet microtubules of the photoreceptor connecting cilium*, J Cell Biol 105 (6, Pt.2): 2973-87

HOWE AK und JULIANO RL (2000) *Regulation of ancorage-dependent signal tranduction by protein kinase A and p21-activated kinase*, Nat Cell Biol 2: 593-600

JAFFE AB und HALL A (2005) *Rho GTPases: Biochemistry and biology*, Annu Rev Cell Dev Biol 21: 247-69

KIBUCHI K, KURODA S und AMANO M (1999) *Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells*, Annu Rev Biochem 68: 459–86

KALAB P, PU und DASSO M (1999) *The ran GTPase regulates mitotic spindle assembly*, Curr Biol 9: 481-4

KALININ A, THOMÄ NH, IAKOVENKO A, HEINEMANN I, ROSTKOVA E, CONSTANTINESCU AT und ALEXANDROV K (2001) *Expression of mammalian geranylgeranyltranferase type-ll in Escherichia coli and its application for in vitro prenylation of Rab proteins*, Protein Expr Purif 22 (1): 84-91

KIEL C, VOGT A, CAMPAGNA A, CHATR-ARYAMONTRI A, SWIATEK-DE LANGE M, BEER M, BOLZ S, MACK AF, KINKL N, CESARENI G, SERRANO L und UEFFING M (2011) *Structural and fuctional protein network analysis predict novel signaling functions for rhodopsin*, Mol Syst Biol 7: 551

KING CC, GARDINER EM, ZENKE FT, BOHL BP, NEWTON AC, HEMMINGS BA und BOKOCH GM (2000) *p21-activaed kinase (PAK1) is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1)*, J Biol Chem 275: 41201-9

KOCH K-W (1991) *Purification and identification of photoreceptor guanylate cyclase,* J Biol Chem 266 (13): 8634-37

KOCH K-W, DUDA T und SHARMA RK (2002) *Photoreceptor specific guanylate cyclases in vertebrate phototransduction*, Mol Cell Biochem 230 (1-2): 97-106

KOCH K-W, DUDA T und SHARMA RK (2010) *Ca2+-modulated vision-linked ROS-GC guanylate cyclase transduction machinery*, Cell Biochem 334: 105-15

KOCH K-W und HELTEN A (2008) *Guanylate cyclase-based signaling in photoreceprors and retina*, In: Signal Transduction in the Retina, Steven J. Flieser and Oleg G. Kisselev eds., CRC Press Taylor & Francis, Kapitel 6: 121-43

KOCH K-W, LAMBRECHT HG, HABERECHT M, REDBURN D und SCHMIDT HHHW (1994) *Functional coupling of a Ca^{2+}7calmodulin dendent nitric oxide synthase and a soluble guanylyl cyclase in vertebrate photoreceptor cells*, EMBO J 13: 3312-20

KOH CG, TAN EJ, MANSER E und LIM L (2002) *The p21-activated kinase PAK is negatively regulated by POPX1 and POPX2, a pair of serine/threonine phosphatase of the PP2c familiy*, Curr Biol 12: 317-21

KOLB H (2005) *Simple Anatomy of the Retina,* erschienen im Mai 2005, aktualisiert im Januar 2012, In: KOLB H, FERNANDEZ E, NELSON R (Herausgeber), *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* [Internet, University of Utah Health Sciences Center], Salt Lake City (UT), USA, Verfügbar auf: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11533/ (Zugriff im September 2014)

KOMOLOV KE, ZINCHENKO DV, CHURUMOVA VA, VAGANOVA SA, WEIERGRÄBER OH, SENIN II, PHILIPPOV PP und KOCH K-W (2005) *One of the Ca^{2+} binding sites of recoverin exclusively controls interaction with rhodopsin kinase,* Biol Chem 386: 285-9

KOMOLOV KE, SENIN II, PHILIPPOV PP und KOCH K-W (2006) *Surface plasmon resonance study of g protein/receptor coupling in a lipid bilayer-free system*, Anal Chem 78 (4): 1228-34

KOMOLOV KE und KOCH K-W (2010) Application of surface plasmon resonance spectroscopy to study G-protein coupled receptor signalling, Methods in mol biol (Clifton, N.J.) 627, Kapitel 17: 249-60

KOMOLOV KE, AGUILÀ M, TOLEDO D, MANYOSA J, GARRIGA P und KOCH KW (2010) *On-chip photoactivation of heterologously expressed rhodopsin allows kinetic analysis of G-protein signaling by surface plasmon resonance spectroscopy*, Anal Bioanal Chem 397 (7): 2967-76

KÖSTER M, DELL'ORCO D und KOCH K-W (2014) *The interaction network of rhodopsin involving the heterotrimeric G protein transducin and the monomeric GTPase Rac1 is determined by distinct binding processes*, FEBS J, doi: 10.1111/febs.13064

KRAMER C (2013) *Funktionelle Charakterisierung von Recoverin-Isoformen und der Opsin-Kinase GRK7*, Masterarbeit, Universität Oldenburg

KRECK ML, UHLINGER DJ, TYAGI SR, INGE L und LAMBETH D (1994) *Participation of the samll molecular weight GTP-binding protein Rac1 in cell-free activation and assembly of the respiratory burst oxidase,* J Biol Chem 299 (6): 4161-8

KUMANOGOH H, MIYATA S, SOKAWA Y und MAEKAWA S (2001) *Biochemical and morphological analysis on the localization of Rac1 in neurons*, Neurosci Res 39: 189-96

LAEMMLI UK (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, Nature 227: 680-5s of apoptosis, Proc Natl Acad Sci USA 94: 13642-7

LAM BD und HORDIJK PL (2013) *The Rac1 hypercariable region in targeting and signaling – A tail of many stories*, Small GTPases 4 (2): 78-89

LEE N, MACDONALD H, REINHARD C, HALENBECK R; ROULSTON A, SHI T und WILLIAMS LT (1997) *Activation of hPAK65 by caspase cleavage induces some of the morphological and biochemical changes of apoptosis*, Proc Natl Acad Sci USA 94 (25): 13642-7

LEI M, LU W, MENG W, PARRINI M-C, ECK MJ, MAYER BJ und HARRISON SC (2000) *Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch*, Cell 102: 387-97

LIANG Y, FOTIADIS D, FILIPEK S, SARPERSTEIN DA, PALCZEWSKI K und ENGEL A (2003) *Organization of the G-protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes*, J Biol Chem 278: 21655-62

LOLLEY RN, FARBER DB, RAYBORN ME und HOLLYFIELD JG (1976) *Cyclic GMP accumulation causes degeneration of photoreceptor cells: stimulation of an inherited disease,* Science 196: 664-6

LOO TH, NG YW, LIM L und MANSER E (2004) *GIT1 activates p21-activated kinase through a mechanism independent of p21 binding*, Mol Cell Biol 24: 3849-59

LU W, KATZ S, GUPTA R und MAYER BJ (1997) *Activation of Pak by membrane localization mediated by an SH3 binding domain from the adaptor protein Nck*, Curr Biol 7 (2): 85-94

MAHMOOD T und YANG P-C (2012) *Western Blot: Technique, theory and trouble shooting*, N Am J Med Sci 4 (9): 429-34

MAKINO ER, HANDY JW, LI T und ARSHAVSKY VY (1999) *The GTPase activating factor for transducin in rod photoreceptors is the complex between RGS9 and type 5 G-Protein beta subunit*, Proc Natl Acad Sci USA 96: 1947-52

MANSER E, LEUNG T, SALIHUDDIN H, ZHAO ZS und LIM L (1994) *A brain serine threonine protein-kinase activated by Cdc42 and Rac1,* Nature 367: 40-46

MARTINEZ O und GOUD B (1998) *Rab proteins,* Biochim Biophys Atca 1404: 101-12

MENZEL N, SCHNEEBERGER D und RAABE T (2007) *The Drosophila p21 activated kinase Mbt regulates the actin cytoskeleton and adherens junctions to control photoreceptor cell morphogenesis,* Mech Dev 124: 78-90

MICHAELSON D, SILLETTI J, MURPHY G, D'EUSTACHIO P, RUSH M und PHILIPS MR (2001) *Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding*, J Cell Biol 152: 111–26

MILLIGAN G und KOSTENIS E (2006) *Heterotrimeric G-proteins: a short history*, Br J Pharmacol 147: S46-S55

MOISSOGLU K, LIESSLING V, WAN C, HOFFMAN BD, NORAMBUENA A, TAMM LK und SCHWARTZ MA (2014) *regulation of Rac1 translocation and activation by membrane domains and their boundaries*, J Cell Sci 127: 2565-76

MOLDAY LL, COOK NJ, KAUPP UB und MOLDAY RS (1990) *The cGMP-gated cation channel of bovine rod photoreceptor cells is associated with a 240-kDa protein exhibiting immunochemical cross-reactivity with spectrin*, J Biol Chem 265 (30): 18690-5

NAKAMURA M, MASUDA H, HORII J, KUMA K, YOKOYAMA N, OHIBA T, NISHITANI H, MIYATA T, TANAKA M und NISHIMOTO T (1998) *When overexpresses, a novel centrosomal protein, RanBPM causes ectopic mictrotubule nucleation similar to γ-tubulin*, J Cell Biol 143: 1041-52

NAVARRO-LÉRIDA I, SÁNCHEZ-PERALES S, CALCO M, RENTERO C, ZHENG Y, ENRICH C und A DEL POZO M (2012) *A palmitoylation switch mechanism regulates Rac1 function and membrane organization*, EMBO J 31: 534-551

OLSHEVSKAYA EV, CALVERT PD, WOODRUFF ML, PESHENKO IV, SAVCHENKO AB, MAKINO CL, HO Y-S, FAIN GL und DIZHOOR AM (2004) *The Y99C mutation in guanylyl cyclase-activating protein 1 increases intracellular Ca^{2+} and causes photoreceptor degeneration in transgenic mice*, J Neurosci 25 (27): 6078-85

ORNSTEIN L (1964) *Disc electrophoresis. I. Background and theory,* Ann N Y Acad Sci, 121: 312-49

PALCZEWSKI K (1997) *GTP-binding-protein-coupled receptor kinases: two mechanistic models*, Eur J Biochem 248 (2): 261-9

PALCZEWSKI K und BENOVIC JL (1991) *G-protein-coupled receptor kinases*, Trends Biochem Sci 16 (10): 387-91

PARRINI MC, LEI M, HARRISON SC und MAYER BJ (2002) *Pak1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociatied upon activation by Cdc42 and Rac1*, Mol Cell 9: 73-83

PHILIPPOV PP, SENIN II und KOCH K-W (2006) *Recoverin: A calcium-dependent regulator of the visual transduction,* in: Neuronal Calcium sensor proteins, New York, Nova Science Publishers, Inc., 139-52

PIRRUCCELLO M, SONDERMANN H, PELTON JG, PELLICENA P, HOELZ A, CHERNOFF J, WEMMER DE und KURIYAN J (2006). *A dimeric kinase assembly underlying autophosphorylation in the p21 activated kinases,* J Mol Biol 361: 312-26

Pugh EN Jr und Lamb TD (2000) *Phototransduction in vertebrate rods and cones: molecular mechanism of Amplification, recovery and light adaptation*, Handbook of Biological Physics, Kapitel 5: 183-255

PUTO LA, PESTONJAMASP K, KING CC und BOCKOCH GM (2003) *p21-activated kinase 1 (PAK1) interacts with the Grb2 adapter protein to couple growth factor signaling,* J Biol Chem 278: 9388-93

QIAGEN (2002) *Ni-NTA Superflow BioRobot® Handbook 09/2002*, Download auf: www.qiagen.com

RUDEL T und BOCKOCH GM (1997) *Membrane and morphological changes in apoptic cells regulated by caspapse-mediated activation of PAK2*, Science 276: 1571-4

SÄFTEL W, WINKLER U und STABENAU H (1999) *Separation of native basic proteins by catodic discontinous polyacrylamide gel electrophoresis*, Bio-Rad tech note Nr. 2376

SCHAFFNER W und WEISSMANN C (1973) *A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution,* Anal Biochem 56: 502-14

SCHEKMAN R und ORCI L (1996) *Coat proteins and vesicle budding*, Science 271: 1526-23

SCHNEEBERGER D und RAABE T (2003) *Mbt, a Drosophila PAK protein, combines with Cdc42 to regulate photoreceptor cell morphogenesis*, Development 130: 427-37

SCHNETKAMP PP (1989) *Na-Ca or Na-Ca-K exchange in rod photoreceptors,* Prog Biophys Mol Biol 54 (1): 1-29

SCHOLTEN A und KOCH K-W (2011) *Differential calcium signaling by cone specific guanylate cyclase-activating proteins from the zebrafish retina*, PLoS One 6 (8): e23117

SCHURMANN A, MOONEY AF, SANDERS LC, SELLS MA, WANG HG, REED JC und BOKOCH GM (2000) *p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis*, Mol Cell Biol 20 (2): 453–61

SENIN II, HÖPPNER-HEITMANN D, POLKOVNIKOVA OO, CHURUMOVA VA TIKHOMIROVA NK, PHILIPPOV PP und KOCH K-W (2004) *Recoverin and rhodopsin kinase activity in detergent-resistant membrane rafts from rod outer segments,* J Biol Chem 279 (47): 48647-53

SHICHI H und SOMER RL (1978) *Light-dependent phosphorylation of rhodopsin*, J Biol Chem 253 (19): 7040-6

SHIH TY, WILLIAMS DR, WEEKS MO, MARYAK JM, VASS WC und SCOLNICK EM (1978) *Comparison of the genomic organization of Kirsten and Harvey sarcoma viruses*, J Virol 27: 45-55

SHIMIZU K, GOLDFARB M, PERUCHO M und WIGGLER M (1983) *Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line*, Proc Natl Acad Sci USA 80: 383-7

SIDEROVSKI DP und WILLARD FS (2005), *The GAPs, GEFs and GDIs of heterotrimeric G-Protein alpha subunits*, Int J Biol Sci 1: 51-66

SLEPAK VZ und HURLEY JB (2008) *Mechanism of light-induced translocation of Arrestin and Transducin in photoreceptors: interaction-restricted diffusion*, IUBMB Life 60 (1): 2-9

SONG H, BUSH RA, VIJAYASARATHY C, FARISS RN, KJELLSTROM S und SIEVING PA (2014) *Transgenic expression of constitutively active RAC1 disrupts mouse rod morphogenesis*, Invest Ophthalmol Vis Sci 55: 2659-68

SZCZEPANOWSKA J (2009) *Involvement of Rac/Cdc42/PAK pathway in cytoskeletal rearrangements*, Acta Biochim Pol 56 (2): 225-34

TAKAI Y, SASAKI T und MATOZAKI T (2001) *Small GTP-binding proteins*, Physiol Rev 81 (1): 153-218

THAXTON C, LOPERA J, BOTT M und FERNANDEZ-VALLE C (2008) *Neuregulin und laminin stimulate phosphorylation of the NF2 tumor supressor in Schwann cells by distinct protein kinase A and p21-activated kinase-dependent pathways*, Oncogene 27: 2705-15

TOWBIN H, STAEHELIN T und GORDON J (1979) *Electrophoretich transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications*, Proc Natl Acad Sci USA 76 (9): 4350-4

USHIO-FUKAI M (2006) *Localizing NADPH oxidase-derived ROS*, Sci STKE 349: re8

VAUGHAN DK und FISHER SK (1987) *The distribution of F-actin in cells isolated from vertebrate retina*, Exp Eye Res 44: 393-406

VISVIKIS O, MADDUGODA MP und LEMCHEZ E (2010) *Direct modifications of Rho proteins: deconstructing GTPase regulation*, Biol Cell 102: 377-89

WEBER A (1999) *Actin binding proteins that change extent and rate of actin monomer-polymer distribution by different mechanisms*, Mol Cell Biochem 190: 67-74

WERNER E (2004) *GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling*, J Cell Sci 117: 143-53

WILLIAMS DS (1991) *Actin filaments and photoreceptor membrane turnover,* BioEssays 13 (4): 171-8

WILLIAMS DS (2002) *Transport to the photoreceptor outer segment by myosin VIIa and kinesin II*, Vis Res 42: 455-62

WILLIAMS DS, HALLET MA und ARIKAWA K (1992) *Association of myosin with the connecting cilium of rod photoreceptors*, J Cell Sci 103: 183-190

WITTMANN T, BOKOCH GM und WATERMAN-STORER CM (2004) *Regulation of microtubule destabilizing activity of Op18/stathmin downstream of Rac1*, J Biol Chem 279 (7): 6196-203

XU J, DODD RL, MAKINO CL, SIMON MI, BAYLOR DA und CHEN J (1997) *Prolonged photoresponses in transgenic mouse rods lacking arrestin*, Nature 389 (6650): 505-9

YAU K-W und HARDIE RC (2009) *Phototranduction Motifs and Variations*, Cell 139: 246-64

YEUNG T, TEREBIZNIK M, YU L, SILVIUS J, ABIDI WM, PHILIPS M, LEVINE T, KAPUS A und GRINSTEIN S (2006) *Receptor activation alters inner surface potential during phagocytosis*, Science 313: 347–51

ZHAN Q, GE Q, OHIRA T, VAN DYKE T und BADWEY JA (2003) *p21-activated kinase 2 in neutrophils can be refulated by phosphorylation at multiple sites and by a variety of protein phosphatases*, J Immunol 171: 3785-93

ZHANG L, LUO J, WAN P, WU J, LASKI F und CHEN J (2011) *Regulation of cofilin phosphorylation and asymmetry in collective cell migration during morphogenisis*, Development 138 (3): 455-64

ZHAO Z und MANSER E (2005) *PAK and ohter Rho-associated kinases – effectors with surprisingly divers mechanism of refulation,* Biochem J 386: 201-14

6. ANHANG

6.1. Reinigung von GST-PAK-PBD

Die Rac1/Cdc42-bindende Domäne (PBD) wurde als Fusionsprotein mit GST (GST-PAK-PBD) exprimiert und im Pulldown-Assay genutzt, um aktiviertes Rac1 zu isolieren.

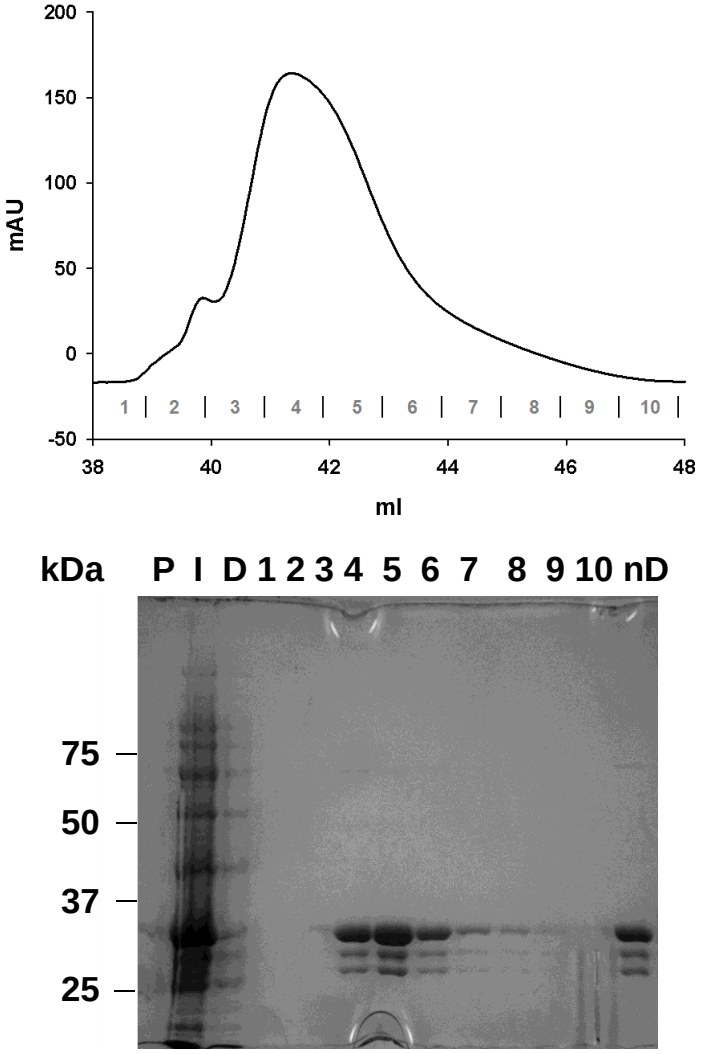


Abb. 6-1: Reinigung von GST-PAK-PBD. GST-PAK-PBD wurde mit einer GSTrap-Säule an der FPLC Anlage gereinigt. Im Chromatogramm (*oben*) war bei der Elution ein klarer Peak zu erkennen, der sich von Fraktion 4-6 zog. Die bei der Reinigung genommenen Proben wurden im 12%igen SDS-Gel analysiert (*unten*). Das stärkste Signal in den Elutionsfraktionen (Fraktion 4-6) deckt sich mit dem Auftreten des Peaks im Chromatogramm. Bei den zwei unteren Banden handelt es sich vermutlich um trunkierte Versionen oder Degradationsprodukte von GST-PAK-PBD *P: Pellet nach Aufschluss, I: Input, D: Durchfluss, 1-10: Elutionsfraktion 1-10, nD: nach Dialyse*

Um ausreichend Protein zu Verfügung stehen zu haben, um es an CNBr-Sepharose koppeln zu können, wurde es in *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RP heterolog exprimiert und

anschließend mittels Affinitätschromatografie, wie in 2.2.12.4 beschrieben, gereinigt. Das Chromatogramm und Reinigungsgel sind in Abb. 6-1 gezeigt. GST-PAK-PBD eluierte in der vierten bis sechsten Fraktion (4-6 ml, Abb. 6-1, oben). Im Reinigungsgel ließ sich in den gleichen Fraktionen das stärkste Signal, d.h. die höchste Proteinmenge, auf erwarteter Höhe (ca. 35 kDa) erkennen. Unterhalb der Hauptbande traten zwei weitere, schwächere Banden auf. Hierbei handelte es sich vermutlich entweder um trunkierte Versionen oder Degradationsprodukte von GST-PAK-PBD. Die Ausbeute betrug ca. 5 mg/ 500 ml *E. coli*-Flüssigkultur.

6.2. Reinigung der Mutante hRac1(G12V)

Die konstitutiv aktive Mutante hRac1(G12V) wurde primär bei der Überprüfung der (His_6)-hPAK1-Aktivitität (siehe 2.2.27) genutzt. Expression und Reinigung wurden analog zum WT durchgeführt (siehe 2.2.12.1 und 3.4). Für die chromatografische Reinigung wurde eine Kationenaustauschersäule eingesetzt. Das Protein wurde in fünf Stufen mit Hilfe eines Salzgradienten eluiert. Die Ausbeute betrug 2-5 mg/l Bakterienkultur. Ein exemplarisches Reinigungsgel ist in Abb. 6-2 gezeigt. Wie der Wildtyp blieb auch hRac1(G12V) nach Aufschluss in der löslichen Fraktion und konnte so gut gereinigt werden.

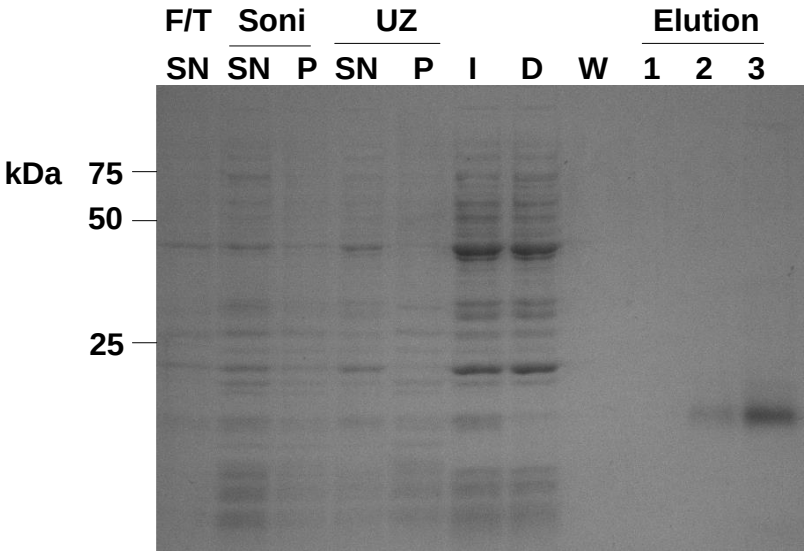


Abb. 6-2: Chromatografische Reinigung von hRac1(G12V). Während der Reinigung genommene Proben wurden im 12%igen SDS-Gel getrennt und anschließend mit Coomassie angefärbt. Die Proben soni/ P, SN und UZ/P, SN, ebenso wie die Proben I, D und 1-5 sind vom Auftrag her miteinander vergleichbar. Rac(G12V) eluierte vollständig in den ersten drei Fraktionen. *F/T: nach Auftauen/Einfrieren, soni: nach Sonifikation, UZ: nach Ultrazentrifugation, P: Pellet. SN: Überstand, I: Input, D: Durchfluss*

6.3. Reinigung von Transducin aus ROS

Für SPR-spektroskopische Experimente wurde Transducin (G_T) wie in 2.2.12.5 beschrieben aus ROS gereinigt. Die während der Reinigung genommenen Proben wurden im SDS-Gel analysiert. Ein exemplarisches Reinigungsgel ist in Abb. 6-3 gezeigt. Nach Elution, d.h. im Input der PD-10-Säule, war eine Doppelbande zu erkennen. Hierbei handelte es sich um die α- Untereinheit (39 kDa) sowie die β-Untereinheit (37 kDa). Die γ-Untereinheit ist mit 8 kDa zu klein und zu gering konzentriert, um mit dieser Färbemethode sichtbar gemacht werden zu können. Da dieses Protokoll bereits gut etabliert war und die Ergebnisse wie erwartet ausgefallen waren, wurde auf einen Westernblot zur spezifischen Identifikation von $G_T\alpha$ verzichtet.

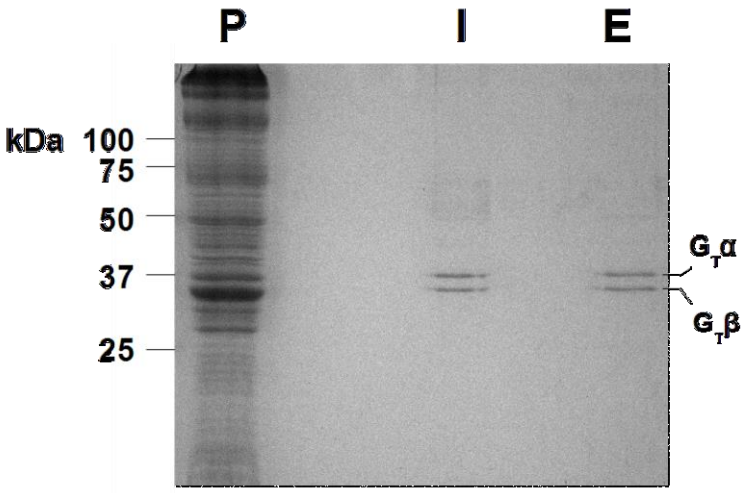


Abb. 6-3: Reinigung von G_T aus ROS. Natives G_T wurde aus belichteten ROS gereinigt. Die einzelnen Schritte der Reinigung wurde im 12%igen SDS-Gel analysiert. Es wurden 6 µl pro Spur aufgetragen. *P: Pellet nach Elution, I: Input, E: Eluat*

6.4. Sequenzierung von *His_6-hPAK1*

Um sicherzustellen, dass *His_6-hPAK1* ohne Mutationen in den Vektor pET30a(+) kloniert wurde, wurde der mittels Restriktionsanalyse positiv selektierte Klon #26 (siehe 3.7.1) zur Sequenzierung verschickt. Das Gen wurde mit Promotor- und Terminator-spezifischen Primern vorwärts und rückwärts sequenziert. Die vollständigen Ergebnisse der Sequenzierungen sind in Abb. 6-4 und 6-5 gezeigt. Bei der Vorwärtssequenzierung des Gens tauchte eine zusätzliche Base (Guanosin, G) an der Position 952 auf (Abb. 6-4), die Begutachtung des Sequenzier-Chromatogramms (nicht gezeigt) ergab jedoch, dass der Peak an dieser Stelle sehr gering blieb.

```
PAKHIS26    CATATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATT  -  80
             NdeI      His6

HPAK1                                                          ATGTCAAATAACGGCCTAGACATTC  - 558
PAKHIS26    CGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGGCCATGTCAAATAACGGCCTAGACATTC  - 160
                                          Enterokinase   NotI.......................

HPAK1       AAGACAAACCCCCAGCCCCTCCGATGAGAAATACCAGCACTATGATTGGAGCCGGCAGCAAAGATGCTGGAACCCTAAAC  - 638
PAKHIS26    AAGACAAACCCCCAGCCCCTCCGATGAGAAATACCAGCACTATGATTGGAGCCGGCAGCAAAGATGCTGGAACCCTAAAC  - 240
            ................................................................................

HPAK1       CATGGTTCTAAACCTCTGCCTCCAAACCCAGAGGAGAAGAAAAAGAAGGACCGATTTTACCGATCCATTTTACCTGGAGA  - 718
PAKHIS26    CATGGTTCTAAACCTCTGCCTCCAAACCCAGAGGAGAAGAAAAAGAAGGACCGATTTTACCGATCCATTTTACCTGGAGA  - 320
            ................................................................................

HPAK1       TAAAACAAATAAAAAGAAAGAGAAAGAGCGGCCAGAGATTTCTCTCCCTTCAGATTTTGAACACACAATTCATGTCGGTT  - 798
PAKHIS26    TAAAACAAATAAAAAGAAAGAGAAAGAGCGGCCAGAGATTTCTCTCCCTTCAGATTTTGAACACACAATTCATGTCGGTT  - 400
            ................................................................................

HPAK1       TTGATGCTGTCACAGGGGAGTTTACGGGAATGCCAGAGCAGTGGGCCCGCTTGCTTCAGACATCAAATATCACTAAGTCG  - 878
PAKHIS26    TTGATGCTGTCACAGGGGAGTTTACGGGAATGCCAGAGCAGTGGGCCCGCTTGCTTCAGACATCAAATATCACTAAGTCG  - 480
            ................................................................................

HPAK1       GAGCAGAAGAAAAACCCGCAGGCTGTTCTGGATGTGTTGGAGTTTTACAACTCGAAGAAGACATCCAACAGCCAGAAATA  - 958
PAKHIS26    GAGCAGAAGAAAAACCCGCAGGCTGTTCTGGATGTGTTGGAGTTTTACAACTCGAAGAAGACATCCAACAGCCAGAAATA  - 560
            ................................................................................

HPAK1       CATGAGCTTTACAGATAAGTCAGCTGAGGATTACAATTCTTCTAATGCCTTGAATGTGAAGGCTGTGTCTGAGACTCCTG  -1038
PAKHIS26    CATGAGCTTTACAGATAAGTCAGCTGAGGATTACAATTCTTCTAATGCCTTGAATGTGAAGGCTGTGTCTGAGACTCCTG  - 640
            ................................................................................

HPAK1       CAGTGCCACCAGTTTCAGAAGATGAGGATGATGATGATGATGATGCTACCCCACCACCAGTGATTGCTCCACGCCCAGAG  -1118
PAKHIS26    CAGTGCCACCAGTTTCAGAAGATGAGGATGATGATGATGATGATGCTACCCCACCACCAGTGATTGCTCCACGCCCAGAG  - 720
            ................................................................................

HPAK1       CACACAAAATCTGTATACACACGGTCTGTGATTGAACCACTTCCTGTCACTCCAACTCGGGACGTGGCTACATCTCCCAT  -1198
PAKHIS26    CACACAAAATCTGTATACACACGGTCTGTGATTGAACCACTTCCTGTCACTCCAACTCGGGACGTGGCTACATCTCCCAT  - 800
            ................................................................................

HPAK1       TTCACCTACTGAAAATAACACCACTCCACCAGATGCTTTGACCCGGAATACTGAGAAGCAGAAGAAGAAGCCTAAAATGT  -1278
PAKHIS26    TTCACCTACTGAAAATAACACCACTCCACCAGATGCTTTGACCCGGAATACTGAGAAGCAGAAGAAGAAGCCTAAAATGT  - 880
            ................................................................................

HPAK1       CTGATGAGGAGATCTTGGAGAAATTACGAAGCATAGTGAGTGTGGGCGATCCTAAGAAGAAATATACACGG-TTTGAGAA  -1357
PAKHIS26    CTGATGAGGAGATCTTGGAGAAATTACGAAGCATAGTGAGTGTGGGCGATCCTAAGAAGAAATATACACGGGTTTGAGAA  - 960
            ...............................................................X........

HPAK1       GATTGGACAAGGTGCTTCAGGCACCGTGTACACAGCAATGGATGTGGCCACAGGACAGGAGGTGGCCATTAAGCAGATGA  -1437
PAKHIS26    GATTGGACAAGGTGCTTCAGGCACCGTGTACACAGCAATGGATGTGGCCACAGGACAGGAGGTGGCCATTAAGCAGATGA  -1040
            ................................................................................

HPAK1       ATCTTCAGCAGCAGCCCAAGAAAGAGCTGATTATTAATGAGATCCTGGTCATGAGGGAAAACAAGAACCCAAACATTGTG  -1517
PAKHIS26    ATCTTCAGCAGCAGCCCAA                                                               -1059
            ...................

HPAK1       AATTACTTGGACAGTTACCTCGTGGGAGATGAGCTGTGGGTTGTTATGGAATACTTGGCTGGAGGCTCCTTGACAGATGT  -1597

HPAK1       GGTGACAGAAACTTGCATGGATGAAGGCCAAATTGCAGCTGTGTGCCGTGAGTGTCTGCAGGCTCTGGAGTTCTTGCATT  -1677

HPAK1       CGAACCAGGTCATTCACAGAGACATCAAGAGTGACAATATTCTGTTGGGAATGGATGGCTCTGTCAAGCTAACTGACTTT  -1757

HPAK1       GGATTCTGTGCACAGATAACCCCAGAGCAGAGCAAACGGAGCACCATGGTAGGAACCCCATACTGGATGGCACCAGAGGT  -1837

HPAK1       TGTGACACGAAAGGCCTATGGGCCCAAGGTTGACATCTGGTCCCTGGGCATCATGGCCATCGAAATGATTGAAGGGGAGC  -1917

HPAK1       CTCCATACCTCAATGAAAACCCTCTGAGAGCCTTGTACCTCATTGCCACCAATGGGACCCCAGAACTTCAGAACCCAGAG  -1997

HPAK1       AAGCTGTCAGCTATCTTCCGGGACTTTCTGAACCGCTGTCTCGAGATGGATGTGGAGAAGAGAGGTTCAGCTAAAGAGCT  -2077

HPAK1       GCTACAGCATCAATTCCTGAAGATTGCCAAGCCCCTCTCCAGCCTCACTCCACTGATTGCTGCAGCTAAGGAGGCAACAA  -2157

HPAK1       AGAACAATCACTAA                                                                    -2171
```

Abb. 6-4:Sequenzierung von *His6-hPAK1* (vorwärts). Das Ergebnis der Vorwärtssequenzierung von *His$_6$-hPAK1* in pET30a(+) (PAKHIS 26) ist im Vergleich mit der Mastersequenz des Wildtyps (HPAK1) gezeigt. Start- und Stoppcodon sind hellgrau unterlegt.

```
PAKHIS26      CATATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATT  -  80
               NdeI      His6

HPAK1                                                          ATGTCAAATAACGGCCTAGACATTC  -  25
PAKHIS26      CGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGGCCATGTCAAATAACGGCCTAGACATTC  - 160
                                                Enterokinase   NotI.......................

HPAK1         AAGACAAACCCCCAGCCCCTCCGATGAGAAATACCAGCACTATGATTGGAGCCGGCAGCAAAGATGCTGGAACCCTAAAC  - 105
PAKHIS26      AAGACAAACCCCCAGCCCCTCCGATGAGAAATACCAGCACTATGATTGGAGCCGGCAGCAAAGATGCTGGAACCCTAAAC  - 240
              ................................................................................

HPAK1         CATGGTTCTAAACCTCTGCCTCCAAACCCAGAGGAGAAGAAAAAGAAGGACCGATTTTACCGATCCATTTTACCTGGAGA  - 185
PAKHIS26      CATGGTTCTAAACCTCTGCCTCCAAACCCAGAGGAGAAGAAAAAGAAGGACCGATTTTACCGATCCATTTTACCTGGAGA  - 320
              ................................................................................

HPAK1         TAAAACAAATAAAAAGAAAGAGAAAGAGCGGCCAGAGATTTCTCTCCCTTCAGATTTTGAACACACAATTCATGTCGGTT  - 265
PAKHIS26      TAAAACAAATAAAAAGAAAGAGAAAGAGCGGCCAGAGATTTCTCTCCCTTCAGATTTTGAACACACAATTCATGTCGGTT  - 400
              ................................................................................

HPAK1         TTGATGCTGTCACAGGGGAGTTTACGGGAATGCCAGAGCAGTGGGCCCGCTTGCTTCAGACATCAAATATCACTAAGTCG  - 345
PAKHIS26      TTGATGCTGTCACAGGGGAGTTTACGGGAATGCCAGAGCAGTGGGCCCGCTTGCTTCAGACATCAAATATCACTAAGTCG  - 480
              ................................................................................

HPAK1         GAGCAGAAGAAAAACCCGCAGGCTGTTCTGGATGTGTTGGAGTTTTACAACTCGAAGAAGACATCCAACAGCCAGAAATA  - 425
PAKHIS26      GAGCAGAAGAAAAACCCGCAGGCTGTTCTGGATGTGTTGGAGTTTTACAACTCGAAGAAGACATCCAACAGCCAGAAATA  - 560
              ................................................................................

HPAK1         CATGAGCTTTACAGATAAGTCAGCTGAGGATTACAATTCTTCTAATGCCTTGAATGTGAAGGCTGTGTCTGAGACTCCTG  - 505
PAKHIS26      CATGAGCTTTACAGATAAGTCAGCTGAGGATTACAATTCTTCTAATGCCTTGAATGTGAAGGCTGTGTCTGAGACTCCTG  - 640
              ................................................................................

HPAK1         CAGTGCCACCAGTTTCAGAAGATGAGGATGATGATGATGATGATGCTACCCCACCACCAGTGATTGCTCCACGCCCAGAG  - 585
PAKHIS26      CAGTGCCACCAGTTTCAGAAGATGAGGATGATGATGATGATGATGCTACCCCACCACCAGTGATTGCTCCACGCCCAGAG  - 720
              ................................................................................

HPAK1         CACACAAAATCTGTATACACACGGTCTGTGATTGAACCACTTCCTGTCACTCCAACTCGGGACGTGGCTACATCTCCCAT  - 665
PAKHIS26      CACACAAAATCTGTATACACACGGTCTGTGATTGAACCACTTCCTGTCACTCCAACTCGGGACGTGGCTACATCTCCCAT  - 800
PAKHIS26R'                          GGTCTGTGATTGAACCACTTCCTGTCACTCCAACTCGGGACGTGGCTACATCTCCCAT  -1030
              ................................................................................

HPAK1         TTCACCTACTGAAAATAACACCACTCCACCAGATGCTTTGACCCGGAATACTGAGAAGCAGAAGAAGAAGCCTAAAATGT  - 745
PAKHIS26      TTCACCTACTGAAAATAACACCACTCCACCAGATGCTTTGACCCGGAATACTGAGAAGCAGAAGAAGAAGCCTAAAATGT  - 880
PAKHIS26R'    TTCACCTACTGAAAATAACACCACTCCACCAGATGCTTTGACCCGGAATACTGAGAAGCAGAAGAAGAAGCCTAAAATGT  - 950
              ................................................................................

HPAK1         CTGATGAGGAGATCTTGGAGAAATTACGAAGCATAGTGAGTGTGGGCGATCCTAAGAAGAAATATACACGGTTTGAGAAG  - 825
PAKHIS26      CTGATGAGGAGATCTTGGAGAAATTACGAAGCATAGTGAGTGTGGGCGATCCTAAGAAGAAATATACACGGTTTGAGAAG  - 960
PAKHIS26R'    CTGATGAGGAGATCTTGGAGAAATTACGAAGCATAGTGAGTGTGGGCGATCCTAAGAAGAAATATACACGGTTTGAGAAG  - 870
              ................................................................................

HPAK1         ATTGGACAAGGTGCTTCAGGCACCGTGTACACAGCAATGGATGTGGCCACAGGACAGGAGGTGGCCATTAAGCAGATGAA  - 905
PAKHIS26      ATTGGACAAGGTGCTTCAGGCACCGTGTACACAGCAATGGATGTGGCCACAGGACAGGAGGTGGCCATTAAGCAGATGAA  -1040
PAKHIS26R'    ATTGGACAAGGTGCTTCAGGCACCGTGTACACAGCAATGGATGTGGCCACAGGACAGGAGGTGGCCATTAAGCAGATGAA  - 790
              ................................................................................

HPAK1         TCTTCAGCAGCAGCCCAAGAAAGAGCTGATTATTAATGAGATCCTGGTCATGAGGGAAAACAAGAACCCAAACATTGTGA  - 985
PAKHIS26      TCTTCAGCAGCAGCCCAA                                                               -1058
PAKHIS26R'    TCTTCAGCAGCAGCCCAAGAAAGAGCTGATTATTAATGAGATCCTGGTCATGAGGGAAAACAAGAACCCAAACATTGTGA  - 710
              ................................................................................

HPAK1         ATTACTTGGACAGTTACCTCGTGGGAGATGAGCTGTGGGTTGTTATGGAATACTTGGCTGGAGGCTCCTTGACAGATGTG  -1065
PAKHIS26R'    ATTACTTGGACAGTTACCTCGTGGGAGATGAGCTGTGGGTTGTTATGGAATACTTGGCTGGAGGCTCCTTGACAGATGTG  - 630
              ................................................................................

HPAK1         GTGACAGAAACTTGCATGGATGAAGGCCAAATTGCAGCTGTGTGCCGTGAGTGTCTGCAGGCTCTGGAGTTCTTGCATTC  -1145
PAKHIS26R'    GTGACAGAAACTTGCATGGATGAAGGCCAAATTGCAGCTGTGTGCCGTGAGTGTCTGCAGGCTCTGGAGTTCTTGCATTC  - 550
              ................................................................................

HPAK1         GAACCAGGTCATTCACAGAGACATCAAGAGTGACAATATTCTGTTGGGAATGGATGGCTCTGTCAAGCTAACTGACTTTG  -1225
PAKHIS26R'    GAACCAGGTCATTCACAGAGACATCAAGAGTGACAATATTCTGTTGGGAATGGATAGCTCTGTCAAGCTAACTGACTTTG  - 470
              ...................................................G>S..........................

HPAK1         GATTCTGTGCACAGATAACCCCAGAGCAGAGCAAACGGAGCACCATGGTAGGAACCCCATACTGGATGGCACCAGAGGTT  -1305
PAKHIS26R'    GATTCTGTGCACAGATAACCCCAGAGCAGAGCAAACGGAGCACCATGGTAGGAACCCCATACTGGATGGCACCAGAGGTT  - 390
              ................................................................................

HPAK1         GTGACACGAAAGGCCTATGGGCCCAAGGTTGACATCTGGTCCCTGGGCATCATGGCCATCGAAATGATTGAAGGGGAGCC  -1385
PAKHIS26R'    GTGACACGAAAGGCCTATGGGCCCAAGGTTGACATCTGGTCCCTGGGCATCATGGCCATCGAAATGATTGAAGGGGAGCC  - 310
              ................................................................................

HPAK1         TCCATACCTCAATGAAAACCCTCTGAGAGCCTTGTACCTCATTGCCACCAATGGGACCCCAGAACTTCAGAACCCAGAGA  -1465
PAKHIS26R'    TCCATACCTCAATGAAAACCCTCTGAGAGCCTTGTACCTCATTGCCACCAATGGGACCCCAGAACTTCAGAACCCAGAGA  - 230
              ................................................................................
```

```
HPAK1        AGCTGTCAGCTATCTTCCGGGACTTTCTGAACCGCTGTCTCGAGATGGATGTGGAGAAGAGAGGTTCAGCTAAAGAGCTG  -1545
PAKHIS26R'   AGCTGTCAGCTATCTTCCGGGACTTTCTGAACCGCTGTCTCGAGATGGATGTGGAGAAGAGAGGTTCAGCTAAAGAGCTG  -  50
             ..............................................................................

HPAK1        CTACAGCATCAATTCCTGAAGATTGCCAAGCCCCTCTCCAGCCTCACTCCACTGATTGCTGCAGCTAAGGAGGCAACAAA  -1625
PAKHIS26R'   ATACAGCATCAATTCCTGAAGATTGCCAAGCCCCTCTCCAGCCTCACTCCACTGATTGCTGCAGCTAAGGAGGCAACAAA  -  70
            L>I...........................................................................

HPAK1        GAACAATCACTAA                                                                     -1638
PAKHIS26R'   GAACAATCACTAAGCGGCCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACA             -   1
             .............
```

Abb. 6-5: Ergebnis der Vorwärts- und Rückwärtssequenzierung von *His$_6$-hPAK1* im Alignment mit der Mastersequenz des Wildtyps. Die Details sind im Text beschrieben. Mutierte Basen sind rot markiert, die betroffenen Codons dunkelgrau unterlegt. Die Aminosäureaustausche sind im Einbuchstabencode angegeben. Start- und Stoppcodon sind hellgrau unterlegt. *PAKHIS 26: Vorwärtssequenzierung, : PAKHIS 26R': Rückwärtssequenzierung, HPAK1: Wildtyp.*

Deshalb war davon auszugehen, dass es sich hierbei um einen Fehler bei der *in silico*-Auswertung des Chromatogramms hielt und dieses zusätzliche Guanosin dort real nicht vorhanden war (mündliche Mitteilung Dr. A. Scholten, Universität Oldenburg). Weiterhin ergaben sich zwei Punktmutationen an den Positionen 1201 und 1546 (Abb. 6-5). Diese führten zu den Aminosäureaustauschen G401S und L516I. Hierbei handelte es sich um Austausche, die bereits im ursprünglichen Klon (pCMV6M hPAK1 WT, der AG Biochemie zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. H.-G. Nothwang, Universität Oldenburg) enthalten waren (mündl. Mitteilung Dr. A. Scholten, Universität Oldenburg), weshalb der Klon #26 zur Expression von His$_6$-hPAK1 genutzt wurde.

6.5. Reinigungsversuch von hPAK1 mittels AEC

Wie in 2.2.12.3 beschrieben, wurde versucht hPAK1 ohne Tag zu reinigen. Hierzu wurde das Protein zunächst an eine Ni-Säule gebunden und anschließend der His$_6$-Tag mit der Enterokinase abgedaut, sodass das Protein eluierte, der Tag jedoch an der Säule blieb. Beim Verdau waren mehrere hPAK1-Fragmente entstanden (siehe 3.7.3.2). Es wurde versucht diese voneinander zu trennen. Zunächst wurde hierfür eine SEC durchgeführt, jedoch ohne einen weiteren Trennungserfolg zu erzielen (siehe 3.7.3.2). Aus diesem Grund wurde ebenfalls eine Anionenaustauschchromatografie (AEC) ausprobiert. Hierbei wurden drei AEC-Säulen mit unterschiedlicher Oberflächenmodifikation und Oberflächengröße ausprobiert, d.h. mit verschiedener Austauschkapazität getestet: (1) HiTrap ANX FF, 1ml, (2) HiTrap DEAE FF, 1ml und (3) HiTrap Q XL, 1ml. Zur Elution wurde ein linearer Salzgradient benutzt (0-1M NaCl in 20 ml bei 1 ml/min). Es wurden 1 ml-Fraktionen gesammelt. Der Reinigungserfolg wurde mittels SDS-PAGE geprüft. Das Chromatogramm und das Reinigungsgel zur Säule HiTrap ANX FF sind in Abb. 6-6 gezeigt. Die Fraktionen, in denen dem Chromatogramm nach Protein enthalten sein sollte, wurden im SDS-Gel untersucht.

Hierbei zeigten sich lediglich in den Fraktionen des größten Peaks (Fraktion 8-11) eindeutige Proteinbanden. Bis auf in Fraktion 8 waren immer noch drei Banden zu beobachten, d.h. kein Trennungserfolg zu verzeichnen.

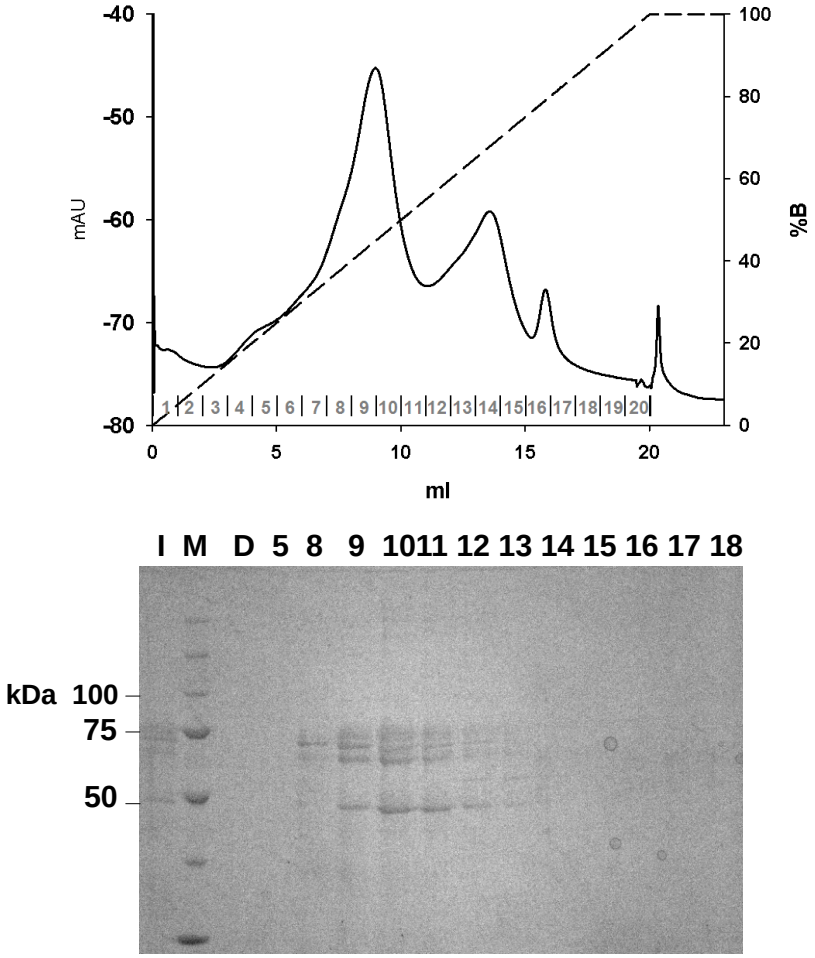


Abb. 6-6: Reinigung von hPAK1 mittels Anionenaustauschchromatografie (Säule: HiTrap ANX FF). Um die beim Verdau entstandenen Fragmente gegebenenfalls weiter zu trennen, wurde eine Anionenaustauschchromatografie (AEC) durchgeführt. Im Chromatogramm (*oben*) waren mehrere Peaks zu erkennen. Eine Auswahl der gesammelten Fraktionen wurde im SDS-Gel analysiert. *— UV-Signal in mAU, --- Salzgradient B in % (100% entsprachen 1 M NaCl), I: Input, M: Proteinstandard, D: Durchfluss, 5-18: Elutionsfraktion 5-18*

In der 8. Fraktion wurde primär eine Bande (die oberste Bande) detektiert. Diese war jedoch sehr schwach und stellte nur einen sehr geringen Anteil dar. Folglich musste die Trennung als sehr ineffizient eingestuft werden. Die Proteinkonzentration wurde zwar nicht bestimmt, trotzdem ist fraglich, ob auf diese Weise ausreichend Protein für weiterführende Experimente gereinigt werden könnte. Die Chromatogramme der Säulen HiTrap DEAE FF und HiTrap Q XL zeigten keine Peaks (Daten nicht gezeigt). Dennoch wurden die Elutionsfraktionen beider Säulen elektrophoretisch analysiert. Beide Reinigungsgele waren ohne erkennbare Banden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend scheint auch die AEC keine geeignete Methode zur weiteren Fragmenttrennung im größeren Maßstab zu sein. Ein großes generelles Problem stellte allerdings die geringe Ausbeute im ersten Reinigungsschritt dar. Es wurde nur wenig Protein auf die Säulen gegeben, welches bei der Elution zusätzlich auch noch verdünnt wurde.

6.6. Dimerisierung von rekombinanten His_6-hPAK1

Die Dimerisierung des heterolog exprimierten His6-hPAK1 sollte mittels SEC-Analyse untersucht werden. Experimente mit der Säule Bio-Sept SEC2000 blieben aufgrund eines zu geringen Auflösungsvermögen im relevanten kDa-Bereich ohne Aussage (siehe 3.8). Aus diesem Grund zur Superdex 200 10/300 gewechselt. Diese ergab eine deutlich bessere Auftrennung der Referenzproteine Katalase (240 kDa), ADH (150 kDa) und BSA (66 kDa) (vgl. Abb. 3-22 und 6-7). Nichtsdestotrotz waren die Chromatogramme aufgrund zahlreicher Peaks geringer Signalstärke für His_6-hPAK1 immer noch uneindeutig (Daten nicht gezeigt, siehe auch Erläuterungen in 3.8).

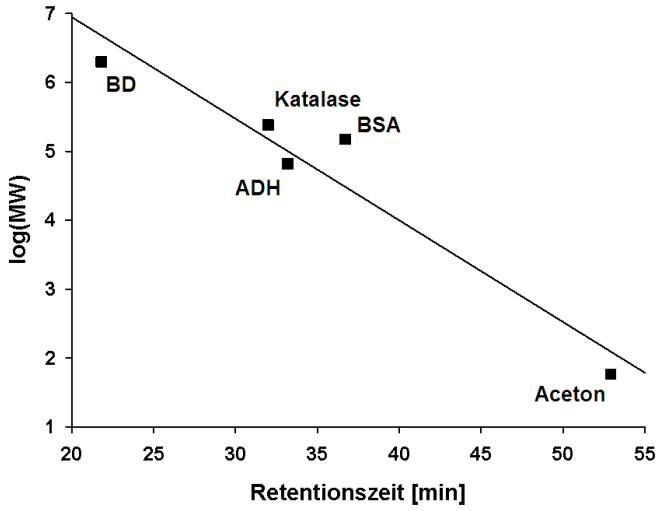


Abb. 6-7: Analytische SEC zur Größenbestimmung von His_6-hPAK1. Kalibriergerade mit der Säule Superdex 200 10/300 bei einem Fluss von 0,4 ml/min.

6.7. Massenspektrometrische Analyse von PAK1-Substraten in ROS-Membranen

Zur Identifikation des enthaltenen Proteins oder der enthaltenen Proteine, wurde die Bande der putativen His_6-hPAK1-Substrate (siehe 3.10.2.2 und 3.10.2.4) als Doppelbande isoliert und zur massenspektrometrischen Analyse verschickt. Mittels Q-TOF-Analyse wurden die Sequenzen einiger Peptide bestimmt und anhand dieser die Identität des zugehörigen Proteins über die Proteindatenbank UniProtKB/Swiss-Prot (www.expasy.org) ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 6-1 dargestellt. Um gegebenenfalls weitere Ergebnisse zu erzielen, wurde die gleiche Probe für eine LC/MS-Analyse genutzt. Mit dieser Methode wurde ein sehr umfangreicher Datensatz generiert. Dieser ist in Tab. 6-2 gezeigt.

Tab. 6-1: Ergebnisse der Q-TOF-Analyse. Angegeben sind die Ergebnisse der Q-TOF-Analyse.

Masse M/Z	Ergebnis/Kürzel	Accnr. SwissProt	Größe Da.	Proteinsequenzen	Start-End	Bemerkung	Database	Score
729.8036	PPIase B	P80311	23729	K.DTNGSQFFITTVK.T	146 – 158		SwissProt	54
682.8036				K.TVDNFVALATGEK.G	72 – 84			42
936.9036	VAMP-2	P63026	12641	R.LQQTQAQVDEVVDIMR.V	32 – 47		SwissProt	28
833.9036				R.ADALQAGASQFETSAAK.L	67 – 83			43
736.8036	NDUFB8	Q02372	21639	K.QYPYNNLYLER.G	160 – 170		SwissProt	22
960.9036	NDUFB11	Q8HXG5	17562	R.WQEDPEPEDENLYEK.N	55 – 69		SwissProt	2
716.8036	NDUFB7	Q02368	16387	R.YLGDASVEPDPLR.M	9 – 21		SwissProt	46
738.8036	NDUFS7	P42026	23755	R.QSDVMIVAGTLTNK.M	119 – 132		SwissProt	36
746.9036				R.QSDVMIVAGTLTNK.M		Mox		11
605.8036	ARPC3	Q3T035	20533	K.LIGNMALLPIR.S	15 – 25		SwissProt	18
656.8036	PRAF3	Q5E9M1	21651	R.AWDDFFPGSDR.F	10 – 20		SwissProt	22
773.9036	RPL11	Q3T087	20240	K.VLEQLTGQTPVFSK.A	39 – 52		SwissProt	47
872.4036	Histone H2B type 1-N	Q32L48	13915	K.AMGNMNSFVNDIFER.I	59 – 73		SwissProt	22
851.8036	RPLP1	Q56K14	11507	K.AAGVNVEPFWPGLFAK.A	34 – 49		SwissProt	11
615.8036	TUBB2B	Q6B856	49 921	R.ISEQFTAMFR.R	381 – 390		SwissProt	9
833.9036	RPL12	P61284	17808	R.QAQIEVVPSASALIIK.A	68 – 83		SwissProt	16
851.8036	RPLP1	Q56K14	11507	K.AAGVNVEPFWPGLFAK.A	34 – 49		SwissProt	11
851.8036	Tubulin alpha	P81947	50120	R.AVFVDLEPTVIDEVR.T	65 – 79		SwissProt	4
813.8036	EMC4	Q3T0K8	20073	R.GGGQGDSLYPVGYLDK.Q	35 – 50		SwissProt	5

Tab.6-2: Ergebnisse der LC/MS-Analyse. Angegeben sind die Ergebnisse der LC/MS-Analyse geordnet vom höchsten zum geringsten Score. Zusätzlich angegeben ist die Zahl der Peptide, die zur Identifizierung des Proteins dienten, ebenso wie viele davon spezifisch waren. *OS: Organismus, GN: Genname, PE: Anzahl der Nachweise für die Existenz des Proteins, SV: Nummer der Sequenzversion,, AA: Aminosäure, MW: Molmasse, pI: isoelektrischer Punkt*

Accnr. SwissProt	Ergebnis/Kürzel	Score	Abdeckung	#spezifische Peptide	#Peptide	#AAs	MW [kDa]	berechneter pI
Q02368	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7 OS=Bos taurus GN=NDUFB7 PE=1 SV=2 - [NDUB7_BOVIN]	307,53	59,12	9	9	137	16,4	8,18
P80311	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Bos taurus GN=PPIB PE=1 SV=4 - [PPIB_BOVIN]	265,57	55,56	15	15	216	23,7	9,32
P63026	Vesicle-associated membrane protein 2 OS=Bos taurus GN=VAMP2 PE=1 SV=2 - [VAMP2_BOVIN]	180,11	45,69	4	7	116	12,6	8,13
P42029	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8 OS=Bos taurus GN=NDUFA8 PE=1 SV=2 - [NDUA8_BOVIN]	158,76	38,37	5	5	172	20,1	7,90
Q02372	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial OS=Bos taurus GN=NDUFB8 PE=1 SV=1 - [NDUB8_BOVIN]	142,35	39,78	6	6	186	21,6	6,11
P42026	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial OS=Bos taurus GN=NDUFS7 PE=1 SV=1 - [NDUS7_BOVIN]	135,07	21,30	5	5	216	23,8	9,86
Q02367	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6 OS=Bos taurus GN=NDUFB6 PE=1 SV=2 - [NDUB6_BOVIN]	109,70	45,31	6	6	128	15,5	9,61
Q148H0	Apolipoprotein O OS=Bos taurus GN=APOO PE=2 SV=1 - [APOO_BOVIN]	100,99	13,13	2	2	198	22,5	9,20
Q3MHM5	Tubulin beta-4B chain OS=Bos taurus GN=TUBB4B PE=2 SV=1 - [TBB4B_BOVIN]	81,32	28,54	3	10	445	49,8	4,89
Q2KJD0	Tubulin beta-5 chain OS=Bos taurus GN=TUBB5 PE=2 SV=1 - [TBB5_BOVIN]	81,11	24,77	2	9	444	49,6	4,89
P02470	Alpha-crystallin A chain OS=Bos taurus GN=CRYAA PE=1 SV=1 - [CRYAA_BOVIN]	74,62	23,70	4	4	173	19,8	6,20
Q6B856	Tubulin beta-2B chain OS=Bos taurus GN=TUBB2B PE=1 SV=2 - [TBB2B_BOVIN]	69,27	25,84	2	9	445	49,9	4,89
Q0VCH8	Transmembrane protein 65 OS=Bos taurus GN=TMEM65 PE=2 SV=1 - [TMM65_BOVIN]	64,26	27,97	6	6	236	25,0	8,60
Q8HXG5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11, mitochondrial OS=Bos taurus GN=NDUFB11 PE=1 SV=2 - [NDUBB_BOVIN]	63,37	27,27	4	4	154	17,6	5,41
Q56JX8	40S ribosomal protein S13 OS=Bos taurus GN=RPS13 PE=2 SV=3 - [RS13_BOVIN]	63,19	33,11	7	7	151	17,2	10,54
Q2KI07	ADP-ribosylation factor-like protein 8B OS=Bos taurus GN=ARL8B PE=2 SV=1 - [ARL8B_BOVIN]	60,79	25,81	6	6	186	21,5	8,15
Q0V7N0	Vesicle-associated membrane protein 1 OS=Bos taurus GN=VAMP1 PE=3 SV=2 - [VAMP1_BOVIN]	50,33	44,07	3	6	118	12,9	6,65

Fortsetzung Tab. 6-2:

Accnr. SwissProt	Ergebnis/Kürzel	Score	Abdeckung	#spezifische Peptide	#Peptide	#AAs	MW [kDa]	berechneter pI
Q0VCH8	Transmembrane protein 65 OS=Bos taurus GN=TMEM65 PE=2 SV=1 - [TMM65_BOVIN]	64,26	27,97	6	6	236	25,0	8,60
Q8HXG5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11, mitochondrial OS=Bos taurus GN=NDUFB11 PE=1 SV=2 - [NDUBB_BOVIN]	63,37	27,27	4	4	154	17,6	5,41
Q56JX8	40S ribosomal protein S13 OS=Bos taurus GN=RPS13 PE=2 SV=3 - [RS13_BOVIN]	63,19	33,11	7	7	151	17,2	10,54
Q2KI07	ADP-ribosylation factor-like protein 8B OS=Bos taurus GN=ARL8B PE=2 SV=1 - [ARL8B_BOVIN]	60,79	25,81	6	6	186	21,5	8,15
Q0V7N0	Vesicle-associated membrane protein 1 OS=Bos taurus GN=VAMP1 PE=3 SV=2 - [VAMP1_BOVIN]	50,33	44,07	3	6	118	12,9	6,65
Q02375	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial OS=Bos taurus GN=NDUFS4 PE=1 SV=1 - [NDUS4_BOVIN]	49,68	30,86	5	5	175	19,8	10,14
P81947	Tubulin alpha-1B chain OS=Bos taurus PE=1 SV=2 - [TBA1B_BOVIN]	48,79	18,18	6	6	451	50,1	5,06
P62808	Histone H2B type 1 OS=Bos taurus PE=1 SV=2 - [H2B1_BOVIN]	46,06	35,71	5	5	126	13,9	10,32
Q7YR75	39S ribosomal protein L12, mitochondrial OS=Bos taurus GN=MRPL12 PE=1 SV=1 - [RM12_BOVIN]	43,30	27,78	6	6	198	21,4	9,17
Q2NKR7	Protein FAM162A OS=Bos taurus GN=FAM162A PE=2 SV=1 - [F162A_BOVIN]	41,65	23,72	6	6	156	17,7	9,77
Q3T087	60S ribosomal protein L11 OS=Bos taurus GN=RPL11 PE=2 SV=3 - [RL11_BOVIN]	40,40	12,92	2	2	178	20,2	9,60
Q5E9M1	PRA1 family protein 3 OS=Bos taurus GN=ARL6IP5 PE=2 SV=1 - [PRAF3_BOVIN]	40,39	23,94	4	4	188	21,7	9,50
Q3MHM7	60S ribosomal protein L35 OS=Bos taurus GN=RPL35 PE=2 SV=3 - [RL35_BOVIN]	39,65	11,38	2	2	123	14,6	11,05
Q56JX5	40S ribosomal protein S25 OS=Bos taurus GN=RPS25 PE=2 SV=1 - [RS25_BOVIN]	37,62	24,00	3	3	125	13,7	10,11
P61284	60S ribosomal protein L12 OS=Bos taurus GN=RPL12 PE=2 SV=1 - [RL12_BOVIN]	37,54	43,03	5	5	165	17,8	9,42
Q5E9F7	Cofilin-1 OS=Bos taurus GN=CFL1 PE=2 SV=3 - [COF1_BOVIN]	37,31	27,11	3	3	166	18,5	8,00
P29105	Hippocalcin-like protein 1 OS=Bos taurus GN=HPCAL1 PE=1 SV=4 - [HPCL1_BOVIN]	37,14	32,64	5	6	193	22,3	5,35
A5PK61	Histone H3.3C OS=Bos taurus GN=H3F3C PE=2 SV=1 - [H3C_BOVIN]	36,83	19,85	3	3	136	15,4	11,49
Q3T0R1	40S ribosomal protein S18 OS=Bos taurus GN=RPS18 PE=2 SV=3 - [RS18_BOVIN]	36,56	38,82	7	7	152	17,7	10,99
Q56JU9	40S ribosomal protein S24 OS=Bos taurus GN=RPS24 PE=2 SV=2 - [RS24_BOVIN]	36,54	29,01	3	3	131	15,2	10,90
Q3T0F4	40S ribosomal protein S10 OS=Bos taurus GN=RPS10 PE=2 SV=1 - [RS10_BOVIN]	35,88	18,79	4	4	165	18,9	10,15
P00423	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial OS=Bos taurus GN=COX4I1 PE=1 SV=1 - [COX41_BOVIN]	34,38	26,63	5	5	169	19,6	9,31

Fortsetzung Tab. 6-2:

Accnr. SwissProt	Ergebnis/Kürzel	Score	Abdeckung	#spezifische Peptide	#Peptide	#AAs	MW [kDa]	berechneter pI
Q3SZV6	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim21 OS=Bos taurus GN=TIMM21 PE=2 SV=1 - [TIM21_BOVIN]	32,77	23,77	5	5	244	27,9	9,48
Q56K03	60S ribosomal protein L27a OS=Bos taurus GN=RPL27A PE=2 SV=3 - [RL27A_BOVIN]	32,00	15,54	3	3	148	16,6	11,12
Q2TBX5	Translocon-associated protein subunit delta OS=Bos taurus GN=SSR4 PE=2 SV=1 - [SSRD_BOVIN]	31,86	18,60	2	2	172	18,8	5,78
A4IF97	Myosin regulatory light chain 12B OS=Bos taurus GN=MYL12B PE=2 SV=1 - [ML12B_BOVIN]	31,57	40,35	7	7	171	19,7	4,84
P82669	28S ribosomal protein S25, mitochondrial OS=Bos taurus GN=MRPS25 PE=1 SV=2 - [RT25_BOVIN]	31,02	30,64	5	5	173	20,0	9,07
P00829	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Bos taurus GN=ATP5B PE=1 SV=2 - [ATPB_BOVIN]	29,84	9,47	3	3	528	56,2	5,27
Q3T0V4	40S ribosomal protein S11 OS=Bos taurus GN=RPS11 PE=2 SV=3 - [RS11_BOVIN]	29,77	27,22	6	6	158	18,4	10,30
Q3T0C7	Stathmin OS=Bos taurus GN=STMN1 PE=2 SV=3 - [STMN1_BOVIN]	28,73	24,83	5	5	149	17,3	5,97
P82911	28S ribosomal protein S11, mitochondrial OS=Bos taurus GN=MRPS11 PE=1 SV=2 - [RT11_BOVIN]	28,45	27,41	4	4	197	20,8	10,49
P61602	Neurocalcin-delta OS=Bos taurus GN=NCALD PE=1 SV=2 - [NCALD_BOVIN]	28,35	27,46	4	5	193	22,2	5,35
Q3SZQ6	60S ribosomal protein L32 OS=Bos taurus GN=RPL32 PE=2 SV=3 - [RL32_BOVIN]	27,98	22,22	4	4	135	15,9	11,33
Q5E936	Thioredoxin domain-containing protein 12 OS=Bos taurus GN=TXNDC12 PE=2 SV=1 - [TXD12_BOVIN]	27,86	38,37	5	5	172	19,2	5,27
Q9N2J2	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial OS=Bos taurus GN=GPX4 PE=2 SV=2 - [GPX4_BOVIN]	27,72	22,84	4	4	197	22,2	8,65
Q3T0Q4	Nucleoside diphosphate kinase B OS=Bos taurus GN=NME2 PE=1 SV=1 - [NDKB_BOVIN]	26,51	25,66	3	3	152	17,3	7,97
P02510	Alpha-crystallin B chain OS=Bos taurus GN=CRYAB PE=1 SV=2 - [CRYAB_BOVIN]	25,30	18,29	3	3	175	20,0	7,33
A1A4P5	Prefoldin subunit 2 OS=Bos taurus GN=PFDN2 PE=2 SV=1 - [PFD2_BOVIN]	24,53	29,22	4	4	154	16,6	6,58
O41515	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B OS=Bos taurus GN=MAP1LC3B PE=1 SV=4 - [MLP3B_BOVIN]	23,73	24,80	2	3	125	14,7	8,66
Q2HJE9	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17-B OS=Bos taurus GN=TIMM17B PE=2 SV=1 - [TI17B_BOVIN]	23,54	21,51	3	3	172	18,3	9,03
P02769	Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4 - [ALBU_BOVIN]	23,30	13,34	7	7	607	69,2	6,18
P00428	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial OS=Bos taurus GN=COX5B PE=1 SV=2 - [COX5B_BOVIN]	22,73	19,38	3	3	129	13,8	8,51

Fortsetzung Tab. 6-2:

Accnr. SwissProt	Ergebnis/Kürzel	Score	Abdeckung	#spezifische Peptide	#Peptide	#AAs	MW [kDa]	berechneter pI
P22027	ATP synthase subunit s, mitochondrial OS=Bos taurus GN=ATP5S PE=1 SV=2 - [ATP5S_BOVIN]	22,28	20,00	4	4	200	23,3	8,34
Q3SZX5	39S ribosomal protein L22, mitochondrial OS=Bos taurus GN=MRPL22 PE=1 SV=1 - [RM22_BOVIN]	20,76	35,29	6	6	204	23,5	9,86
P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PEBP1 PE=1 SV=3 - [PEBP1_HUMAN]	20,40	18,18	1	2	187	21,0	7,53
Q3SYX9	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5 OS=Bos taurus GN=ARPC5 PE=1 SV=3 - [ARPC5_BOVIN]	20,29	21,19	3	3	151	16,2	6,18
Q3T0D8	Ragulator complex protein LAMTOR1 OS=Bos taurus GN=LAMTOR1 PE=2 SV=1 - [LTOR1_BOVIN]	19,47	30,43	4	4	161	17,7	5,15
P62763	Visinin-like protein 1 OS=Bos taurus GN=VSNL1 PE=1 SV=2 - [VISL1_BOVIN]	19,11	14,14	3	3	191	22,1	5,15
Q5E9A6	Vacuolar protein-sorting-associated protein 25 OS=Bos taurus GN=VPS25 PE=2 SV=1 - [VPS25_BOVIN]	18,75	30,11	4	4	176	20,7	6,34
Q3T035	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3 OS=Bos taurus GN=ARPC3 PE=1 SV=3 - [ARPC3_BOVIN]	18,47	13,48	2	2	178	20,5	8,59
Q3T0K8	ER membrane protein complex subunit 4 OS=Bos taurus GN=EMC4 PE=2 SV=1 - [EMC4_BOVIN]	18,39	15,30	3	3	183	20,1	8,62
Q17QM9	CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1 OS=Bos taurus GN=CNRIP1 PE=2 SV=1 - [CNRP1_BOVIN]	18,19	27,44	4	4	164	18,7	7,94
Q17QQ3	Synaptosomal-associated protein 25 OS=Bos taurus GN=SNAP25 PE=1 SV=1 - [SNP25_BOVIN]	18,11	14,56	2	2	206	23,3	4,77
A1A4R1	Histone H2A type 2-C OS=Bos taurus GN=HIST2H2AC PE=2 SV=1 - [H2A2C_BOVIN]	17,98	27,13	3	3	129	14,0	10,90
O97725	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12 OS=Bos taurus GN=NDUFA12 PE=1 SV=1 - [NDUAC_BOVIN]	17,51	28,28	3	3	145	17,1	9,67
Q2TBN3	Centrin-2 OS=Bos taurus GN=CETN2 PE=2 SV=1 - [CETN2_BOVIN]	17,34	25,00	3	3	172	19,8	5,00
Q24JY1	60S ribosomal protein L23a OS=Bos taurus GN=RPL23A PE=2 SV=1 - [RL23A_BOVIN]	17,23	28,21	6	6	156	17,7	10,45
P02253	Histone H1.2 OS=Bos taurus GN=HIST1H1C PE=1 SV=2 - [H12_BOVIN]	16,57	17,37	4	4	213	21,3	11,00
Q56JV3	GTP-binding protein Rheb OS=Bos taurus GN=RHEB PE=2 SV=1 - [RHEB_BOVIN]	16,22	22,83	3	3	184	20,5	6,80
A5PK63	40S ribosomal protein S17 OS=Bos taurus GN=RPS17 PE=2 SV=1 - [RS17_BOVIN]	16,11	23,70	2	2	135	15,6	9,73
Q5E963	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein OS=Bos taurus GN=ARPC5L PE=2 SV=1 - [ARP5L_BOVIN]	15,84	16,34	2	2	153	16,9	6,60
Q58CY6	Prostamide/prostaglandin F synthase OS=Bos taurus GN=FAM213B PE=2 SV=1 - [PGFS_BOVIN]	15,68	17,91	3	3	201	21,5	6,33
A6QPI6	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog OS=Bos taurus GN=TOMM22 PE=2 SV=1 - [TOM22_BOVIN]	15,62	33,57	3	3	140	15,3	4,37

Fortsetzung Tab. 6-2:

Accnr. SwissProt	Ergebnis/Kürzel	Score	Abdeckung	#spezifische Peptide	#Peptide	#AAs	MW [kDa]	berechneter pI
P06394	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Bos taurus GN=KRT10 PE=3 SV=1 - [K1C10_BOVIN]	15,25	7,98	4	4	526	54,8	5,11
Q56K10	40S ribosomal protein S15 OS=Bos taurus GN=RPS15 PE=2 SV=3 - [RS15_BOVIN]	15,11	22,07	3	3	145	17,0	10,39
P84080	ADP-ribosylation factor 1 OS=Bos taurus GN=ARF1 PE=1 SV=2 - [ARF1_BOVIN]	15,00	20,44	3	3	181	20,7	6,80
P33567	Beta-synuclein OS=Bos taurus GN=SNCB PE=1 SV=1 - [SYUB_BOVIN]	14,91	17,91	2	3	134	14,3	4,41
P13696	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Bos taurus GN=PEBP1 PE=1 SV=2 - [PEBP1_BOVIN]	14,83	24,06	2	3	187	21,0	7,49
Q32P65	Mimitin, mitochondrial OS=Bos taurus GN=NDUFAF2 PE=2 SV=1 - [MIMIT_BOVIN]	14,37	16,07	3	3	168	19,6	7,42
Q3T0G8	Alpha-synuclein OS=Bos taurus GN=SNCA PE=2 SV=1 - [SYUA_BOVIN]	13,82	27,14	2	3	140	14,5	4,73
Q3SZ43	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2 OS=Bos taurus GN=UBE2V2 PE=2 SV=3 - [UB2V2_BOVIN]	13,82	49,66	7	7	145	16,4	8,09
Q3T149	Heat shock protein beta-1 OS=Bos taurus GN=HSPB1 PE=2 SV=1 - [HSPB1_BOVIN]	13,65	27,86	4	4	201	22,4	6,40
Q05B71	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2 OS=Bos taurus GN=CISD2 PE=2 SV=1 - [CISD2_BOVIN]	13,32	25,19	3	3	135	15,3	9,61
P04695	Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-1 OS=Bos taurus GN=GNAT1 PE=1 SV=3 - [GNAT1_BOVIN]	13,24	13,71	3	3	350	39,9	5,73
Q08E52	Serine/threonine-protein kinase PAK 1 OS=Bos taurus GN=PAK1 PE=1 SV=1 - [PAK1_BOVIN]	12,97	10,85	3	3	544	60,5	5,86
P19483	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Bos taurus GN=ATP5A1 PE=1 SV=1 - [ATPA_BOVIN]	12,69	9,22	4	4	553	59,7	9,19
Q1JQC5	Regulator of microtubule dynamics protein 3 OS=Bos taurus GN=RMDN3 PE=2 SV=1 - [RMD3_BOVIN]	12,64	8,07	2	2	471	51,9	5,07
Q32L97	Vesicle-associated membrane protein 4 OS=Bos taurus GN=VAMP4 PE=2 SV=1 - [VAMP4_BOVIN]	12,53	14,89	2	2	141	16,4	7,34
Q5XQN5	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Bos taurus GN=KRT5 PE=1 SV=1 - [K2C5_BOVIN]	12,37	10,65	6	6	601	62,9	7,81
A6H773	Transmembrane protein 70, mitochondrial OS=Bos taurus GN=TMEM70 PE=2 SV=1 - [TMM70_BOVIN]	12,36	13,39	3	3	254	28,1	9,61
Q0VCY1	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A OS=Bos taurus GN=VAPA PE=2 SV=1 - [VAPA_BOVIN]	12,18	10,44	2	2	249	27,8	8,60
Q56JW4	Adenine phosphoribosyltransferase OS=Bos taurus GN=APRT PE=2 SV=1 - [APT_BOVIN]	12,04	12,78	2	2	180	19,5	7,72
Q1RMH8	Sorting nexin-3 OS=Bos taurus GN=SNX3 PE=2 SV=3 - [SNX3_BOVIN]	12,02	11,73	3	3	162	18,8	8,66
Q9TTK8	Creatine kinase U-type, mitochondrial OS=Bos taurus GN=CKMT1 PE=2 SV=1 - [KCRU_BOVIN]	11,70	10,34	3	3	416	46,9	8,34

Fortsetzung Tab. 6-2:

Accnr. SwissProt	Ergebnis/Kürzel	Score	Abdeckung	#spezifische Peptide	#Peptide	#AAs	MW [kDa]	berechneter pI
Q5EA61	Creatine kinase B-type OS=Bos taurus GN=CKB PE=2 SV=1 - [KCRB_BOVIN]	11,63	11,55	3	3	381	42,7	5,78
P62935	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Bos taurus GN=PPIA PE=1 SV=2 - [PPIA_BOVIN]	11,46	14,02	2	2	164	17,9	8,16
Q29RM3	Receptor expression-enhancing protein 5 OS=Bos taurus GN=REEP5 PE=2 SV=1 - [REEP5_BOVIN]	11,34	16,93	4	4	189	21,4	8,12
P60712	Actin, cytoplasmic 1 OS=Bos taurus GN=ACTB PE=1 SV=1 - [ACTB_BOVIN]	11,28	17,60	5	5	375	41,7	5,48
Q3T0M0	Vacuolar protein sorting-associated protein 29 OS=Bos taurus GN=VPS29 PE=2 SV=1 - [VPS29_BOVIN]	10,73	16,67	3	3	186	20,9	7,05
Q2TA37	ADP-ribosylation factor-like protein 2 OS=Bos taurus GN=ARL2 PE=1 SV=1 - [ARL2_BOVIN]	10,17	18,48	3	3	184	20,9	6,34
P12344	Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Bos taurus GN=GOT2 PE=1 SV=2 - [AATM_BOVIN]	10,15	9,07	3	3	430	47,5	9,07
Q3T0L3	39S ribosomal protein L17, mitochondrial OS=Bos taurus GN=MRPL17 PE=1 SV=1 - [RM17_BOVIN]	9,31	11,63	2	2	172	19,7	9,98
Q3ZBH8	40S ribosomal protein S20 OS=Bos taurus GN=RPS20 PE=3 SV=1 - [RS20_BOVIN]	9,20	19,33	2	2	119	13,4	9,94
P00171	Cytochrome b5 OS=Bos taurus GN=CYB5A PE=1 SV=3 - [CYB5_BOVIN]	9,18	25,37	3	3	134	15,3	5,03
Q2HJ23	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A OS=Bos taurus GN=MAP1LC3A PE=2 SV=1 - [MLP3A_BOVIN]	9,12	22,31	2	3	121	14,3	8,68
Q3ZBL5	Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochondrial OS=Bos taurus GN=PTRH2 PE=2 SV=1 - [PTH2_BOVIN]	9,09	19,55	2	2	179	19,3	8,44
P23004	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial OS=Bos taurus GN=UQCRC2 PE=1 SV=2 - [QCR2_BOVIN]	9,07	6,62	2	2	453	48,1	8,73
Q0IIM2	ADP-ribosylation factor-like protein 6 OS=Bos taurus GN=ARL6 PE=1 SV=1 - [ARL6_BOVIN]	8,86	17,74	3	3	186	21,0	8,78
Q3ZBR7	39S ribosomal protein L18, mitochondrial OS=Bos taurus GN=MRPL18 PE=2 SV=1 - [RM18_BOVIN]	8,09	13,89	2	2	180	20,4	9,67
Q2TBS2	39S ribosomal protein L21, mitochondrial OS=Bos taurus GN=MRPL21 PE=1 SV=1 - [RM21_BOVIN]	7,97	14,35	2	2	209	23,2	9,88
P62803	Histone H4 OS=Bos taurus PE=1 SV=2 - [H4_BOVIN]	7,81	29,13	3	3	103	11,4	11,36
P82919	28S ribosomal protein S18a, mitochondrial OS=Bos taurus GN=MRPS18A PE=1 SV=3 - [RT18A_BOVIN]	7,80	19,90	3	3	196	22,3	10,37
P02699	Rhodopsin OS=Bos taurus GN=RHO PE=1 SV=1 - [OPSD_BOVIN]	7,80	8,33	2	2	348	39,0	6,27
A2VDT1	Protein tyrosine phosphatase type IVA 3 OS=Bos taurus GN=PTP4A3 PE=2 SV=1 - [TP4A3_BOVIN]	7,60	17,92	2	2	173	19,5	9,07
P45879	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Bos taurus GN=VDAC1 PE=1 SV=3 - [VDAC1_BOVIN]	7,55	11,31	3	3	283	30,7	8,54
Q5E9F5	Transgelin-2 OS=Bos taurus GN=TAGLN2 PE=2 SV=3 - [TAGL2_BOVIN]	7,46	18,59	3	3	199	22,4	8,24

Fortsetzung Tab. 6-2:

Accnr. SwissProt	Ergebnis/Kürzel	Score	Abdeckung	#spezifische Peptide	#Peptide	#AAs	MW [kDa]	berechneter pI
Q862I1	60S ribosomal protein L24 OS=Bos taurus GN=RPL24 PE=2 SV=2 - [RL24_BOVIN]	7,35	13,38	2	2	157	17,8	11,25
Q2TBW6	ADP-ribosylation factor-like protein 3 OS=Bos taurus GN=ARL3 PE=2 SV=1 - [ARL3_BOVIN]	7,20	16,48	2	2	182	20,5	7,24
Q02380	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5, mitochondrial OS=Bos taurus GN=NDUFB5 PE=1 SV=1 - [NDUB5_BOVIN]	7,13	6,35	2	2	189	21,6	9,61
Q3T199	40S ribosomal protein S23 OS=Bos taurus GN=RPS23 PE=2 SV=1 - [RS23_BOVIN]	7,04	15,38	2	2	143	15,8	10,49
Q3T0C9	Synaptojanin-2-binding protein OS=Bos taurus GN=SYNJ2BP PE=2 SV=1 - [SYJ2B_BOVIN]	4,64	13,10	2	2	145	15,8	5,94
Q5E947	Peroxiredoxin-1 OS=Bos taurus GN=PRDX1 PE=2 SV=1 - [PRDX1_BOVIN]	7,02	11,06	2	2	199	22,2	8,40
Q8MJN0	FUN14 domain-containing protein 2 OS=Bos taurus GN=FUNDC2 PE=2 SV=1 - [FUND2_BOVIN]	7,00	20,53	3	3	190	20,6	9,57
P67810	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A OS=Bos taurus GN=SEC11A PE=2 SV=1 - [SC11A_BOVIN]	6,41	9,50	2	2	179	20,6	9,48
P48616	Vimentin OS=Bos taurus GN=VIM PE=1 SV=3 - [VIME_BOVIN]	6,34	10,30	4	4	466	53,7	5,12
Q5E953	Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1 OS=Bos taurus GN=UFC1 PE=2 SV=1 - [UFC1_BOVIN]	6,16	11,38	2	2	167	19,4	7,40
P42899	60S acidic ribosomal protein P2 OS=Bos taurus GN=RPLP2 PE=3 SV=1 - [RLA2_BOVIN]	6,08	39,13	2	2	115	11,7	4,61
A2VE79	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 1 OS=Bos taurus GN=NUDT3 PE=2 SV=1 - [NUDT3_BOVIN]	6,06	13,95	2	2	172	19,3	5,95
P61356	60S ribosomal protein L27 OS=Bos taurus GN=RPL27 PE=2 SV=2 - [RL27_BOVIN]	5,78	20,59	3	3	136	15,8	10,56
Q3MHL6	TSC22 domain family protein 1 OS=Bos taurus GN=TSC22D1 PE=2 SV=1 - [T22D1_BOVIN]	5,59	19,44	2	2	144	15,7	5,20
P35604	Coatomer subunit zeta-1 OS=Bos taurus GN=COPZ1 PE=1 SV=2 - [COPZ1_BOVIN]	5,49	16,38	2	2	177	20,2	4,81
Q3ZCF3	S-phase kinase-associated protein 1 OS=Bos taurus GN=SKP1 PE=2 SV=1 - [SKP1_BOVIN]	5,23	15,34	2	2	163	18,6	4,54
Q148F8	Heat shock protein beta-6 OS=Bos taurus GN=HSPB6 PE=2 SV=1 - [HSPB6_BOVIN]	5,20	14,02	2	2	164	17,5	6,40
Q2TA29	Ras-related protein Rab-11A OS=Bos taurus GN=RAB11A PE=2 SV=3 - [RB11A_BOVIN]	5,20	10,19	2	2	216	24,5	6,57
Q0IIG8	Ras-related protein Rab-18 OS=Bos taurus GN=RAB18 PE=2 SV=1 - [RAB18_BOVIN]	4,76	12,62	2	2	206	23,0	5,24
P82916	28S ribosomal protein S17, mitochondrial OS=Bos taurus GN=MRPS17 PE=1 SV=3 - [RT17_BOVIN]	4,32	15,38	2	2	130	14,5	9,64

Fortsetzung Tab. 6-2:

Accnr. SwissProt	Ergebnis/Kürzel	Score	Abdeckung	#spezifische Peptide	#Peptide	#AAs	MW [kDa]	berechneter pI
P82670	28S ribosomal protein S10, mitochondrial OS=Bos taurus GN=MRPS10 PE=1 SV=2 - [RT10_BOVIN]	4,30	10,45	2	2	201	23,0	9,28
Q9BGI1	Peroxiredoxin-5, mitochondrial OS=Bos taurus GN=PRDX5 PE=2 SV=2 - [PRDX5_BOVIN]	4,25	10,96	2	2	219	23,2	8,07
P29172	Microtubule-associated protein tau OS=Bos taurus GN=MAPT PE=1 SV=3 - [TAU_BOVIN]	4,22	4,91	2	2	448	46,3	8,47
Q148J6	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4 OS=Bos taurus GN=ARPC4 PE=1 SV=3 - [ARPC4_BOVIN]	4,09	9,52	2	2	168	19,7	8,43
Q56JV1	40S ribosomal protein S26 OS=Bos taurus GN=RPS26 PE=3 SV=3 - [RS26_BOVIN]	4,02	20,87	2	2	115	13,0	11,00
Q1JQA5	Neudesin OS=Bos taurus GN=NENF PE=2 SV=1 - [NENF_BOVIN]	3,90	11,24	2	2	169	18,3	4,94
P02722	ADP/ATP translocase 1 OS=Bos taurus GN=SLC25A4 PE=1 SV=3 - [ADT1_BOVIN]	3,74	7,72	2	2	298	32,9	9,83
Q95KV7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13 OS=Bos taurus GN=NDUFA13 PE=1 SV=3 - [NDUAD_BOVIN]	2,64	13,89	2	2	144	16,7	9,23
A6QP01	Selenoprotein T OS=Bos taurus GN=SELT PE=2 SV=2 - [SELT_BOVIN]	2,55	10,26	2	2	195	22,2	8,60
Q3SZF2	ADP-ribosylation factor 4 OS=Bos taurus GN=ARF4 PE=2 SV=3 - [ARF4_BOVIN]	0,00	13,89	2	2	180	20,5	6,19

7. PUBLIKATIONEN

Aus dieser Arbeit ist bisher folgende Publikation hervorgegangen:

KÖSTER M, DELL'ORCO D und KOCH K-W (2014) *The interaction network of rhodopsin involving the heterotrimeric G protein transducin and the monomeric GTPase Rac1 is determined by distinct binding processes*, FEBS J, doi: 10.1111/febs.13064

8. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt sowie alle Zitate kenntlich gemacht zu haben. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht (siehe Abschnitt 7)

Ort, Datum Maike Köster

9. CURRICULUM VITAE

Persönliche Informationen

Name	Maike Köster
Geburtsdatum	12.03.1986
Geburtsort	Bremerhaven
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Berufspraxis

05/2011 – 01/2015	Anfertigung der Promotion (Dr. rer. nat.) in der AG Biochemie an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
05/2011 – 04/2014	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AG Biochemie der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg mit dem Ziel der Promotion (Dr. rer. nat.)
04/2008 und 05/2008	Studentische Hilfskraft in der AG Biochemie der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg **Tätigkeiten:** · Betreuung des Grundpraktikums im Fach Biochemie · Tutorium zur Grundvorlesung im Fach Biochemie

Weitere berufliche Informationen

06/2013	Posterpräsentation beim "European Meeting on Phototransduction" (EMP), Hanse-Wissenschaftskolleg, Delmenhorst
04/2013	Teilnahme am Symposium der Forschergruppe "Dynamik und Stabilität retinaler Verarbeitung", Hanse-Wissenschaftskolleg, Delmenhorst
03/2013	Posterpräsentation beim "Pro Retina" - Meeting , Seminaris SeeHotel, Potsdam
01/2012	Vortrag bei der Seminar-Reihe "Hanse Feedback in Neuroscience", Hanse-Wissenschaftskolleg, Delmenhorst

Publikationen

- KÖSTER M, DELL'ORCO D und KOCH K-W (2014) *The interaction network of rhodopsin involving the heterotrimeric G-protein transducin and the monomeric GTPase Rac1 is determined by distinct binding processes*, FEBS J, doi: 10.1111/febs.13064

Hochschulausbildung

2008 – 2011	Studium an der Medizinischen Hochschule Hannover im Fach Biochemie **Titel:** Master of Science in Biochemie **Gesamtnote:** sehr gut (1,4) **Titel der Masterarbeit:** *Anpassung der proteolytischen Aktivität von BoNT/B an TI-VAMP durch Mutation im Bereich der S5 bis S2' Bindungstasche* (Note: 1,3)
2005 - 2008	Studium an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg im Fach Biologie mit Spezialisierung im Fach Biochemie **Titel:** Bachelor of Science in Biologie **Gesamtnote:** gut (1,63) **Titel der Bachelorarbeit**: *Identifizierung der Hauptbestandteile in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) aus der Wirbeltier-retina* (Note: 1,3)
2004 – 2005	Studium an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg im Fach Chemie (Abschlussziel: Diplom)

Schulbildung

1997 – 2004	Sekundarstufe I und II, Gymnasium Wesermünde (dem Land Niedersachsen zugehörig) in Bremerhaven **Abschluss:** Allgemeine Hochschulreife
1995 – 1997	Orientierungsstufe, Edith Stein Schule, Bremerhaven
1992 - 1995	Grundschule, Altwulsdorfer Schule, Bremerhaven

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch danke ich für die Überlassung des Themas, das Engagement und die ständige Hilfs- und Disskusionsbereitschaft.

Herrn Dr. Alexander Scholten danke ich für die Bereitstellung verschiedener Plasmidkonstrukte und die Hilfe bei methodischen Fragestellungen.

Bei Herrn Werner Säftel bedanke ich mich für die große Unterstützung im Labor, die die Umsetzung vieler Experimente erst möglich gemacht hat.

Herrn Dr. Michael Müller danke ich für die Bereitstellung der OPL-Präparation und die zahlreichen aufmunternden Worte.

Herrn Dr. Daniele Dell'Orco danke ich für die Simulation der Rac1/G_T-Kompetition und der konstruktiven Zusammenarbeit bei der Publikation.

Frau Inga Kayser und Herrn Dr. Uwe Winkler danke ich für die Unterstützung im Isotopenlabor.

Frau Jutta Appelt danke ich für die Organisation der Zellkultur und die Blumen beim AG-Frühstück.

Frau Dr. Ramona Fries und Herrn Dr. Patrick Zägel sowie Frau Astrid Markgraf, M.Sc., Herrn Stefan Sulmann, M.Sc. und Frau Farina Vocke, M.Sc. danke ich für eine sehr schöne Zusammenarbeit und den geteilten „Leidensweg".

Bei allen Mitgliedern der AG Biochemie bedanke ich mich dafür, dass mir die Zeit als Doktorandin immer in guter Erinnerung bleiben wird.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, meiner erweiterten Familie und meinen Freunden für das Verständnis und die Unterstützung während der gesamten Arbeit.