

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



[PDF-Version]

DISSERTATION

**„Differentielle Rekrutierung der Isoformen
des kleinen G-Proteins Rho bei der Invasion
von *Shigellen* in Epithelzellen“**

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)
vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Birgit Bohm
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. M. Dietel

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. Ulf B. Göbel, Berlin
2. Prof. Dr. Dr. Klaus Aktories, Freiburg
3. Prof. Dr. Günter Schulz, Berlin

Datum der Promotion: 13. 12. 1999

Abstract

Shigella is the etiologic agent of human bacillary, an infectious large bowel disease. A major feature of *Shigella*'s pathogenic potential is the capacity to invade epithelial cells. *Shigella* entry into epithelial cells is considered a parasite-induced internalization requiring cytoskeletal rearrangements; *Shigella* entry induces a blossom-like membrane structure at the bacterial entry site. This membrane folding process is dependent on the small GTPase rho. It has been shown that three rho isoforms rhoA, rhoB and rhoC are recruited into bacterial entry sites with different localization relative to the membrane structures. While rhoA preferentially accumulates in close vicinity to entering bacteria, rhoB and rhoC are recruited into the tips of *Shigella*-induced cellular protrusions. We could show that the C-terminal CAAX-region of rho is a prerequisite for recruitment, but not sufficient for different recruitment of rho isoforms. Additional information for differential recruitment patterns seems to come from the preterminal region of rho proteins. This result is of great importance for the functional role of rho during *Shigella*-invasion into epithelial cells.

Zusammenfassung

Bakterien der Gattung *Shigella* sind die Erreger der bakteriellen Ruhr beim Menschen. Der wesentliche Virulenzfaktor der *Shigellen* ist ihre Fähigkeit zur Invasion. Die Invasion in Epithelzellen ist Ausdruck des erregerspezifischen Infektionsprozesses, der gekennzeichnet ist durch eine vom Bakterium induzierte zelluläre Aufnahme über einen Phagozytose-ähnlichen Mechanismus. In dessen Verlauf führt die charakteristische Reorganisation des Zytoskeletts der Zelle zur Ausbildung einer blütenartigen Membranstruktur an der bakteriellen Eintrittsstelle. Als essentielles Glied der Signalisationskaskade vom Bakterium zum zellulären Zytoskelett erwies sich das kleine G-Protein Rho. Es wurde gezeigt, daß Rho als Regulator der Veränderungen des Zytoskeletts selbst an den bakteriellen Invasionslocus rekrutiert wird. Diese Rekrutierung umfaßt drei Isoformen von Rho: RhoA, RhoB und RhoC. Trotz hoher Sequenzhomologie der Isoformen untereinander (85%) existiert ein unterschiedliches Rekrutierungsmuster dieser Isoproteine an der Eintrittsstelle von *Shigella flexneri*. RhoA akkumuliert vorwiegend um die eindringenden Bakterien herum. Demgegenüber werden RhoB und RhoC in die bakterieninduzierten zellulären Protrusionen rekrutiert. Der Mechanismus dieser isoformspezifischen Rekrutierung ist nicht bekannt. Anhand unserer Experimente konnten wir zeigen, daß das allen kleinen G-Proteinen gemeinsame C-terminale Peptid-Motiv CAAX (C = Cystein, A = aliphatische Aminosäure, X = Leucin) eine wesentliche Voraussetzung für die Rekrutierung von Rho darstellt, sich die isoformspezifische Rekrutierung jedoch nicht anhand des CAAX-Motivs erklären läßt. Bedeutsam für die differentielle Rekrutierung der Isoproteine ist vielmehr die präterminale Region des Moleküls. Diese Beobachtung hat weitreichende Konsequenzen für die funktionelle Rolle von Rho bei der Epithelzelloinvasion durch *Shigella*.

Schlagwörter

Shigella, GTPase, Rho, Zytoskelett

Keywords

Shigella, GTPase, rho, cytoskeleton

Danksagung

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

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. Thomas Adam für die Überlassung des Themas der Arbeit und die damit verbundene experimentelle Arbeit in seinem Labor aussprechen. Herr Dr. Adam verfolgte das Entstehen dieser Arbeit mit großem Interesse, vielen wertvollen Anregungen und konstruktiver Kritik. Er war stets für mich erreichbar und vermittelte mir in vielen Gesprächen einen Teil seines fundierten, umfangreichen Wissens.

Ich möchte Frau Dr. Barbara Graf, Frau Anke Friedrich, Herrn Friedrich von Winzingerode und Herrn Marco Kachler für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die aufmunternden Worte und Ratschläge danken. Ihnen ist es zu verdanken, daß ich mich am Institut schnell eingelebt und wohlfühlt habe.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Ehemann und meinen Eltern, die mir durch ihr Verständnis und ihre Fürsorge die Arbeit sehr erleichterten.

1 Einleitung

Die Bakterien der Gattung *Shigella* sind die Erreger der Bakterienruhr beim Menschen. *Shigellen* sind unbegeißelte und damit unbewegliche, gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien. Phylogenetisch der Gattung *Escherichia* eng verwandt gehören sie zur Familie der Enterobacteriaceae.^{1,2}

Biochemisch werden vier *Shigella* Spezies voneinander abgegrenzt: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* und *S. sonnei*. Eine weitere Unterteilung der Spezies in Serovare beruht auf dem Vorhandensein spezifischer O-Antigene. Bei *S. dysenteriae* werden 10 Serovare, bei *S. flexneri* 11 Sero- und Subserovare und bei *S. boydii* 15 Serovare unterschieden. *S. sonnei* ist serologisch einheitlich.

Die bakterielle Ruhr, vorwiegend verursacht durch *S. sonnei* und *S. flexneri*, ist weltweit endemisch verbreitet. Hervorgerufen durch *S. dysenteriae* kann sie aber auch in epidemischer Form auftreten.

In den Industriestaaten Mitteleuropas gehören die *Shigellen* mit einer Inzidenz von etwa 10 Fällen/100 000 Einwohner/Jahr zu den eher seltenen Erregern bakterieller Durchfallerkrankungen. In Deutschland wurden 1997 insgesamt 1926 Fälle gemeldet, wobei Verdacht, Erkrankung und Tod meldepflichtig sind.³

Der natürliche Lebensraum der *Shigellen* ist der Darm des Menschen. An Shigellose Erkrankte sind daher die Infektionsquelle. Ansteckungsgefahr besteht hauptsächlich während der ersten 2-3 Tage post manifestationem bis zu maximal sechs Wochen nach klinischer Genesung. Die Übertragung der *Shigellen* erfolgt direkt fäkal-oral über Schmierinfektion oder über kontaminierte Nahrungsmittel bzw. mit Fäkalien verunreinigtes Wasser. Kennzeichnend ist eine sehr geringe minimale Infektionsdosis von 10-100 virulenten Bakterien.⁴ Im Gegensatz zu anderen Enterobakterien besitzen *Shigellen* eine relative Säureresistenz, so daß ihre Keimzahl während der Magenpassage nicht wesentlich reduziert wird.⁵ Die Inkubationszeit beträgt 1-3 Tage.

Pathologisch-anatomisch handelt es sich bei der Shigellose um eine Kolitis. Die Eintrittspforte der Bakterien sind M-Zellen, spezialisierte Epithelzellen über den Lymphfollikeln, den Peyerschen Plaques.^{6,7} Verbunden mit der Invasion der *Shigellen* in die Zellen der Darmschleimhaut kommt es zur Auslösung inflammatorischer Reaktionen. Gefäßläsionen, Mikroabszesse und membranartig belegte Ulzera der Kolonschleimhaut sowie herdförmige Blutungen ausgedehnter Geschwüre charakterisieren patho-histologisch das Vollbild der Infektion.⁸⁻¹⁰

Klinisch zeigt die Shigellose eine vielfältige Symptomatik.¹¹ Die Verläufe variieren von oligosymptomatisch schleichend bis zu foudroyant toxischen Formen. Uncharakteristische Prodromi, wie Kopf- und Gliederschmerzen, Müdigkeit, Inappetenz und erhöhte Temperatur kennzeichnen den Beginn der Erkrankung, deren klassisches Bild durch die drei Symptome akutes Fieber bis 40°C, Tenesmen mit Stuhldrang und initial profuse, später blutige Durchfälle geprägt wird. Gewöhnlich heilt die Shigellose unbehandelt nach einer Dauer von 1-2 Wochen aus. Seltene lokale Komplikationen der akuten Phase der Erkrankung sind das toxische Megakolon und die Darmperforation mit der Gefahr einer kotigen Peritonitis. Systemische Manifestationen in Form von Exsikkose, Sepsis, hämolytisch-urämischem Syndrom, Enzephalopathie und Krampfanfällen sind ebenfalls selten und werden vorwiegend bei Kindern beobachtet.¹² Als postinfektiöse Spätkomplikationen, die innerhalb einer Woche bis zu mehreren Monaten nach Beginn der intestinalen Symptomatik auftreten, werden die Reaktive Arthritis und das Reiter-Syndrom beschrieben.

Die Mechanismen, mit deren Hilfe *Shigella flexneri* die Darmschleimhaut infiziert, sind seit längerer Zeit Gegenstand bakteriologischer Pathogenitätsforschung. Ein wesentlicher Virulenzfaktor von *Shigella flexneri* ist die Fähigkeit zur Invasion von Darmepithelzellen.¹³ Das Studium der molekularen und zellulären Grundlagen der Zellinvasion erfolgt vorwiegend am Zellkulturmodell etablierter Epithelzelllinien, wie Henle 407, HeLa, T84 oder Caco2. Die Ergebnisse dieser *in-vitro* an epithelialen Zellmonolayern durchgeführten experimentellen Arbeiten, können anschließend *in-vivo* durch den Einsatz der Mutanten im Sereny-Test und dem Makaken-Modell, dem besten Tiermodell für die humane Shigellose, verifiziert werden. Während der Sereny-Test durch Inokkulation der virulenten *Shigellen* in den Konjunktivalsack von Meerschweinchen eine ulzeröse Keratokonjunktivitis hervorruft, führt die intragastrische Inokkulation der *Shigellen* bei Makaken zum klinischen Bild der Shigellose.¹⁴⁻¹⁶

Auf bakterieller Seite ist die Epithelzellinvasion durch *Shigella flexneri* bereits sehr gut erforscht.¹⁷⁻¹⁹ Genetische Grundlage des virulenten Phänotyps der *Shigellen* ist ein 220 kb Virulenzplasmid.²⁰ Untersuchungen haben gezeigt, daß die gesamte genetische Information für die Expression des invasiven Phänotyps auf einem 31 kb-Fragment des Virulenzplasmids lokalisiert ist.²¹ Dieses Fragment enthält 32 Gene, u. a. *ipgC*, *ipaA*, *ipaB*, *ipaC* und *ipaD* sowie die Mehrheit der *mxi-spa* Gene. Die *ipa*-Gene kodieren für die Ipa-Proteine IpaA, IpaB,

IpaC und IpaD, die als erstes im Zusammenhang mit der durch sie hervorgerufenen Immunantwort der Infizierten beschrieben wurden.²² Sie sind die bedeutendsten bakteriellen Proteine für den Invasionsvorgang.²³⁻²⁶ Die Ipa-Proteine befinden sich überwiegend im Zytosol der Bakterienzelle. IpaB und IpaC liegen dabei an das Chaperon IpgC gebunden vor. Nach Wahrnehmung der Epithelzellen seitens der *Shigellen* sezernieren diese einen Proteinkomplex, der die Invasionsproteine IpaB, IpaC und weitere, noch nicht identifizierte Proteine enthält, zu denen auch IpaA gehören könnte.^{27, 28} Dieser Sekretionsvorgang ist Wachstumsphasen-abhängig.²⁹ Die Sekretion des Proteinkomplexes erfolgt über einen von den Mxi- und Spa-Proteinen gebildeten Sekretionsapparat.³⁰⁻³² Es wurde gezeigt, daß die sezernierten Ipa-Proteine an der Regulation ihrer eigenen Sekretion beteiligt sind, da IpaB und IpaD den Sekretionsvorgang in Abwesenheit stimulierender Signale verhinderten.³³ Stimuliert wird die Sekretion durch Glykoproteine der den Epithelzellen aufliegenden extrazellulären Matrix, wie Fibronectin, Laminin und Kollagen Typ IV.²⁸ Weiterhin wurde gezeigt, daß die Bindung des sezernierten IpaB/IpaC-Komplexes an Latex-Partikel von Bakteriengröße *in-vitro* zu deren zellulärer Aufnahme führte.³⁴ Die Aufnahme der Latex-Partikel ging mit einer Reorganisation des zellulären Zytoskeletts einher und glich somit dem für *Shigellen* beschriebenen erregerspezifischen Infektionsprozeß, der gekennzeichnet ist durch eine vom Bakterium induzierte Aufnahme über einen Phagozytose-ähnlichen Mechanismus.³⁵

Shigella flexneri kann offenbar verschiedene Zellen im Colon infizieren. Die ersten Zielzellen sind M-Zellen, spezialisierte Darmepithelzellen der Peyerschen Plaques.³⁶ Nachdem *Shigellen* die M-Zellen durchwandert haben, werden sie von den die M-Zellen umgebenden Makrophagen phagozytiert. Nach Auflösung der Phagosomenmembran induzieren sie über Aktivierung des Interleukin-1 β converting enzyme die Apoptose der Makrophagen.^{37, 38} Beide Vorgänge sind IpaB-abhängig und führen zu einer massiven IL-1 β - Freisetzung durch die Makrophagen und letztlich durch deren Untergang ebenfalls zur Freisetzung der *Shigellen*.³⁹⁻⁴¹ Welche Bedeutung nicht-programmierten Formen des Zelltodes in diesem Prozeß zukommt ist derzeit ungewiß.⁴² Die Infektion der M-Zellen ist notwendig, da *Shigellen* Enterozyten nicht über deren apikalen Pol infizieren können. Nur am basolateralen Pol können sie in Epithelzellen eindringen.⁴³ Die Infektion der Enterozyten über den basolateralen Pol kann einerseits von benachbarten M-Zellen aus erfolgen und andererseits nach Freisetzung aus den Makrophagen. Eine dritte Möglichkeit des bakteriellen Zugangs zum basolateralen Pol der Enterozyten bietet die durch Interleukin-1 β ausgelöste Einwanderung von Granulozyten in das Infektionsgebiet. Die Migration der Granulozyten in Richtung des Darmlumens bewirkt eine Öffnung epithelialer Zell-Zell-Verbindungen, die es luminalen *Shigellen* ermöglicht, den basolateralen Pol der Enterozyten auf direktem Weg zu erreichen.⁴⁴

Durch den Einsatz spezifischer Antikörper, die zu einer Inhibition der Interleukin-1 vermittelten Signaltransduktion führten oder die Transmigration der Granulozyten blockierten, konnte die bakterielle Invasion erheblich reduziert werden. Dies beweist, daß die durch Infektion der Makrophagen ausgelöste inflammatorische Reaktion in der Pathogenese der Shigellose einen hohen Stellenwert einnimmt.^{6, 45}

Kürzlich wurde veröffentlicht, daß *Shigella*-LPS, das polarisierten Epithelien an ihrer apikalen Membran präsentiert wurde, via Transzytose durch die Epithelzelle zu einer Attraktion von Granulozyten führe und somit der Infektion der M-Zellen vorangehe.⁴⁶

Die in die Enterozyten eingedrungenen Bakterien lysieren die Vakuolenmembran und gelangen so in das Zytoplasma der Zelle. Dort vermehren sie sich mit einer Generationszeit von 40 Minuten.⁴⁷ Die unbegeißelten *Shigellen* werden intrazellulär unter Ausnutzung physiologischer Funktionen der Epithelzelle bewegt. Dabei unterscheidet man den „organelle-like-movement“-Bewegungstyp (OLM), bei dem die Bakterien entlang von zellulären Mikrofilamenten bewegt werden, vom *icsA*- (intra- and intercellular spread) abhängigen Bewegungstyp.⁴⁸⁻⁵⁰ *IcsA* ist ein bakterielles Protein, das über eine Induktion von Aktinpolymerisation zur Ausbildung eines Aktinschweifs an einem Pol des Bakteriums führt, der das Bakterium vor sich herschiebt. *IcsA* ist bedeutsam für die Infektion von Nachbarzellen und somit für die interzelluläre Ausbreitung der *Shigellen*. Die Infektion der Nachbarzellen erfolgt über die Ausbildung hochorganisierter Zell-Zell-Kontakte mit bakteriellen Protrusionen von der infizierten in die zu infizierende Zelle.⁵¹ Die bakteriellen Protrusionen sind von einer Doppelmembran umgeben, die von der Zellmembran der infizierten Zelle und der Membran der Nachbarzelle gebildet wird. Durch Lyse dieser Doppelmembran erhalten die *Shigellen* Zugang zum Zytoplasma der Nachbarzelle. *IcsA*-negative Mutanten infizierten *in-vitro* zwar Epithelzellen über deren basolateralen Pol, sie waren jedoch nicht mehr infektiös für die umgebenden Nachbarzellen. Ebenso führte der Einsatz der *icsA*-Mutanten im Makakenmodell histopathologisch und klinisch nicht zum Bild der Shigellose bei den Affen, sondern nur zu einer lokalisierten perifollikulären Entzündung, die mit einer milden dysenterischen Symptomatik einherging.¹⁶ Da *icsA*-Mutanten M-Zellen infizieren können und durch die Infektion von Makrophagen inflammatorische Reaktionen hervorrufen können wird offensichtlich, daß nicht nur die bakteriell ausgelöste Entzündungsreaktion ein entscheidender Pathogenitätsfaktor für die Entstehung der Shigellose ist, sondern auch

die intraepitheliale Ausbreitung der Bakterien. Es ergibt sich die Schlußfolgerung, daß die Enterozyten der Kolonschleimhaut die eigentlichen Wirtszellen der *Shigellen* sind. Diese These wird unterstützt durch den Nachweis, daß die infizierten Epithelzellen im Gegensatz zu den infizierten Makrophagen nicht geschädigt werden. Die Replikation der *Shigellen* in HeLa-Zellen führte weder zu einer Aktivierung stressinduzierter Stoffwechselvorgänge noch zu sichtbaren Zeichen von Apoptose.⁵²

Die über intra- und interzelluläre Ausbreitung der *Shigellen* erfolgte massive bakterielle Infektion der Epithelzellen führt letztendlich zu einer schweren Kolitis mit Dysenterie. Eine systemische Ausbreitung der *Shigellen* im menschlichen Organismus wird nur selten beobachtet. Die durch Apoptose der Makrophagen ausgelöste inflammatorische Reaktion, die initial die Invasion von *Shigella* begünstigt, führt zu einer schnellen Demarkierung des Infektionsgebietes und einer beschleunigten Ablösung der infizierten Epithelzellschicht und damit zur Exkretion des Erregers aus dem Intestinaltrakt.^{6, 45}

Die Infektion der Epithelzellen durch *Shigella flexneri* beginnt mit einer bislang nicht definierten Zell-Zell-Interaktion. Eine Adhärenz der Bakterien an die Zellen ist *in-vitro* kaum nachweisbar.³⁵ Die sich anschließende Invasion ist Ausdruck des erregerspezifischen Infektionsprozesses, der gekennzeichnet ist durch eine vom Bakterium induzierte zelluläre Aufnahme über einen Phagozytose-ähnlichen Mechanismus.³⁵ Charakteristisch für diesen Invasionsprozeß ist einerseits, daß die Internalisation von *Shigella* nicht mit einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration einhergeht.⁵³ Andererseits ist die bakterielle Invasion abhängig von einer grundlegenden Funktion des Zytoskeletts der Epithelzelle, der Aktinpolymerisation. Durch Vorbehandlung der Zellen mit Cytochalasin B, einem Inhibitor der Aktinpolymerisation, konnte die Aufnahme des Erregers *in-vitro* verhindert werden.⁵⁴ Außerdem wurde die Induktion der zellulären Aktinpolymerisation durch *Shigella flexneri* direkt gezeigt.³⁵

Die Bedeutung des zellulären Zytoskeletts im Infektionsprozeß wird unterstrichen durch die mit Hilfe der Elektronenmikroskopie sichtbaren morphologischen Strukturen während der Invasion, die die bakterieninduzierten Veränderungen des Zytoskeletts eindrucksvoll widerspiegeln. Die *Shigella*-induzierten Verwerfungen der Zytoplasmamembran der Epithelzellen beim Eindringen des Bakteriums wurden mit der Ausbildung von „membrane ruffles“ in Verbindung gebracht.⁵⁵ „Membrane ruffles“ entstehen in klassischer Weise infolge zellulärer Rezeptorstimulation durch Wachstumsfaktoren wie EGF und PDGF.⁵⁶ Für *Shigella* ist eine direkte Interaktion der Bakterien mit zellulären Rezeptoren bisher nicht nachgewiesen. Möglicherweise findet eine Rezeptorstimulation durch sezernierte bakterielle Produkte statt, denn es wurde gezeigt, daß in CHO Zellkulturen die sezernierten Ipa-Proteine von *Shigella flexneri* an $\alpha_5\beta_1$ Integrinrezeptoren der Zellen binden.⁵⁷ Integrine sind Membranproteine, die extrazelluläre Signale ins Zellinnere weiterleiten und in enger Verbindung zu Zelladhäsionsplaques, einem wesentlichen Bestandteil des Zytoskeletts, stehen.⁵⁸ Die durch *S. flexneri* bewirkte Ausbildung von „membrane ruffles“ weist im Gegensatz zu der klassischen, EGF-induzierten Form einige Besonderheiten auf.⁵⁶ Es handelt sich hierbei um eine das Bakterium umgebende blütenartige Membranstruktur mit Pfeilerarchitektur.⁵⁹ Die Pfeiler werden von Protrusionen der Epithelzelle gebildet. Sie entstehen um das Bakterium herum, folgen jedoch nicht exakt dessen Form. Die Zytoplasmamembran verbindet die Pfeiler untereinander, erreicht dabei aber nicht immer die Höhe der Pfeilerspitzen, die somit sichtbar bleiben. Die zellulären Protrusionen konfluieren über dem Bakterium und internalisieren es. Mit der Bildung des Phagosoms ist die Invasion beendet. Mittels S1-Myosin-Markierung von F-Aktin wurde gezeigt, daß die seitlich des Bakteriums entstehenden Protrusionen angefüllt sind mit langen, parallel angeordneten Aktinfilamenten. Die positiven Enden der Aktinfilamente sind zur Plasmamembran hin orientiert, während die negativen Enden zum Zellinneren zeigen. Die Aktinfilamente entstehen infolge der nach initialem Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle einsetzenden Ausbildung von Aktinnukleationszonen und einer *de-novo* Aktinpolymerisation unterhalb des Bakteriums und neben dem Bakterium. Die Bündelung der Aktinfilamente in den Protrusionen erfolgt durch die T-Isoform von Plastin, die an die bakterielle Eintrittsstelle rekrutiert wird.⁵⁹

Die beschriebene Invasions-assoziierte Zytoskelettorganisation durch *Shigella* und die anhand von Plastin nachgewiesene Rekrutierung eines orientierungssensitiven Aktin-bündelnden Proteins an den bakteriellen Invasionslocus führte zur Suche nach Bindegliedern zwischen bakteriellen Signalen und den Veränderungen des zellulären Zytoskeletts. Von besonderem Interesse waren in diesem Zusammenhang die kleinen G-Proteine der Rho-Familie.⁶⁰⁻⁶⁶ Zu dieser Proteinfamilie gehören Rho, Rac, CDC42 und TC10. Diese Proteine sind GTPasen mit einem Molekulargewicht von 20-24 kDa. Sie besitzen die Fähigkeit, Guaninnukleotide zu binden und zu hydrolysieren. Im GTP-gebundenem Zustand sind sie biologisch aktiv und im GDP-gebundenem Zustand inaktiv. Der Übergang von der einen in die andere Form wird durch verschiedene Regulationsproteine bewirkt. Zu diesen Regulatoren gehören GTPase aktivierende Proteine (GAP's) und Guanin-Nukleotid Austausch Faktoren (GEF's). Während GEF's den Austausch von GDP gegen GTP fördern und somit die biologische Aktivität der GTPasen, stimulieren GAP's die GTPase-Aktivität der Rho-Proteine und damit den Übergang in die inaktive Form.^{67, 68} Weitere negative Regulatoren der Rho-Aktivität sind GDP-Dissoziations-Inhibitoren

(GDI's). Diese Proteine verhindern den GDP/GTP-Austausch. Zusätzlich beeinflussen die GDI's die Lokalisation der Rho-Proteine innerhalb der Zelle, indem sie sie im GDP-gebundenem Zustand zytosolisch stabilisieren.⁶⁹⁻⁷⁴

Neben diesen physiologischen Regulatoren kann die Aktivität kleiner G-Proteine der Rho-Familie durch eine Vielzahl bakterieller Toxine beeinflusst werden.⁷⁵ Einige Toxine führen zu einer Stabilisierung der GTPasen im aktiven, GTP-gebundenen Zustand, wie beispielsweise CNF1 (Cytotoxic necrotizing factor 1) von *E. coli*. Die Wirkung von CNF1 beruht dabei auf der Desaminierung von Glutamin an Position 63 von Rho bzw. Glutamin 61 von CDC42. Diese Desaminierung führt zu einer funktionellen Aktivierung, da die intrinsische wie die GAP stimulierte GTPase-Aktivität inhibiert werden.⁷⁶⁻⁷⁸ Eine monospezifische Aktivierung von Rho ist für das Toxin CNF2 von *E. coli* nachgewiesen worden.⁷⁹ Die bakteriellen Toxine, die eine Inhibition kleiner Rho-Proteine verursachen, werden in die beiden Gruppen der großen *Clostridien*-Toxine (Molekulargewicht um 270 kDa) und der C3-artigen Exoenzyme (Molekulargewicht um 25 kDa) eingeteilt. Zu der ersten Gruppe gehören Toxin A und B von *Clostridium difficile*, die eine Glukosylierung der Aminosäure Threonin an Position 37 bzw. 35 hervorrufen. Sie wirken an Rho, Rac und CDC42.⁸⁰⁻⁸³ Die Toxine der zweiten Gruppe sind monospezifische Inhibitoren für Rho. Sie erzielen ihre Wirkung über die ADP-Ribosylierung von Asparagin an Position 41 im Rho-Molekül.⁸⁴ Vertreter dieser Gruppe sind *Clostridium limosum* Transferase, *Staphylococcus aureus* Transferase (EDIN), *Bacillus cereus* Transferase und der Namensgeber dieser Gruppe, das Exoenzym C3 von *Clostridium botulinum*.^{75, 85-89}

Der Effekt von Rho-GTPasen auf das Zytoskelett ist am besten in Fibroblasten untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die EGF vermittelte Entstehung von „membrane ruffles“ Rac-abhängig ist.⁵⁶ CDC42 ist an der Ausbildung von Filopodien beteiligt.⁹⁰ Zu den biologischen Funktionen von Rho gehört die Ausbildung von Zelladhäsionsplaques sowie von „stress fibers“.⁹¹ Aber auch für Rho konnte die Induktion von „membrane ruffling“ durch Stimulation von KB Zellen mit HGF oder TPA gezeigt werden.⁹²

Die komplexe Zytoskelettstruktur an der bakteriellen Eintrittsstelle mit ihren eng gebündelten Aktinfilamenten ließ an eine Verwandtschaft mit Rho-abhängigen Zytoskelettstrukturen („stress fibers“, Zelladhäsionsplaques) denken. Deshalb wurde Rho auf eine mögliche Rolle bei der *Shigellen*-Invasion untersucht. Durch den Einsatz des Rho-spezifischen Inhibitors C3 konnte zunächst in quantitativen Studien der Nachweis erbracht werden, daß die Funktion dieser kleinen GTPase für die Epithelzellinvasion der *Shigellen* essentiell ist.^{93, 94}

Erkenntnisse über die biologischen Funktionen von Rho wurden überwiegend durch Mikroinjektion von C3, Rho-GDI, GTP γ S-Rho, Rho^{Val 14} oder RhoGAP^{p190} gewonnen.⁹⁵⁻⁹⁸ GTP γ S-Rho und Rho^{Val 14} stellen dabei aktive Rho-Formen dar. Bisläng wurden die Untersuchungen fast ausschließlich mit RhoA durchgeführt, obwohl mehrere Isoformen von Rho beschrieben sind. Drei dieser Isoformen, RhoA, RhoB und RhoC, werden in allen bisher untersuchten Geweben exprimiert.⁹⁹

RhoA-Aktivität steht sowohl im Zusammenhang mit der Bildung von Protein-Proteinkomplexen, wie Zelladhäsionsplaques und Cadherin vermittelten Zell-Zell-Verbindungen als auch mit der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, sichtbar an Aktinpolymerisation und der Ausbildung von „stress fibers“.^{91, 100, 101} Weitere Funktionen von Rho betreffen den Phospholipidstoffwechsel und die Phosphorylierung von Proteinen. Phospholipide und Proteinphosphorylierung gehören neben Kalzium und Calmodulin zu den Regulatoren der Interaktion vieler Aktin-bindender Proteine mit G- oder F-Aktin. Aktiviertes RhoA bewirkt eine Aktivierung von Phospholipase D, Phosphatidylinositol 3-Kinase und Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Die Aktivierung der Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase führt zur Synthese von Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP₂). PIP₂ bindet u. a. Profilin, Vinculin und α -Actinin. Die Bindung von PIP₂ an Profilin, ein G-Aktin bindendes Protein, bewirkt die Dissoziation von Profilin und G-Aktin. G-Aktin steht damit für die Polymerisation zur Verfügung. Vinculin verankert das Zytoskelett in der Zellmembran durch gleichzeitige Bindung von Talin oder α -Actinin und F-Aktin. Eine Bindung von PIP₂ mit Vinculin führt zu einer Konformationsänderung von Vinculin, die die Bindungsaffinität für F-Aktin und Talin erhöht.¹⁰⁶ Auch die Funktion der ERM-Proteine (Ezrin, Radixin, Moesin) wird von PIP₂ beeinflusst. Die Proteine der ERM-Familie stellen wie Vinculin Verbindungselemente zwischen Aktinfilamenten und der Plasmamembran dar.^{107, 108} Der N-Terminus dieser Proteine stellt die Verbindung zu zellulären Oberflächenproteinen her, wie CD44, CD43 oder der H⁺/K⁺ ATPase.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Der C-Terminus ist für die Interaktion mit den Aktinfilamenten verantwortlich. C- und N-Terminus inhibieren gegenseitig ihre Funktion. Diese gegenseitige Funktionsbehinderung wird durch PIP₂-Bindung aufgehoben.¹¹¹ In MDCK Zellen, die RhoA exprimierten, zeigte RhoA eine Kolo-kalisation mit ERM-Proteinen in „membrane ruffling areas“ und Zelladhäsionsplaques. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Assoziation von ERM und Vinculin mit der Plasmamembran RhoA-Aktivität voraussetzt.^{112, 113}

Die Etablierung fokaler Adhäsionskomplexe und die Induktion von „stress fibers“, die beide Rho-abhängig sind, werden über verschiedene Signaltransduktionsketten realisiert. Ersteres kann durch den Einsatz des Kinase-

Inhibitors Staurosporin blockiert werden. Die Aktinpolymerisation wird davon nicht beeinflusst. Demgegenüber können sowohl die Ausbildung von „stress fibers“ als auch die Bildung von Zelladhäsionskomplexen durch den Einsatz von Genistein, einem Tyrosinkinase-Inhibitor, verhindert werden.¹¹⁴ Die Induktion der „stress fiber“-Bildung geht einher mit einer Aktivierung der Isoform NHE1 des Na⁺/H⁺-Austauschers, die für die Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes bedeutsam ist.¹¹⁵ Die Assoziation zum Zytoskelett ergibt sich möglicherweise durch die Wirkung des pH-Wertes auf die Funktion von Cortactin. Cortactin ist ein F-Aktin bindendes und F-Aktin bündelndes Protein. Cortactin ist submembranös in „membrane ruffles“ lokalisiert und wird durch die Tyrosinkinase Src phosphoryliert.^{116, 117} Die Tyrosin-Phosphorylierung reduziert die F-Aktin-bündelnde Aktivität von Cortactin. Diese Aktivität ist an das Vorhandensein eines physiologischen pH-Wertes geknüpft.¹¹⁸ Auch für Src wurde ein Zusammenhang mit der Aktivität von Rho nachgewiesen. Die Translokation von Src zur Zelloberfläche, dem biologischen Wirkort dieser Tyrosinkinase, ist Rho-abhängig.¹¹⁹ Neben dem bereits erwähnten Cortactin sind FAK, Paxillin und RhoGAP^{p190} weitere Substrate von Src.¹¹⁷ Die Expression von Src in Fibroblasten führt zu einer drastischen Aktindepolymerisation. In diesen Vorgang scheint die Phosphorylierung von RhoGAP^{p190} involviert zu sein, da sie zeitgleich erfolgt.¹²⁰

Die Aufklärung der Signaltransduktion via Rho erfordert neben der Beschreibung der gefundenen Zusammenhänge auch Informationen über die Aktivierung von Rho, direkte Substrate von Rho und das Abschalten der Rho-Aktivität. Bekannt ist, daß die extrazelluläre Zugabe von Lysophosphatidsäure, Bombesin oder Sphingosin 1-Phosphat die Rho-Aktivität stimuliert.^{91, 121} Ob diese Stimulation wie bei Ras über GEF's vermittelt wird, ist nicht bekannt. Ras ist über das Adaptorprotein Grb2 sowohl mit Wachstumshormonrezeptoren verbunden als auch mit Sos, einem GEF für Ras.¹²²⁻¹²⁴

Einige direkte Substrate von Rho sind identifiziert worden. Dazu zählen als Substrate mit bekannter Funktion die Serin/Threonin Kinase PKN, die eine Bindungsstelle für α -Actinin besitzt; p140mDia, das Profilin binden kann und p160RhoKinase, eine Serin/Threonin Kinase, deren Aktivität zu einer Phosphorylierung der Myosin light chain-Phosphatase führt.¹²⁵⁻¹²⁹ Als Rho-Substrate mit bisher undefinierter Funktion sind RhoGDI und Citron bekannt.⁶⁵ Die Rho-Aktivität wird beendet durch die Funktion der GAP's. Zu dieser Gruppe von Regulationsproteinen gehören p122 (ein RhoA-GAP), das Phospholipase C- δ 1 bindet, p190RhoGAP und myr5.¹³⁰ Myr5 ist ein unkonventionelles Myosin, das über die gleichzeitige Bindung von Rho und Aktin-Filamenten eine direkte Assoziation von Rho mit dem Zytoskelett ermöglicht.^{131, 132} Weiterhin wurde berichtet, daß die Stimulierung von Proteinkinase A (PKA) zur Aktindepolymerisation existierender Filamente führt, aber deren Neubildung nicht verhindert.¹¹⁴ Grundlage dieses Phänomens ist die Phosphorylierung von membrangebundenem RhoA/GTP an Serin 188 durch PKA.¹³³ Phosphoryliertes RhoA/GTP zeigt keine Veränderung der Bindungsaffinitäten für die Guaninnukleotide und auch keine Änderung der intrinsischen GTPase-Aktivität, jedoch bindet es RhoGDI mit hoher Affinität. Es kommt dadurch zum Verlust der Membranbindung von RhoA im GTP-gebundenem Zustand. Der Wechsel des Zellkompartiments (Membran-Zytosol) stellt hier einen alternativen Weg für die Beendigung der RhoA-Aktivität dar.

Eine Möglichkeit der Steuerung der biologischen Aktivität von Enzymen ist ihre Rekrutierung. Sie beschränkt die enzymatische Aktivität auf eine bestimmte intrazelluläre Lokalisation. Während biochemische Untersuchungen meist das Ziel verfolgen, potentielle Interaktionen zwischen verschiedenen Molekülen *in-vitro* zu zeigen, ist für eine tatsächliche Interaktion *in-vivo* Voraussetzung, daß sich die Reaktionspartner zu einem bestimmten Zeitpunkt in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander befinden. Rekrutierung bezeichnet insofern den Vorgang einer gesteuerten intrazellulären Translokation eines Moleküls zur Ermöglichung einer biochemischen Interaktion mit einem potentiellen Reaktionspartner. Da für kleine GTPasen vom Rho-Typ eine Vielzahl potentieller Reaktionspartner beschrieben wurde¹²⁵⁻¹²⁹, ist die genaue Beschreibung der Rekrutierungsmuster eine wichtige Voraussetzung zur Erforschung der *in-vivo* ablaufenden Signaltransduktionskaskaden.

Derweil die Literatur über die biologischen Funktionen von Rho ständig an Umfang gewinnt, ist kaum etwas über die Rekrutierung von Rho veröffentlicht. Beschrieben ist, daß in MDCK Zellen die Stimulation der RhoA-Aktivität mit der dynamischen Translokation von RhoA vom Zytosol zur „membrane ruffling area“ einhergeht. Dieser Vorgang kann durch RhoGDI und C3 verhindert werden, d.h. daß sowohl die Aktivierung von Rho als auch die Substratbindung für eine Rekrutierung notwendig sind.^{112, 113}

Für die Regulation der *Shigella*-induzierten Zytoskelettveränderungen während der Epithelzellinvasion ist die Aktivität des kleinen G-Proteins Rho essentiell.^{93, 94} Die Inaktivierung von Rho führt zu Aktindepolymerisation und damit zu morphologischen Veränderungen der Zelle.^{134, 135} In C3 vorbehandelten Zellen unterblieb das bakterieninduzierte Rearrangement des Zytoskeletts und damit die den Invasionsvorgang begleitende Ausbildung der blütenartigen Membranstruktur.⁹³ Zellen mit blockierter Rho-Aktivität zeigten noch Aktinnukleation unterhalb von *Shigella* jedoch keine Aktinpolymerisation mehr. Eine funktionelle Bedeutung von Rho für den Invasionsvorgang liegt demnach in der Induktion der Aktinpolymerisation in den *Shigella*-

induzierten zellulären Protrusionen.

Die von *Shigella flexneri* induzierte Zytoskelettstruktur am bakteriellen Eintrittsort enthält eine Reihe von Proteinen, die Bestandteile von Zelladhäsionskomplexen sind, wie Vinculin, Paxillin, Talin, α -Actinin und die Tyrosinkinase pp125^{FAK}. In Anlehnung an die Bedeutung der Rho-Aktivität für die Bildung von Zelladhäsionsplaques konnten *in-vitro* Interaktionen von Rho mit einigen dieser Proteine während des Invasionsprozesses von *Shigella* aufgedeckt werden. Die mit der Invasion von *S. flexneri* in CHO-Zellen einhergehende lokalisierte Akkumulation von F-Aktin und Vinculin ist Rho-abhängig.⁹⁴ α -Actinin wird IpaA-abhängig an den Invasionslocus rekrutiert.²⁶ Dieses Protein bindet Proteinkinase N (PKN), eines der Substrate von Rho. Paxillin ist ein Substrat von FAK.¹³⁶ Sowohl FAK als auch Paxillin werden im Zusammenhang mit der bakteriellen Invasion Rho-abhängig phosphoryliert.⁹⁴

Weitere Proteine, die an die Eintrittsstelle von *Shigella* rekrutiert werden, sind Cortactin und Src. In HeLa-Zellen konnte während des bakteriellen Invasionsvorganges eine lokale Kinaseaktivierung von Src mit der daraus resultierenden Tyrosinphosphorylierung von Cortactin nachgewiesen werden.¹³⁷ Möglicherweise ist dies ein Schritt in Richtung einer Antagonisierung der Rho induzierten Zytoskelettorganisation nach erfolgreicher Aufnahme der *Shigellen*, da die Tyrosinphosphorylierung durch Src die F-Aktin-bündelnde Aktivität von Cortactin reduziert.¹¹⁸ Eine lokale Aktindepolymerisation könnte die Folge sein. Die Rekrutierung von myr5, dem atypischen Myosin mit RhoGAP-Funktion, an die bakterielle Eintrittsstelle von *S. flexneri* im HeLa-Zell-Modell unterstreicht hierbei den Prozeß der Gegenregulation der Rho-Aktivität.¹³⁸

Ein direktes Substrat für Rho während der Invasion von *Shigella flexneri* in Epithelzellen ist bisher nicht beschrieben. Jedoch wurde gezeigt, daß Rho als essentielles Glied der Signaltransduktionskette selbst an den Invasionslocus, den Ort der Zytoskelettorganisation, rekrutiert wird. Diese Rekrutierung umfaßt die Isoformen RhoA, RhoB und RhoC. Obwohl die Sequenzhomologie zwischen diesen drei Isoformen groß ist, zeigen sie ein unterschiedliches Rekrutierungsmuster an der bakteriellen Eintrittsstelle. RhoA akkumuliert vorwiegend um die eindringenden *Shigellen* herum. Dagegen werden RhoB und RhoC in die zellulären Protrusionen rekrutiert, die die Bakterien umgeben.⁹³

1.1 Fragestellung

Die Aufgabenstellung dieser Promotionsarbeit war die Untersuchung der differentiellen, isoformspezifischen Rekrutierung des kleinen G-Proteins Rho bei der Invasion von *Shigellen* in Epithelzellen auf submolekularer Ebene.

Die Rho-Proteine gehören zur Familie der kleinen G-Proteine.¹³⁹ Auf der Ebene der Primärstruktur besitzen sie eine 30 %ige Homologie zu den Ras-Proteinen. Diese Sequenzhomologie betrifft fünf bei allen kleinen G-Proteinen konservierte Regionen für die Bindung der Guaninnukleotide und das am C-terminalen Ende zu findende Peptid-Motiv CAAX.¹⁴⁰ C steht dabei für die Aminosäure Cystein, A für eine beliebige aliphatische Aminosäure und X für Leucin. Das charakteristische CAAX-Motiv ist von wesentlicher Bedeutung für die posttranslationale Modifikation der kleinen GTPasen.

Für RhoA wurde nachgewiesen, daß es posttranslational zu drei spezifischen C-terminalen Veränderungen an der CAAX-Box kommt.¹⁴¹ Zuerst erfolgt eine Geranylgeranylierung am Cystein. Dem schließt sich die Abspaltung der drei C-terminalen Aminosäuren (AAX) an. Danach folgt als letzte Modifikation die Carboxylmethylierung am Cystein. Die beschriebenen Veränderungen sind sowohl für die Membranbindung des Proteins als auch für die Interaktion von Rho mit den Regulationsproteinen RhoGDI und RhoGEF bedeutsam.¹⁴²⁻¹⁴⁴

Ein Vergleich der drei Rho-Isoformen auf Primärstrukturebene läßt eine hohe Sequenzhomologie der Isoformproteine untereinander erkennen. (HUSAR, s. Computerprogramme) RhoA und RhoC werden von je 193 Aminosäuren gebildet. Das RhoB-Molekül besteht aufgrund dreier zusätzlicher Aminosäuren aus insgesamt 196 Aminosäuren. Alle drei Isoformen enthalten C-terminal die CAAX-Box. Der Unterschied in der Aminosäuresequenz von RhoA zu RhoB beläuft sich abgesehen von den drei zusätzlichen Aminosäuren im RhoB-Molekül auf 28 Aminosäuren (15 %), zwischen RhoA und RhoC auf nur 14 Aminosäuren (7 %). RhoB und RhoC unterscheiden sich ebenfalls in 28 Aminosäuren (15 %). Wird demgegenüber die C-terminale Aminosäuresequenz der Isoformen ab Position 181 verglichen, zeigt sich zwischen RhoA und RhoB ebenso wie zwischen RhoB und RhoC eine Differenz von 89 % in diesem Abschnitt der Primärstruktur. Zwischen RhoA und RhoC besteht C-terminal ab Position 181 eine 67 %ige Differenz.

Obwohl auf Primärstrukturebene RhoA und RhoC homologer sind als RhoB und RhoC, werden RhoB und RhoC während der Invasion von *Shigella* in die zellulären Protrusionen der entstehenden Eintrittsstruktur rekrutiert. RhoA akkumuliert vorwiegend um die eindringenden Bakterien herum. Deshalb war das Ziel dieser Promotionsarbeit, der isoformspezifischen Rekrutierung von Rho während der Invasion von *Shigella flexneri* in HeLa-Zellen auf molekularer Ebene näherzukommen.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien und Bakterienstämme

2.1.1 Zellen

Die zellbiologischen Untersuchungen wurden an HeLa-Zellen, einer humanen Cervixkarzinomzelllinie, durchgeführt.¹³

2.1.2 Bakterienstämme

Eingesetzt wurden der Bakterienstamm TG 1, ein K12-Derivat von *Escherichia coli*¹⁴⁵, und der adhäsive, invasive Stamm SC 301 von *Shigella flexneri*.⁵⁵ Es handelt sich hierbei um eine Mutante von *S. flexneri* Serotyp 5b mit dem Virulenzplasmid pWR110²⁰ und dem Plasmid pIL22, das für AFA-I (ein afimbrielles Adhäsion von uropathogenen *E. coli* K552) codiert.¹⁴⁶

2.2 Geräte

Für die Bearbeitung der Aufgabenstellung wurden die nachfolgend aufgelisteten Geräte eingesetzt.

Abzug sowie Säuren- und Laugenschrank von Köttermann

Autoklaviergerät

Beckmann L-8-M Ultrazentrifuge von Beckmann

Begasungsbrutschrank BB 16 von Heraeus

IBM Computer Pentium I, Betriebssystem Windows 95

DNA Thermal Cycler 480 von Perkin Elmer

elektronische Waage im µg-Bereich A 120 S von Sartorius

elektronische Waage LC 6201 von Sartorius

Elektrophoresegerät: Mini-Gel Electrophoresis Unit Mupid[®]-2 von Eurogentec

Fireboy plus von Integra Biosciences

Inkubator 1000 und Unimax-Schüttler 1010 von Heidolph

Inverses Mikroskop Telaval 31 von Zeiss mit dem Objektiv Achromat LDN 20 x / 0,35

Kühlschrank 4°C von Liebherr

Kühlschrank -20°C von Liebherr

Kühlschrank -80°C von Heraeus

Kühlzentrifuge eppendorf centrifuge 5402 von Eppendorf

Labofuge 400 R von Heraeus

Laminar Flow Box antair_{BSK} Klasse 2

LI-COR[®] DNA-Sequencer model 4000 von MWG Biotech

Magnetrühr- und Erwärmungsplatte MR 3001 von Heidolph

Metallblock Thermostat Techne-Dri-Block[®] BD 2A von thermo-Dux

Mikroskop Axiovert 135 von Zeiss mit den Objektiven:

- Plan Neofluar 100 x / 1,30 Öl (Nr. 440486)
- Plan Neofluar 40 x / 1,30 Öl (Nr. 440451)

Mikroskop-Kamera MC 80 von Zeiss
Modell 2000/200 von BioRad für die Elektrophorese
pH-Meter von Beckman: pHTM
Scanmaker Office plus von Mikrotek
Standardmikrowellengerät
Stratagene Eagle EyeTM II von Stratagene
Tischzentrifuge centrifuge 5415 C von Eppendorf
Trio-ThermoblockTM von Biometra
Ultraspec[®] III, Spektralphotometer von Pharmacia
UV-Kamera von Polaroid
UV-Transilluminator von Pharmacia
Vakuumwasserpumpe vac 30 von Heraeus
Vortexgerät REAX 2000 von Heidolph
Wasserbad von der Firma Dinkelberg
Zentrifuge K 26 D für große Volumina von MLW

2.3 Chemikalien

2.3.1 Bezugsliste der Chemikalien

Abkürzung/Formel	Name/Erläuterung	Bezug
1 kb DNA Ladder	DNA-Fragment-Längenmarker	MBI Fermentas
100 bp DNA Ladder	DNA-Fragment-Längenmarker	MBI Fermentas
6 X Loading Dye Solution	Farbmarker, 6fach konzentriert	MBI Fermentas
Aceton p. A.		Merck
Agarose		Sigma
Ampicillin	Antibiotikum	Sigma
AmpliTaq (mit Puffer und MgCl ₂)	DNA Polymerase	Perkin Elmer
Anti-mouse Texas Red (TR)	Anti-VSV-Zweitantikörper	Jackson
APS	Ammoniumpersulfat	Fluka
BES	N, N-bis-2 aminoethane-sulfonic acid buffered saline, Zellreagenz	Merck
Bodipy-phalloidine	markiertes Peptid für die F-Aktinfärbung	Molecular probes
Borsäure p. A.		Merck
Bromphenolblau	Farbmarker	Sigma
BSA	Bovines Serum-Albumin	MBI Fermentas
CaCl ₂	Kalziumchlorid	Sigma
Calf intestine alkaline phosphatase	DNA-Phosphatase	MBI Fermentas
Cellfectin	Transfektionsreagenz	Gibco BRL Life Technologies™
CH ₃ COOH	Eisessig	Merck
Chloroform p. A.		Merck
DNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat	MBI Fermentas
DMRIE-C	Transfektionsreagenz	Gibco BRL Life Technologies™
Dynabeads® M-280 Streptavidin	Magnetpartikel, s. Magnetische Separation mit Dynabeads® M-280 Streptavidin	Deutsche Dynal GmbH
Eco32I (EcoRV)	Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas
EcoRI	Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	Merck
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Kit für die endotoxinfreie Plasmidpräparation	Qiagen

Ethanol p. A.		Merck
Ethidiumbromid		Aldrich
FCS	Fötales Kälberserum	Gibco BRL Life Technologies™
Fnu4HI	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs
Formamid		Sigma
Glycerol, wasserfrei		Merck
Glycin p. A.		Roth
HCl 25 %	Salzsäure	Merck
Isopropanol p. A.		Merck
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
Kanamycin	Antibiotikum	Sigma
KCl	Kaliumchlorid	Merck
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
KpnI	Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas
LB	Luria-Bertani Medium	Fluka
Lipofectamine	Transfektionsreagenz	Gibco BRL Life Technologies™
Lipofectin	Transfektionsreagenz	Gibco BRL Life Technologies™
Long Ranger™ DNA Sequencing Gel Solution	Gel-Lösung für DNA Sequenziergele	FMC BioProducts
M 13 (-20) F	forward-Primer für pUC19	MWG Biotech
M 13 (-24) R	reverse-Primer für pUC19	MWG Biotech
M 13 (-47) F	forward-Primer für pUC19	MWG Biotech
M 13 reverse CS (-49)	reverse-Primer für pUC19	MWG Biotech
M 13 universal CS (-43)	forward-Primer für pUC19	MWG Biotech
MEM	Minimal Essential Medium	Gibco BRL Life Technologies™
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Magnesiumchlorid	Merck
Moviol 4-88	Substanz zum Eindecken von Deckgläschen	Sigma
Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
NaCH ₃ COO	Natriumacetat	Merck
NaCl p. A.	Natriumchlorid	Merck
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O p. A.	Natriumdihydrogenphosphat	Merck
NaOH	Natriumhydroxid	Merck
NheI	Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas
NotI	Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas

P5D4	Anti-VSV-Erstantikörper	Kultur-Überstand, im Labor hergestellt
PaulI	Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas
PEG 50 % (w/v)	Polyethylenglycol 4000	MBI Fermentas
PFA	Paraformaldehyd	Fluka
pH-Teststreifen		Merck
Phenol		Fluka
Phenol/Chloroform Gemisch		Fluka
Plasmid Maxi Kit	Kit für die Plasmidpräparation	Qiagen
Plasmid Midi Kit	Kit für die Plasmidpräparation	Qiagen
PstI	Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas
pUC19	Plasmid/Vektor	New England Biolabs
Pwo (mit Puffer und MgSO ₄)	DNA Polymerase	Eurogentec
Qiaquick Gel Extraction Kit	Kit für die DNA-Extraktion aus Agarosegelen	Qiagen
SDS	Natriumdodecylsulfat, Detergens	Sigma
Silan		Sigma
SpinPlasmidPrep	Kit für die Plasmidpräparation	Qiagen
T4 DNA Ligase	DNA-Ligase	MBI Fermentas
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylen-diamin	Fluka
Tfx TM -50 Reagent	Transfektionsreagenz	Promega
Thermo Sequenase fluorescentlabelled primer cycle sequencing kit	Reagenzien für die DNA-Sequenzierung	Amersham LIFE SCIENCE
Tris base p. A.	Puffer	Roth
Triton-X-100	Detergens	Sigma
Trypsin	Proteinase	Gibco BRL Life Technologies TM
TSB	Tryptic soy broth	Fluka
Urea p. A.	Harnstoff	Roth
Xylencyanol	Farbmarker	Sigma

2.3.2 Zusammensetzung verwendeter Reagenzien

2.3.2.1 Medien

Nachstehend wiedergegeben sind die Arbeitsanleitungen zur Herstellung der in den Experimenten eingesetzten Medien.

- **TSB** für *Shigellen*: 30 g/l
- im Autoklaven bei 121°C über 15' sterilisieren, abkühlen lassen
- Zugabe der Antibiotika Ampicillin 100 µg/ml und Kanamycin 50 µg/ml für den Stamm SC 301

- **LB** für *E. coli* (TG 1): 20 g/l
- im Autoklaven bei 121°C über 15' sterilisieren, abkühlen lassen
- Zugabe des Antibiotikum Ampicillin 100 µg/ml

- für Agar-Platten: Agarosegehalt 1,5 %, d. h. zu einem Liter Medium 15 g Agarose zugeben, autoklavieren, abkühlen lassen, Antibiotikum zugeben und anschließend Platten gießen

2.3.2.2 Puffer

Zur Herstellung der in den Experimenten eingesetzten Puffer wurde auf die folgenden Arbeitsanleitungen zurückgegriffen.

BBS-Puffer

2 X BBS

Zubereitung von 40 ml 2 X BBS:

Substanz	Molekulargewicht	Menge für 40 ml	Konzentration in 2 X Lösung
BES	213,20 g/mol	0,43 g	50 mM
NaCl	58,44 g/mol	0,66 g	280 mM
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	358,14 g/mol	0,0214 g	1,5 mM

- Mengen in 30 ml Aqua bid. lösen
- ca. 750 µl 1 M NaOH-Lösung zur Einstellung des pH-Wertes zugeben (pH = 6,95), kontrollieren
- auffüllen auf 40 ml und steril filtrieren

EDTA

0,5 M EDTA (pH 8,0)

- 186,1 g Dinatriummethylen diamintetraacetat in 800 ml A. bidest mittels Magnetrührer auflösen
- pH-Wert auf 8,0 titrieren (Zugabe von NaOH-Plätzchen, ca. 20 g)
- A. bid. ad 1000 ml
- steril filtrieren

10 X EDTA/Salzlösung für Trypsin

Zubereitung einer 100 ml Lösung aus:

- EDTA 0,2 g
- NaCl 8 g
- KCl 0,2 g
- Na₂HPO₄ 1,15 g
- KH₂PO₄ 0,2 g
- Aqua bidest ad 80 ml
- pH-Wert auf 7,5 einstellen
- A. bid. ad 100 ml
- steril filtrieren bzw. autoklavieren

PBS-Puffer

10 X nach Dulbecco pH 7,4 (mit NaOH einstellen)

mit Ca^{2+} und Mg^{2+}

Herstellung:

- 10 X Lösung ohne CaCl_2 ansetzen (Ausfällung)
- CaCl_2 zu 1 X Lösung ad 0,9 mM zugeben

Substanz	Molekulargewicht	Ansatz pro Liter	Konzentration in 10 X Lösung
CaCl_2	111,00 g/mol	1 g	9 mM
KCl	74,55 g/mol	2 g	26,8 mM
KH_2PO_4	136,10 g/mol	2 g	14,7 mM
$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	203,30 g/mol	1 g	4,92 mM
NaCl	58,44 g/mol	80 g	1,37 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	268,10 g/mol	21,6 g	80,57 mM

10 X nach Dulbecco pH 7,4 (mit NaOH einstellen)

ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

- siehe oben, CaCl_2 und MgCl_2 weglassen

TAE-Puffer

konzentrierte Vorratslösung

50 X = 242 g Tris base
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

A. bid. ad 1000 ml

Gebrauchslösung

1 X = 0,04 M Tris acetat
0,001 M EDTA

TBE-Puffer

konzentrierte Vorratslösung

10 X = 108 g Tris Base
55 g Borsäure
40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

A. bid. ad 1000 ml

Gebrauchslösung

1 X = 0,089 M Trisborat
0,002 M EDTA

TE-Puffer

10 X TE-Puffer pH 8,0 (mit HCl einstellen)

Substanz	Ansatz pro Liter	Konzentration in 10 X Lösung
Tris (MW 21,14 g/mol)	12,14 g	100 mM
EDTA (0,5 M)	20 ml	10 mM

- A. bid. ad 1000 ml

2.3.2.3 Weitere Reagenzien

Wiedergegeben sind die Arbeitsanleitungen für die Herstellung der in den Experimenten eingesetzten Reagenzien.

Moviol zum Eindecken der Deckgläschen

- zusammengeben: 6 g Glycerol
2,4 g Moviol 4-88
6 ml Aqua bidest
- 2 h bei RT inkubieren
- 12 ml Tris-HCl 0,2 M (pH 8,5) zugeben
- 10' bei 50°C inkubieren
- 15' bei 7.500 g zentrifugieren
- Aliquots bei 4°C aufbewahren

Natriumacetatlösung

Herstellung einer sterilen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) mit einem Endvolumen von 50 ml:

- 12,3 g Natriumacetat abwägen (Natriumacetat hat ein MW von 82,03 g/mol)
- Aqua bid. ad 30 ml
- CH₃COOH-Zugabe zur pH-Einstellung
- Aqua bid. ad 50 ml
- steril filtrieren

Paraformaldehyd 3,7 % in 1 X PBS

Herstellung einer 100 ml Lösung:

- 3,7 g PFA in 20 ml A. bid. lösen
- auf 50-60°C erhitzen
- einige Tropfen 10 M NaOH zugeben (zur Lösung des PFA)
- abkühlen lassen auf RT
- 10 X PBS zugeben zu 1 X PBS (10 ml)
- pH-Wert mit HCl auf 7,6 einstellen
- A. bid. ad 100 ml
- aliquotieren und aufbewahren bei -20°C (Ausdehnung beachten)

Trypsin

Herstellung von 0,25 % Trypsin (1 X) aus 10 X Trypsin (2,5 %) ohne EDTA und 10 X EDTA/Salzlösung:

- 1 : 10 Verdünnung des Trypsins 2,5 % und
- 1 : 10 Verdünnung der EDTA/Salzlösung, jeweils mit Aqua ad injectionem

Stop-Reagenz für die DNA-Sequenzierreaktion

Herstellung einer 10 ml Lösung:

9,5 ml	Formamid
0,4 ml	EDTA (0,5 M)
0,1 ml	A. bid.
5 mg	Bromphenolblau
5 mg	Xylencyanol

2.4 Methoden

2.4.1 Zellbiologische Methoden

Nachstehend aufgeführt sind die Arbeitsanleitungen für den Einsatz von HeLa-Zellen in den durchgeführten Experimenten.

2.4.1.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

verwendete Materialien

- HeLa-Zellen
- MEM
- FCS
- 1 X Trypsin + 1 X EDTA/Salzlösung, hier bezeichnet als Trypsin

Arbeitsschritte

- Zellkultur unter dem Mikroskop betrachten:
 - Zellen konfluent, dann trypsinieren
 - Zellen nicht konfluent, dann Medium wechseln:
 - altes Medium aspirieren, durch neues Medium mit 10 % FCS ersetzen

Trypsinieren von HeLa-Zellen in 15 ml Zellkulturschalen

- Medium aspirieren, Zellen mit 2 ml Trypsin waschen, Trypsin verwerfen
- 3,5 ml Trypsin zugeben, Zellkulturschale 5' bei 37°C im Brutschrank inkubieren
- nach Lösung aller Zellen 9,5 ml MEM zugeben und in Zentrifugenröhrchen überführen
- Zellen abzentrifugieren über 4' bei 500 g und RT
- Überstand verwerfen
- Resuspension des Zellpellets in 2 ml MEM
- Zellen zählen, s. Quantifikation von Zellen
- Neuaussaat der Zellen in die gewünschte Zellkulturschale in entsprechender Konzentration und Zugabe von MEM mit 10 % FCS
- Aufbewahrung der Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂

2.4.1.2 Quantifikation von Zellen

- verwendet wird die Neubauer Zählkammer mit 16er Feld (16 Quadrate: 4 x 4, die von einer Tripellinie umgeben sind)
- 1 Quadrat hat die Abmessungen: 0,0025 mm² Grundfläche x 0,100 mm Tiefe; das entspricht einem Volumen = $V = 0,00025 \text{ mm}^3 = 0,00025 \mu\text{l}$

Quantifikation:

- fünf 16er-Kästchen auszählen, die Summe entspricht N
- $N/5 = X$
- $X/16 \times 4000 = \text{Zellen}/\mu\text{l}$ bzw. $X \times 250 = \text{Zellen}/\mu\text{l}$
- $\text{Zellen}/\mu\text{l} \times 10^3 = \text{Zellen}/\text{ml} = c_1$

Ansatz für eine neue Zell-Kultur:

- $c_1 \text{ (s.o.)} \times V_1 = c_2 \text{ (gewünschte Zellzahl/ml)} \times V_2 \text{ (Volumen der neuen Zellkulturschale)}$
- $V_1 = c_2 \times V_2 / c_1$

2.4.1.3 Transfektion von HeLa-Zellen

Kalziumphosphat-Methode, modifiziert für die 6-Loch-Platte

verwendete Materialien

- HeLa-Zellen, elektronenmikroskopisch getestet waren die Zellen Mykoplasmen-frei
- 2,5 M CaCl₂

- 2 X BBS
- DNA
- A. bid.
- MEM
- FCS
- Trypsin

Arbeitsschritte

Tag 1

- Arbeit unter der Laminar Flow Box
- HeLa-Zellen trypsinieren, s. Kultivierung von HeLa-Zellen
- in eine sterile 6-Loch-Platte pro Vertiefung ein steriles Deckgläschen 22 x 22 mm einlegen
- HeLa-Zellen einsäen: 2 ml MEM + 10 % FCS mit 7×10^4 Zellen/ml, d. h. $1,4 \times 10^5$ Zellen/Vertiefung

Tag 2

18-24 h später

- Mediumwechsel 2-4 h vor Zugabe der DNA/CaPO₄-Präzipitate
- lösen von 5-10 µg DNA/Vertiefung in Aqua bid. und CaCl₂ (Endkonzentration 250 mM) in einem Gesamtvolumen von 130 µl
- tropfenweise Zugabe von 130 µl 2 X BBS auf dem Vortexgerät zur Bildung kleinster Präzipitate
- 15-20' bei Raumtemperatur inkubieren
- tropfenweise Zugabe der Präzipitate (250 µl/Vertiefung) zu den Zellen
- Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂

Tag 3

18-24 h später

- Zellen mit MEM waschen
- 2 ml MEM mit 10 % FCS/Vertiefung zugeben

Tag 4

Infektion, s. 2.4.1.4

2.4.1.4 Infektion von HeLa-Zellen

modifiziert für die 6-Loch-Platte

verwendete Materialien

- TSB
- SC 301
- Kanamycin
- Ampicillin
- HeLa-Zellen
- MEM
- FCS
- Eis
- PBS
- PFA
- Glycin
- Triton-X-100

Arbeitsschritte

- o/n-Schüttelkultur von SC 301 in TSB mit Ampicillin 100 µg/ml und Kanamycin 50 µg/ml
- von der o/n Schüttelkultur des Stammes SC 301 am Morgen eine 1 : 100 Verdünnung in TSB ohne Antibiotikazusatz herstellen, diese bei 37°C wachsen lassen bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,7-0,8 bei 600 nm (1 OD bei 600 nm = 4×10^8 Bakterien/ml)

- HeLa-Zellen waschen mit MEM und nur noch 2 ml MEM ohne FCS/Vertiefung zugeben
- die Konzentration der Bakterien im Experiment beträgt 6×10^7 Bakterien/ml MEM, d. h. abzentrifugieren der Bakterien der angesetzten Verdünnungskultur bei 9.500 g in einer Tischzentrifuge über 10' bei RT, Überstand werfen, Pellet auf Eis
- Aufnahme des Pellets in 15 ml MEM
- MEM von den HeLa-Zellen aspirieren
- Zugabe von 2 ml SC 301 in MEM/Vertiefung, 20' bei RT inkubieren zur Adhärenz der Bakterien an die Zellen
- anschließend erfolgt durch Inkubation im Wasserbad bei 37°C über 13' die bakterielle Invasion
- nachfolgend den Überstand werfen
- mehrfaches Waschen der Zellen mit 1 X PBS (2 ml/Vertiefung)
- Fixation der Zellen: pro Vertiefung 2 ml PFA 3,7 % in 1 X PBS zugeben, 20' bei RT inkubieren
- mehrfaches Waschen der Zellen mit 1 X PBS (2 ml/Vertiefung)
- pro Vertiefung 2 ml 0,1 M Glycin in 1 X PBS zugeben, mindestens 5' bei RT inkubieren
- mehrfaches Waschen der Zellen mit 1 X PBS (2 ml/Vertiefung)
- Zugabe von 1,5 ml Triton-X-100 0,1 % in 1 X PBS/Vertiefung, waschen mit 1 X PBS, anschließend 2 ml Triton X-100 0,1 % in 1 X PBS/Vertiefung zugeben, 5' bei RT inkubieren zur Permeabilisation der Zellmembran
- mehrfaches Waschen der Zellen mit 1 X PBS (2 ml/Vertiefung)
- Färbung, s. Zellfärbung mit Antikörpern

2.4.1.5 Zellfärbung mit Antikörpern

verwendete Materialien

- Primärantikörper: P5D4, Kulturüberstand von entsprechendem Hybridom (Maus, IgG₁)¹⁴⁷
- fluoreszenzmarkierter Sekundär-Antikörper: Anti-mouse Texas Red (Maus, IgG)
- Bodipy-phalloidine: Bodipy markiertes Phalloidin zur F-Aktin - Färbung
- 1 X PBS
- mit transfizierten und infizierten Zellen benetzte Deckgläschen
- Parafilm

Arbeitsschritte

- Antikörper in 1 X PBS steril verdünnen
- Parafilm ausbreiten
- pro 22 x 22 mm Deckgläschen 40 µl der Antikörper-Verdünnung auftragen, darauf die Deckgläschen mit der mit fixierten Zellen versehenen Seite nach unten auflegen
- 20' in feuchter Kammer lichtgeschützt bei RT inkubieren
- anschließend Zellen mehrfach mit 1 X PBS waschen

2.4.1.6 Herstellung von Objektträgern

verwendete Materialien

- Deckgläschen mit fixierten Zellen
- Objektträger
- Moviol

Arbeitsschritte

- Objektträger beschriften
- zum Eindecken der Deckgläschen auf den Objektträger Moviol auftragen (ca.17 µl Moviol bei 22 x 22 mm großen Deckgläschen)
- Deckgläschen ausrichten
- 10' bei 37°C im Brutschrank trocknen lassen

2.4.2 Bakteriologische Methoden - Klonierung

Nachstehend wiedergegeben sind die Arbeitsanleitungen für die Klonierungsexperimente mit *E.coli*-Zellen.

2.4.2.1 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

verwendete Materialien

- LB
- *E.coli*-Zellen
- Eis
- CaCl₂ (100 mM)
- Glycerol

Arbeitsschritte

- Übernachtschüttelkultur von *E.coli*-Zellen in LB bei 37°C
- Verdünnung der Übernachtschüttelkultur 1 : 100 in 50 ml LB
- Verdünnungskultur bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,3-0,4 bei 600 nm wachsen lassen
- ab jetzt auf Eis arbeiten (4°C)
- zentrifugieren 10' bei 4°C und 5000 g
- Überstand verwerfen
- Resuspension des Pellets in 10 ml CaCl₂ (100 mM)
- 20' auf Eis inkubieren
- erneut zentrifugieren über 10' bei 4°C und 5000 g
- Überstand verwerfen
- Resuspension des Pellets in 2,5 ml CaCl₂ (100 mM)
- aliquotieren
- Glycerol ad 20 % zur Aufbewahrung bei -80°C
- oder 20' auf Eis inkubieren und anschließend transformieren

2.4.2.2 Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen

verwendete Materialien

- kompetente *E.coli*-Zellen
- Plasmid-DNA, die ein Resistenzgen für ein Antibiotikum enthält; verwendet wurden die Plasmide pUC19 und pKC3, s. Einsatz verschiedener Vektoren
- LB
- LB-Agarplatten mit Antibiotikum entsprechend der Plasmidresistenz
- Eis

Arbeitsschritte

- bei -80°C aufbewahrte kompetente *E.coli*-Zellen 20' auf Eis inkubieren
- zu 200 µl *E.coli*-Zellen DNA zugeben
- weitere 20' auf Eis inkubieren
- anschließend Hitzeschock über 2' bei 42°C im Wasserbad
- sofort nach dem Hitzeschock 800 µl LB zugeben
- Inkubation bei 37°C ≥ 1 h
- zentrifugieren über 2' bei 12.000 g und RT in einer Tischzentrifuge
- Resuspension des Pellets in 100 µl LB
- ausstreichen der 100 µl auf einer LB-Agarplatte mit Antibiotikum
- Inkubation der Agarplatten über Nacht bei 37°C
- Kontrolle der Agarplatten durch kompetente *E.coli*-Zellen, die nicht mit Plasmid-DNA transformiert wurden; aufgrund der fehlenden Antibiotikaresistenz sollten keine Kolonien wachsen
- Effizienz: ca. 1.000.000 Kolonien/µg transformierte Plasmid-DNA

2.4.2.3 Isolierung von Klonen mit rekombinantem Plasmid

verwendete Materialien

- Plasmide, wie pUC19, die Fremd-DNA (z.B. ein PCR-Produkt) als Insert enthalten
- kompetente *E.coli*-Zellen
- LB
- Ampicillin
- LB-Agarplatten mit Ampicillin 100 µg/ml
- Glycerol

Arbeitsschritte

- Transformation der kompetenten *E.coli*-Zellen mit der gewünschten Plasmid-DNA, die zusätzlich ein Resistenzgen für Ampicillin als Selektionskriterium enthält, s. Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen
- ausplattieren auf LB/Ampicillin – Agarplatten
- von mindestens zwei der gewachsenen Kolonien fraktionierte Ausstriche herstellen, um Einzelkolonien zu erhalten
- o/n-Schüttelkultur von zwei Einzelkolonien in LB mit Ampicillin 100 µg/ml
- von diesen Schüttelkulturen jeweils 300 µl abnehmen und 900 µl Glycerol zugeben (ad 75 %), anschließend bei -80°C als Stamm 1 / 2 aufbewahren
- restliche Schüttelkultur für die Plasmidpräparation verwenden, s. Präparation von Plasmid-DNA
- Kontrolle der Plasmide mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung, s. Enzymatische Methoden

2.4.3 Molekularbiologische Methoden

Aufgeführt sind die Arbeitsanleitungen für die Arbeiten mit DNA.

2.4.3.1 Allgemeine Techniken

2.4.3.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

am UV-Spektrometer ^{148, Appendix C1}

- eine OD von 1,000 in einer Quarzküvette mit 10 mm Durchmesser und einer Wellenlänge des verwendeten Lichts von 260 nm entspricht:
 - 50 µg Doppelstrang-DNA/ml
 - 40 µg Einzelstrang-DNA oder RNA/ml
 - 20 µg Oligonukleotide/ml

(Verdünnungsfaktor der DNA bei der Berechnung berücksichtigen)

2.4.3.1.2 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

verwendete Materialien

- Agarose
- 50 X TAE
- A. bidest
- mehrfach konzentrierter Farbmarker
- Lösung mit DNA-Fragmenten verschiedener Länge
- Ethidiumbromid-Bad

Arbeitsschritte

Gießen eines 1,4 % Agarosegels in 1 X TAE

- für 100 ml Gel-Lösung werden pipettiert:
 - 1,4 g Agarose
 - 2 ml 50 X TAE
 - auffüllen mit A. bid. ad 100 ml
- Gemisch 3-5' in der Mikrowelle erwärmen bis sich die Agarose gelöst hat
- Lösung abkühlen lassen und das Gel gießen, Kamm einpassen
- Agarosegel erstarren lassen, ca. 30'

Elektrophorese

- Agarosegel in die Elektrophoresekammer legen und die Kammer mit 1 X TAE auffüllen
- zu der DNA-Lösung Farbmarker pipettieren, daß dieser im Endvolumen 1fach konzentriert vorliegt
- auftragen der DNA-Farblösung in die Taschen des Gels
- schließen der Elektrophoresekammer, elektrische Verbindung herstellen und starten der Elektrophorese mit 5-10 V/cm
- nach Beendigung der E-Phorese das Agarosegel 15-30' in ein Ethidiumbromid-Bad legen zur Färbung der DNA-Fragmente (Konzentration des Ethidiumbromids in A. bidest: 0,5 µg/ml)
- Ergebnis mittels UV-Transilluminator oder Eagle Eye ansehen und dokumentieren

2.4.3.1.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen mittels Qiaquick Gel Extraction Kit, in Anlehnung an das Qiaquick Protokoll

verwendete Materialien

- Qiaquick Gel Extraction Kit
- Ethanol 70 %
- Isopropanol
- 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2)
- DNA im Agarosegel
- A. bid.

Arbeitsschritte

- DNA-Fragment mittels Skalpell aus dem Agarosegel ausschneiden
- wägen des erhaltenen Gelstücks
- zu je 100 mg Gel 300 ml Puffer QX1 des Kits geben
- Gemisch bei 50°C inkubieren bis sich das Gel verflüssigt, ca. 10-20'
- anschließend für je 100 mg Gel 100 µl Isopropanol hinzufügen, vortexen
- Überprüfung des pH-Wertes der Lösung, der < 7,5 sein soll; pH-Korrektur ist durch Zugabe von 10 µl einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) möglich
- Qiaquick-Säulen vorbereiten (eine Säule für 400 mg Agarose), Reaktionsgemisch hineingeben
- zentrifugieren der beladenen Säulen bei 10.000 g für 1' bei RT
- aufgefangene Flüssigkeit verwerfen
- waschen der Säule mit 0,5 ml Puffer QX1 des Kits, zentrifugieren s. o.
- waschen der Säule mit 0,75 ml Puffer PE des Kits, zentrifugieren s. o.
- nach dem Verwerfen der aufgefangenen Flüssigkeit wird erneut für 1' bei 10.000 g und RT zentrifugiert
- zur Eluierung der DNA werden 30 µl A. bid. in die Säule pipettiert, nach 1' wird die DNA-Lösung in ein neues Reaktionsgefäß bei maximaler g-Zahl abzentrifugiert
- messen der DNA-Konzentration am UV-Spektrometer, s. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.4.3.1.4 Aufreinigung von DNA über Phenol/Chloroform-Extraktion

verwendete Materialien

- DNA/Proteinlösung mit definiertem Ausgangsvolumen (AV)
- TE
- Phenol
- Phenol/Chloroform-Gemisch
- Chloroform
- Eis

Arbeitsschritte

- alle Arbeiten finden unter dem Abzug statt
- da durch häufiges Pipettieren Verluste entstehen, ist ein Mindestvolumen von 300 µl zu empfehlen, d. h. DNA/Proteinlösung gegebenenfalls mit 1 X TE auffüllen
- 1 AV Phenol zugeben ($V_{\text{Ansatz}} : V_{\text{Phenol}} = 1 : 1$)
- 2' vortexen
- zentrifugieren über 15' bei maximaler g-Zahl und 4°C
- Überstand (wäßrige Phase mit gelöster DNA) in ein neues Reaktionsgefäß überpipettieren, hydrophobe Phase in einen Phenol-Abfallbehälter
- 1 Volumen des Phenol-Chloroform-Gemischs zugeben
- 2' vortexen
- zentrifugieren über 15' bei maximaler g-Zahl und 4°C
- Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überpipettieren, Rest in den Phenol-Abfallbehälter
- 1 Volumen Chloroform zugeben
- 2' vortexen
- zentrifugieren über 5' bei maximaler g-Zahl und RT
- Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überpipettieren
- jetzt auf Eis stellen
- anschließend Ethanolpräzipitation der DNA, s. Ethanolpräzipitation von DNA

2.4.3.1.5 Ethanolpräzipitation von DNA

verwendete Materialien

- gelöste DNA in entsprechendem Ausgangsvolumen (AV)
- 3 M NaCH₃COO (pH 5,2)
- Ethanol 100 %
- Ethanol 70 %

Arbeitsschritte

- pipettieren: gelöste DNA in entsprechendem Ausgangsvolumen (AV)

- + 1/10 AV 3 M NaCH₃COO (pH 5,2)
- + 2 x AV Ethanol 100%

- 2' vortexen
- o/n-Präzipitation bei -20°C
oder
- Präzipitation über 30' bei -80°C
- waschen der DNA:
 1. zentrifugieren über 15' bei maximaler g-Zahl und -2°C, damit sich die DNA nicht löst
 2. vorsichtig Ethanol-Überstand aspirieren
 3. 1 ml Ethanol 70 % (-20°C) zugeben, vortexen
 4. zentrifugieren über 10' bei maximaler g-Zahl und -2°C
 5. Überstand aspirieren
 6. 3.-5. Wiederholen
 7. 200 µl Ethanol 100 % (-20°C) zugeben
 8. zentrifugieren über 10' bei maximaler g-Zahl und -2°C
 9. Überstand aspirieren
 10. Pellet trocknen lassen
 11. Resuspension des Pellets in entsprechendem Volumen Aqua bid.
- anschließend DNA-Messung zur Konzentrationsbestimmung

2.4.3.1.6 Magnetische Separation mit Dynabeads® M-280 Streptavidin

Allgemeine Information

Es handelt sich um eine Suspension von $6,7 \times 10^8$ Dynabeads®/ml (10 mg/ml) gelöst in PBS (pH 7,4), 0,1 % BSA und 0,02 % NaN₃. Dynabeads® M-280 Streptavidin sind paramagnetische Partikel von einheitlicher Größe, die von Streptavidin umhüllt sind. Sie können aufgrund ihrer paramagnetischen Eigenschaften beliebig oft selektiert und wieder resuspendiert werden. Durch die hohe Affinität des Streptavidins zu Biotin ist eine Bindung von biotinylierten Molekülen, wie beispielsweise Doppelstrang-DNA, Einzelstrang-DNA, RNA, Proteinen und Lectinen möglich. Die Bindungskapazität für DNA beträgt 22 pmol eines 526 bp-Fragments/mg Dynabeads® bzw. 5 µg biotinylierte DNA/100 µl Beads (= 1 mg Beads).

Puffer für die Arbeit mit den Beads

Bindungspuffer:	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 100 mM NaCl 1 mM EDTA 0,15 % Triton-X-100
20 X SSPE:	3 M NaCl 0,2 M NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O 0,02 M EDTA pH 7,4
Denaturierungslösung:	0,5 M NaOH 2 mM EDTA
'Annealing'-Puffer:	150 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8
Extensionspuffer:	Puffer der entsprechenden Polymerase

Protokoll für die Bindung von biotinylierter DNA an die Beads

- Arbeit mit gleichen Volumina Beads und DNA
- 30 µl Beads 2 x mit Bindungspuffer waschen
- resuspendieren der Beads in 30 µl Bindungspuffer
- 30 µl DNA (biotinyliert) 10' auf 65°C erhitzen (Linearisierung), anschließend anzentrifugieren zur Rückgewinnung des Kondensats vom Reaktionsgefäßdeckel
- Beads zu der linearisierten DNA geben (30 µl + 30 µl = 60 µl)
- Zugabe von 1/3 des bisherigen Volumens (60 µl) = 20 µl 20 X SSPE zu 5 X SSPE Endkonzentration
- vortexen

- Inkubation über 1 h bei 40°C und anschließend über 20' bei RT, zwischendurch antippen, damit die Beads nicht sedimentieren
 - 3 x mit vorgewärmtem Bindungspuffer waschen (37°C)
 - Resuspension in 24 µl Aqua bidest
 - Zugabe von 6 µl Denaturierungslösung zur Bildung von Einzelstrang-DNA, vortexen
 - 5' bei RT inkubieren
 - Überstand verwerfen (nicht biotinylierter Einzelstrang)
 - Beads 2 x mit 150 µl Bindungspuffer waschen
 - resuspendieren in 30 µl Bindungspuffer
- Ergebnis: Einzelstrang-DNA, die über die Biotin-Streptavidin-Bindung an die Beads gebunden ist; jetzt sind 'Annealing' und Extension möglich

Protokoll für 'Annealing'- und Extensionsreaktion mit an Dynabeads® gebundener Einzelstrang-DNA als template – DNA

Weiterarbeit nach obigem Protokoll

- Einzelstrang-DNA-Beads 1 x in 150 µl 'Annealing'-Puffer waschen
 - Überstand verwerfen
 - Resuspension in 7,7 µl Aqua bidest
 - + 2 µl 'Annealing'-Puffer
 - + 0,3 µl Oligonukleotid X (Konzentration abhängig von der Konzentration der Ausgangs-DNA)
 - 'Annealing' über 30', beginnend mit z. B. 72°C für 2', anschließend langsamer Temperaturabfall auf 45°C, dann 4°C; die 'Annealing'-Temperatur richtet sich nach dem Tm-Wert des Oligonukleotids
 - 3 x waschen in 1 X Extensionspuffer
 - Zugabe der Beads zu entsprechendem „PCR-Ansatz“ von 100 µl für die Extension, z. B. Beads

+	10 X Puffer	10 µl
+	5 mM MgSO ₄ zu 1,5 mM	6 µl
+	5 mM Nukleotide zu 400 µM	8 µl
+	Pwo 2,5 U/µl zu 0,5 U	0,2 µl
+	Aqua bid.	75,8 µl
 - Extension auf vorgewärmtem Block bei 72°C für 10'
 - anschließend 2 x waschen mit Bindungspuffer
 - resuspendieren in 50 µl Bindungspuffer
 - bei 4°C o/n aufbewahren
- Ergebnis: Doppelstrang-DNA, die über Biotin-Streptavidin-Bindung an die Beads gebunden ist; durch Restriktionsbehandlung ist die DNA von den Beads lösbar

2.4.3.1.7 Präparation von Plasmid-DNA

mittels Qiagen Plasmid Kit, modifiziert nach dem Qiagen-Protokoll

verwendete Materialien

- LB
- TG 1 mit entsprechendem Plasmid
- Ethanol 70 %
- Isopropanol
- Qiagen Plasmid Kit (SpinPlasmidPrep, Midi, Maxi, Endofree Maxi)
- Eis
- A. bid.
- 1 M NaOH
- 20 % SDS

Arbeitsschritte

- o/n-Kultur von TG 1 mit Plasmid in

10 ml LB mit Ampicillin 100 µg/ml für das SpinPlasmidPrep
50 ml LB mit Ampicillin 100 µg/ml für das Midi Kit
200 ml LB mit Ampicillin 100 µg/ml für das Maxi Kit
200 ml LB mit Ampicillin 100 µg/ml für das Endofree Maxi Kit
- Bakterienzellen abzentrifugieren bei 8.000 g und RT über 15'

- Resuspension des Bakterienzellenpellets in Puffer P1 des Kits
- Puffer P2 frisch zubereiten, P2 = 200 mM NaOH, 1 % SDS
- Zugabe von Puffer P2, vorsichtig mischen und anschließend bei RT 5' inkubieren
- gekühlten Puffer P3 des Kits zugeben, vorsichtig mischen und danach 15' auf Eis inkubieren
- Zentrifugation in der Ultrazentrifuge bei ca. 80.000 g und 4°C über 45'
- Überstand von der Zentrifugation auf die zuvor mit Puffer QBT äquilibrierte Säule geben
- zweimaliges Waschen der Säule mit Puffer QC des Kits
- Eluierung der Plasmid-DNA mit Puffer QF
- durch Zugabe von Isopropanol wird die DNA ausgefällt
- anschließend 45' bei ca. 80.000 g und 4°C zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abpipettieren und DNA mit ca. 2-3 ml Ethanol 70 % waschen, zentrifugieren und den Überstand vorsichtig aspirieren
- das DNA-Pellet trocknen lassen und im Anschluß daran in A. bid. aufnehmen
- DNA-Konzentration am UV-Spektrometer bestimmen und gleichzeitig den Reinheitsgrad der DNA ermitteln über das Verhältnis der Meßergebnisse bei 260 nm und 280 nm (A_{260nm}/A_{280nm} soll > 1,5 sein)
- Kontrolle des Plasmids über Restriktionsanalyse oder Sequenzierung, s. Enzymatische Methoden

Anmerkung: Bei der endotoxinfreien Plasmidpräparation wird zusätzlich ein im Endofree-Kit mitgeliefertes Filtersystem verwendet und die Arbeit erfolgt mit endotoxinfreien Substanzen.

2.4.3.1.8 Hybridisierung von Oligonukleotiden

verwendete Materialien

- A. bid.
- Oligonukleotide 1 und 2
- 10 X TE
- 1 M NaCl

Arbeitsschritte

- aufnehmen der Oligonukleotide in sterilem A. bid. und anschließend Konzentrationsbestimmung am UV-Spektrometer, s. Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren
- pipettieren des Reaktionsansatzes zu folgenden Bedingungen in einem Gesamtvolumen von 100 µl:
 - soll das Hybridisierungsprodukt in einer Konzentration von 10 µM vorliegen, so müssen beide Oligonukleotide im Reaktionsansatz in einer Konzentration von 10 µM vorliegen
 - die Hybridisierung erfolgt in 1 X TE und 100 mM NaCl
- erhitzen des Reaktionsgemisches auf 94°C für 3'
- anschließend Reaktionsgemisch auf die Tm der Oligonukleotide abkühlen lassen
- bei Erreichen der Tm Reaktionsgemisch auf Eis stellen
- das Hybridisierungsprodukt kann sofort verwendet werden, z. B. zur Restriktion, Ligation und Klonierung

Anmerkung: Die Tm (Hybridisierungstemperatur) der Oligonukleotide berechnet sich wie folgt:

$$T_m = 81,5 + 0,41 (G + C) + 16,6 \log [Na^+] - 500/d$$

(G + C)	prozentualer Anteil der beiden Basen am gesamten Oligonukleotid
[Na ⁺]	Molarität
d	Länge der hybridisierten Doppelstrang-DNA

2.4.3.2 Enzymatische Methoden

2.4.3.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

verwendete Materialien

- Doppelstrang-DNA, z. B. Plasmid-DNA
- Restriktionsendonuklease(n), z. B. PstI und EcoRI
- Enzym-spezifische(r), meist 10fach konzentrierte(r) Puffer
- A. bid.
- BSA, wird nur von einigen Restriktionsendonukleasen benötigt

Arbeitsschritte

- pipettieren von A. bid., zu schneidender DNA, Reaktionspuffer und Restriktionsenzym(en) zu folgenden Bedingungen:
 - der Puffer liegt im Gesamtvolumen 1fach konzentriert vor
 - das Restriktionsenzym liegt im Verhältnis zu der zu schneidenden DNA in mindestens 5fachem Überschuß vor, d. h. pro μg DNA werden mindestens 5 U Enzym benötigt
 - die Menge an verwendetem Restriktionsenzym muß im Gesamtansatz 1 : 20 verdünnt vorliegen, d. h. wird 1 μl der Enzymlösung eingesetzt, dann muß der Gesamtansatz minimal 20 μl betragen
 - benötigt das Enzym BSA, so beträgt dessen Konzentration im Reaktionsansatz 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Inkubation des Restriktionsansatzes bei der für das Enzym typischen Restriktionstemperatur, z. B. 37°C für EcoRI über 60-90'
- stoppen der Reaktion durch kurzzeitiges Erwärmen des Reaktionsansatzes auf die für das Enzym spezifische Inaktivierungstemperatur, z. B. 65°C über 10' für EcoRI oder Reinigung der DNA vom Enzym mittels Elektrophorese, DNA-Extraktion aus dem Gel und anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion, s. Allgemeine Techniken
- Kontrolle der Restriktionsanalyse mittels Elektrophorese und mitlaufendem DNA-Fragment-Längenmarker

Anmerkung: Es ist ebenfalls möglich, einen Restriktionsansatz o/n zu inkubieren. Dabei sollte jedoch maximal 1 U Enzym pro μg DNA für die Restriktion eingesetzt werden.

2.4.3.2.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

verwendete Materialien

- CIAP (calf intestine alkaline phosphatase) von MBI Fermentas
- 10fach konzentrierter Reaktionspuffer für CIAP
- A. bid.
- phosphorylierte DNA

Arbeitsschritte

- pipettieren des Reaktionsansatzes mit einem Gesamtvolumen von 50 μl :
 - 10-40 μl DNA-Lösung, die 1-20 pmol an 3'- oder 5'-DNA-Enden enthält
 - 5 μl 10 X Reaktionspuffer
 - 0,05-1 U CIAP
 - Aqua bidest ad 50 μl
- Reaktionsansatz für 30' bei 37°C inkubieren
- stoppen der Reaktion durch Erwärmung auf 75°C über 10' oder mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender DNA-Präzipitation mit Ethanol, s. Allgemeine Techniken

2.4.3.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten

verwendete Materialien

- T4 DNA Ligase (mit PEG) von MBI Fermentas
- 10fach konzentrierter Reaktionspuffer für die Ligase
- PEG 50 % -Lösung
- BSA
- A. bid.
- zu ligierende DNA-Fragmente
- Eis

Arbeitsschritte

DNA-Fragment Ligation in einen Vektor, sticky end-Ligation

- pipettieren des Reaktionsansatzes mit einem Gesamtvolumen von maximal 20 μl zu folgenden Bedingungen:
 - der Reaktionsansatz enthält 1-3 U an T4 DNA Ligase
 - der Reaktionspuffer ist 1fach konzentriert
 - das Verhältnis der Molaritäten von Vektor zu Fragment ist 1 : 2, d. h. verwendet man 50 fmol an Vektor-DNA werden 100 fmol Fragment-DNA eingesetzt
- Reaktionsansatz gut mischen
- Inkubation des Ligationsansatzes für mindestens 60' bei 16°C (o/n-Ligation ist auch möglich)

- durch Erhitzen auf 65°C für 10' wird die T4 DNA Ligase inaktiviert
- der Reaktionsansatz kann im Anschluß an die Ligation für die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen genutzt werden

Verwendung der PEG 50 % -Lösung für die blunt end-Ligation sowie für die Ligation von zwei Inserts in einen geschnittenen Vektor bzw. die Ligation dreier Fragmente = Doppelligation

- pipettieren des Reaktionsansatzes mit einem Gesamtvolumen von 20 µl zu folgenden Bedingungen:
 - der Reaktionsansatz enthält 3-4 U T4 DNA Ligase
 - der Reaktionspuffer ist 1fach konzentriert
 - die PEG 50 % -Lösung hat eine Endkonzentration von 10 %
 - das Verhältnis der Molaritäten von Vektor zu jedem Fragment ist 1 : 2, d. h. verwendet man 50 fmol an Vektor-DNA werden 100 fmol von jeder Fragment-DNA eingesetzt
- den Reaktionsansatz bei 16°C o/n inkubieren
- durch Erhitzen auf 65°C für 10' wird die T4 DNA Ligase inaktiviert, anschließend auf Eis stellen
- der Reaktionsansatz kann im Anschluß an die Ligation für die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen genutzt werden

Kontrollmöglichkeiten der Ligation von Vektor und Fragment mit anschließender Transformation:

- Positivkontrolle für die Ligation: Wiederholung einer bereits erfolgreichen Ligationsreaktion
- Negativkontrolle für die Ligation: a) Ansatz nur mit dem linearisierten Vektor, dessen Enden nicht ligierbar sind
b) Ansatz nur mit dem Fragment
- Positivkontrolle für die Transformation: Verwendung eines Plasmids mit Resistenzgen

2.4.3.2.4 Durchführung einer PCR

verwendete Materialien

- A. bid.
- template-DNA (Matrize)
- DNA Polymerase, z. B. Pwo
- 10 X Reaktionspuffer für die Polymerase
- 25 mM MgSO₄
- 5 mM dNTP's
- Oligonukleotide als Primer
- Mineralöl

Arbeitsschritte

- pipettieren des Reaktionsansatzes von 100 µl zu folgenden Bedingungen
 pro Ansatz: 1,5 fmol template-DNA
 20 pmol von jedem Primer (forward- und reverse-Primer)
 0,5 U Pwo
 1,5 mM MgSO₄
 100 µM jedes dNTP, d. h. 400 µM zusammen
 1 X Reaktionspuffer
 A. bid. ad 100 µl
- stets eine Leerprobe mitführen, d. h. alle Reagenzien ohne template-DNA, um eine Hybridisierung der Oligonukleotide aneinander auszuschließen bzw. andersartige Verunreinigungen, die als Template dienen
- Zugabe von 70 µl Mineralöl pro Ansatz
- Programmierung des Thermocyclers wie folgt:

1. 94°C	3'	Denaturierung
2. 65°C	30''	'Annealing'
3. 72°C	1'	Extension
4. 94°C	1'	Denaturierung
5. 65°C	30''	'Annealing'
6. 72°C	1'	Extension
6. an 4.:		15 Zyklen
7. 94°C	1'	Denaturierung
8. 65°C	30''	'Annealing'

- | | | |
|---------|-----|---------------|
| 9. 72°C | 10' | Extension |
| 10. 4°C | | Reaktionsstop |
- Kontrolle der PCR mittels Elektrophorese, Größenbestimmung des PCR-Produkts anhand des mitlaufenden DNA-Fragment-Längenmarkers
 - anschließend Reinigung des PCR-Produkts über Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation
 - Sequenzierung des PCR-Produkts, s. DNA-Sequenzierung

2.4.3.2.5 DNA-Sequenzierung

Anwendung findet ein sogenanntes „cycle sequencing“-Verfahren, bei dem die Sequenzierung auf der Synthese eines neuen DNA-Stranges beruht, der an der Bindungsstelle des Primers beginnt und durch den Einbau eines Dideoxynukleosidtriphosphats (ddNTP) terminiert wird. Die Konzentrationen von dNTP's und ddNTP's sind so gewählt, daß der Einbau eines ddNTP anstelle eines dNTP's an jeder Position der zu sequenzierenden DNA möglich ist. Bei diesem Verfahren trägt der Primer eine 5'-Infrarot-Farbstoff-Markierung, die durch den Laser des LI-COR® DNA-Sequencer Model 4000 von MWG Biotech erkannt wird. Wie der Name „cycle sequencing“ besagt, erfolgt die Synthese der DNA-Stränge durch wiederholte Zyklen von Denaturierung, 'Annealing' und Extension/Terminierung. Der markierte Primer kann so mehrfach an die template-DNA binden, wodurch einerseits nur eine sehr geringe Menge template-DNA benötigt wird und sich andererseits der Anteil an markierten Banden/DNA-Fragmenten erhöht. Die Qualität der Sequenzierreaktion hängt von der spezifischen Bindung des Primers an das Template ab. Deshalb sollte die 'Annealing'-Temperatur optimal auf den eingesetzten Primer abgestimmt sein. Die 'Annealing'-Temperatur läßt sich dabei wie folgt berechnen: $T_{\text{Annealing}} = T_{m_{\text{Primer}}} + 3^{\circ}\text{C}$.

SEQUENZIERREAKTION

verwendete Materialien

- Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit von Amersham LIFE SCIENCE
- zu sequenzierende DNA
- Primer
- Mineralöl
- Stop-Reagenz

Arbeitsschritte

- Herstellung einer DNA/Primer-Lösung pro DNA-Probe mit einem Gesamtvolumen von 24 µl, dabei sollen die 24 µl ca. 0,15-0,25 pmol an DNA und 2 pmol an Primer enthalten
- Aufteilen der 24 µl auf 4 Reaktionsgefäße: A, C, G, T
- Zugabe von 2 µl A-, C-, G- oder T-Lösung des Sequenzierkits zu dem entsprechenden Reaktionsgefäß, jedes Reaktionsgefäß enthält ein Volumen von 8 µl
- pro Reaktionsgefäß 30 µl Mineralöl zugeben
- Sequenzierreaktion starten:

1. 5'	95°C	Denaturierung
2. 30''	95°C	Denaturierung
3. 30''	58°C (abhängig vom Primer)	'Annealing'
4. 1'	70°C	Extension
4. an 2. :		30 Zyklen
5. 4°C		
- nach Beendigung des Thermocycling-Programms Zugabe von 6 µl Stop-Reagenz unter das Öl
- erneute Denaturierung bei 95°C für 3'
- anschließend 1-2 µl pro Tasche auf das Sequenzier-Gel auftragen; d. h. mehrmaliges Auftragen ist möglich

HERSTELLUNG EINES GELS FÜR DIE DNA-SEQUENZIERUNG

verwendete Materialien

- A. bidest
- Ethanol
- Silan/Ethanolllösung (50 µl Silan in 10 ml Ethanol)
- Eisessig

- APS 10 %
- TEMED
- 10 X TBE
- Urea
- Long Ranger Gel Solution (50 %)
- Nalgene cellulose acetate filter (> 0,45 + M)

Arbeitsschritte

Herstellung der Gel-Lösung für ein 8 %-Gel

- das Gesamtvolumen der fertigen Lösung beträgt 50 ml
- 21 g Urea, 5 ml von 10 X TBE und 8 ml Long Ranger Gel Solution (50 %) zusammen in ein Gefäß geben, unter Erwärmung vorsichtig mischen bis sich der Harnstoff gelöst hat, anschließend auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- Zugabe von A. bid. zu einem Gesamtvolumen von 50 ml
- Filtern der Gel-Lösung durch einen Nalgene cellulose acetate filter (> 0,45 + M)

Gießen des Gels

- Glasplatten säubern mit A. bid. und Ethanol
- zu 165 µl der Silan/Ethanollösung 5 µl 10 %igen Eisessig geben, mit diesem Gemisch die Stelle der späteren Kammlage benetzen und 3' trocknen lassen
- Glasplatten mit plazierten Spacern ausrichten, in die Vorrichtung stellen und fixieren
- 1,5 ml der gefertigten Gel-Lösung entnehmen, 25 µl APS 10 % und 5 µl TEMED zugeben, vortexen und unverzüglich in die vorgestanzten Mulden des Fußes der Vorrichtung geben für die untere Abdichtung des Gels, 10' polymerisieren lassen
- Glasplatten jetzt schräg lagern
- zu der restlichen Gel-Lösung 225 µl APS 10 % und 22,5 µl TEMED hinzufügen, vortexen und mittels Pipette das Gel luftblasenfrei gießen
- anschließend Kamm einlegen und diesen mittels Klammern fest einspannen
- das Gel benötigt 60'-90' für die Polymerisation

Elektrophorese mit dem LI-COR® DNA-Sequencer Model 4000 von MWG Biotech

- auspolymerisiertes Gel in die LI-COR Kammer einspannen
- Tankbehälter für Pufferlösung aufsetzen und mit 1 X TBE füllen
- Verbindungen herstellen, Elektrophorese-Kammer schließen
- Vorlauf starten bei einer Spannung von 1000 Volt bis das Gel eine Temperatur von 50°C erreicht
- Laser-Scanner fokussieren
- ist die gewünschte Temperatur erreicht, wird der Vorlauf gestoppt
- öffnen der E-Phorese-Kammer, richtiges Positionieren des Kammes und sorgfältiges Ausspülen der Probestaschen
- auftragen von 1-2 µl der Sequenzierreaktion pro Tasche
- elektrische Verbindungen herstellen, Elektrophorese-Kammer schließen
- Elektrophorese starten mit einer Spannung von 1500 Volt, d.h. 36 V/cm
- eine Auswertung mit der entsprechenden Software (s. Computerprogramme) ist nach ungefähr 6-8 Stunden möglich

2.4.4 Computerprogramme

Bildbearbeitungsprogramme Adobe Photoshop und Corel Photo Paint

Gendatenbanken: EMBL, GenBank

HUSAR: Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources

IBM OS/2 Base ImageIR Software mit den Programmteilen Data Collection und Image Analysis für die DNA-Sequenzierung

Microsoft Word 97 für Windows

Zeichenprogramm Autosketch

3 Ergebnisse

Zur Untersuchung des molekularen Mechanismus der differentiellen Rekrutierung von RhoA, RhoB und RhoC während der Invasion von *Shigella flexneri* in HeLa-Zellen wurden definierte DNA-Mutanten der Isoformen erzeugt. Aufgrund der funktionellen Bedeutung des CAAX-Motivs kleiner G-Proteine und der beschriebenen Differenzen in der Primärstrukturebene der Rho-Isoformen (s. Fragestellung) wurden die folgenden Mutationen im Rho-Molekül vorgenommen. Eine Übersicht dazu bietet Tabelle 1 **Übersicht über die Rho-Konstrukte**.

Es wurden CAAX-Deletionsmutanten für alle drei Isoformen hergestellt:

- Konstrukte **RhoAd**, **RhoBd** und **RhoCd**.

Weiterhin wurde RhoA wie folgt mutiert:

- die C-terminalen Aminosäuren 181-189 von RhoA vor der CAAX-Box wurden durch die entsprechenden Aminosäuren von RhoB (aa 181-192) bzw. von RhoC (aa 181-189) ersetzt, die CAAX-Box von RhoA (aa 190-193) blieb erhalten, Konstrukte **RhoABA** und **RhoACA**
- die C-terminalen Aminosäuren von RhoA und die CAAX-Box von RhoA (aa 181-193) wurden durch die C-terminalen Aminosäuren von RhoB und die CAAX-Box von RhoB (aa 181-196) bzw. durch die C-terminalen Aminosäuren von RhoC und die CAAX-Box von RhoC (aa 181-193) ersetzt, Konstrukte **RhoABB** und **RhoACC**
- die C-terminalen Aminosäuren 181-189 von RhoA vor der CAAX-Box wurden durch die entsprechenden C-terminalen Aminosäuren von RhoB (aa 181-192) bzw. RhoC (aa 181-189) ersetzt, aber ohne nachfolgende CAAX-Box von RhoA, Konstrukte **RhoABd** und **RhoACd**

Des Weiteren wurden Punktmutationen für RhoA an den Aminosäurepositionen vorgenommen, an denen nicht konservative Aminosäuredifferenzen sowohl zwischen RhoA und RhoB als auch zwischen RhoA und RhoC vorliegen. Infolge der größeren Sequenzhomologie zwischen RhoA und RhoC wurden die folgenden Mutanten hergestellt:

- die Aminosäuren 140 und 141 von RhoA wurden durch die entsprechenden Aminosäuren von RhoC ersetzt, Konstrukt **RhoA 140**
- die Aminosäure 183 von RhoA wurde durch die entsprechende Aminosäure von RhoC ersetzt, Konstrukt **RhoA 183**
- die Aminosäuren 186 und 187 von RhoA wurden durch die entsprechenden Aminosäuren von RhoC ersetzt, Konstrukt **RhoA 186**
- die Aminosäure 188 von RhoA wurde durch die entsprechende Aminosäure von RhoC ersetzt, Konstrukt **RhoA 188**

Für die Herstellung der Rho-Mutanten konnte von bereits vorhandener DNA, die für RhoA, RhoB oder RhoC mit dem N-terminal eingefügten Peptid-tag VSV kodiert, ausgegangen werden. Die VSV-tag Sequenz kodiert für 11 Aminosäuren (Y-T-D-I-E-M-N-R-L-G-K) des Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G, die von dem spezifischen monoklonalen Antikörper P5D4 erkannt werden.¹⁴⁷ Die für RhoA vorliegende DNA kodierte jedoch nur für die Aminosäuren 5-193 des Proteins. Um vollständige Konstrukte zu erhalten, wurden die ersten vier Aminosäuren von RhoA in die Mutanten integriert, obwohl experimentell nachgewiesen wurde, daß das Fehlen dieser vier Aminosäuren die Funktion von RhoA nicht beeinträchtigt. Die Klonierung der hergestellten Mutanten in pUC19 ermöglichte die Sequenzierung der Konstrukte. Einige der sequenzierten Rho-Mutanten wurden nach Klonierung in pKC3, einem Expressionsvektor für eukaryote Zellen (s. Einsatz verschiedener Vektoren), im HeLa-Zell-Modell getestet. Durch die Transfektion von HeLa-Zellen mit der Konstrukt-DNA konnte der Einfluß der Mutanten auf das zelluläre Zytoskelett untersucht werden und nach zusätzlicher Infektion der transfizierten Zellen mit *Shigella flexneri* auch ihr Rekrutierungsverhalten.^{60-62, 93, 149}

Es wurden die in dem Methodenteil dargelegten experimentellen Techniken verwendet, die nun im einzelnen für die Herstellung der jeweiligen Konstrukte beschrieben sind. Experimentell eingesetzte Oligonukleotide sind in Tabelle 2 **Verwendete Oligonukleotide** zusammengefaßt.

Tabelle 1 Übersicht über die Rho-Konstrukte

Konstrukt	Länge	aa von RhoA	aa von RhoB	aa von RhoC	CAAX - Box	grafische Darstellung des Konstrukts
RhoAd	624 bp	1 - 189	-	-	fehlt	
RhoBd	633 bp	-	1 - 192	-	fehlt	
RhoC	639 bp	-	-	1 - 193	von RhoC	
RhoCd	627 bp	-	-	1 - 189	fehlt	
RhoABA	645 bp	1 - 180 190 - 193	181 - 192	-	von RhoA	

RhoABB	645 bp	1 - 180	181 - 196	-	von RhoB	
RhoABd	633 bp	1 - 180	181 - 192	-	fehlt	
RhoACA	636 bp	1 - 180 190 - 193	-	181 - 189	von RhoA	
RhoACC	636 bp	1 - 180	-	181 - 193	von RhoC	
RhoACd	624 bp	1 - 180	-	181 - 189	fehlt	
RhoA 140	636 bp	1 - 139 142 - 193	-	140 - 141	von RhoA	
RhoA 183	636 bp	1 - 182 184 - 193	-	183	von RhoA	

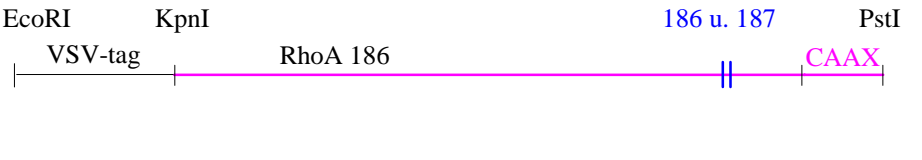

RhoA 186	636 bp	1 - 185 188 - 193	-	186 - 187	von RhoA	
RhoA 188	636 bp	1 - 187 189 - 193	-	188	von RhoA	

Tabelle 2 **Verwendete Oligonukleotide**

Name	laufende Nr. im Labor von Dr. Adam	Länge	5'-3' Sequenz (einschließlich Restriktionsschnittstellen)	verwendet für Konstrukt(e)
c	22	57 b	Nukleotidsequenz von Fnu4HI/den aa ₁₇₇₋₁₈₀ von RhoA/den aa ₁₈₁₋₁₉₃ von RhoC/stop/von PstI;beidseitig offen	RhoACC
c-rev	23	52 b	Gegenstrang zu c; beidseitig offen	RhoACC
rho a 1	9	84 b	Gegenstrang zur Nukleotidsequenz der aa ₁₇₃₋₁₈₀ von RhoA/der aa ₁₈₁₋₁₉₂ von RhoB/der aa ₁₉₀₋₁₉₃ von RhoA/stop/von PstI/ATCG	RhoABA
rho a 3	8	19 b	Gegenstrang zur Nukleotidsequenz der aa ₁₇₅₋₁₈₀ von RhoA	RhoABA
rho a 5	6	30 b	Gegenstrang zur Nukleotidsequenz der aa ₁₈₈₋₁₉₃ von RhoA/stop/von PstI/ATCG	RhoA 140
rhoa 140	31	50 b	Nukleotidsequenz der aa ₁₂₇₋₁₃₉ von RhoA/der aa ₁₄₀₋₁₄₁ von RhoC/der aa ₁₄₂₋₁₄₄ von RhoA	RhoA 140
rhoa 183	32	57 b	Gegenstrang zur Nukleotidsequenz der aa ₁₇₉₋₁₈₂ von RhoA/der aa ₁₈₃ von RhoC/der aa ₁₈₄₋₁₉₃ von RhoA/stop/von PstI/ATCG	RhoA 183
rhoa 186	29	44 b	Gegenstrang zur Nukleotidsequenz der aa ₁₈₃₋₁₈₅ von RhoA/der aa ₁₈₆₋₁₈₇ von RhoC/der aa ₁₈₈₋₁₉₃ von RhoA/stop/von PstI/ATCG	RhoA 186
rhoa 188	30	44 b	Gegenstrang zur Nukleotidsequenz der aa ₁₈₃₋₁₈₇ von RhoA/der aa ₁₈₈ von RhoC/der aa ₁₈₉₋₁₉₃ von RhoA/stop/von PstI/ATCG	RhoA 188
rhoabrev	24	49 b	Gegenstrang zur Nukleotidsequenz der aa ₁₈₅₋₁₉₆ von RhoB/stop/von PstI/ATCG	RhoABB
rhoacarev	43	45 b	Gegenstrang zur Nukleotidsequenz der aa ₁₈₄₋₁₈₉ von RhoC/der aa ₁₉₀₋₁₉₃ von RhoA/stop/von PstI/ATCG	RhoACA
rhoacdrev	44	39 b	Gegenstrang zur Nukleotidsequenz der aa ₁₈₁₋₁₈₉ von RhoC/stop/von PstI/ATCG	RhoCd, RhoACd
rhoadrev	45	38 b	Gegenstrang zur Nukleotidsequenz der aa ₁₈₁₋₁₈₉ von RhoA/stop/von PstI/ATCG	RhoAd
rhobd	41	45 b	Nukleotidsequenz von PstI/den aa ₁₈₀₋₁₉₂ von RhoB/stop/von PstI; beidseitig offen	RhoBd
rhobd.rev	42	45 b	Gegenstrang zu rhobd; beidseitig offen	RhoBd
rhobdrev	46	37 b	Gegenstrang zur Nukleotidsequenz der aa ₁₈₅₋₁₉₂ von RhoB/stop/von PstI/ATCG	RhoABd
rhocrev	26	35 b	Gegenstrang zur Nukleotidsequenz der aa ₁₈₆₋₁₉₃ von RhoC/stop/von PstI/ATCG	RhoC

vsv-cs-bio	1	26 b	TAC/Nukleotidsequenz von EcoRI/den aa ₁₋₆ vom VSV-tag; biotinyliert am 5'-Ende	RhoAd, RhoBd, RhoABA, RhoABB, RhoABd, RhoACA, RhoACd
vsvrhoc	25	63 b	TAC/Nukleotidsequenz von EcoRI/den aa ₁₋₁₂ vom VSV-tag/von KpnI/CAT/den aa ₁₋₃ von RhoC	RhoC, RhoCd

3.1 Herstellung der Rho-Konstrukte

3.1.1 Konstrukt RhoABA

Bei der ersten Mutante RhoABA wurden die Aminosäuren 181-189 von RhoA durch die Aminosäuren 181-192 von RhoB ersetzt, die CAAX-Box von RhoA blieb bestehen. Der Sequenz von RhoABA wurde am N-terminalen Ende eine Sequenz für das VSV-tag vorangestellt. Die VSV-tag-Sequenz kodiert für 11 Aminosäuren (Y-T-D-I-E-M-N-R-L-G-K) des Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G, die von dem spezifischen monoklonalen Antikörper P5D4 erkannt werden.¹⁴⁷

Das **Konstrukt RhoABA** setzt sich zusammen aus:



1. einer Schnittstelle für EcoRI
2. der Sequenz für VSV (VSV-tag)
3. einer Schnittstelle für KpnI
4. den aa 1-180 von RhoA (magenta)
5. den aa 181-192 von RhoB (grün)
6. den aa 190-193 von RhoA = CAAX-Box von RhoA (magenta)
7. dem Stop-Codon TGA
8. einer Schnittstelle für PstI

Die folgenden Arbeitsschritte führten zum gewünschten Konstrukt, s. begleitend zum Text die Übersicht am Ende des Kapitels. Der erste Schritt beinhaltete eine PCR für das PCR-Produkt RhoA₅₋₁₈₀ (EcoRI/VSV-tag/KpnI/RhoA₅₋₁₈₀) mit den Aminosäuren der gewünschten Mutante bis zur aa 180 von RhoA. Als template-DNA diente EcoRI/VSV/KpnI/RhoA₅₋₁₉₃/stop/PstI in pKC3. Als Primer wurden eingesetzt:

- Oligonukleotid 1: vsv-cs-bio (biotinyliertes Oligonukleotid als forward-Primer für die Nukleotidsequenz EcoRI/VSV-tag), T_m = 74°C.
- Oligonukleotid 2: rho a 3 (reverse-Primer für die Nukleotidsequenz der aa₁₇₅₋₁₈₀ von RhoA), T_m = 58°C.

Die PCR wurde mit dem Enzym Pwo durchgeführt. Pwo ist eine thermostabile „high fidelity“ DNA Polymerase. Die hohe Genauigkeit (etwa 10fach höher als die der Taq Polymerase) resultiert aus der 3'-5' Exonukleaseaktivität, die den Einbau falscher Nukleotide während der Extension verhindert. Das 'Annealing' erfolgte bei 65°C, um eine hohe Spezifität der Primer-Bindung an die template-DNA zu gewährleisten. Insgesamt wurden nur 15 Zyklen gefahren, um die Fehlerrate der PCR gering zu halten. Die PCR wurde anhand einer Elektrophorese überprüft, s. Abbildung 1.



Abbildung 1 Elektrophoretische Kontrolle des PCR-Produkts RhoA₅₋₁₈₀

- Spur 1 : Leerprobe (ohne template-DNA)
- Spur 2 : pcr-Produkt von 576 bp bei Ansatz₁
- Spur 3 : pcr-Produkt von 576 bp bei Ansatz₂

Es folgte die Reinigung von RhoA₅₋₁₈₀ über eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender

Ethanolpräzipitation.

Der zweite Schritt zur Herstellung von RhoABA bestand in der Bindung von RhoA₅₋₁₈₀ an Dynabeads®. (s. Magnetische Separation mit Dynabeads® M-280 Streptavidin) Anschließend erfolgte eine Denaturierung, um Einzelstrang-RhoA₅₋₁₈₀ (gebunden an die Beads) zu erhalten. Der Ersatz der aa 181-189 von RhoA durch die aa 181-192 von RhoB sollte durch die Bindung des aus 84 Nukleotiden bestehenden Oligonukleotids rho a 1 an Einzelstrang-RhoA₅₋₁₈₀ und eine einmalige Extensionsreaktion erfolgen. Mit Pwo waren die einfache Extension an der Beads-DNA und eine PCR nicht erfolgreich. (s. Einsatz von Dynabeads® M-280 Streptavidin) Deshalb erfolgte diese PCR, deren Template Einzelstrang-RhoA₅₋₁₈₀ (gebunden an die Beads) war, mit Taq Polymerase und den Primern:

- vsv-cs-bio und
- rho a 1 (Nukleotidsequenz der aa₁₇₃₋₁₈₀ von RhoA als bindender Teil des Oligonukleotids an das Template/der aa₁₈₁₋₁₉₂ von RhoB/der aa₁₉₀₋₁₉₃ von RhoA/stop/der PstI-Schnittstelle)

Da beim ersten ´Annealing´ nur 23 der 84 Basen des Oligonukleotids rho a 1 binden konnten, denn nur für diese Basen (Nukleotidsequenz der aa₁₇₃₋₁₈₀ von RhoA) war ein Template vorhanden, erfolgte das erste ´Annealing´ bei 65°C. Beim zweiten ´Annealing´ konnten nach erfolgter Extension alle 84 Basen des Oligonukleotids rho a 1 binden, deshalb wurden ab dem 2. Zyklus ´Annealing´ und Extension bei einer Temperatur von 72°C ausgeführt. Das erhaltene PCR-Produkt war RhoABA₅. Nach der elektrophoretischen Kontrolle der PCR (Abbildung 2) schloß sich die Aufreinigung von RhoABA₅ an.



Abbildung 2 Elektrophoretische Kontrolle des PCR-Produkts RhoABA₅₋₁₉₃

- Spur 1 : pcr-Produkt von 633 bp bei Ansatz₁
- Spur 2 : pcr-Produkt von 633 bp bei Ansatz₂
- Spur 3 : Leerprobe

Im folgenden Schritt wurde die gereinigte RhoABA₅-DNA mit EcoRI und PstI über 1,5 h bei 37°C verdaut. Nach Hitzeinaktivierung der Enzyme über 10' bei 70°C wurde die geschnittene DNA über ein 1,1 %iges Agarosegel in 1 X TAE elektrophoretisch aufgereinigt und die DNA aus dem Agarosegel mittels Qiaquick Gel Extraction Kit extrahiert. Im Anschluß daran erfolgte die Ligation von RhoABA₅ (EcoRI/PstI geschnitten) und pUC19 (EcoRI/PstI geschnitten) mit T4 DNA Ligase über 1 h bei 16°C. Mit dem erhaltenen Ligationsprodukt wurden kompetente *E. coli*-Zellen (TG 1) transformiert und ausplattiert. Die Transformation von RhoABA₅ in pUC19 war erfolgreich. Von vier Klonen wurde ein fraktionierter Ausstrich gefertigt und nachfolgend das enthaltene Plasmid RhoABA₅ in pUC19 von Klon 1-4 mit dem Midi-Kit von Qiagen präpariert. Die DNA-Messung ergab:

Plasmid-DNA von	m _{DNA}	Konzentration
Klon 1	1,05 µg/µl	467 nM = 0,46 µM
Klon 2	1,50 µg/µl	668 nM = 0,67 µM
Klon 3	1,80 µg/µl	802 nM = 0,80 µM
Klon 4	2,10 µg/µl	935 nM = 0,93 µM

(pUC19/RhoABA₅ hat eine Größe von ca. 3400 bp, d. h. ein MW von 2,244 x 10⁶ g/l)

Die Plasmide wurden durch eine EcoRI/PstI-Restriktionsanalyse kontrolliert (Abbildung 3). Die Plasmide von Klon 2, 3 und 4 enthielten ein Fragment der entsprechenden Länge von 633 bp. Das Plasmid von Klon 1 enthielt

kein Insert.

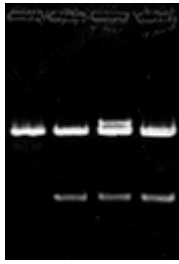


Abbildung 3 Elektrophoretische Kontrolle der EcoRI/PstI-Restriktionsanalyse der Plasmide pUC19/RhoABA₅₋₁₉₃ von Klon 1-4

- Spur 1 : Plasmid von Klon 1, kein Fragment enthalten
Spur 2 : Plasmid von Klon 2, Vektor (2800 bp) und
Fragment (633 bp) der erwarteten Länge
Spur 3 : Plasmid von Klon 3, Vektor (2800 bp) und
Fragment (633 bp) der erwarteten Länge
Spur 4 : Plasmid von Klon 4, Vektor (2800 bp) und
Fragment (633 bp) der erwarteten Länge

Dementsprechend erfolgte die Sequenzierung der Inserts der Plasmide von Klon 2, 3 und 4 mit dem „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit“ von Amersham, dem forward-Primer M 13(-20) F und dem reverse-Primer M 13(-24) R. Das 'Annealing' für die forward-Sequenzierung wurde bei 58°C ausgeführt und für die reverse-Sequenzierung bei 56°C. Die Sequenzierreaktion lief erfolgreich. Die folgenden Sequenzen waren lesbar.

Insert von Klon 3

- forward-Sequenzierung (Sequenz des kodierenden DNA-Strangs): die Sequenz beginnt im VSV-tag/ KpnI/RhoA aa₅₋₁₄₈
- reverse-Sequenzierung (Sequenz des Gegenstrangs, rückläufig gelesen): die Sequenz beginnt in pUC19/PstI/stop/RhoA aa₁₉₃₋₁₉₀/RhoB aa₁₉₂₋₁₈₁/RhoA aa₁₈₀₋₄₀

Insert von Klon 4

- forward-Sequenzierung: bei der aa₁₈ von RhoA fand sich eine Änderung des Codes von AAG zu AGG, d.h. Lysin anstelle von Arginin
- reverse-Sequenzierung: die Sequenz des Gegenstrangs, die bis zur aa₄₅ von RhoA gelesen werden konnte, war korrekt

Bei Klon 3 entsprach die Sequenz der erwarteten Sequenz für das Konstrukt RhoABA₅. Die Sequenz des Inserts von Klon 4 enthielt an Position 18 im Gen von RhoA eine veränderte Aminosäure. Die Sequenz von Klon 2 war kaum lesbar. Mit dem Plasmid von Klon 3 — RhoABA₅ in pUC19 — wurde weitergearbeitet. Die letzte Veränderung, der Einbau der fehlenden ersten vier Aminosäuren von RhoA in das Konstrukt, war erst nach der Herstellung von VSV/RhoA₁₋₁₉₃ in pKC3 möglich (s. Konstrukt RhoACC). Es erfolgte eine Restriktion von RhoABA₅/pUC19 mit Eco32I und PstI, wobei das erhaltene Fragment (RhoABA₄₅₋₁₉₆, Eco32I/PstI geschnitten) eluiert wurde. Des Weiteren wurde ein Eco32I/PstI-Restriktionsverdau von VSV/RhoA₁₋₁₉₃ in pKC3 durchgeführt und der Vektor (pKC3/EcoRI/VSV/KpnI/RhoA₁₋₄₅, Eco32I/PstI geschnitten) dephosphoryliert und eluiert. Die anschließende Ligation von Fragment und Vektor ergab RhoABA in pKC3. Kompetente *E. coli*-Zellen wurden transformiert, vier Klone pKC3/RhoABA subkloniert und die Plasmide präpariert. Eine erste Kontrolle der Plasmide durch Restriktion mit EcoRI und PstI (Abbildung 4) ergab, daß nur das Plasmid von Klon 1 das Fragment RhoABA mit einer Länge von 645 bp enthielt. Die Plasmide von Klon 2-4 enthielten ein etwa 1000 bp-Fragment unklarer Herkunft.

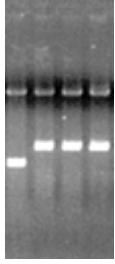


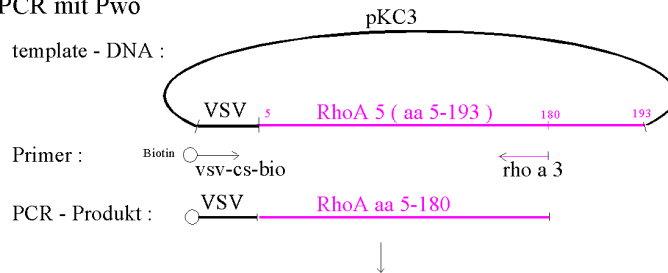
Abbildung 4 Elektrophoretische Kontrolle der EcoRI/PstI-Restriktionsanalyse der Plasmide pKC3/RhoABA₁₋₁₉₃

- Spur 1 : Plasmid von Klon 1, Vektor (3500 bp) und Fragment (645 bp) der erwarteten Länge
- Spur 2 : Plasmid von Klon 2, Vektorgröße ist korrekt, 1000 bp-Fragment unklarer Herkunft
- Spur 3 : Plasmid von Klon 3, Vektorgröße ist korrekt, 1000 bp-Fragment unklarer Herkunft
- Spur 4 : Plasmid von Klon 4, Vektorgröße ist korrekt, 1000 bp-Fragment unklarer Herkunft

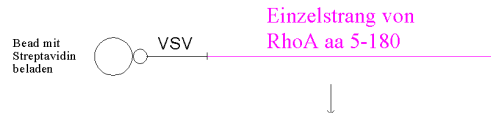
Eine zweite Kontrolle der Plasmid-DNA von Klon 1 war ebenfalls positiv. Eine PCR mit den Oligonukleotiden 1 (vsv-cs-bio) und 2 (rho a 1) und der Plasmid-DNA von Klon 1 als Template führte zu einem PCR-Produkt der erwarteten Länge von 645 bp. Nach erfolgter Umklonierung des Fragments von Klon 1 in pUC19 wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Die Auswertung dieses Sequenziergels bestätigte die Sequenz des hergestellten Konstrukts. Das Konstrukt RhoABA begann mit der ersten Aminosäure von RhoA. (Sequenz s. unter Sequenzüberprüfung von RhoABA)

Herstellung des Konstrukts RhoABA

1. PCR mit Pwo



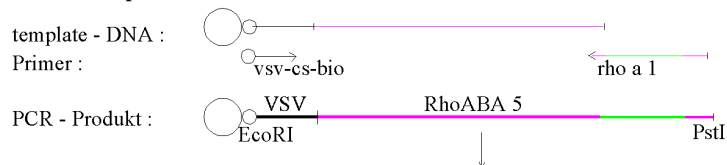
2. Bindung an Dynabeads und Denaturierung der gebundenen DNA



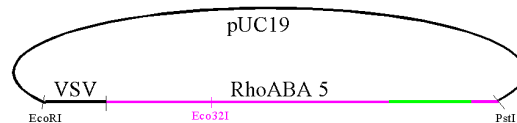
3. Extension mit Oligonukleotid rho a 1 und Pwo : nicht erfolgreich

4. PCR mit Pwo : nicht erfolgreich

5. PCR mit Taq

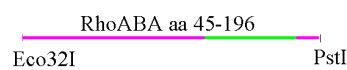


6. EcoRI / PstI - Restriktion und Klonierung in pUC19

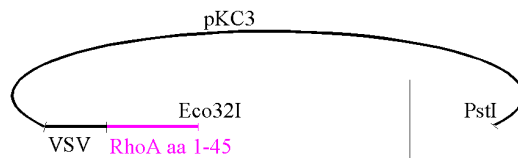


7. Sequenzierung von RhoABA 5

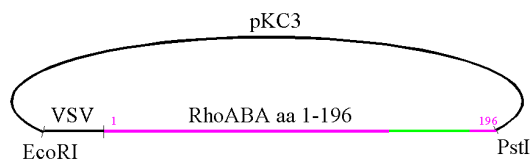
8. Eco32I / PstI - Restriktion von RhoABA 5



und VSV / RhoA in pKC3



9. Ligation zu RhoABA in pKC3



10. Klonierung von RhoABA in pUC19

11. Sequenzierung des Konstrukts RhoABA

3.1.2 Konstrukt RhoACC

Die zweite hergestellte Mutante, RhoACC, enthält anstelle der Aminosäuren 181-189 und der CAAX-Box (aa 190-193) von RhoA die entsprechenden Aminosäuren (aa 181-193) von RhoC.

Das **Konstrukt RhoACC** setzt sich zusammen aus:



1. einer Schnittstelle für EcoRI
2. der Sequenz für VSV (VSV-tag genannt)
3. einer Schnittstelle für KpnI
4. den aa 1-180 von RhoA (magenta)
5. den aa 181-193 von RhoC (blau)
6. dem Stop-Codon TGA
7. einer Schnittstelle für PstI

Zur Herstellung von RhoACC (s. begleitend zum Text die Übersicht am Ende des Kapitels) wurde von der Plasmid-DNA pUC19 mit dem Insert EcoRI/NotI/VSV/KpnI/RhoA₅/PstI ausgegangen. Weiterhin wurden die im Gen von RhoA₅₋₁₉₃ nur einfach vorhandenen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Fnu4HI und Eco32I genutzt.

Als erster Schritt erfolgte ein Restriktionsverdau der Plasmid-DNA mit den beiden Endonukleasen NotI und PstI. Die beiden erhaltenen DNA-Fragmente, das Insert NotI/VSV/KpnI/RhoA₅/PstI und der NotI/PstI geschnittene Vektor pUC19, wurden eluiert. Der Vektor wurde zusätzlich dephosphoryliert. Es wurden insgesamt 5 µg von NotI/VSV/KpnI/RhoA₅/PstI eluiert, da eine weitere Restriktion im Gen von RhoA mit dem Enzym Fnu4HI folgte (Abbildung 5). Das entstandene Fragment NotI/VSV/KpnI/RhoA₅₋₁₇₇/Fnu4HI wurde nach Aufreinigung in einer Gesamtmenge von 1,3 µg eluiert.

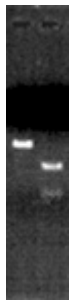


Abbildung 5 Elektrophoretische Kontrolle der Restriktionsbehandlung von NotI/VSV/KpnI/RhoA₅₋₁₉₃/PstI mit Fnu4HI

- Spur 1 : Fragment NotI/VSV/KpnI/RhoA₅₋₁₉₃/PstI ungeschnitten (624 bp)
Spur 2 : Restriktion des Fragments NotI/VSV/KpnI/RhoA₅₋₁₉₃/PstI mit Fnu4HI führt zu zwei Fragmenten mit einer Größe von 567 bp und 57 bp

Der nächste Schritt bestand in der Hybridisierung der beiden Oligonukleotide c und c-rev (s. Tabelle 2 **Verwendete Oligonukleotide**). Das entstandene Hybridisierungsprodukt war von den offenen Schnittstellen für Fnu4HI und PstI begrenzt, da die Oligonukleotidsequenzen von c und c-rev der Fnu4HI/PstI offenen Sequenz entsprachen. Es bildete den C-terminalen DNA-Abschnitt des Konstrukts RhoACC mit der Nukleotidsequenz von Fnu4HI/den aa₁₇₇₋₁₈₀ von RhoA/den aa₁₈₁₋₁₉₃ von RhoC/stop/von PstI. Anschließend erfolgte die Ligation dreier DNA-Fragmente, s. auch Übersicht am Ende des Kapitels:

1. des dephosphorylierten, NotI/PstI geschnittenen Vektors pUC19
2. des Fragments NotI/VSV/KpnI/RhoA₅₋₁₇₇/Fnu4HI und
3. des Hybridisierungsproduktes Fnu4HI/RhoA₁₇₇₋₁₈₀/RhoC₁₈₁₋₁₉₃/stop/PstI.

Aus diesen drei Fragmenten entstand das Ligationsprodukt RhoACC₅ in pUC19. Die Ligation wurde mit T4 DNA Ligase von Fermentas unter Zusatz von PEG bei 16°C o/n durchgeführt (s. Ligation von DNA-Fragmenten). Für die Ligation wurden der Vektor und die beiden Fragmente in verschiedenen Molaritätsverhältnissen zueinander eingesetzt, von 10 : 1 bis 1 : 10. Die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen mit den verschiedenen Ligationsansätzen ergab, daß bei korrekten Positiv- und Negativkontrollen für die Ligationsreaktion und die LB/Ampicillin-Agarplatten nur auf Platte A (Molaritätsverhältnis Vektor zu Fragment 10 : 1) zwei Klone und auf Platte D (Molaritätsverhältnis Vektor zu Fragment 1 : 2) vier Klone gewachsen waren. Diese sechs Klone A 1-2 und D 1 - 4 wurden fraktioniert ausgestrichen. Nach erfolgter Plasmidpräparation wurde durch eine NotI/PstI-Restriktionsanalyse der Plasmide festgestellt (Abbildung 6), daß bei Klon A 1 genomische DNA von TG 1 präpariert wurde, die Plasmid-DNA bei A 2 die Vektorlänge von pUC19 hatte, jedoch das NotI/PstI-Insert länger als erwartet war. Bei den Plasmiden von D 1 - 4 führte die Restriktion zu Vektor und Fragment der erwarteten Länge.

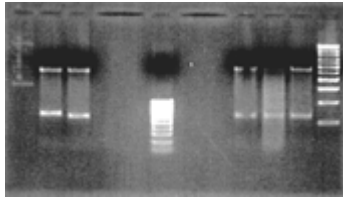


Abbildung 6 Elektrophoretische Kontrolle der NotI/PstI-Restriktionsanalyse der Plasmide pUC19/RhoACC₅₋₁₉₃ von Klon A 1 - 2 und Klon D 1 - 4

- Spur 1 : genomische DNA von Klon A 1
- Spur 2 : Plasmid von A 2, Vektorlänge ist korrekt (2800 bp), aber Fragment (ca. 700 bp) ist größer als erwartet
- Spur 3 : Plasmid von D 1, Vektor (2800 bp) und Fragment (624 bp) der erwarteten Länge
- Spur 4 : 100 bp-DNA-Längenmarker
- Spur 5 : Plasmid von D 2, Vektor und Fragment korrekter Länge
- Spur 6 : Plasmid von D 3, Vektor und Fragment korrekter Länge
- Spur 7 : Plasmid von D 4, Vektor und Fragment korrekter Länge
- Spur 8 : 1 kb-DNA-Längenmarker

Zur weiteren Kontrolle der NotI/PstI-Fragmente von A 2 und D 1 - 4, insbesondere zur Überprüfung der Übergänge an der Fnu4HI-Schnittstelle, wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Bei der Auswertung stellte sich heraus, daß das Fragment von A 2 ein zusätzliches, beidseitig Fnu4HI geschnittenes Insert enthielt zwischen dem RhoA-Fragment und dem Hybridisierungsprodukt. Dies erklärte die größere Länge des NotI/PstI-Inserts von A 2. Die Inserts von D 1 - 4 entsprachen der erwarteten Sequenz des Konstrukts RhoACC. Das Plasmid D 2 wurde für die Weiterarbeit ausgewählt.

Um das vollständige Konstrukt RhoACC (beginnend mit der ersten Aminosäure von RhoA) zu erhalten, wurde wie folgt vorgegangen. Im Labor war in der Zwischenzeit KpnI/RhoA₁₋₁₉₃/PstI in pKC3 hergestellt worden. Somit lag die komplette RhoA-Sequenz in pKC3 vor. Allerdings war der Sequenz nicht das VSV-tag vorangestellt. Über einen KpnI/PstI-Restriktionsverdau der Plasmide RhoA in pKC3 und VSV/RhoA₅ in pKC3 und eine anschließende Ligation von pKC3/VSV und RhoA₁₋₁₉₃ entstand VSV/RhoA₁₋₁₉₃ in pKC3. Über einen erneuten Restriktionsverdau von RhoACC₅ in pUC19 mit EcoRI und Eco32I entstand Eco32I/RhoACC₄₅₋₁₉₃/pUC19/EcoRI. Ebenso wurde VSV/RhoA in pKC3 geschnitten und das Fragment EcoRI/VSV/KpnI/RhoA₁₋₄₅/Eco32I eluiert (Abbildung 7).

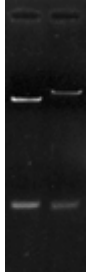


Abbildung 7 Elektrophoretische Kontrolle der EcoRI/Eco32I-Restriktionsanalyse der Plasmide pUC19/RhoACC₅₋₁₉₃ und pKC3/RhoA₁₋₁₉₃

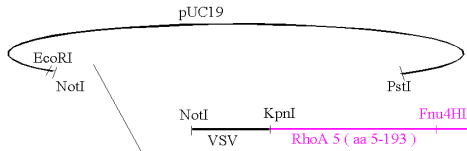
- Spur 1 : Restriktion des Plasmids pUC19/RhoACC₅₋₁₉₃ führt zu einem Fragment von 171 bp und einem Vektor von ca. 3300 bp
- Spur 2 : Restriktion des Plasmids pKC3/RhoA₁₋₁₉₃ führt zu einem Fragment von 183 bp und einem Vektor von ca. 4000 bp

Die beiden DNA-Fragmente Eco32I/RhoACC₄₅₋₁₉₃/pUC19/EcoRI (3300 bp) und EcoRI/VSV/KpnI/RhoA₁₋₄₅/Eco32I (183 bp) wurden zu EcoRI/VSV/KpnI/RhoACC/PstI in pUC19 ligiert und in *E. coli*-Zellen kloniert. Das Plasmid pUC19/RhoACC wurde mittels Restriktion kontrolliert und das Insert RhoACC über eine PCR sowie eine anschließende Sequenzierung bestätigt. (Sequenz s. unter Sequenzüberprüfung von RhoACC). In einem letzten Schritt wurde die Mutante VSV/RhoACC unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen EcoRI und PstI in den Vektor pKC3 umklont.

Herstellung des Konstrukts RhoACC

1. Restriktionsverdau mit NotI und PstI

Ausgangsmaterial : pUC19 + EcoRI/NotI/VSV/RhoA 5/PstI

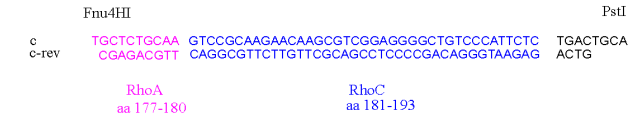


2. Restriktion des DNA-Fragments

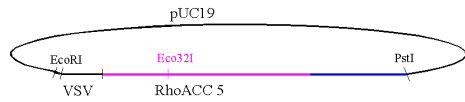
NotI/VSV/RhoA 5/PstI mit Fnu4HI



3. Hybridisierung der beiden Oligonukleotide c und c-rev



4. Ligation zu RhoACC 5



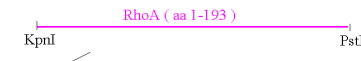
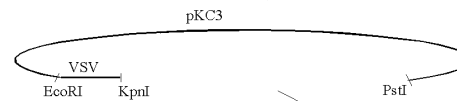
5. Sequenzierung



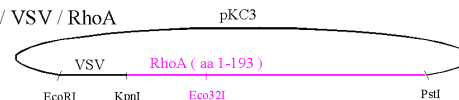
6. KpnI / PstI Restriktionsverdau von

a) pKC3 / VSV / RhoA 5 (aa 5-193)

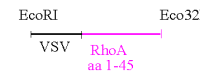
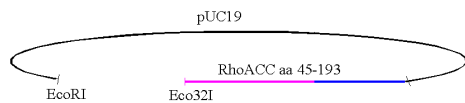
und b) pKC3 / KpnI / RhoA (aa 1-193) / PstI



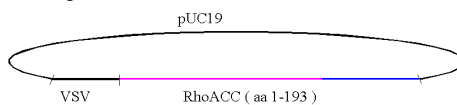
7. Ligation zu pKC3 / VSV / RhoA



8. Restriktion mit EcoRI und Eco32I



9. Ligation zu RhoACC



10. Sequenzierung

11. Klonierung von RhoACC in pKC3

3.1.3 Konstrukte RhoAd, RhoC, RhoCd, RhoABB, RhoABd, RhoACA, RhoACd

Ausgehend von der im Labor vorhandenen Plasmid-DNA und der hergestellten DNA für die Konstrukte RhoABA und RhoACC konnten die CAAX-Deletionsmutanten RhoAd und RhoCd sowie die Konstrukte RhoC, RhoABB, RhoABd, RhoACA und RhoACd hergestellt werden.

Die bereits für RhoC vorliegende DNA (KpnI/NotI/VSV/EcoRI/RhoC/BamHI/XbaI/SalI/PstI in pUC19) wurde nur entsprechend der Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen verändert, damit die Konstrukte einen einheitlichen Aufbau erhielten.

Die **Konstrukte** setzen sich zusammen aus:

1. einer Schnittstelle für EcoRI
2. der Sequenz für VSV (VSV-tag genannt)
3. einer Schnittstelle für KpnI
4. den entsprechenden aa, s. u.
5. dem Stop-Codon TGA
6. einer Schnittstelle für PstI

RhoAd = RhoA₁₋₁₈₉ (magenta)



RhoC = RhoC₁₋₁₉₃ (blau)



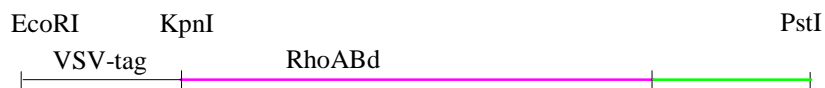
RhoCd = RhoC₁₋₁₈₉ (blau)



RhoABB = RhoA₁₋₁₈₀ (magenta) / RhoB₁₈₁₋₁₉₆ (grün)



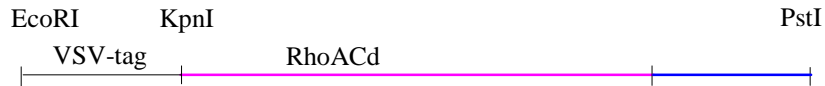
RhoABd = RhoA₁₋₁₈₀ (magenta) / RhoB₁₈₁₋₁₉₂ (grün)



RhoACA = RhoA₁₋₁₈₀ (magenta) /RhoC₁₈₁₋₁₈₉ (blau) /RhoA₁₉₀₋₁₉₃ (magenta)



RhoACd = RhoA₁₋₁₈₀ (magenta) /RhoC₁₈₁₋₁₈₉ (blau)



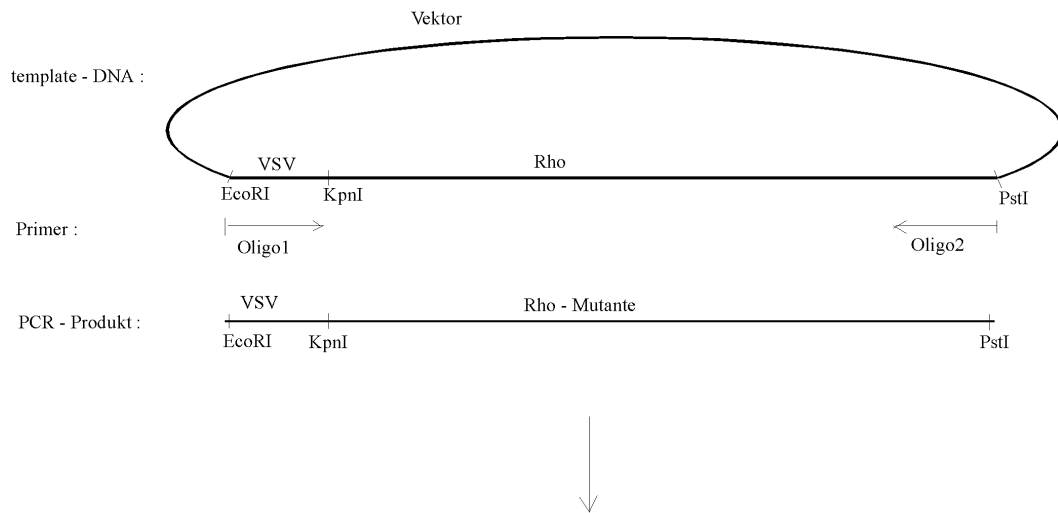
Für die Herstellung der neuen Konstrukte (s. auch Übersicht am Ende des Kapitels) wurde jeweils eine PCR über 15 Zyklen mit Pwo als DNA Polymerase bei einer 'Annealing'-Temperatur von 65°C durchgeführt. Folgende Oligonukleotide (s. Tabelle 2 **Verwendete Oligonukleotide**) und Templates kamen dabei zum Einsatz:

Konstrukt	Größe	template-DNA	Oligonukleotid 1 5'-3'	Oligonukleotid 2 3'-5'
RhoAd	624 bp	VSV/RhoA	vsv-cs-bio	rhoadrev
RhoC	639 bp	VSV/RhoC _{alt}	vsvrhoc	rhocecv
RhoCd	627 bp	VSV/RhoC _{alt}	vsvrhoc	rhoacdev
RhoABB	645 bp	VSV/RhoABA	vsv-cs-bio	rhoabrev
RhoABd	633 bp	VSV/RhoABA	vsv-cs-bio	rhobdrev
RhoACA	636 bp	VSV/RhoACC	vsv-cs-bio	rhoacarev
RhoACd	624 bp	VSV/RhoACC	vsv-cs-bio	rhoacdev

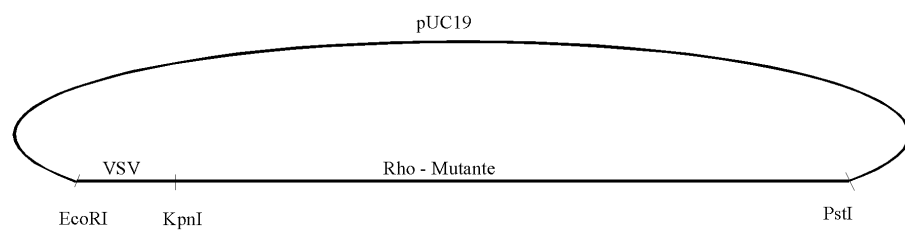
Die PCR's wurden anhand einer Elektrophorese überprüft. Die entstandenen PCR-Produkte wurden nach Aufreinigung mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und PstI geschnitten und anschließend in den Vektor pUC19 ligiert. Nach erfolgter Klonierung wurden die Plasmide präpariert und mittels Restriktionsanalyse und PCR kontrolliert. Die im Anschluß durchgeführte Sequenzierung bestätigte die erwartete Sequenz für die Mutanten RhoAd, RhoC, RhoCd, RhoABB, RhoABd, RhoACA und RhoACd. (Sequenzen s. unter Sequenzüberprüfung der hergestellten Rho-Konstrukte) Als letzter Schritt erfolgte die Klonierung der Konstrukte RhoAd, RhoC, RhoCd, RhoABB, RhoABd, RhoACA und RhoACd in pKC3 unter Verwendung der EcoRI/PstI-Restriktionsschnittstellen.

Zusammenfassende Darstellung über die Herstellung der Konstrukte RhoAd, RhoC, RhoCd, RhoABB, RhoABd, RhoACA und RhoACd

1. PCR mit Pwo



2. Restriktion mit EcoRI und PstI, Klonierung in pUC19



3. Sequenzierung

4. Klonierung der Mutanten in pKC3

3.1.4 Konstrukt RhoBd

Für RhoB wurde ebenfalls eine CAAX-Deletionsmutante hergestellt, allerdings mit der Besonderheit, daß der Triplet-Code der Aminosäure 180 von RhoB verändert wurde, ohne die Aminosäure 180 zu ändern. Die Veränderung wurde vorgenommen, um die an dieser Stelle im Gen von RhoB befindliche PstI-Schnittstelle zu eliminieren.

Das **Konstrukt RhoBd** setzt sich zusammen aus:



1. einer Schnittstelle für EcoRI
2. der Sequenz für VSV (VSV-tag genannt)
3. einer Schnittstelle für KpnI
4. den aa 1-192 von RhoB (grün), dabei Veränderung der Nukleotidsequenz für die aa 180 von CAG zu CAA ohne Änderung der Aminosäure Glutamin an Position 180
5. dem Stop-Codon TGA
6. einer Schnittstelle für PstI

Zur Herstellung von RhoBd (s. begleitend zum Text auch die Übersicht am Ende des Kapitels) wurde von VSV/RhoB in pUC19 ausgegangen. Es wurde eine Einfachrestriktion mit PstI durchgeführt, die zu den beiden DNA-Fragmenten PstI/pUC19/EcoRI/VSV/KpnI/RhoB₁₋₁₈₀/PstI und PstI/RhoB₁₈₀₋₁₉₆/PstI führte. Im Anschluß an eine Dephosphorylierung wurde PstI/pUC19/EcoRI/VSV/KpnI/RhoB₁₋₁₈₀/PstI eluiert.

Zur Vervollständigung des Konstrukts mußten die restlichen Nukleotide, die für die Aminosäuren 180-192 kodieren, wieder hinzugefügt werden und dabei die intragenische PstI-Schnittstelle entfernt werden. Dies erfolgte durch die Hybridisierung der beiden Oligonukleotide rhobd und rhobd.rev (s. Tabelle 2 **Verwendete Oligonukleotide**). Das entstandene Hybridisierungsprodukt war beidseitig durch offene PstI-Schnittstellen begrenzt und veränderte die Nukleotidsequenz der aa₁₈₀ von RhoB von CAG (Glutamin) zu CAA (Glutamin). Die intragenische Nukleotidfolge CTGCAG (PstI-Restriktionsschnittstelle) wurde dadurch zu CTGCAA umgewandelt, einer Sequenz, an der das Enzym PstI nicht mehr schneidet.

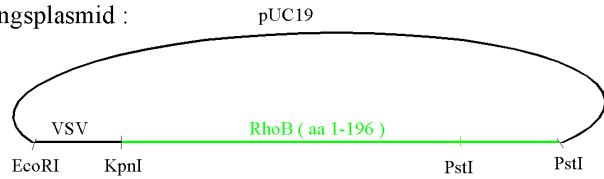
Die Ligation von PstI/pUC19/VSV/RhoB₁₋₁₈₀/PstI mit dem Hybridisierungsprodukt PstI/RhoB₁₈₀₋₁₉₂/PstI führte zu VSV/RhoBd. Im Anschluß an die Ligation erfolgte die Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen. Es wurden acht Klone subkloniert und die enthaltenen Plasmide präpariert. Nach Aufreinigung der Plasmid-DNA's mittels Phenol/Chloroform-Extraktion erfolgte eine reverse-Sequenzierung der Inserts, um die Veränderung am C-terminalen Ende von RhoBd zu verifizieren. Die Sequenzierung führte zu dem Ergebnis, daß vier der acht Plasmide nicht das Hybridisierungsprodukt enthielten, dementsprechend einfach geschnittene, nicht dephosphorylierte Religationsplasmide von VSV/RhoBd₁₋₁₈₀ in pUC19 waren. Bei einem Plasmid war das Hybridisierungsprodukt PstI/RhoB₁₈₀₋₁₉₂/PstI mehrfach hintereinander in PstI/pUC19/VSV/RhoB₁₋₁₈₀/PstI hineinligiert worden. Ein Plasmid enthielt das Hybridisierungsprodukt in falscher Orientierung. Zwei Plasmide enthielten das Hybridisierungsprodukt richtig orientiert, allerdings fehlten bei einem dieser beiden Plasmide vier Nukleotide in dem Molekülabschnitt, der aus den hybridisierten Oligonukleotiden entstanden ist. Das andere Plasmid enthielt die erwartete Sequenz. (Sequenz s. unter Sequenzüberprüfung von RhoBd)

Zur Bestätigung der in Sequenzierreaktionen allgemein schwierig zu lesenden Sequenz GCGCGC (Bandenkompensation) wurde eine zusätzliche Restriktionsanalyse mit dem für diese Nukleotidfolge spezifischen Enzym PstI durchgeführt. Dies war möglich, da die PstI-Schnittstelle in pUC19 nicht vorhanden ist und in RhoB nur einmal vorkommt.

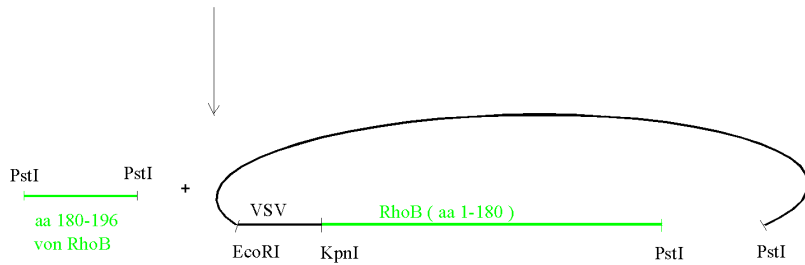
Abschließend erfolgte die Klonierung der CAAX-Deletionsmutante RhoBd in pKC3 unter Verwendung der EcoRI/PstI-Restriktionsschnittstellen.

Herstellung des Konstrukts RhoBd

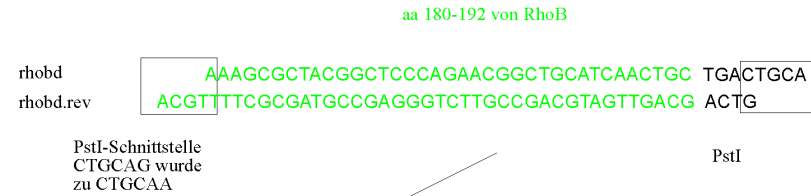
Ausgangsplasmid :



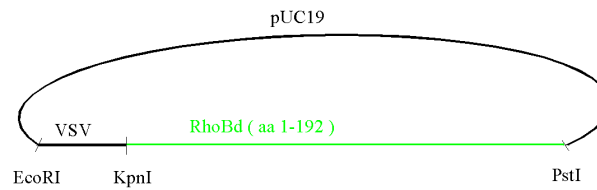
1. Restriktion mit PstI und Dephosphorylierung



2. Hybridisierung der beiden Oligonukleotide rhobd und rhobd.rev



3. Ligation zu RhoBd



4. Sequenzierung

5. Klonierung von RhoBd in pKC3

3.1.5 Konstrukt RhoA 140

Bei diesem Konstrukt wurden einzelne Aminosäuren von RhoA verändert. Die Aminosäuren 140 (Lysin) und 141 (Prolin) von RhoA wurden durch die Aminosäuren 140 (Arginin) und 141 (Serin) von RhoC ersetzt. Der Austausch dieser Aminosäuren erfolgte, da sich RhoA und RhoC an beiden Positionen durch nicht konservative Aminosäuren unterscheiden.

Das **Konstrukt RhoA 140** setzt sich zusammen aus:



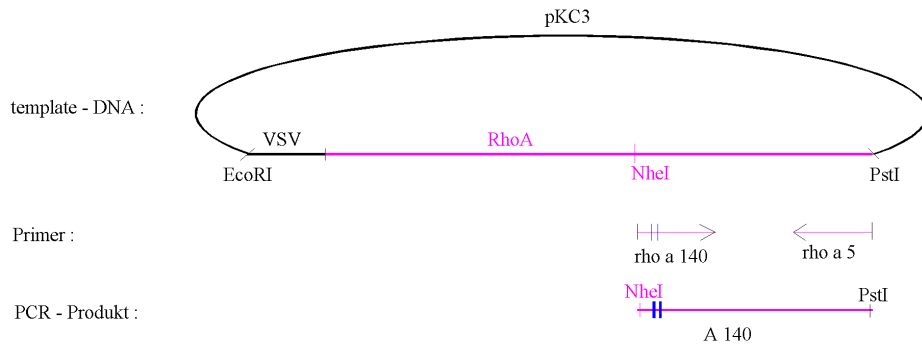
1. einer Schnittstelle für EcoRI
2. der Sequenz für VSV (VSV-tag genannt)
3. einer Schnittstelle für KpnI
4. den aa 1-139 von RhoA (magenta)
5. den aa 140-141 von RhoC (blau)
6. den aa 142-193 von RhoA (magenta)
7. dem Stop-Codon TGA
8. einer Schnittstelle für PstI

Der erste Schritt für die Herstellung von RhoA 140 (s. begleitend zum Text auch die Übersicht am Ende des Kapitels) bestand in einer PCR, wiederum über 15 Zyklen, Pwo als DNA Polymerase und einer 'Annealing'-Temperatur von 65°C. Als Oligonukleotide dienten rhoa 140 und rho a 5 (s. Tabelle 2 **Verwendete Oligonukleotide**) und als template-DNA wurde VSV/RhoA in pKC3 eingesetzt. Das PCR-Produkt A 140 (Nukleotidsequenz der aa₁₂₇₋₁₃₉ von RhoA/der aa₁₄₀₋₁₄₁ von RhoC/der aa₁₄₂₋₁₉₃ von RhoA/stop/von PstI) wurde mit den Restriktionsendonukleasen NheI und PstI geschnitten. Ebenfalls erfolgte eine Restriktionsbehandlung von VSV/RhoAd in pUC19 mit NheI (im Gen von RhoA kommt diese Schnittstelle nur einmal an der Aminosäureposition 128 vor) und PstI, um den Vektor pUC19/VSV/RhoA₁₋₁₂₈ (NheI/PstI geschnitten) zu erhalten. Es schloß sich die Ligation des Vektors mit A 140 zum Ligationsprodukt RhoA 140 in pUC19 an. Nach Klonierung und Plasmidpräparation wurden die Plasmide pUC19/RhoA 140 mittels EcoRI/PstI-Restriktion kontrolliert und anschließend das Insert VSV/RhoA 140 über eine Sequenzierung bestätigt. (Sequenz s. unter Sequenzüberprüfung von RhoA 140)

Das sequenzierte Konstrukt VSV/RhoA 140 wurde abschließend in den Vektor pKC3 unter Verwendung der EcoRI/PstI-Restriktionsschnittstellen umklontiert.

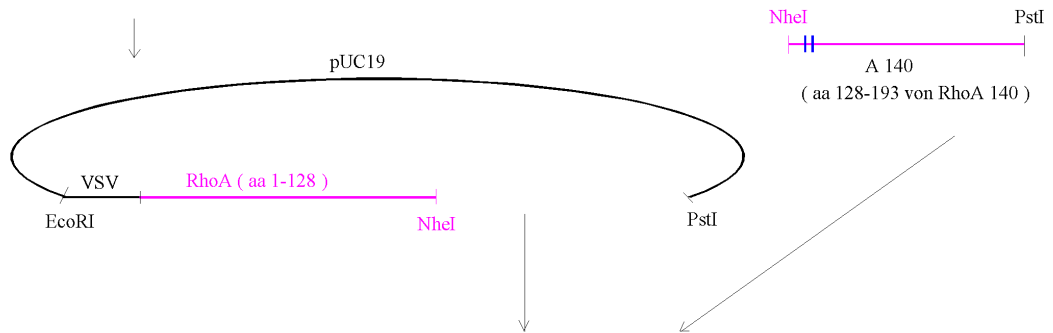
Herstellung des Konstrukts RhoA 140

1. PCR mit Pwo

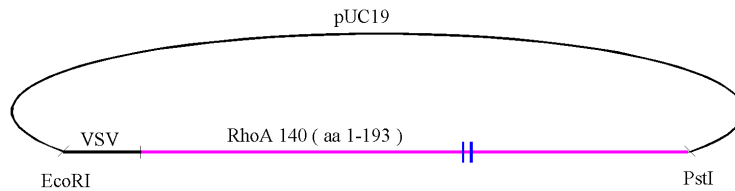


2. Restriktion mit NheI und PstI von A 140

und pUC19 / RhoAD



3. Ligation zu RhoA 140 in pUC19



4. Sequenzierung

5. Klonierung von RhoA 140 in pKC3

3.1.6 Konstrukte RhoA 183, RhoA 186, RhoA 188

RhoA und RhoC zeigen auf Primärstrukturebene eine 93 %ige Homologie in ihrem Aufbau. Im Gegensatz dazu beträgt die Übereinstimmung bezogen auf den Bereich der Aminosäuren 181-189 beider Isoformen nur 33 %. Bei dem Konstrukt RhoACA sind die Aminosäuren 181-189 von RhoA durch die Aminosäuren 181-189 von RhoC ersetzt worden. Bei den nachfolgend beschriebenen Konstrukten wurden nun einzelne Aminosäuren dieses Molekülabschnitts von RhoA gegen die entsprechenden Aminosäuren von RhoC ausgetauscht. Der Austausch erfolgte an den Positionen, an denen sich RhoA und RhoC durch nicht konservative Aminosäuren unterscheiden. Die **Konstrukte** setzen sich zusammen aus:

1. einer Schnittstelle für EcoRI
2. der Sequenz für VSV (VSV-tag genannt)
3. einer Schnittstelle für KpnI
4. den aa 1-193 von RhoA mit Austausch einzelner aa von RhoA gegen die von RhoC, s. u.
5. dem Stop-Codon TGA
6. einer Schnittstelle für PstI

Konstrukt RhoA 183 = RhoA₁₋₁₈₂ (magenta) /RhoC₁₈₃ (blau) /RhoA₁₈₄₋₁₉₃ (magenta);
aa₁₈₃ von RhoA (Arginin) durch Lysin ersetzt



Konstrukt RhoA 186 = RhoA₁₋₁₈₅ (magenta) /RhoC₁₈₆₋₁₈₇ (blau) /RhoA₁₈₈₋₁₉₃ (magenta);
aa₁₈₆₋₁₈₇ von RhoA (Lysin - Lysin) durch Arginin - Arginin ersetzt



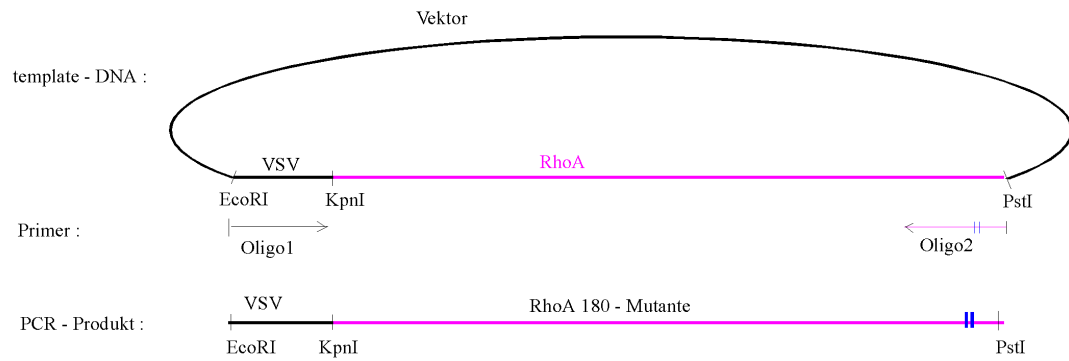
Konstrukt RhoA 188 = RhoA₁₋₁₈₇ (magenta) /RhoC₁₈₈ (blau) /RhoA₁₈₉₋₁₉₃ (magenta);
aa₁₈₈ von RhoA (Serin) durch Arginin ersetzt



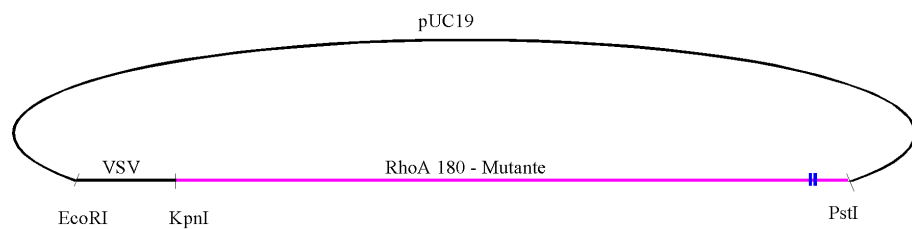
Diese drei Konstrukte wurden jeweils über eine PCR, deren Template VSV/RhoA in pKC3 war, hergestellt. (s. begleitend zum Text auch die Übersicht am Ende des Kapitels) Als Oligonukleotid 1 wurde vsv-cs-bio eingesetzt und als Oligonukleotid 2 entweder rhoa 183 oder rhoa 186 oder rhoa 188, s. Tabelle 2 **Verwendete Oligonukleotide**. Die PCR-Produkte wurden gereinigt, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und PstI geschnitten und in pUC19 kloniert. Anschließend wurden die Inserts RhoA 183, RhoA 186 und RhoA 188 durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung bestätigt. (Sequenzen s. unter Sequenzüberprüfung der hergestellten Rho-Konstrukte) Die Klonierung der Rho-Mutanten RhoA 183, RhoA 186 und RhoA 188 in den Vektor pKC3 unter Verwendung der EcoRI/PstI-Restriktionsschnittstellen stellte den letzten Schritt dar.

Zusammenfassende Darstellung über die Herstellung der Konstrukte RhoA 183, RhoA 186 und RhoA 188

1. PCR mit Pwo



2. Restriktion mit EcoRI und PstI, Klonierung in pUC19



3. Sequenzierung

4. Klonierung der Mutanten in pKC3

3.2 Sequenzüberprüfung der hergestellten Rho-Konstrukte

3.2.1 Sequenzüberprüfung von RhoAd

- vsvrhead = vollständige DNA-Sequenz des Konstrukts RhoAd, Basen der Nukleotide 1 bis 624
 - Basen der Nukleotidsequenz der Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen: *kursiv*
 - Basen der Nukleotidsequenz des VSV-tag sowie des Stop-Codon: schwarz
 - Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoA: magenta
- ad3f = forward-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts, 390 Basen gelesen
- ad3r = komplementärer Gegenstrang der 429 gelesenen Basen der reverse-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts
 - Basen der Nukleotidsequenz von pUC19: grau
 - Basen der Nukleotidsequenz des Primers: violett

60

ad3f
AATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCATGGCTGCCATC 59
vsvrhead
GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCATGGCTGCCATC 60

120

ad3f
CGGAAGAAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC 119
vsvrhead
CGGAAGAAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC 120

180

ad3f
TTCAGCAAGGACCAGTTCCCAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTATGTGGCA 179
vsvrhead
TTCAGCAAGGACCAGTTCCCAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTATGTGGCA 180

240

ad3f
GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA 239
ad3r
TGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA 23
vsvrhead
GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA 240

300

ad3f
GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT 299
ad3r
GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT 83
vsvrhead
GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT 300

360

ad3f
TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG 359
ad3r
TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG 142
vsvrhoad
TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG 360

420

ad3f
CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGG 390
ad3r
CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT 202
vsvrhoad
CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT 420

480

ad3r
GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC 262
vsvrhoad
GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC 480

540

ad3r
AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAA 322
vsvrhoad
AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAA 540

600

ad3r
GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGCTAGACGTGGG 382
vsvrhoad
GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGCTAGACGTGGG 600

660

ad3r
AAGAAAAAATCTGGTTGACTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCAT 429
vsvrhoad
AAGAAAAAATCTGGTTGACTGCAG 624

3.2.2 Sequenzüberprüfung von RhoBd

- vsvrhobd = vollständige DNA-Sequenz des Konstrukts RhoBd, Basen der Nukleotide 1 bis 633

Basen der Nukleotidsequenz der Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen: *kursiv*

Basen der Nukleotidsequenz des VSV-tag sowie des Stop-Codon: schwarz

Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoB: grün, aa 180

- bdlf = forward-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts, 344 Basen gelesen

- bdlr = komplementärer Gegenstrang der 352 gelesenen Basen der reverse-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts

Basen der Nukleotidsequenz von pUC19: grau

Basen der Nukleotidsequenz des Primers: violett

60

bdlf

AATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCATGGCGGCCATC 59

vsvrhobd

GAATTCCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGT**ACCATGGCGGCCATC** 60

120

bdlf

CGCAAGAAGCTGGTGGTGGTGGGCGACGGCGCGTGTGGCAAGACGTGCCTGCTGATCGTG 119

vsvrhobd

CGCAAGAAGCTGGTGGTGGTGGGCGACGGCGCGTGTGGCAAGACGTGCCTGCTGATCGTG 120

180

bdlf

TTCAGTAAGGACGAGTTCCCCGATGTGTACGTGCCACCGTCTTCGAGAACTATGTGGCC 179

vsvrhobd

TTCAGTAAGGACGAGTTCCCCGAGGTGTACGTGCCACCGTCTTCGAGAACTATGTGGCC 180

240

bdlf

GACATTGAGGTGGACGGCAAGCAGGTGGAGCTGGCGCTGTGGGACACGGCGGGCCAGGAG 239

vsvrhobd

GACATTGAGGTGGACGGCAAGCAGGTGGAGCTGGCGCTGTGGGACACGGCGGGCCAGGAG 240

300

bdlf

GACTACGACCGCCTGCGGCCGCTCTCCTACCCGGACACCGACGTCATTCTCATGTGCTTC 299

vsvrhobd

GACTACGACCGCCTGCGGCCGCTCTCCTACCCGGACACCGACGTCATTCTCATGTGCTTC 300

360

bdlf

TCGGTGGACAGCCCGACTCGCTGGAGAACATCCCCGAGAAGTGG 344

bdlr

GGTGGACAGCCCGGACTCGCTGGAGAACATCCCCGAGAAGTGGGTCCCCGAGGTGAAG	58
vsvrhobd	
TCGGTGGACAGCCCGGACTCGCTGGAGAACATCCCCGAGAAGTGGGTCCCCGAGGTGAAG	360
420	
bd1r	
CACTTCTGTCCCAATGTGCCATCATCCTGGTGGCCAACAAAAAAGACCTGCGCAGCGAC	118
vsvrhobd	
CACTTCTGTCCCAATGTGCCATCATCCTGGTGGCCAACAAAAAAGACCTGCGCAGCGAC	420
480	
bd1r	
GAGCATGTCCGCACAGAGCTGGCCCGCATGAAGCAGGAACCCGTGCGCACGGATGACGGC	178
vsvrhobd	
GAGCATGTCCGCACAGAGCTGGCCCGCATGAAGCAGGAACCCGTGCGCACGGATGACGGC	480
540	
bd1r	
CGCGCCATGGCCGTGCGCATCCAAGCCTACGACTACCTCGAGTGCTCTGCCAAGACCAAG	238
vsvrhobd	
CGCGCCATGGCCGTGCGCATCCAAGCCTACGACTACCTCGAGTGCTCTGCCAAGACCAAG	540
600	
bd1r	
GAAGGCGTGCGCGAGGTCTTCGAGACGGCCACGCGCGCCGCGCTGCAAAGCGCTACGGC	298
vsvrhobd	
GAAGGCGTGCGCGAGGTCTTCGAGACGGCCACGCGCGCCGCGCTGCAAAGCGCTACGGC	600
660	
bd1r	
TCCCAGAACGGCTGCATCAACTGCTGACTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATC	352
vsvrhobd	
TCCCAGAACGGCTGCATCAACTGCTGACTGCAG	633

3.2.3 Sequenzüberprüfung von RhoC

- vsvrhoc = vollständige DNA-Sequenz des Konstrukts RhoC, Basen der Nukleotide 1 bis 639

Basen der Nukleotidsequenz der Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen: *kursiv*

Basen der Nukleotidsequenz des VSV-tag sowie des Stop-Codon: schwarz

Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoC: blau

- c3f = forward-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts, 462 Basen gelesen

- c3r = komplementärer Gegenstrang der 466 gelesenen Basen der reverse-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts

Basen der Nukleotidsequenz von pUC19: grau

Basen der Nukleotidsequenz des Primers: violett

60

c3f
AATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCCATATGGCTGCA 59
vsvrhoc
GAATTCCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGT**ACCCATATGGCTGCA** 60

120

c3f
ATCCGAAAGAAGCTGGTGATCGTTGGGGATGGTGCCTGTGGGAAGACCTGCCTCCTCATC 119
vsvrhoc
ATCCGAAAGAAGCTGGTGATCGTTGGGGATGGTGCCTGTGGGAAGACCTGCCTCCTCATC 120

180

c3f
GTCTTCAGCAAGGATCAGTTTCCGGAGGTCTACGTCCCTACTGTCTTTGAGAACTATATT 179
vsvrhoc
GTCTTCAGCAAGGATCAGTTTCCGGAGGTCTACGTCCCTACTGTCTTTGAGAACTATATT 180

240

c3f
GCGGACATTGAGGTGGACGGCAAGCAGGTGGAGCTGGCTCTGTGGGACACAGCAGGGCAG 239
c3r
GGACGGCAAGCAGGTGGAGCTGGCTCTGTGGGACACAGCAGGGCAG 46
vsvrhoc
GCGGACATTGAGGTGGACGGCAAGCAGGTGGAGCTGGCTCTGTGGGACACAGCAGGGCAG 240

300

c3f
GAAGACTATGATCGACTGCGGCCTCTCTCCTACCCGGACACTGATGTCATCCTCATGTGC 299
c3r
GAAGACTATGATCGACTGCGGCCTCTCTCCTACCCGGACACTGATGTCATCCTCATGTGC 106
vsvrhoc
GAAGACTATGATCGACTGCGGCCTCTCTCCTACCCGGACACTGATGTCATCCTCATGTGC 300

360

c3f
 TTCTCCATCGACAGCCCTGACAGCCTGGAAAACATTCTGAGAAGTGGACCCCAGAGGTG 359
 c3r
 TTCTCCATCGACAGCCCTGACAGCCTGGAAAACATTCTGAGAAGTGGACCCCAGAGGTG 166
 vsvrhoc
 TTCTCCATCGACAGCCCTGACAGCCTGGAAAACATTCTGAGAAGTGGACCCCAGAGGTG 360

420

c3f
 AAGCACTTCTGCCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTGGGGAATAAGAAGGACCTGAGGCAA 419
 c3r
 AAGCACTTCTGCCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTGGGGAATAAGAAGGACCTGAGGCAA 226
 vsvrhoc
 AAGCACTTCTGCCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTGGGGAATAAGAAGGACCTGAGGCAA 420

480

c3f
 GACGAGCACACCAGGAGAGAGCTGGCCAAGATGAAGCAGGAGC 462
 c3r
 GACGAGCACACCAGGAGAGAGCTGGCCAAGATGAAGCAGGAGCCCGTTCGGTCTGAGGAA 286
 vsvrhoc
 GACGAGCACACCAGGAGAGAGCTGGCCAAGATGAAGCAGGAGCCCGTTCGGTCTGAGGAA 480

540

c3r
 GGCCGGGACATGGCGAACCGGATCAGTGCCTTTGGCTACCTTGAGTGCTCAGCCAAGACC 346
 vsvrhoc
 GGCCGGGACATGGCGAACCGGATCAGTGCCTTTGGCTACCTTGAGTGCTCAGCCAAGACC 540

600

c3r
 AAGGAGGGAGTGCGGGAGGTGTTTGAGATGGCCACTCGGGCTGGCCTCCAGGTCCGCAAG 406
 vsvrhoc
 AAGGAGGGAGTGCGGGAGGTGTTTGAGATGGCCACTCGGGCTGGCCTCCAGGTCCGCAAG 600

660

c3r
 AACAAAGCGTCGGAGGGGCTGTCCCATTCTCTGACTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATC 466
 vsvrhoc
 AACAAAGCGTCGGAGGGGCTGTCCCATTCTCTGACTGCAG 639

3.2.4 Sequenzüberprüfung von RhoCd

- vsvrhocd = vollständige DNA-Sequenz des Konstrukts RhoCd, Basen der Nukleotide 1 bis 627

Basen der Nukleotidsequenz der Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen: *kursiv*

Basen der Nukleotidsequenz des VSV-tag sowie des Stop-Codon: schwarz

Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoC: blau

- cd3f = forward-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts, 465 Basen gelesen

- cd3r = komplementärer Gegenstrang der 467 gelesenen Basen der reverse-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts

Basen der Nukleotidsequenz von pUC19: grau

Basen der Nukleotidsequenz des Primers: violett

60

cd3f
GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCCATATGGCTGCA 60
vsvrhocd
GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGT**ACCCAT****ATGGCTGCA** 60

120

cd3f
ATCCGAAACAAGCTGGTGATCGTTGGGGATGGTGCCTGTGGGAAGACCTGCCTCCTCATC 120
vsvrhocd
ATCCGAAAGAAGCTGGTGATCGTTGGGGATGGTGCCTGTGGGAAGACCTGCCTCCTCATC 120

180

cd3f
GTCTTCAGCAAGGATCAGTTTCCGGAGGTCTACGTCCCTACTGTCTTTGAGAACTATATT 180
vsvrhocd
GTCTTCAGCAAGGATCAGTTTCCGGAGGTCTACGTCCCTACTGTCTTTGAGAACTATATT 180

240

cd3f
GCGGACATTGAGGTGGACGGCAAGCAGGTGGAGCTGGCTCTGTGGGACACAGCAGGGCAG 240
cd3r
GACATTGAGGTGGACGGCAAGCAGGTGGAGCTGGCTCTGTGGGACACAGCAGGGCAG 57
vsvrhocd
GCGGACATTGAGGTGGACGGCAAGCAGGTGGAGCTGGCTCTGTGGGACACAGCAGGGCAG 240

300

cd3f
GAAGACTATGATCGACTGCGGCCTCTCTCCTACCCGGACACTGATGTCATCCTCATGTGC 300
cd3r
GAAGACTATGATCGACTGCGGCCTCTCTCCTACCCGGACACTGATGTCATCCTCATGTGC 117
vsvrhocd
GAAGACTATGATCGACTGCGGCCTCTCTCCTACCCGGACACTGATGTCATCCTCATGTGC 300

360

cd3f
 TTCTCCATCGACAGCCCTGACAGCCTGGAAAACATTCTGAGAAGTGGACCCCAGAGGTG 360
 cd3r
 TTCTCCATCGACAGCCCTGACAGCCTGGAAAACATTCTGAGAAGTGGACCCCAGAGGTG 177
 vsvrhod
 TTCTCCATCGACAGCCCTGACAGCCTGGAAAACATTCTGAGAAGTGGACCCCAGAGGTG 360

420

cd3f
 AAGCACTTCTGCCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTGGGGAATAAGAAGGACCTGAGGCAA 420
 cd3r
 AAGCACTTCTGCCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTGGGGAATAAGAAGGACCTGAGGCAA 237
 vsvrhod
 AAGCACTTCTGCCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTGGGGAATAAGAAGGACCTGAGGCAA 420

480

cd3f
 GACGAGCACACCAGGAGAGAGCTGGCCAAGATGAAGCAGGAGCCC 465
 cd3r
 GACGAGCACACCAGGAGAGAGCTGGCCAAGATGAAGCAGGAGCCCGTTCGGTCTGAGGAA 297
 vsvrhod
 GACGAGCACACCAGGAGAGAGCTGGCCAAGATGAAGCAGGAGCCCGTTCGGTCTGAGGAA 480

540

cd3r
 GGCCGGGACATGGCGAACCGGATCAGTGCCTTTGGCTACCTTGAGTGCTCAGCCAAGACC 357
 vsvrhod
 GGCCGGGACATGGCGAACCGGATCAGTGCCTTTGGCTACCTTGAGTGCTCAGCCAAGACC 540

600

cd3r
 AAGGAGGGAGTGCGGGAGGTGTTTGGAGATGGCCACTCGGGCTGGCCTCCAGGTCCGCAAG 417
 vsvrhod
 AAGGAGGGAGTGCGGGAGGTGTTTGGAGATGGCCACTCGGGCTGGCCTCCAGGTCCGCAAG 600

660

cd3r
 AACAAAGCGTCGGAGGGGCTGACTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCAT 467
 vsvrhod
 AACAAAGCGTCGGAGGGGCTGACTGCAG 627

3.2.5 Sequenzüberprüfung von RhoABA

- vsvrhoaba = vollständige DNA-Sequenz des Konstrukts RhoABA, Basen der Nukleotide 1 bis 645
 - Basen der Nukleotidsequenz der Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen: *kursiv*
 - Basen der Nukleotidsequenz des VSV-tag sowie des Stop-Codon: schwarz
 - Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoA: magenta
 - Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoB: grün
- p26f = forward-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts, 236 Basen gelesen
- p26r = komplementärer Gegenstrang der 390 gelesenen Basen der reverse-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts
 - Basen der Nukleotidsequenz von pUC19: grau
 - Basen der Nukleotidsequenz des Primers: violett

60

p26f	ACCGGCTGGGCAGGGTACCATGGCTGCCATC	32
vsvrhoaba	GAATTC ATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAGGG TACC ATGGCTGCCATC	60

120

p26f	CGGAAGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC	92
vsvrhoaba	CGGAAGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC	120

180

p26f	TTCAGCAAGGACCAGTTCACAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTATGTGGCA	152
vsvrhoaba	TTCAGCAAGGACCAGTTCACAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTATGTGGCA	180

240

p26f	GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA	212
vsvrhoaba	GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA	240

300

p26f	GATTATGATCGCCTGAGGCCCTC	236
p26r	GGCCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT	44
vsvrhoaba	GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT	300

360

p26r	TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG	104
vsvrhoaba	TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG	360
	420	
p26r	CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT	163
vsvrhoaba	CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT	420
	480	
p26r	GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC	223
vsvrhoaba	GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC	480
	540	
p26r	AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAA	283
vsvrhoaba	AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAA	540
	600	
p26r	GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAAGCGCTACGGC	343
vsvrhoaba	GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAAGCGCTACGGC	600
	660	
p26r	TCCCAGAACGGCTGCATCAACTGCTGCCTTGTCTTGTGACTGCAGCA	390
vsvrhoaba	TCCCAGAACGGCTGCATCAACTGCTGCCTTGTCTTGTGACTGCAG	645

3.2.6 Sequenzüberprüfung von RhoABB

- vsvrhoabb = vollständige DNA-Sequenz des Konstrukts RhoABB, Basen der Nukleotide 1 bis 645
 - Basen der Nukleotidsequenz der Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen: *kursiv*
 - Basen der Nukleotidsequenz des VSV-tag sowie des Stop-Codon: schwarz
 - Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoA: magenta
 - Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoB: grün
- abb2f = forward-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts, 377 Basen gelesen
- abb2r = komplementärer Gegenstrang der 384 gelesenen Basen der reverse-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts
 - Basen der Nukleotidsequenz von pUC19: grau
 - Basen der Nukleotidsequenz des Primers: violett

60

abb2f
 GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCATGGCTGCCATC 60
 vsvrhoabb
GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGT**ACC**ATGGCTGCCATC 60

120

abb2f
 CGGAAGAAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC 120
 vsvrhoabb
CGGAAGAAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC 120

180

abb2f
 TTCAGCAAGGACCAGTTCACAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTATGTGGCA 180
 vsvrhoabb
TTCAGCAAGGACCAGTTCACAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTATGTGGCA 180

240

abb2f
 GATATCCAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA 240
 vsvrhoabb
GATATCCAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA 240

300

abb2f
 GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT 300
 abb2r
 CAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT 29
 vsvrhoabb
GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT 300

360

abb2f		
TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG		360
abb2r		
TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG		89
vsvrhoabb		
TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG		360
	420	
abb2f		
CATTTCTGTCCCAACGT		377
abb2r		
CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT		149
vsvrhoabb		
CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT		420
	480	
abb2r		
GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC		209
vsvrhoabb		
GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC		480
	540	
abb2r		
AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAA		269
vsvrhoabb		
AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAA		540
	600	
abb2r		
GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAAGCGCTACGGC		329
vsvrhoabb		
GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAAGCGCTACGGC		600
	660	
abb2r		
TCCAGAACGGCTGCATCAACTGCTGCAAGGTGCTATGACTGCAGGCATGCAAGC		384
vsvrhoabb		
TCCAGAACGGCTGCATCAACTGCTGCAAGGTGCTATGACTGCAG		645

3.2.7 Sequenzüberprüfung von RhoABd

- vsvrhoabd = vollständige DNA-Sequenz des Konstrukts RhoABd, Basen der Nukleotide 1 bis 633
 - Basen der Nukleotidsequenz der Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen: *kursiv*
 - Basen der Nukleotidsequenz des VSV-tag sowie des Stop-Codon: schwarz
 - Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoA: magenta
 - Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoB: grün
- abd1f = forward-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts, 272 Basen gelesen
- abd1r = komplementärer Gegenstrang der 489 gelesenen Basen der reverse-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts
 - Basen der Nukleotidsequenz von pUC19: grau
 - Basen der Nukleotidsequenz des Primers: violett

60

abd1f	GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCATGGCTGCCATC	60
vsvrhoabd	GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCATGGCTGCCATC	60

120

abd1f	CGGAAGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC	120
vsvrhoabd	CGGAAGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC	120

180

abd1f	TTCAGCAAGGACCAGTTCACAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTATGTGGCA	180
abd1r		
	GAGAACTATGTGGCA	15
vsvrhoabd	TTCAGCAAGGACCAGTTCACAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTATGTGGCA	180

240

abd1f	GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA	240
abd1r	GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTCTGGGACACAGCTGGGCAGGAA	75
vsvrhoabd	GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA	240

300

abd1f	GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCC	272
abd1r	GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT	135
vsvrhoabd		

GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT	300
360	
abd1r TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG	195
vsvrhoabd TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG	360
420	
abd1r CATTTCTGTCCCAACGTGCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATATTCGGAATGAT	255
vsvrhoabd CATTTCTGTCCCAACGTGCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT	420
480	
abd1r GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC	315
vsvrhoabd GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC	480
540	
abd1r AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAA	375
vsvrhoabd AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAA	540
600	
abd1r GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAAGCGCTACGGC	435
vsvrhoabd GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAAGCGCTACGGC	600
660	
abd1r TCCCAGAACGGCTGCATCAACTGCTGACTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATC	489
vsvrhoabd TCCCAGAACGGCTGCATCAACTGCTGACTGCAG	633

3.2.8 Sequenzüberprüfung von RhoACA

- vsvrhoaca = vollständige DNA-Sequenz des Konstrukts RhoACA, Basen der Nukleotide 1 bis 636
 - Basen der Nukleotidsequenz der Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen: *kursiv*
 - Basen der Nukleotidsequenz des VSV-tag sowie des Stop-Codon: schwarz
 - Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoA: magenta
 - Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoC: blau
- acalf = forward-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts, 493 Basen gelesen
- acalr = komplementärer Gegenstrang der 280 gelesenen Basen der reverse-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts
 - Basen der Nukleotidsequenz von pUC19: grau
 - Basen der Nukleotidsequenz des Primers: violett

60

acalf	GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCATGGCTGCCATC	60
vsvrhoaca	GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCATGGCTGCCATC	60

120

acalf	CGGAAGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC	120
vsvrhoaca	CGGAAGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC	120

180

acalf	TTCAGCAAGGACCAGTTCACAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTATGTGGCA	180
vsvrhoaca	TTCAGCAAGGACCAGTTCACAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTATGTGGCA	180

240

acalf	GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA	240
vsvrhoaca	GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA	240

300

acalf	GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT	300
vsvrhoaca	GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT	300

360

acalf	TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG	360
-------	--	-----

vsvrhoaca	TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG	360
	420	
acalf	CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT	420
acalr	TGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT	44
vsvrhoaca	CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT	420
	480	
acalf	GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC	480
acalr	GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC	104
vsvrhoaca	GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC	480
	540	
acalf	AGAGATATGGCAA	493
acalr	AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAA	164
vsvrhoaca	AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAA	540
	600	
acalr	GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGTCCGCAAGAAC	224
vsvrhoaca	GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGTCCGCAAGAAC	600
	660	
acalr	AAGCGTCGGAGGGGCTGCCTTGTCTTGTGACTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAAT	280
vsvrhoaca	AAGCGTCGGAGGGGCTGCCTTGTCTTGTGACTGCAG	636

3.2.9 Sequenzüberprüfung von RhoACC

- vsvrhoacc = vollständige DNA-Sequenz des Konstrukts RhoACC, Basen der Nukleotide 1 bis 636
 - Basen der Nukleotidsequenz der Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen: *kursiv*
 - Basen der Nukleotidsequenz des VSV-tag sowie des Stop-Codon: schwarz
 - Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoA: magenta
 - Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoC: blau
- p25f = forward-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts, 515 Basen gelesen
- p25r = komplementärer Gegenstrang der 643 gelesenen Basen der reverse-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts
 - Basen der Nukleotidsequenz von pUC19: grau
 - Basen der Nukleotidsequenz des Primers: violett

60

p25f	TGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCATGGCT	47
p25r	GCCAGTGAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCATGGCT	60
vsvrhoacc	GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACC ATGGCT	54

120

p25f	GCCATCCGGAAGAAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTC	107
p25r	GCCATCCGGAAGAAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTC	120
vsvrhoacc	GCCATCCGGAAGAAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTC	114

180

p25f	ATAGTCTTCAGCAAGGACCAGTTCAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTGGAGAACTAT	167
p25r	ATAGTCTTCAGCAAGGACCAGTTCAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTGGAGAACTAT	180
vsvrhoacc	ATAGTCTTCAGCAAGGACCAGTTCAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTGGAGAACTAT	174

240

p25f	GTGGCAGATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGG	227
p25r	GTGGCAGATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGG	240
vsvrhoacc	GTGGCAGATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGG	234

300

p25f

CAGGAAGATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATG 287
p25r
CAGGAAGATTATGATAGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATG 300
vsvrhoacc
CAGGAAGATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATG 294

360

p25f
TGTTTTTCCATCGACAGCCCTGATAGTTTGTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCCAGAA 347
p25r
TGTTTTTCCATCGACAGCCCTGATAGTTTGTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCCAGAA 360
vsvrhoacc
TGTTTTTCCATCGACAGCCCTGATAGTTTGTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCCAGAA 354

420

p25f
GTCAAGCATTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGG 407
p25r
GTCAAGCATTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGG 420
vsvrhoacc
GTCAAGCATTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGG 414

480

p25f
AATGATGAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAA 467
p25r
AATGATGAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAA 480
vsvrhoacc
AATGATGAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAA 474

540

p25f
GAAGGCAGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAG 515
p25r
GAAGGCAGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTCAGCAAAG 540
vsvrhoacc
GAAGGCAGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTCAGCAAAG 534

600

p25r
ACCAAAGATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAAGTCCGC 600
vsvrhoacc
ACCAAAGATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAAGTCCGC 594

660

p25r
AAGAACAAGCGTCGGAGGGGCTGTCCCATTCTCTGACTGCAGC 643
vsvrhoacc
AAGAACAAGCGTCGGAGGGGCTGTCCCATTCTCTGACTGCAGC 636

3.2.10 Sequenzüberprüfung von RhoACd

- vsvrhoacd = vollständige DNA-Sequenz des Konstrukts RhoACd, Basen der Nukleotide 1 bis 624
 - Basen der Nukleotidsequenz der Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen: *kursiv*
 - Basen der Nukleotidsequenz des VSV-tag sowie des Stop-Codon: schwarz
 - Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoA: magenta
 - Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoC: blau
- acd1f = forward-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts, 498 Basen gelesen
- acd1r = komplementärer Gegenstrang der 264 gelesenen Basen der reverse-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts
 - Basen der Nukleotidsequenz von pUC19: grau
 - Basen der Nukleotidsequenz des Primers: violett

60

acd1f
 GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCATGGCTGCCATC 60
 vsvrhoacd
GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCATGGCTGCCATC 60

120

acd1f
 CGGAAGAAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC 120
 vsvrhoacd
CGGAAGAAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC 120

180

acd1f
 TTCAGCAAGGACCAGTTCACAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTATGTGGCA 180
 vsvrhoacd
TTCAGCAAGGACCAGTTCACAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTATGTGGCA 180

240

acd1f
 GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA 240
 vsvrhoacd
GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA 240

300

acd1f
 GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT 300
 vsvrhoacd
GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT 300

360

acd1f
 TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG 360

vsvrhoacd		
TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG		360
	420	
acd1f		
CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT		420
acd1r	ATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT	39
vsvrhoacd		
CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT		420
	480	
acd1f		
GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC		480
acd1r	GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC	99
vsvrhoacd	GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC	480
	540	
acd1f		
AGAGATATGGCAAACAGG		498
acd1r	AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAA	159
vsvrhoacd	AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAA	540
	600	
acd1r		
GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGTCCGCAAGAAC		219
vsvrhoacd	GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGTCCGCAAGAAC	600
	660	
acd1r		
AAGCGTCGGAGGGGCTGACTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATC		264
vsvrhoacd	AAGCGTCGGAGGGGCTGACTGCAG	624

3.2.11 Sequenzüberprüfung von RhoA 140

- vsvrhoa140 = vollständige DNA-Sequenz des Konstrukts RhoA 140, Basen der Nukleotide 1 bis 636

Basen der Nukleotidsequenz der Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen: *kursiv*

Basen der Nukleotidsequenz des VSV-tag sowie des Stop-Codon: schwarz

Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoA: magenta

Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoC: blau

- a140-1f = forward-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts, 433 Basen gelesen

- a140-1r = komplementärer Gegenstrang der 424 gelesenen Basen der reverse-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts

Basen der Nukleotidsequenz von pUC19: grau

Basen der Nukleotidsequenz des Primers: violett

60

a140-1f
 GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCATGGCTGCCATC 60
 vsvrhoa140
GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGG**TACC**ATGGCTGCCATC 60

120

a140-1f
 CGGAAGAAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC 120
 vsvrhoa140
CGGAAGAAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC 120

180

a140-1f
 TTCAGCAAGGACCAGTTCACAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTATGTGGCA 180
 vsvrhoa140
TTCAGCAAGGACCAGTTCACAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTATGTGGCA 180

240

a140-1f
 GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA 240
 a140-1r
 ACACAGCTGGGCAGGAA 18
 vsvrhoa140
GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA 240

300

a140-1f
 GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT 300
 a140-1r
 GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT 78
 vsvrhoa140
GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT 300

360

a140-1f
TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG 360
a140-1r
TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG 138
vsvrhoa140
TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG 360

420

a140-1f
CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT 420
a140-1r
CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT 198
vsvrhoa140
CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT 420

480

a140-1f
GAGCACACAAGGC 433
a140-1r
GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGCGATCTGAAGAAGGC 258
vsvrhoa140
GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGCGATCTGAAGAAGGC 480

540

a140-1r
AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAA 318
vsvrhoa140
AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAA 540

600

a140-1r
GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGCTAGACGTGGG 378
vsvrhoa140
GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGCTAGACGTGGG 600

660

a140-1r
AAGAAAAAATCTGGTTCCTTGTCTTGTGACTGCAGGCATGCAAGC 424
vsvrhoa140
AAGAAAAAATCTGGTTCCTTGTCTTGTGACTGCAG 636

3.2.12 Sequenzüberprüfung von RhoA 183

- vsvrhoa183 = vollständige DNA-Sequenz des Konstrukts RhoA 183, Basen der Nukleotide 1 bis 636

Basen der Nukleotidsequenz der Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen: *kursiv*

Basen der Nukleotidsequenz des VSV-tag sowie des Stop-Codon: schwarz

Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoA: magenta

Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoC: blau

- a183-2f = forward-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts, 434 Basen gelesen

- a183-2r = komplementärer Gegenstrang der 542 gelesenen Basen der reverse-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts

Basen der Nukleotidsequenz von pUC19: grau

Basen der Nukleotidsequenz des Primers: violett

60

a183-2f		
GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCATGGCTGCCATC		60
vsvrhoa183		
GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCATGGCTGCCATC		60

120

a183-2f		
CGGAAGAAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC		120
a183-2r		
	TAGTC	5
vsvrhoa183		
CGGAAGAAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC		120

180

a183-2f		
TTCAGCAAGGACCAGTCCCAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTATGTGGCA		180
a183-2r		
TTCAGCAAGGACCAGTCCCAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTATGTGGCA		65
vsvrhoa183		
TTCAGCAAGGACCAGTCCCAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTTGAGAACTATGTGGCA		180

240

a183-2f		
GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA		240
a183-2r		
GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA		125
vsvrhoa183		
GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA		240

300

a183-2f		
GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT		300
a183-2r		

GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT	185
vsvrhoa183	
GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT	300
360	
a183-2f	
TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG	360
a183-2r	
TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG	245
vsvrhoa183	
TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG	360
420	
a183-2f	
CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT	420
a183-2r	
CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT	305
vsvrhoa183	
CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT	420
480	
a183-2f	
GAGCACACAAGGCG	434
a183-2r	
GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC	365
vsvrhoa183	
GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC	480
540	
a183-2r	
AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAA	425
vsvrhoa183	
AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAA	540
600	
a183-2r	
GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGCTAGAAAGGGG	485
vsvrhoa183	
GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGCTAGAAAGGGG	600
660	
a183-2r	
AAGAAAAAATCTGGTTGCCTTGTCTTGTGACTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATC	542
vsvrhoa183	
AAGAAAAAATCTGGTTGCCTTGTCTTGTGACTGCAG	636

3.2.13 Sequenzüberprüfung von RhoA 186

- vsvrhoa186 = vollständige DNA-Sequenz des Konstrukts RhoA 186, Basen der Nukleotide 1 bis 636

Basen der Nukleotidsequenz der Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen: *kursiv*

Basen der Nukleotidsequenz des VSV-tag sowie des Stop-Codon: schwarz

Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoA: magenta

Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoC: blau

- a186-1f = forward-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts, 436 Basen gelesen

- a186-1r = komplementärer Gegenstrang der 424 gelesenen Basen der reverse-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts

Basen der Nukleotidsequenz von pUC19: grau

Basen der Nukleotidsequenz des Primers: violett

60

a186-1f		
GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCATGGCTGCCATC		60
vsvrhoa186		
GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCATGGCTGCCATC		60

120

a186-1f		
CGGAAGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC		120
vsvrhoa186		
CGGAAGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC		120

180

a186-1f		
TTCAGCAAGGACCAGTTCACAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTGAGAACTATGTGGCA		180
vsvrhoa186		
TTCAGCAAGGACCAGTTCACAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTGAGAACTATGTGGCA		180

240

a186-1f		
GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA		240
a186-1r		
	ACACAGCTGGGCAGGAA	18
vsvrhoa186		
GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA		240

300

a186-1f		
GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT		300
a186-1r		
GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT		78
vsvrhoa186		
GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT		300

360

a186-1f
TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG 360
a186-1r
TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG 138
vsvrhoa186
TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG 360

420

a186-1f
CATTTCTGTCCCAACGTGCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT 420
a186-1r
CATTTCTGTCCCAACGTGCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT 198
vsvrhoa186
CATTTCTGTCCCAACGTGCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT 420

480

a186-1f
GAGCACACAAGGCGGG 436
a186-1r
GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC 258
vsvrhoa186
GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC 480

540

a186-1r
AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAA 318
vsvrhoa186
AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAA 540

600

a186-1r
GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGCTAGACGTGGG 378
vsvrhoa186
GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGCTAGACGTGGG 600

660

a186-1r
AAGAGAAGATCTGGTTCCTTGTCTTGTGACTGCAGGCATGCAAGC 424
vsvrhoa186
AAGAGAAGATCTGGTTCCTTGTCTTGTGACTGCAGGCATGCAAGC 636

3.2.14 Sequenzüberprüfung von RhoA 188

- vsvrhoa188 = vollständige DNA-Sequenz des Konstrukts RhoA 188, Basen der Nukleotide 1 bis 636

Basen der Nukleotidsequenz der Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen: *kursiv*

Basen der Nukleotidsequenz des VSV-tag sowie des Stop-Codon: schwarz

Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoA: magenta

Basen der Nukleotidsequenz der aa von RhoC: blau

- a188-1f = forward-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts, 436 Basen gelesen

- a188-1r = komplementärer Gegenstrang der 543 gelesenen Basen der reverse-Sequenzierung des hergestellten Konstrukts

Basen der Nukleotidsequenz von pUC19: grau

Basen der Nukleotidsequenz des Primers: violett

60

a188-1f		
GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCATGGCTGCCATC		60
vsvrhoa188		
GAATTCATGTACACCGACATCGAGATGAACCGGCTGGGCAAGGGTACCATGGCTGCCATC		60

120

a188-1f		
CGGAAGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC		120
a188-1r		
	ATAGTC	6
vsvrhoa188		
CGGAAGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTC		120

180

a188-1f		
TTCAGCAAGGACCAGTTCAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTGAGAACTATGTGGCA		180
a188-1r		
TTCAGCAAGGACCAGTTCAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTGAGAACTATGTGGCA		66
vsvrhoa188		
TTCAGCAAGGACCAGTTCAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTTGAGAACTATGTGGCA		180

240

a188-1f		
GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA		240
a188-1r		
GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA		126
vsvrhoa188		
GATATCGAGGTGGATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAA		240

300

a188-1f		
GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT		300
a188-1r		

GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT	186
vsvrhoa188	
GATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTT	300
360	
a188-1f	
TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG	360
a188-1r	
TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG	246
vsvrhoa188	
TCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACATCCCAGAAAAGTGGACCCAGAAAGTCAAG	360
420	
a188-1f	
CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT	420
a188-1r	
CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT	306
vsvrhoa188	
CATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGGTTGGGAATAAGAAGGATCTTCGGAATGAT	420
480	
a188-1f	
GAGCACACAAGGCGGG	436
a188-1r	
GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC	366
vsvrhoa188	
GAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTGAAGAAGGC	480
540	
a188-1r	
AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAA	426
vsvrhoa188	
AGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAA	540
600	
a188-1r	
GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGCTAGACGTGGG	486
vsvrhoa188	
GATGGAGTGAGAGAGGTTTTTCAAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGCTAGACGTGGG	600
660	
a188-1r	
AAGAAAAAACGTGGTTGCCTTGTCTTGTGACTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATC	543
vsvrhoa188	
AAGAAAAAACGTGGTTGCCTTGTCTTGTGACTGCAG	636

3.3 Transfektion mit ausgewählten Rho-Konstrukten

Nach erfolgter Sequenzierung der Rho-Konstrukte und ihrer Klonierung in pKC3 wurde ein Teil der hergestellten Mutanten in Transfektionsexperimenten auf Expression und funktionelle Aktivität hinsichtlich der Induktion von „stress fibers“ untersucht.⁹¹ Für diese Untersuchungen wurden HeLa-Zellen mit der entsprechenden DNA nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert (s. Transfektion von HeLa-Zellen). Eine sich an die Transfektion anschließende Infektion der Zellen mit dem Stamm SC 301 (s. Infektion von HeLa-Zellen) wurde durchgeführt, um neben der Expression der Rho-Mutanten auch ihr Rekrutierungsverhalten während der Invasion von *Shigella flexneri* zu beurteilen. Es stand die Frage, ob die hergestellten Rho-Konstrukte an die bakterielle Eintrittsstelle rekrutiert werden und wenn ja, ob ihre Rekrutierungsmuster dem von RhoA, RhoB oder RhoC entsprachen.

Die transfizierten HeLa-Zellen wurden 18-24 Stunden in MEM unter Zusatz von 10 % Fötalem Kälberserum bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Vor der Infektion wurden die Zellen mit MEM gewaschen. Die *Shigellen* wurden in MEM aufgenommen und zu den Zellen gegeben. Nach Adhäsion der Bakterien an die HeLa-Zellen über 20' bei Raumtemperatur erfolgte eine Inkubation im Wasserbad über 13' bei 37°C für die zelluläre Infektion. Im Anschluß daran wurden die Zellen mehrmals mit PBS-Puffer gewaschen. Die HeLa-Zellen wurden durch Zugabe von Paraformaldehyd (3,7 % in 1 X PBS, pH 7,4) über 20' bei Raumtemperatur fixiert. Die Permeabilisation ihrer Zellmembran erfolgte mit Triton-X-100 (0,1 % in 1 X PBS) über 5' bei Raumtemperatur. Nach mehrfachem Waschen der Zellen mit PBS wurde die Färbung mit spezifischen Antikörpern vorgenommen (s. Zellfärbung mit Antikörpern).

Eine Überprüfung der Funktionalität der Mutanten erfolgte über Aktinfärbung. Als fluoreszenzmarkiertes Peptid für die Darstellung von F-Aktin wurde Bodipy-Phalloidine eingesetzt. Die Rho-Konstrukte, denen N-terminal die VSV-Sequenz vorangestellt war, konnten über eine Zweifachfärbung identifiziert werden. Zuerst erfolgte eine Färbung mit dem monoklonalen Anti-VSV Erstantikörper P5D4¹⁴⁷, anschließend wurde mit dem ebenfalls fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper Anti-mouse Texas-Red gegengefärbt.

Da die Invasion der *Shigellen* in Epithelzellen mit einer vorübergehenden Akkumulation von F-Aktin an der bakteriellen Eintrittsstelle einhergeht und diese lokale Anreicherung von F-Aktin in Infektionsexperimenten mit nicht-invasiven *Shigellen* nicht auftritt, läßt sich das Invasionsereignis ebenfalls anhand der F-Aktin-Färbung darstellen.³⁵

Die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung der Experimente wurden fotografisch dokumentiert.

Aufgrund der größeren Homologie zwischen RhoA und RhoC auf Primärstrukturebene (nur 14 unterschiedliche Aminosäuren im Vergleich zu 28 differierenden Aminosäuren zwischen RhoA und RhoB), wurden zur Untersuchung der *Shigella*-spezifischen Rekrutierung von Rho HeLa-Zellen mit den folgenden Rho-Mutanten transfiziert:

- RhoAd
- RhoCd
- RhoABd
- RhoACA
- RhoACC.

Die Transfektionsexperimente führten zu den folgenden Ergebnissen, s. auch Tabelle 3

Transfektionsergebnisse ausgewählter Rho-Konstrukte in HeLa-Zellen.

RhoAd und RhoCd, die CAAX-Deletionsmutanten von RhoA und RhoC, wurden exprimiert. Beide Konstrukte zeigten funktionelle Aktivität hinsichtlich der für Rho beschriebenen Induktion von Aktinpolymerisation (Abbildungen 8 und 9).



Abbildung 8 Nachweis der funktionellen Aktivität des Konstrukts RhoAd

a) Rot:
In HeLa-Zellen exprimiertes Konstrukt

b) Grün:
F-Aktin-Färbung gleiche Stelle; verstärkte Ausbildung von „stress fibers“ in der transfizierten Zelle

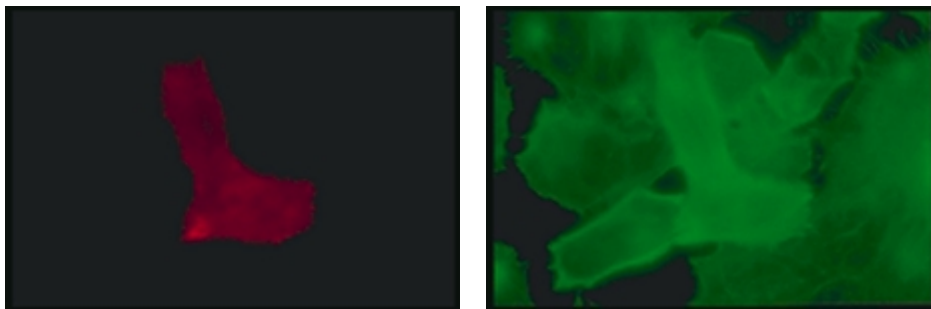


Abbildung 9 Nachweis der funktionellen Aktivität des Konstrukts RhoCd

a) Rot:
In HeLa-Zellen exprimiertes Konstrukt

b) Grün:
F-Aktin-Färbung gleiche Stelle; verstärkte Ausbildung von „stress fibers“ in der transfizierten Zelle

Demgegenüber erfolgte weder für RhoAd noch für RhoCd eine *Shigella*-induzierte Rekrutierung an die bakterielle Eintrittsstelle (Abbildungen 10 und 11).

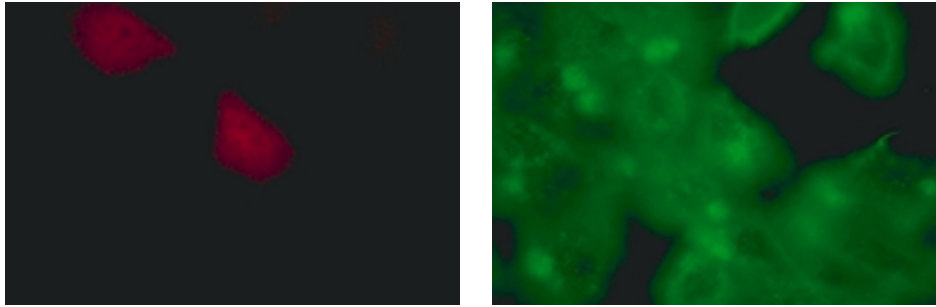


Abbildung 10 Rekrutierungsverhalten des Konstrukts RhoAd während der Invasion von *Shigella flexneri* in HeLa-Zellen

- a) Rot:
In HeLa-Zellen exprimiertes Konstrukt;
keine Rekrutierung von RhoAd an die bakterielle Eintrittsstelle
- b) Grün:
F-Aktin-Färbung gleiche Stelle; lokale Anreicherung von F-Aktin am Invasionslocus von *S. flexneri* (Bildmitte)

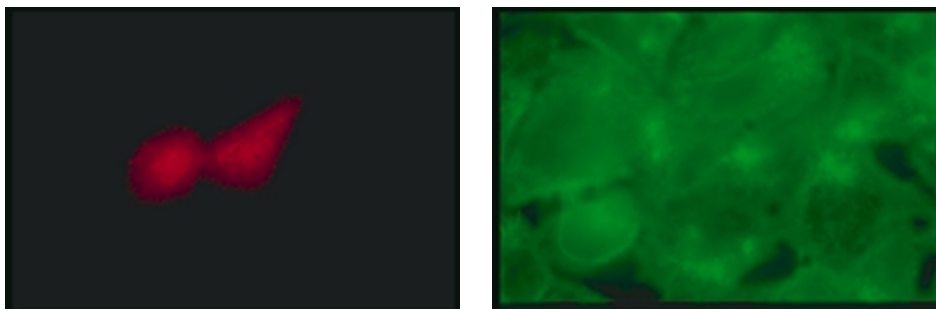


Abbildung 11 Rekrutierungsverhalten des Konstrukts RhoCd während der Invasion von *Shigella flexneri* in HeLa-Zellen

- a) Rot:
In HeLa-Zellen exprimiertes Konstrukt;
keine Rekrutierung von RhoCd an die bakterielle Eintrittsstelle
- b) Grün:
F-Aktin-Färbung gleiche Stelle;
Invasionslocus von *S. flexneri* (Bildmitte)

Die Resultate der Transfektionsexperimente des Konstrukts RhoABd entsprachen denen von RhoAd und RhoCd. RhoABd war funktionell aktiv, ersichtlich an der Induktion von „stress fibers“. Eine Kolokalisation mit dem bakteriellen Invasionslocus konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildungen 12 und 13).

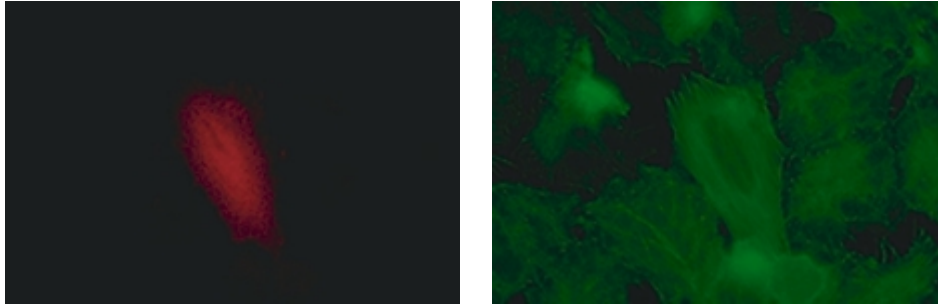


Abbildung 12 Nachweis der funktionellen Aktivität des Konstrukts RhoABd

a) Rot:
In HeLa-Zellen exprimiertes Konstrukt

b) Grün:
F-Aktin-Färbung gleiche Stelle; verstärkte Ausbildung von „stress fibers“ in der transfizierten Zelle

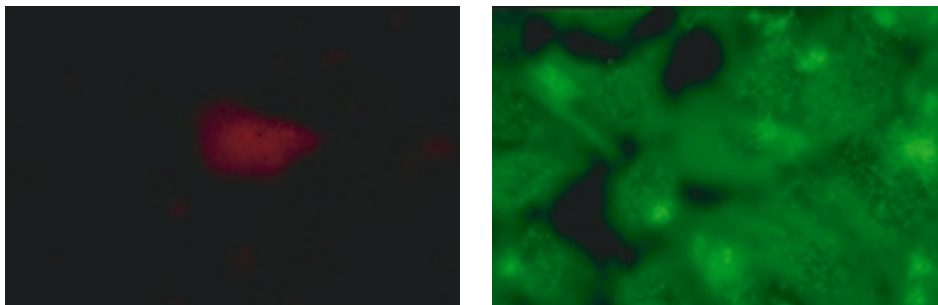


Abbildung 13 Rekrutierungsverhalten des Konstrukts RhoABd während der Invasion von *Shigella flexneri* in HeLa-Zellen

a) Rot:
In HeLa-Zellen exprimiertes Konstrukt;
keine Rekrutierung von RhoABd an die bakterielle Eintrittsstelle

b) Grün:
F-Aktin-Färbung gleiche Stelle; lokale Anreicherung von F-Aktin am Invasionslocus von *S. flexneri* (Bildmitte)

Auch die Transfektion der HeLa-Zellen mit den Rho-Mutanten RhoACA und RhoACC hatte eine Induktion von Aktinpolymerisation zur Folge (Abbildungen 14 und 15).

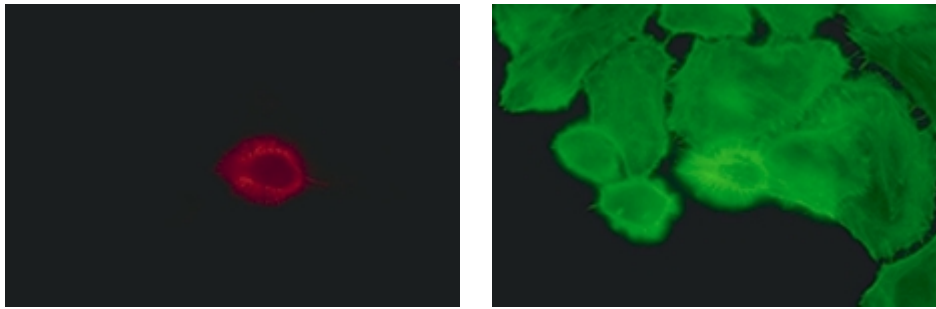


Abbildung 14 Nachweis der funktionellen Aktivität des Konstrukts RhoACA

a) Rot:
In HeLa-Zellen exprimiertes Konstrukt

b) Grün:
F-Aktin-Färbung gleiche Stelle; verstärkte Ausbildung von „stress fibers“ in der transfizierten Zelle

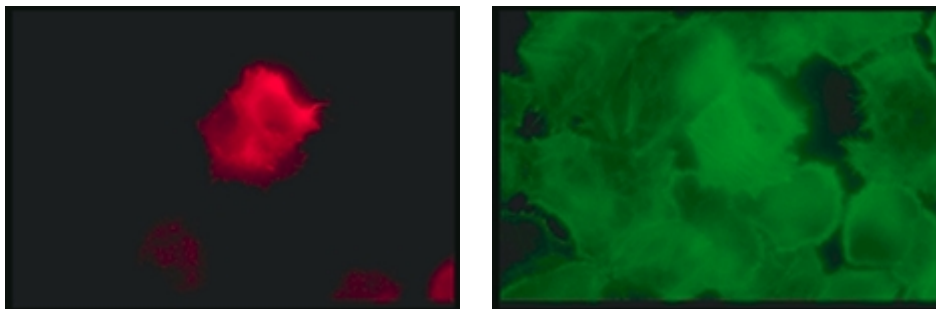


Abbildung 15 Nachweis der funktionellen Aktivität des Konstrukts RhoACC

a) Rot:
In HeLa-Zellen exprimiertes Konstrukt; wie bei Kalziumphosphat-Transfektion häufig auftretend, sind zwei benachbarte Zellen transfiziert

b) Grün:
F-Aktin-Färbung gleiche Stelle; verstärkte Ausbildung von „stress fibers“ in den transfizierten Zelle

Sowohl RhoACA als auch RhoACC wurden an die bakterielle Eintrittsstelle von *Shigella flexneri* rekrutiert. Beide Konstrukte wiesen das Rekrutierungsmuster von RhoC auf (Abbildungen 16 und 17).

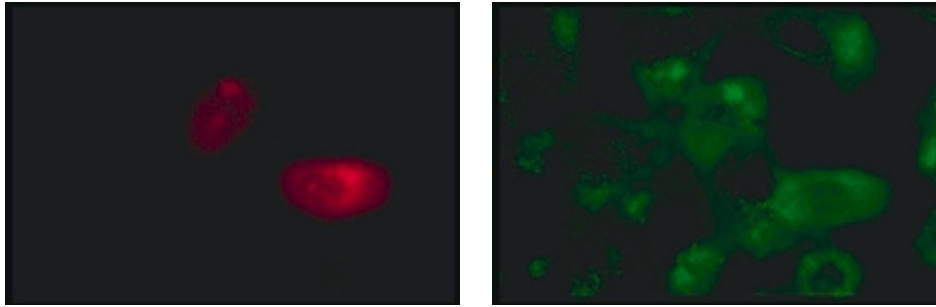


Abbildung 16 Rekrutierungsverhalten des Konstrukts RhoACA während der Invasion von *Shigella flexneri* in HeLa-Zellen

- | | |
|---|--|
| <p>a) Rot:
In HeLa-Zellen exprimiertes Konstrukt;
Rekrutierung von RhoACA an die bakterielle Eintrittsstelle mit deutlicher Anreicherung in den zellulären Protrusionen (Bildmitte)</p> | <p>b) Grün:
F-Aktin-Färbung gleiche Stelle; lokale Anreicherung von F-Aktin am Invasionslocus von <i>S. flexneri</i> (Bildmitte)</p> |
|---|--|

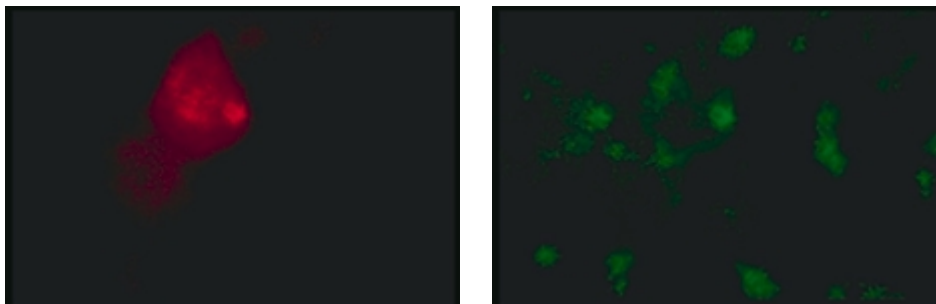


Abbildung 17 Rekrutierungsverhalten des Konstrukts RhoACC während der Invasion von *Shigella flexneri* in HeLa-Zellen

- | | |
|--|--|
| <p>a) Rot:
In HeLa-Zellen exprimiertes Konstrukt;
RhoACC weist das Rekrutierungsmuster von RhoC auf mit Anreicherung in den zellulären Protrusionen am Invasionslocus von <i>S. flexneri</i></p> | <p>b) Grün:
F-Aktin-Färbung gleiche Stelle; lokale Anreicherung von F-Aktin am bakteriellen Eintrittsort (Bildmitte)</p> |
|--|--|

Die Resultate der durchgeführten Experimente sind in der folgenden Tabelle noch einmal zusammengefaßt.

Tabelle 3 Transfektionsergebnisse ausgewählter Rho-Konstrukte in HeLa-Zellen

Konstrukt	Expression	funktionell aktiv, „stress fiber“- Bildung	Rekrutierung	Rekrutierungs- muster
RhoAd	+	+	-	entfällt
RhoCd	+	+	-	entfällt
RhoABd	+	+	-	entfällt
RhoACA	+	+	+	wie RhoC
RhoACC	+	+	+	wie RhoC

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Molekularbiologische Methoden

Die Herstellung der Konstrukte erfolgte durch Mutagenese bereits vorhandener Plasmid-DNA für die Rho-Isoformen RhoA, RhoB und RhoC. Dabei kamen verschiedene molekularbiologische Techniken zum Einsatz.

4.1.1.1 In-vitro Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion - PCR

Die PCR ist ein molekularbiologisches Verfahren zur *in-vitro* Replikation von DNA.¹⁵⁰ Da wir die zu amplifizierende DNA in ihrer Sequenz verändern wollten, interessierte uns vorrangig die Fehlerquote der Kettenverlängerung während des Reaktionsablaufs. Deshalb enthielten unsere PCR-Ansätze nur die notwendigen Reagenzien, wie DNA-Polymerase, Puffer für die Polymerase, Mg²⁺, Oligonukleotide als Primer, dNTP's und Aqua bidest. BSA und Detergenzien, die über eine Enzymstabilisierung die Effizienz der Reaktion erhöhen, wurden nicht eingesetzt. Anwendung fanden zwei verschiedene DNA Polymerasen, Taq und Pwo. Pwo ist eine thermostabile „high fidelity“ DNA Polymerase, die gegenüber der Taq Polymerase eine etwa 10fach höhere Genauigkeit, aber eine geringere Prozessivität aufweist. Die hohe Genauigkeit resultiert aus der 3'-5' Exonukleaseaktivität des Enzyms, die den Einbau falscher Nukleotide während der Extension verringert. Aufgrund der von uns gewünschten geringen Fehlerquote arbeiteten wir experimentell vorwiegend mit Pwo. Bei den eingesetzten Oligonukleotiden wurde neben der Kontrolle auf weitere Bindungsmöglichkeiten an die template-DNA eine routinemäßige Prüfung auf das Vorhandensein von Palindromen und komplementären Strukturen vorgenommen. Weiterhin achteten wir darauf, daß das 3'-Ende der Oligonukleotide von der Base Adenin gebildet wurde. Primer, an deren 3'-Terminus Adenin steht, weisen experimentell die geringste Effizienz für die Extensionsreaktion bei falscher Basenpaarung auf und erhöhen damit die Wahrscheinlichkeit für die korrekte Sequenz des PCR-Produkts.¹⁵⁰ Um eine hohe Genauigkeit der PCR zu erzielen, ermittelten wir die Reaktionsbedingungen für Taq und Pwo, die bei Minimierung der Fehlerrate zu einer ausreichenden Menge an PCR-Produkt führten. Dazu gingen wir für den Einsatz der Taq Polymerase von einem festen zeitlichen Profil für die einzelnen PCR-Teilreaktionen aus und veränderten die 'Annealing'-Temperatur, die Zykluszahl und die Menge der eingesetzten template-DNA. Für den Einsatz von Pwo wurden zusätzlich die Konzentration von Mg²⁺, die Konzentration der dNTP's und die eingesetzte Menge an Enzym ermittelt. Es ergab sich der folgende PCR-Standard für die beiden Polymerasen, der in den Experimenten Anwendung fand.

PCR-Ansatz von 100 µl mit	Taq	Pwo
Menge an eingesetztem Enzym	1,5 U	0,5 U
Reaktionspuffer	1 X	1 X
MgCl ₂ /MgSO ₄	1,5 mM	1,5 mM
template-DNA	1,5 fmol	1,5 fmol
Oligonukleotide 1 und 2	je 20 pmol	je 20 pmol
Nukleotide im Vierermix	200 µM	400 µM

Das genaue Zeitprofil der PCR ist aus den Methoden (s. Durchführung einer PCR) zu entnehmen. Um eine hohe Spezifität der Bindung der Primer an die template-DNA zu gewährleisten, erfolgte das 'Annealing' in Abhängigkeit von der Primerlänge bei 65°C bzw. bei 72°C. Die Zykluszahl wurde zur Reduzierung der Fehlerquote auf 15 festgelegt. Die geringe Fehlerquote der so durchgeführten PCR's wurde anhand der Sequenziererergebnisse bestätigt.

4.1.1.2 Einsatz von Dynabeads[®] M-280 Streptavidin

Dynabeads[®] M-280 Streptavidin sind suspendierte paramagnetische Partikel von einheitlicher Größe, die mit Streptavidin beladen sind. Sie können durch Anlegen eines magnetischen Feldes beliebig oft gesammelt und wieder resuspendiert werden. Durch die hohe Affinität des Streptavidins zu Biotin ist eine Bindung von biotinylierten Molekülen, wie beispielsweise Doppelstrang-DNA, Einzelstrang-DNA, RNA, Proteinen und

Lectinen möglich. Die biotinylierten Moleküle können im Anschluß an die Bindung an Dynabeads über magnetische Separation aus Lösungen isoliert und nach Resuspension in enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden.

Ein Anwendungsbeispiel für den Einsatz sogenannter Dynabeads® ist die von uns ausgeführte *in-vitro* Mutagenese von DNA. (s. Konstrukt RhoABA) Wir gingen dabei so vor, daß wir durch den Einsatz eines 5'-biotinylierten Oligonukleotids in der PCR-Reaktion als PCR-Produkt biotinylierte Doppelstrang-DNA erhielten. Nach Bindung dieses PCR-Produktes an die Dynabeads® isolierten wir im Anschluß an eine Denaturierung der DNA den kodierenden Einzelstrang. An diesem Einzelstrang, der gebunden an die Dynabeads® vorlag, sollte die Mutagenese der DNA über die Bindung eines entsprechend veränderten Oligonukleotids und eine einfache Extension mit Pwo erfolgen. Diese Reaktion führte jedoch nicht zum erwarteten Ergebnis. Nach experimenteller Überprüfung der Dynabeads®, der Biotin-Streptavidin-Bindung und der Denaturierung war offensichtlich, daß die Ursache des Mißerfolgs in der Extensionsreaktion lag. Das für die Extension eingesetzte Oligonukleotid wurde anhand einer erfolgreichen PCR überprüft. Deshalb untersuchten wir, ob anstelle der Extensionsreaktion auch eine PCR durchgeführt werden könnte. Eine PCR in Anlehnung an den ermittelten Standard für Pwo blieb im Gegensatz zu einer mit Taq Polymerase ausgeführten PCR erfolglos. Intensive Kontrollen ergaben, daß eine PCR mit dem Enzym Pwo und an Dynabeads® gebundener Einzelstrang-DNA als Template erst nach 35 Zyklen und Einsatz von 7 fmol template-DNA zu einem elektrophoretisch nachweisbaren Ergebnis führte. Demnach stellt die Bindung der DNA an die Dynabeads® eine entscheidende Behinderung für das Enzym Pwo dar. Diese Funktionsbehinderung ergibt sich möglicherweise aus einer unspezifischen Bindung von Pwo an die Beads oder einer sterischen Behinderung. Im technischen Handbuch der Firma Dynal ist für die Durchführung einer PCR nur der Einsatz der Taq Polymerase beschrieben. Erfahrungen über den Einsatz von Pwo bei der Arbeit mit Dynabeads® liegen nicht vor.

4.1.1.3 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Der Einsatz hybridisierter Oligonukleotide zur DNA-Mutagenese (s. Konstrukt RhoACC und Konstrukt RhoBd) bot sich dort an, wo in unmittelbarer Nähe zu der zu verändernden DNA nur einmal vorkommende Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen im Gen von RhoA und RhoB vorliegen. Die beidseitige Begrenzung der Oligonukleotide durch offene Restriktionsschnittstellen ermöglichte im Anschluß an die Hybridisierung eine sofortige Ligation mit anderen DNA-Fragmenten. Der Gebrauch hybridisierter Oligonukleotide hat gegenüber der PCR den Vorteil, daß eine Veränderung in der übrigen DNA-Sequenz sehr unwahrscheinlich ist.

4.1.1.4 Einsatz verschiedener Vektoren

In den Experimenten wurden die hergestellten Konstrukte in den Plasmiden pUC19 und pKC3 kloniert. Die Klonierung der Mutanten in pUC19 erfolgte, um die vorgenommenen DNA-Veränderungen über eine Sequenzierreaktion mit Standardprimern zu verifizieren.

Für die Untersuchung der funktionellen Aktivität der Mutanten und ihres Rekrutierungsverhaltens während der Invasion von *Shigella flexneri* in HeLa-Zellen erfolgte die Umklonierung der in ihrer Sequenz verifizierten Konstrukte in pKC3. pKC3 ist ein Expressionsvektor für eukaryote Zellen. Es handelt sich um ein Derivat von pBR322 mit einem SV40 early promotor. Dieser Promotor verhindert eine zu starke Expression der transfizierten DNA. Die Rekrutierung der Rho-Mutanten läßt sich am besten in schwach transfizierten Zellen mit einer relativ geringen Expression der transfizierten DNA beurteilen. Stark transfizierte Zellen zeigen verstärkte Rho-Aktivität. Eine aufgrund zu hoher Rho-Aktivität vermehrt einsetzende Bildung von „stress fibers“ verringert den zellulären Bestand an G-Aktin. Dies führt zu einer Verringerung der bakteriellen Infektionsrate, da nicht mehr ausreichend G-Aktin für die mit dem Invasionsvorgang verbundene charakteristische Reorganisation des zellulären Zytoskeletts zur Verfügung steht.⁹³

4.1.2 Zellbiologische Methoden

4.1.2.1 Transfektion

Die Transfektion der HeLa-Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA erfolgte anhand der in den Methoden beschriebenen Kalziumphosphat-Methode (s. Transfektion von HeLa-Zellen). Andere gängige Transfektionsmethoden, die gegenüber der Kalziumphosphat-Methode eine in Abhängigkeit von der Zellart höhere Effizienz aufweisen, erfordern den Einsatz kationischer Lipidreagenzien. Die Lipidreagenzien Lipofectin, Lipofectamine, Cellfectin, DMRIE-C und TfxTM-50 wurden von uns für die Transfektion eingesetzt. Allerdings waren die Ergebnisse bezüglich der Transfektionseffizienz mit denen der Kalziumphosphat-Methode

vergleichbar. Da nicht auszuschließen ist, daß die Lipidreagenzien die Zellmembran und damit die Invasion von *Shigella flexneri* in HeLa-Zellen verändern, haben wir uns für die Kalziumphosphat-Methode entschieden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Während der Invasion von *Shigella flexneri* in HeLa-Zellen kommt es zu einer isoformspezifischen, differentiellen Rekrutierung von RhoA, RhoB und RhoC an den bakteriellen Invasionslocus. RhoA zeigt eine Akkumulation um die eindringenden Bakterien herum. RhoB und RhoC hingegen werden in die, die Bakterien umgebenden zellulären Protrusionen rekrutiert.⁹³ Dies ist insofern erstaunlich, als RhoA und RhoC auf Primärstrukturebene eine größere Homologie (93 %) besitzen als RhoB und RhoC (85 %), bzw. RhoA und RhoB (85 %). Auffällig ist, daß es C-terminal zwischen allen drei Isoformen die größten Differenzen in der Aminosäuresequenz gibt. Vergleicht man die Aminosäuren 181-189 von RhoA, die der CAAX-Box des Proteins vorangehen, mit den entsprechenden Aminosäuren von RhoC, zeigt sich, daß sich beide Isoformen in diesem, neun Aminosäuren umfassenden Abschnitt an sechs Positionen unterscheiden. Dies entspricht einer Differenz von 67 %. Zwischen RhoA und RhoB beträgt die Differenz 78 % an der vergleichbaren Stelle und zwischen RhoB und RhoC sogar 89 %.

Aufgrund des Sequenzvergleichs der Isoproteine betrafen die von uns vorgenommenen Mutationen im Rho-Protein einerseits C-terminale Aminosäuren von RhoA und andererseits die CAAX-Box der Isoformen. Nur für RhoA wurde gezeigt, daß es posttranslational zu drei spezifischen C-terminalen Veränderungen an der CAAX-Box kommt. Zuerst erfolgt eine Geranylgeranylierung am Cystein. Dem schließt sich die Abspaltung der drei C-terminalen Aminosäuren (AAX) an. Danach folgt als letzte Modifikation die Carboxylmethylierung am Cystein.¹⁴¹ Da RhoB und RhoC ebenfalls das CAAX-Motiv aufweisen und X bei allen drei Rho-Isoformen der Aminosäure Leucin entspricht, ist die Geranylgeranylierung am Cystein auch für RhoB und RhoC anzunehmen. Für RhoA wurde nachgewiesen, daß die C-terminalen Modifikationen sowohl für die Interaktion von RhoA mit den Regulationsproteinen RhoGDI und GEF als auch für die Membranbindung des Proteins bedeutsam sind.^{142, 143} Die Isoprenylierung ermöglicht die Membranbindung über die erhöhte Lipophilie von Rho.¹⁵¹ Der Carboxylmethylierung wird aufgrund der Neutralisierung der negativen Ladung des COOH-Terminus ebenfalls eine Verstärkung der Membranbindungsaffinität zugeschrieben.¹⁵²

Die intrazelluläre Lokalisation der Rho-Isoformen in Fibroblasten zeigt, daß eine kleine Fraktion von allen drei Proteinen in der Plasmamembran zu finden ist. Vorwiegend sind RhoA und RhoC jedoch im Zytosol lokalisiert und RhoB in den Endosomen und dem prälysosomalen Kompartiment.¹⁵³ Auch in rat kidney cortex cells, d. h. in polarisierten Epithelzellen ist die Lokalisation von RhoA mehr zytosolisch als membranös.¹⁵⁴ Als bedeutsam für die intrazelluläre Lokalisation erwies sich der C-Terminus der Proteine. RhoA/RhoB-Chimäre, bei denen die 14 bzw. 17 C-terminalen Aminosäuren gegenseitig ausgetauscht wurden, zeigten eine Lokalisation entsprechend dem vorhandenen C-Terminus, d. h. RhoA mit den C-terminalen Aminosäuren von RhoB zeigte dieselbe Lokalisation wie das vollständige RhoB-Protein und umgekehrt.¹⁵³ Überdies ließ sich die Lokalisation der Isoproteine innerhalb der Zelle durch eine Mutation des CAAX-Peptid-Motivs beeinflussen. Der Ersatz des Cysteins der CAAX-Box beider Isoformen durch Serin führte dazu, daß RhoA vorwiegend nukleär zu finden war und RhoB zytosolisch und nukleär.¹⁵³

Die von uns vorgenommenen Mutationen im Rho-Protein sollten nicht zu einer Beeinträchtigung der enzymatischen Aktivität und damit der biologischen Funktionen des Enzyms führen. Eine wesentliche Bedeutung besitzen in diesem Zusammenhang die Aminosäuren 32-42 des Rho-Moleküls. Da die Mikroinjektion des kleinen G-Proteins Ras, substituiert mit den Aminosäuren 25-48 von RhoA, in Fibroblasten nicht zu einer Induktion von „stress fibers“ führte, wird eine zweite C-terminal lokalisierte Effektor-domäne von Rho vermutet.¹⁵⁵ Ras und Rho besitzen auf Primärstrukturebene nur eine Homologie von 30%, die sich auf den N-terminalen Abschnitt beider Proteine bezieht.^{139, 140} Wir sind davon ausgegangen, daß die von uns erfolgten C-terminalen Veränderungen im Protein nicht zu einer Beeinflussung der GTPase-Tätigkeit führten, weil die Mutanten weiterhin vollständige Rho-Moleküle darstellten. Es sollten vom Ansatz her also C-terminal modifizierte Rho-Proteine hergestellt werden, die für die Enzymaktivität positiv sind und deren Rekrutierungsverhalten nicht dem für die Invasion von *Shigella flexneri* beschriebenen Muster entspricht bzw. negativ ist.

Experimentell nachgewiesen wurde, daß N-terminal hinzugefügte Aminosäuren die biologische Aktivität der Rho-Proteine nicht beeinflussen.¹⁵³ Deshalb wurde den Rho-Mutanten zu ihrer späteren Visualisierung in den Experimenten N-terminal die VSV-tag Sequenz vorangestellt. Die VSV-Sequenz kodiert für 11 Aminosäuren (Y-T-D-I-E-M-N-R-L-G-K) des Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G, die von dem monoklonalen Antikörper P5D4 erkannt werden.¹⁴⁷

Da der Vergleich der Aminosäuresequenz der Rho-Isoformen eine größere Homologie zwischen RhoA und

RhoC zeigt, wurden zur Untersuchung der *Shigella*-spezifischen Rekrutierung HeLa-Zellen mit den folgenden Rho-Mutanten transfiziert:

- RhoAd
- RhoCd
- RhoABd
- RhoACA
- RhoACC.

Alle transfizierten Konstrukte wurden exprimiert und waren funktionell aktiv, d.h. sie führten zu Aktinpolymerisation, erkennbar an der Bildung von „stress fibers“. Unterschiede zwischen den einzelnen Konstrukten zeigten sich im Rekrutierungsverhalten.

Die untersuchten Konstrukte RhoAd, RhoCd und RhoABd, die CAAX-Deletionsmutanten darstellen, wurden nicht an die bakterielle Eintrittsstelle von *Shigella flexneri* rekrutiert. Die funktionelle Aktivität der CAAX-Deletionsmutanten war hingegen in unseren Experimenten nicht beeinträchtigt. Letzteres steht in Übereinstimmung mit anderen veröffentlichten Untersuchungen. Eine Mutation im RhoA-Molekül an Position 190, bei der das Cystein der CAAX-Box durch Serin ersetzt wurde und damit die posttranslationalen Modifikationen von RhoA verhindert wurden, führte nicht zu einem Funktionsverlust des Proteins.¹⁵⁵

Die Bedeutung des CAAX-Motivs für die Rekrutierung von Rho könnte wie folgt erklärt werden. Im Zytoplasma liegt Rho im wesentlichen gebunden an RhoGDI vor.^{69,70} Im Rahmen der Aktivierung von Rho ist ein Kompartimentwechsel mit vorübergehender Membranbindung beschrieben.^{112,153} Dieser Kompartimentwechsel kann als Ausdruck des veränderten Gleichgewichts zwischen den Bindungskräften von RhoGDI zur GTPase und der Bindungsaffinität des isoprenylierten und carboxylmethylierten Rho-Proteins zur Membran gedeutet werden.^{74,151,152} Isoprenylierung und Carboxylmethylierung erfolgen an der CAAX-Box des Proteins. Fehlt das CAAX-Motiv, erfolgt weder die Geranylgeranylierung noch die Carboxylmethylierung von Rho. Die Bindung von Rho an die Membran könnte gestört sein, da das posttranslational unveränderte Protein nicht die erforderliche Lipophilie aufweist.

Weiterhin ist während der vorübergehenden Membranbindung eine Kolokalisation von RhoA mit den Proteinen der ERM-Familie beschrieben.¹¹² Diese Proteine verankern das Zytoskelett der Zelle in der Plasmamembran über die gleichzeitige Bindung von F-Aktin und CD44, einem zellulären Oberflächenprotein. Die Bindung der ERM-Proteine zu CD44 schließt drei weitere Proteine ein. Interessanterweise wurde RhoGDI als ein Bestandteil des Moesin/CD44-Komplexes identifiziert.¹¹¹ Die Rekrutierung von Rho zur Plasmamembran könnte demzufolge in gebundener Form an RhoGDI erfolgen. Eine sich anschließende Aktivierung von Rho bewirkt die Lösung der GTPase von RhoGDI, das seinerseits Bestandteil des Proteinkomplexes aus ERM-Proteinen mit zellulären Oberflächenrezeptoren wird. Für die Interaktion von Rho mit RhoGDI sind die posttranslationalen Modifikationen am CAAX-Motiv von wesentlicher Bedeutung.^{142,143} Die infolge der Deletion der CAAX-Box verhinderte Interaktion von Rho mit RhoGDI könnte sich demnach negativ auf die Rekrutierung auswirken und somit eine Erklärung für die nicht erfolgte Rekrutierung der CAAX-Deletionsmutanten während der bakteriellen Invasion bieten.

Das CAAX-Motiv ist anhand unserer experimentellen Ergebnisse als Voraussetzung für die Rekrutierung der Rho-Isoformen RhoA und RhoC anzusehen. Daß die CAAX-Box von genereller Bedeutung für die Rekrutierung der Rho-Isoformen während des bakteriellen Invasionsvorganges ist, muß durch die Transfektion von RhoBd, der CAAX-Deletionsmutante von RhoB, nachgewiesen werden. Aufgrund der gezeigten, nicht erfolgten Rekrutierung von RhoABd ist unseres Erachtens nach davon auszugehen.

Die Konstrukte RhoACA und RhoACC zeigten während der Invasion von *Shigella flexneri* in HeLa-Zellen das Rekrutierungsmuster von RhoC. Da RhoACA die CAAX-Box von RhoA und RhoACC die CAAX-Box von RhoC besitzt, bestätigte sich unsere Vermutung, daß sich die isoformspezifische Rekrutierung nicht durch die Konfiguration des CAAX-Motivs und die damit verbundenen posttranslationalen Modifikationen, die bisher nur für RhoA beschrieben sind, erklären läßt. Aufgrund unserer Resultate ist vielmehr davon auszugehen, daß die C-terminalen Aminosäuren ab Position 181 für das Rekrutierungsverhalten bedeutsam sind. In welcher Weise die Aminosäuren 181-189 von RhoA und RhoC bzw. die Aminosäuren 181-192 von RhoB die isoformspezifische Rekrutierung beeinflussen, muß durch den Einsatz weiterer Mutanten im HeLa-Zell-Modell ermittelt werden. Dies erfordert neben der Untersuchung der Rho-Konstrukte RhoABB und RhoABA, die in Anlehnung an die bisherigen Ergebnisse das Rekrutierungsverhalten von RhoB aufweisen müßten, die Herstellung weiterer Konstrukte. Eines dieser Konstrukte wäre beispielsweise RhoCAC, RhoC substituiert mit den Aminosäuren 181-189 von RhoA. RhoCAC müßte für die Bestätigung unserer These nach Expression in HeLa-Zellen und

Infektion mit *S. flexneri* das Rekrutierungsverhalten von RhoA zeigen.

Möglicherweise bewirken diese 9 bzw. 12 Aminosäuren über die Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine eine unterschiedliche Konformation der Isoformen, die letztendlich entscheidend für das Rekrutierungsmuster ist. Dies kann lediglich vermutet werden, da bisher nur die dreidimensionale Struktur der katalytischen Domäne von RhoA im Zusammenspiel mit einem RhoGAP veröffentlicht ist.⁷⁸ Die Röntgenstrukturanalyse von Ras wiederum berücksichtigt lediglich die Aminosäuren 1-171 des Proteins. Die C-terminalen 18 Aminosäuren konnten nicht mitkristallisiert werden, sodaß aus dieser Struktur ebenfalls keine Analogieschlüsse hinsichtlich der C-terminalen Struktur von Rho gezogen werden können.¹⁴⁰

Eine andere Möglichkeit ist, daß nur einzelne Aminosäuren im C-terminalen Molekülabschnitt für die isoformspezifische Rekrutierung verantwortlich sind. Um dieser Variante nachzugehen, erfolgte die Herstellung der Konstrukte RhoA 183, RhoA 186, und RhoA 188.

Nicht auszuschließen ist außerdem, daß die Rekrutierung auch durch weiter N-terminal gelegene Aminosäuren beeinflußt wird. Ein Vergleich der Primärstruktur der Aminosäuren 1-180 von RhoA und RhoC zeigt jedoch insgesamt nur acht Veränderungen in diesem Molekülabschnitt (4,5 %ige Differenz) gegenüber dem C-Terminus beider Isoproteine (Aminosäuren 181-189) mit einer 67 %igen Differenz. An nur drei dieser acht Aminosäurepositionen, an Position 140, 141 und 157, unterscheiden sich RhoA und RhoC dabei durch einen nicht-konservativen Austausch von Aminosäuren. Um einen möglichen Einfluß dieser Aminosäuren auf das Rekrutierungsverhalten zu untersuchen, wurde RhoA 140, d.h. RhoA substituiert mit den Aminosäuren 140 und 141 von RhoC, hergestellt.

Das Rekrutierungsverhalten dieser Rho-Mutanten wird derzeit im Labor von Herrn Dr. Adam untersucht. Abschließende Ergebnisse zum Rekrutierungsmuster liegen gegenwärtig noch nicht vor.

5 Zusammenfassung

Bakterien der Gattung *Shigella* sind die Erreger der bakteriellen Ruhr beim Menschen. Sie dringen in die Epithelzellen des terminalen Ileums und Kolons ein und rufen ulzeröse Läsionen der Darmschleimhaut hervor.

Der wesentliche Virulenzfaktor der *Shigellen* ist ihre Fähigkeit zur Invasion. Die Invasion in Epithelzellen ist Ausdruck des erregerspezifischen Infektionsprozesses, der gekennzeichnet ist durch eine vom Bakterium induzierte zelluläre Aufnahme über einen Phagozytose-ähnlichen Mechanismus. In dessen Verlauf führt die charakteristische Reorganisation des Zytoskeletts der Zelle zur Ausbildung einer blütenartigen Membranstruktur an der bakteriellen Eintrittsstelle. Die Bestandteile dieser Membranstruktur konfluieren über dem Bakterium und internalisieren es damit.

Als essentielles Glied der Signalisationskaskade erwies sich das kleine G-Protein Rho. Eine Vorbehandlung der Epithelzellen mit dem Rho-spezifischen Inhibitor C3 verhinderte die Ausbildung der charakteristischen Membranstrukturen und infolgedessen die bakterielle Infektion. Es wurde gezeigt, daß Rho als Regulator der Veränderungen des Zytoskeletts selbst an den bakteriellen Invasionslocus rekrutiert wird. Diese Rekrutierung umfaßt drei Isoformen von Rho: RhoA, RhoB und RhoC. Trotz hoher Sequenzhomologie der Isoformen untereinander (85%) existiert ein unterschiedliches Rekrutierungsmuster dieser Isoproteine an der Eintrittsstelle von *Shigella flexneri*. RhoA akkumuliert vorwiegend um die eindringenden Bakterien herum. Demgegenüber werden RhoB und RhoC in die bakterieninduzierten zellulären Protrusionen rekrutiert. Der Mechanismus dieser isoformspezifischen Rekrutierung ist nicht bekannt.

Anhand unserer Experimente konnten wir zeigen, daß das allen kleinen G-Proteinen gemeinsame C-terminale Peptid-Motiv CAAX (C = Cystein, A = aliphatische Aminosäure, X = Leucin) eine wesentliche Voraussetzung für die Rekrutierung von Rho darstellt. Die Deletion der CAAX-Box führte zu einem Verlust der Rekrutierung während der Invasion von *Shigella flexneri*. Die funktionelle Aktivität dieser Rho-Mutanten war nicht beeinträchtigt. Weiterhin wurde deutlich, daß sich die isoformspezifische Rekrutierung nicht anhand des CAAX-Motivs erklären läßt. RhoA-Mutanten, substituiert mit den Aminosäuren 181-189 von RhoC wiesen das Rekrutierungsmuster von RhoC auf unabhängig davon, ob sie das CAAX-Motiv von RhoA oder RhoC besaßen. Bedeutsam für die differentielle Rekrutierung der Isoproteine ist demnach vielmehr die präterminale Region des Moleküls. Diese Beobachtung hat weitreichende Konsequenzen für die funktionelle Rolle von Rho bei der Epithelzellinvasion durch *Shigella*.

Literaturverzeichnis

Kürzel oder laufende Nummer Au-tor Titel des Artikels, des Beitrages (bei Beitragswerken) Heraus-geber Name der Zeitschrift, Beitrags-werkes, Titel des Werkes (Beitrags-werk), Titel des Buches Band Jahr nur für Zeit-schriften *Heft-num-mer* Auflage Erschei-nungs-ort Verlag Erschei-nungs-jahr Seiten-angabe ISSN, ISBN, URL, DOI

- 1 Sansonetti PJ, d'Hauteville H, Erabichon C, Pourcel C: Molecular comparison of virulence plasmids in *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* Ann Microbiol (Paris) 1983 134A 295-318
- 2 Sansonetti PJ, Hale TL, Dammin GJ, Kapfer C, Collins HH, Formal SB: Alterations in the pathogenicity of *Escherichia coli* K-12 after transfer of plasmid and chromosomal genes from *Shigella flexneri* Infect Immun 1983 39/3 1392-1402
- 3 Robert Koch Institut Berlin Epidemiologisches Bulletin 1998 3/98
- 4 DuPont HL, Levine MM, Hornick RB, Formal SB: Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission J Infect Dis 1989 159 1126-1128
- 5 Watermann SR & Small PLC: Identification of σ^S -dependent genes associated with the stationary-phase acid-resistance phenotype of *Shigella flexneri* Mol Microbio 1996 21/5 925-940
- 6 Perdomo JJ, Cavaillon JM, Huerre M, Ohayon H, Gounon P & Sansonetti PJ: Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis J Exp Med 1994 180 1307-1319
- 7 Sansonetti PJ, Arondel J, Cantey JR, Prévost M-C & Huerre M: Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium Infect Immun 1996 64/7 2752-2764
- 8 Takeuchi A, Sprinz H, Labrec EH, Formal SB: Experimental bacillary dysentery, an electron microscopic study of the response of the intestinal mucosa to bacterial invasion Am J Patho 1965 47/6 1011-1044
- 9 Mathan MM & Mathan VI: Morphology of rectal mucosa of patients with shigellosis Rev Infect Dis 1991 13 /Suppl 4 S314-318
- 10 Islam D, Veress B, Bardhan PK, Lindberg AA, Christensson B: *In-situ* characterization of inflammatory responses in the rectal mucosa of patients with shigellosis Infect Immun 1997 65/2 739-749
- 11 DuPont HL, Hornick RB, Dawkins AT, Snyder MJ, Formal SB: The response of man to virulent *Shigella flexneri* 2a J Infect Dis 1969 119 296-299
- 12 Goren A, Freier S, Passwell JH: Lethal toxic encephalopathy due to childhood shigellosis in a developed country Pediatrics 1992 89/6 1189-1193
- 13 Labrec EH, Schneider H, Magnani TJ & Formal SB: Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenesis of bacillary dysentery J Bact 1964 88/5 1503-1518
- 14 Serény B: Experimental keratokonjunctivitis shigellosa Acta Microbiol Acad Sci Hung 1957 4 367-376
- 15 Takeuchi A, Formal SB, Sprinz H: Experimental acute colitis in the rhesus monkey following peroral infection with *Shigella flexneri* Am J Pathol 1968 52 503-520
- 16 Sansonetti PJ, Arondel J, Fontaine A, d'Hauteville H, Bernardini ML: *OmpB* (osmo-regulation) and *icsA* (cell-to-cell spread) mutants of *Shigella flexneri*: vaccine candidates and probes to study the pathogenesis of shigellosis Vaccine 1991 9 416-422
- 17 Sansonetti PJ: Molecular and cellular biology of *Shigella flexneri* invasiveness: from cell assay systems to shigellosis Curr Top Microbiol Immunol 1992 180 1-19
- 18 Parsot C & Sansonetti PJ: Invasion and the pathogenesis of *Shigella* infections Curr Top Microbiol Immunol 1996 209 25-42

- 19 Ménard R, Dehio C & Sansonetti PJ: Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella* Trends Microbiol 1996 4/6 220-226
- 20 Sansonetti PJ, Kopecko DJ, Formal SB: Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri* Infect Immun 1982 35/3 852-860
- 21 Sasakawa C, Kamata K, Sakai T, Makino S, Yamada M, Okada N, Yoshikawa M: Virulence-associated genetic regions comprising 31 kilobases of the 230-kilobase plasmid in *Shigella flexneri* 2a J Bacteriol 1988 170 2480-2484
- 22 Oaks EV, Hale TL, Formal SB: Serum immune response to *Shigella* protein antigens in rhesus monkeys and humans infected with *Shigella* spp. Infect Immun 1986 53/1 57-63
- 23 Ménard R, Sansonetti PJ, Parsot C: Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells J Bact 1993 175/18 5899-5906
- 24 Marquart ME, Picking WL, Picking WD: Soluble invasion plasmid antigen C (IpaC) from *Shigella flexneri* elicits epithelial cell responses related to pathogen invasion Infect Immun 1996 64/10 4182-4187
- 25 Bârză S, Benjelloun-Touimi Z, Phalipon A, Sansonetti P, Parsot C: Functional analysis of the *Shigella flexneri* IpaC invasin by insertional mutagenesis Infect Immun 1997 65/5 1599-1605
- 26 Tran Van Nhieu G, Ben-Ze'ev A & Sansonetti PJ: Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin and the *Shigella* IpaA invasin EMBO J 1997 16/10 2717-2729
- 27 Ménard R, Sansonetti P, Parsot C & Vasselton T: Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri* Cell 1994 79 515-525
- 28 Watari M, Tobe T, Yoshikawa M, Sasakawa C: Contact of *Shigella* with host cells triggers release of Ipa invasins and is an essential function of invasiveness EMBO J 1995 14/11 2461-2470
- 29 Mounier J, Bahrani FK, Sansonetti PJ: Secretion of *Shigella flexneri* Ipa invasins on contact with epithelial cells and subsequent entry of the bacterium into cells are growth stage dependent Infect Immun 1997 65/2 774-782
- 30 Allaoui A, Sansonetti PJ, Parsot C: MxiD, an outer membrane protein necessary for the secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins Mol Microbiol 1993 7/1 59-68
- 31 Allaoui A, Sansonetti PJ, Ménard R, Barzu S, Mounier J, Phalipon A, Parsot C: MxiG, a membrane protein required for secretion of *Shigella* spp. Ipa invasins: involvement in entry into epithelial cells and in intercellular dissemination Mol Microbiol 1995 17/3 461-470
- 32 Bahrani FK, Sansonetti PJ, Parsot C: Secretion of Ipa proteins by *Shigella flexneri*: inducer molecules and kinetics of activation Infect Immun 1997 65/10 4005-4010
- 33 Ménard R, Sansonetti P & Parsot C: The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD EMBO J 1994 13/22 5239-5302
- 34 Ménard R, Prévost M-C, Gounon P, Sansonetti P & Dehio C: The secreted Ipa complex of *Shigella flexneri* promotes entry into mammalian cells Proc Natl Acad Sci USA 1996 93 1254-1258
- 35 Clerc PL & Sansonetti PJ: Entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells: evidence for directed phagocytosis involving actin polymerization and myosin accumulation Infect Immun 1987 55/11 2681-2688
- 36 Neutra MR, Frey A & Kraehenbuhl J-P: Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization Cell 1996 86 345-348
- 37 Zychlinsky A, Prévost MC & Sansonetti PJ: *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages Nature 1992 358 167-169
- 38 Zychlinsky A, Thirumalai K, Arondel J, Cantey JR, Aliprantis AO, Sansonetti PJ: *In-vivo* apoptosis in *Shigella flexneri* infections Infect Immun 1996 64/12 5357-5365
- 39 High N, Mounier J, Prévost MC, Sansonetti PJ: IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole EMBO J 1992 11/5 1991-1999

- 40 Zychlinsky A, Fitting C, Cavaillon J-M & Sansonetti PJ: Interleukin 1 is released by murine macrophages during apoptosis induced by *Shigella flexneri* J Clin Invest 1994 94 1328-1332
- 41 Chen Y, Smith MR, Thirumalai K, Zychlinsky A: A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE EMBO J 1996 15 / 15 3853-3860
- 42 Fernandez-Prada CM, Hoover DL, Tall BD, Venkatesan MM: Human monocyte-derived macrophages infected with virulent *Shigella flexneri in-vitro* undergo a rapid cytolytic event similar to oncosis but not apoptosis Infect Immun 1997 65 / 4 1486-1496
- 43 Mounier J, Vasselon T, Hellio R, Lesourd M & Sansonetti PJ: *Shigella flexneri* enters human colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole Infect Immun 1992 60 / 1 237-248
- 44 Perdomo JJ, Gounon P & Sansonetti PJ: Polymorphonuclear leukocyte transmigration promotes invasion of colonic epithelial monolayer by *Shigella flexneri* J Clin Invest 1994 93 633-643
- 45 Sansonetti PJ, Arondel J, Cavaillon J-M, Huerre M: Role of interleukin-1 in the pathogenesis of experimental shigellosis J Clin Invest 1995 96 884-892
- 46 Beatty WL & Sansonetti PJ: Role of lipopolysaccharide in signalling to subepithelial polymorphonuclear leukocytes Infect Immun 1997 65 / 11 4395-4404
- 47 Sansonetti PJ, Ryter A, Clerc P, Maurelli AT, Mounier J: Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis Infect Immun 1986 51 / 8 461-469
- 48 Vasselon T, Mounier J, Prévost MC, Hellio R & Sansonetti PJ: Stress fiber-based movement of *Shigella flexneri* within cells Infect Immun 1991 59 / 5 1723-1732
- 49 Bernardini ML, Mounier J, d'Hauteville H, Coquis-Rondon M & Sansonetti PJ: Identification of *icsA*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin Proc Natl Acad Sci USA 1989 86 3867-3871
- 50 Vasselon T, Mounier J, Hellio R, Sansonetti PJ: Movement along actin filaments of the perijunctional area and de-novo polymerization of cellular actin are required for *Shigella flexneri* colonization of epithelial Caco-2 cell monolayers Infect Immun 1992 60 / 3 1031-1040
- 51 Sansonetti PJ, Mounier J, Prévost MC & Mège R-M: Cadherin expression is required for the spread of *Shigella flexneri* between epithelial cells Cell 1994 76 829-839
- 52 Mantis N, Prévost M-C, Sansonetti P: Analysis of epithelial cell stress response during infection by *Shigella flexneri* Infect Immun 1996 64 / 8 2474-2482
- 53 Clerc PL, Berthon B, Claret M & Sansonetti PJ: Internalization of *Shigella flexneri* into HeLa cells occurs without an increase in cytosolic Ca²⁺ concentration Infect Immun 1989 57 / 9 2919-2922
- 54 Hale TL, Morris RE & Bonventre PF: *Shigella* infection of Henle intestinal epithelial cells: role of the host cell Infect Immun 1979 24 / 3 887-894
- 55 Clerc PL & Sansonetti PJ: Evidence for clathrin mobilization during directed phagocytosis of *Shigella flexneri* by HEP2 cells Microbial Pathogenesis 1989 7 329-336
- 56 Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekman D, Hall A: The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling Cell 1992 70 401-410
- 57 Watari M, Funato S & Sasakawa C: Interaction of Ipa proteins of *Shigella flexneri* with $\alpha_5\beta_1$ integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells J Exp Med 1996 183 991-999
- 58 Clark EA, Brugge JS: Integrins and signal transduction pathways: the road taken Science 1995 268 233-239
- 59 Adam T, Arpin M, Prévost M-C, Gounon P & Sansonetti PJ: Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-Plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells J Cell Biol 1995 129 / 2 367-381
- 60 Hall A: The cellular functions of small GTP-binding proteins Science 1990 249 635-640

- 61 Hall A: Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton *Ann Rev Cell Biol* 1994 *10* 31-54
- 62 Nobes C, Hall A: Regulation and function of the rho subfamily of small GTPases *Curr Opin Genet Dev* 1994 *4* 77-81
- 63 Takai Y, Sasaki T, Tanaka K, Nakanishi H: Rho as a regulator of the cytoskeleton *Trends Biochem Sci* 1995 *20* 227-231
- 64 Symons M: Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond *Trends Biochem Sci* 1996 *21* 178-181
- 65 Machesky LM & Hall A: Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton *Trends Cell Biol* 1996 *6* 304-310
- 66 Machesky LM & Hall A: Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in rac- and rho-induced cytoskeletal reorganization *J Cell Biol* 1997 *138/4* 913-926
- 67 Isomura M, Kaibuchi K, Yamamoto T, Kawamura S, Katayama M, Takai Y: Partial purification and characterization of GDP dissociation stimulator (GDS) for the rho proteins from bovine brain cytosol *Biochem Biophys Res Commun* 1990 *169/2* 652-659
- 68 Kikuchi A, Kuroda S, Sasaki T, Kotani K, Hirata K, Katayama M, Takai Y: Functional interactions of stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins and their common substrate small GTP-binding protein *J Biol Chem* 1992 *267/21* 14611-14615
- 69 Fukumoto Y, Kaibuchi K, Hori Y, Fujioka H, Araki S, Ueda T, Kikuchi A, Takai Y: Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins *Oncogene* 1990 *5* 1321-1328
- 70 Ueda T, Kikuchi A, Ohga N, Yamamoto J, Takai Y: Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like-GTP-binding protein *J Biol Chem* 1990 *265/16* 9373-9380
- 71 Isomura M, Kikuchi A, Ohga N, Takai Y: Regulation of binding of rhoB p20 to membranes by its specific regulatory protein, GDP dissociation inhibitor *Oncogene* 1991 *6* 119-124
- 72 Bourmeyster N, Stasia M-J, Garin J, Gagnon J, Boquet P, Vignais PV: Copurification of rho protein and the rho-GDP dissociation inhibitor from bovine neutrophil cytosol, effect of phosphoinositides on rho ADP-ribosylation by the C3 exoenzyme of *Clostridium botulinum* *Biochemistry* 1992 *31* 12863-12869
- 73 Leffers H, Nielsen MS, Andersen AH, Honoré B, Madsen P, Vandekerckhove J, Celis JE: Identification of two human rho GDP dissociation inhibitor proteins whose overexpression leads to disruption of the actin cytoskeleton *Exp Cell Res* 1993 *209* 165-174
- 74 Gosser YQ, Nomanbhoy TK, Aghazadeh B, Manor D, Combs C, Cerione RA & Rosen MK: C-terminal binding domain of rho GDP dissociation inhibitor directs N-terminal inhibitory peptide to GTPases *Nature* 1997 *387* 814-819
- 75 Aktories K: Rho proteins: targets for bacterial toxins *Trends Microbiol* 1997 *5/7* 282-288
- 76 Schmidt G, Sehr P, Wilm M, Selzer J, Mann M, Aktories K: Gln 63 of rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1 *Nature* 1997 *387* 725-729
- 77 Flatau G, Lemichez E, Gauthier M, Chardin P, Paris S, Fiorentini C, Boquet P: Toxin-induced activation of the G protein p21 rho by deamidation of glutamine *Nature* 1997 *387* 729-733
- 78 Rittinger K, Walker PA, Eccleston JF, Smerdon SJ, Gamblin SJ: Structure at 1.65 Å of rhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue *Nature* 1997 *389* 758-762
- 79 Oswald E, Sugai M, Labigne A, Wu HC, Fiorentini C, Boquet P, O'Brien AD: Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by virulent *Escherichia coli* modifies the small GTP-binding proteins rho involved in assembly of actin stress fibers *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 *91* 3814-3818
- 80 Sullivan NM, Pellett S, Wilkins TD: Purification and characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile* *Infect Immun* 1982 *35/3* 1032-1040

- 81 Just I, Fritz G, Aktories K, Giry M, Popoff MR, Boquet P, Hegenbarth S, von Eichel-Streiber C: *Clostridium difficile* toxin B acts on the GTP-binding protein rho J Biol Chem 1994 269 / 14 10706-10712
- 82 Just I, Selzer J, Wilm M, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K: Glucosylation of rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B Nature 1995 375 500-503
- 83 Just I, Wilm M, Selzer J, Rex G, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K: The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the rho proteins J Biol Chem 1995 270 / 23 13932-13936
- 84 Sekine A, Fujiwara M, Narumiya S: Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase J Biol Chem 1989 264 / 15 8602-8605
- 85 Aktories K, Weller U, Chhatwal GS: *Clostridium botulinum* type C produces a novel ADP-ribosyltransferase distinct from botulinum C2 toxin FEBS Lett 1987 212 / 1 109-113
- 86 Aktories K, Rösener S, Blaschke U, Chhatwal GS: Botulinum ADP-ribosyltransferase C3, purification of the enzyme and characterization of the ADP-ribosylation in platelet membranes Eur J Biochem 1988 172 445-450
- 87 Kikuchi A, Yamamoto K, Fujita T, Takai Y: ADP-ribosylation of the bovine brain rho protein by botulinum toxin type C1 J Biol Chem 1988 263 / 31 16303-16308
- 88 Braun U, Habermann B, Just I, Aktories K, Vandekerckhove J: Purification of the 22 kDa protein substrate of botulinum ADP-ribosyltransferase C3 from porcine brain cytosol and its characterization as a GTP-binding protein highly homologous to the rho gene product FEBS Lett 1989 243 / 1 70-76
- 89 Nemoto Y, Namba T, Kozaki S, Narumiya S: *Clostridium botulinum* C3 ADP-ribosyltransferase gene J Biol Chem 1991 266 / 29 19312-19319
- 90 Nobes CD & Hall A: Rho, rac and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia Cell 1995 81 53-62
- 91 Ridley AJ & Hall A: The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors Cell 1992 70 389-399
- 92 Nishiyama T, Sasaki T, Takaishi K, Kato M, Yaku H, Araki K, Matsuura Y, Takai Y: rac p21 is involved in insulin-induced membrane ruffling and rho p21 is involved in hepatocyte growth factor-and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced membrane ruffling in KB cells Mol Cell Biol 1994 14 / 4 2447-2456
- 93 Adam T, Giry M, Boquet P & Sansonetti P: Rho-dependent membrane folding causes *Shigella* entry into epithelial cells EMBO J 1996 15 / 13 3315-3321
- 94 Watari M, Kamata Y, Kozaki S & Sasakawa C: Rho, a small GTP-binding protein, is essential for *Shigella* invasion of epithelial cells J Exp Med 1997 185 / 2 281-292
- 95 Rubin EJ, Gill DM, Boquet P, Popoff MR: Functional modification of a 21-kilodalton G protein when ribosylated by exoenzyme C3 of *Clostridium botulinum* Mol Cell Biol 1988 8 / 1 418-426
- 96 Kishi K, Sasaki T, Kuroda S, Itoh T, Takai Y: Regulation of cytoplasmic division of *Xenopus* embryo by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) J Cell Biol 1993 120 / 5 1187-1195
- 97 Miura Y, Kikuchi A, Musha T, Kuroda S, Yaku H, Sasaki T, Takai Y: Regulation of morphology by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) in Swiss 3T3 cells J Biol Chem 1993 268 / 1 510-515
- 98 Takaishi K, Kikuchi A, Kuroda S, Kotani K, Sasaki T, Takai Y: Involvement of rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) in cell motility Mol Cell Biol 1993 13 / 1 72-79
- 99 Olofsson B, Chardin P, Touchot N, Zahraoui A, Tavittian A: Expression of the ras- related *ralA*, *rho12* and *rab* genes in adult mouse tissues Oncogene 1988 3 231-234
- 100 Hotchin NA & Hall A: The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases J Cell Biol 1995 131 / 6 1857-1865

- 101 Braga V, Machesky LM, Hall A & Hotchin NA: The small GTPases rho and rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts *J Cell Biol* 1997 *137*/6 1421-1431
- 102 Bowman EP, Uhlinger DJ, Lambeth JD: Neutrophil phospholipase D is activated by a membrane-associated rho family small molecular weight GTP-binding protein *J Biol Chem* 1993 *268*/29 21509-21512
- 103 Kumagai N, Morii N, Fujisawa K, Nemoto Y, Narumiya S: ADP-ribosylation of rho p21 inhibits lysophosphatidic acid-induced protein tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activation in cultured Swiss 3T3 cells *J Biol Chem* 1993 *268*/33 24535-24538
- 104 Zhang J, King WG, Dillon S, Hall A, Feig L, Rittenhouse SE: Activation of platelet phosphatidylinositide 3-kinase requires the small GTP-binding protein rho *J Biol Chem* 1993 *268*/30 22251-22254
- 105 Chong LD, Traynor-Kaplan A, Bokoch GM, Schwartz MA: The small GTP-binding protein rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells *Cell* 1994 *79* 507-513
- 106 Gilmore AP & Burridge K: Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate *Nature* 1996 *381* 531-535
- 107 Sato N, Funayama N, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita Sa, Tsukita Sh: A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin, its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites *J Cell Sci* 1992 *103* 131-143
- 108 Berrymann M, Zsofia F, Bretscher A: Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells *J Cell Sci* 1993 *105* 1025-1043
- 109 Hanzel D, Reggio H, Bretscher A, Forte JG & Mangeat P: The secretion-stimulated 80K phosphoprotein of parietal cells is ezrin, and has properties of a membrane cytoskeletal linker in the induced apical microvilli *EMBO J* 1991 *10*/9 2363-2373
- 110 Yonemura S, Nagafuchi A, Sato N & Tsukita S: Concentration of an integral membrane protein, CD43 (leukosialin, sialophorin), in the cleavage furrow through the interaction of its cytoplasmic domain with actin-based cytoskeletons *J Cell Biol* 1993 *120*/2 437-449
- 111 Hirao M, Sato N, Kondo T, Yonemura S, Monden M, Sasaki T, Takai Y, Tsukita Sh & Tsukita Sa: Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and rho-dependent signalling pathway *J Cell Biol* 1996 *135*/1 37-51
- 112 Takaishi K, Sasaki T, Kameyama T, Tsukita Sa, Tsukita Sh & Takai Y: Translocation of activated rho from the cytoplasm to membrane ruffling area, cell-cell adhesion sites and cleavage furrows *Oncogene* 1995 *11* 39-48
- 113 Kotani H, Takaishi K, Sasaki T & Takai Y: Rho regulates association of both the ERM family and vinculin with the plasma membrane in MDCK cells *Oncogene* 1997 *14* 1705-1713
- 114 Ridley AJ & Hall A: Signal transduction pathways regulating rho-mediated stress fibre formation: requirement for a tyrosine kinase *EMBO J* 1994 *13*/11 2600-2610
- 115 Vexler ZS, Symons M, Barber DL: Activation of Na⁺-H⁺ exchange is necessary for rhoA-induced stress fiber formation *J Biol Chem* 1996 *271*/37 22281-22284
- 116 Maa M-C, Wilson LK, Moyers JS, Vines RR, Parsons JT & Parsons SJ: Identification and characterization of a cytoskeleton-associated, epidermal growth factor sensitive pp60^{c-src} substrate *Oncogene* 1992 *7* 2429-2438
- 117 Wu H & Parsons JT: Cortactin, an 80/85-Kilodalton pp60^{src} substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex *J Cell Biol* 1993 *120*/6 1417-1426
- 118 Huang C, Ni Y, Wang T, Gao Y, Haudenschild CC & Zhan X: Down-regulation of the filamentous actin cross-linking activity of cortactin by src-mediated tyrosine phosphorylation *J Biol Chem* 1997 *272*/21 13911-13915
- 119 Fincham VJ, Unlu M, Brunton VG, Pitts JD, Wyke JA & Frame MC: Translocation of src kinase to the cell

- periphery is mediated by the actin cytoskeleton under the control of the rho family of small G proteins J Cell Biol 1996 135/6 1551-1564
- 120 Chang J-H, Gill S, Settleman J & Parsons SJ: c-Src regulates the simultaneous rearrangement of actin cytoskeleton, p190RhoGAP, and p120RasGAP following epidermal growth factor stimulation J Cell Biol 1995 130/2 355-368
- 121 Wang F, Nobes CD, Hall A & Spiegel S: Sphingosine 1-phosphate stimulates rho-mediated tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin in Swiss 3T3 fibroblasts Biochem J 1997 324 481-488
- 122 Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, Buday L, Sizeland AM, Weinberg RA: Association of Sos ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation Nature 1993 363 45-51
- 123 Li N, Batzer A, Daly R, Yajnik V, Skolnik E, Chardin P, Bar-Sagi D, Margolis B, Schlessinger J: Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to ras signalling Nature 1993 363 85-88
- 124 Rozakis-Adcock M, Fernley R, Wade J, Pawson T, Bowtell D: The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the ras activator mSos1 Nature 1993 363 83-85
- 125 Amano M, Mukai H, Ono Y, Chihara K, Matsui T, Hamajima Y, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K: Identification of a putative target for rho as the serine-threonine kinase protein kinase N Science 1996 271 648-650
- 126 Ishizaki T, Naito M, Fujisawa K, Maekawa M, Watanabe N, Saito Y, Narumiya S: p160^{ROCK}, a rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of rho and induces focal adhesions FEBS Lett 1997 404 118-124
- 127 Mukai H, Toshimori M, Shibata H, Takanaga H, Kitagawa M, Miyahara M, Shimakawa M & Ono Y: Interaction of PKN with (-actinin J Biol Chem 1997 272/8 4740-4746
- 128 Narumiya S, Ishizaki T, Watanabe N: Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton FEBS Lett 1997 410 68-72
- 129 Watanabe N, Madaule P, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Kakizuka A, Saito Y, Nakao K, Jockusch M, Narumiya S: p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila diaphanous*, is a target protein for rho small GTPase and is a ligand for profilin EMBO J 1997 16/11 3044-3056
- 130 Homma Y & Emori Y: A dual function signal mediator showing RhoGAP and phospholipase C-(stimulating activities EMBO J 1995 14/2 286-291
- 131 Reinhard J, Scheel AA, Diekmann D, Ruppert C, Bähler M: A novel type of myosin implicated in signalling by rho family GTPases EMBO J 1995 14/4 697-704
- 132 Mermall V, Post PL, Mooseker MS: Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic and signal transduction Science 1998 279 527-532
- 133 Lang P, Gesbert F, Delespine-Carmagnat M, Stancou R, Pouchelet M & Bertoglio J: Protein kinase A phosphorylation of rhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes EMBO J 1996 15/3 510-519
- 134 Chardin P, Boquet P, Madaule P, Popoff MR, Rubin EJ & Gill DM: The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells EMBO J 1989 8/4 1087-1092
- 135 Paterson HF, Self AJ, Garrett MD, Just I, Aktories K, Hall A: Microinjection of recombinant p21^{rho} induces rapid changes in cell morphology J Cell Biol 1990 111 1001-1007
- 136 Bellis SL, Miller JT & Turner CE: Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin *in-vitro* by focal adhesion kinase J Biol Chem 1995 270/29 17437-17441
- 137 Dehio C, Prévost M-C & Sansonetti PJ: Invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri* induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60^{c-src}-mediated signalling pathway EMBO J 1995 14/11 2471-

- 138 Adam T: A role for the small GTPase rho in epithelial cell invasion of *Shigella* Bull Inst Pasteur 1998 96 93-102
- 139 Bourne HR, Sanders DA, McCormick F: The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism Nature 1991 349 117-127
- 140 De Vos AM, Tong L, Milburn MV, Matias PM, Jancarik J, Noguchi S, Nishimura S, Miura K, Ohtsuka E, Kim S-H: Three dimensional structure of an oncogene protein: catalytic domain of human c-H-ras p21 Science 1988 239 888-893
- 141 Katayama M, Kawata M, Yoshida Y, Horiuchi H, Yamamoto T, Matsuura Y, Takai Y: The posttranslationally modified C-terminal structure of bovine aortic smooth muscle rhoA p21 J Biol Chem 1991 266 / 19 12639-12645
- 142 Hori Y: Function of the post-translationally modified C-terminal region of rho p21 Kobe J Med Sci 1992 38 79-92
- 143 Marshall CJ: Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions Science 1993 259 1865-1866
- 144 Mohr C, Just I, Hall A, Aktories K: Morphological alterations of *Xenopus* oocytes induced by valine-14 p21^{tho} depend on isoprenylation and are inhibited by *Clostridium botulinum* C3 ADP-ribosyltransferase FEBS Lett 1990 275 168-172
- 145 Francis CL, Jerse AE, Kaper JB, Falkow S: Characterization of interactions of enteropathogenic *Escherichia coli* 0127:H6 with mammalian cells *in-vitro* J Infect Dis 1991 164 693-703
- 146 Labigne-Roussel AF, Lark D, Schoolnik G, Falkow S: Cloning and expression of an afimbrial adhesin (AFA-I) responsible for P blood group-independent, mannose-resistant hemagglutination from a pyelonephritic *Escherichia coli* strain Infect Immun 1984 46 / 1 251-259
- 147 Kreis TE: Microinjected antibodies against the cytoplasmic domain of vesicular stomatitis virus glycoprotein block its transport to the cell surface EMBO J 1986 5 / 5 931-941
- 148 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning, a laboratory manual 1-3 2. New York Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989
- 149 Hall A: Rho GTPases and the actin cytoskeleton Science 1998 279 509-514
- 150 Innis MA, Gelfond DH, Srinisky JJ, White TJ: pcr protocols 1. San Diego-London Academic Press Inc. 1990
- 151 Silvius JR & l'Heureux F: Fluorimetric evaluation of the affinities of isoprenylated peptides for lipid bilayers Biochemistry 1994 33 3014-3022
- 152 Philips MR, Pillinger MH, Staud R, Volker C, Rosenfeld MG, Weissmann G & Stock JB: Carboxyl methylation of ras-related proteins during signal transduction in neutrophils Science 1993 259 977-980
- 153 Adamson P, Paterson HF & Hall A: Intracellular localization of the p21^{tho} proteins J Cell Biol 1992 119 / 3 617-627
- 154 Boivin D, Bilodeau D, Béliveau R: Regulation of cytoskeletal functions by rho small GTP-binding proteins in normal and cancer cells Can J Physiol Pharmacol 1996 74 801-810
- 155 Self AJ, Paterson HF, Hall A: Different structural organization of ras and rho effector domains Oncogene 1993 8 655-661

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Elektrophoretische Kontrolle des PCR-Produkts RhoA ₅₋₁₈₀	39
Abbildung 2	Elektrophoretische Kontrolle des PCR-Produkts RhoABA ₅₋₁₉₃	40
Abbildung 3	Elektrophoretische Kontrolle der EcoRI/PstI-Restriktionsanalyse der Plasmide pUC19/RhoABA ₅₋₁₉₃ von Klon 1-4.....	41
Abbildung 4	Elektrophoretische Kontrolle der EcoRI/PstI-Restriktionsanalyse der Plasmide pKC3/RhoABA ₁₋₁₉₃	42
Abbildung 5	Elektrophoretische Kontrolle der Restriktionsbehandlung von NotI/VSV/KpnI/RhoA ₅₋₁₉₃ /PstI mit Fnu4HI	44
Abbildung 6	Elektrophoretische Kontrolle der NotI/PstI-Restriktionsanalyse der Plasmide pUC19/RhoACC ₅₋₁₉₃ von Klon A 1 - 2 und Klon D 1 – 4	45
Abbildung 7	Elektrophoretische Kontrolle der EcoRI/Eco32I-Restriktionsanalyse der Plasmide pUC19/RhoACC ₅₋₁₉₃ und pKC3/RhoA ₁₋₁₉₃	46
Abbildung 8	Nachweis der funktionellen Aktivität des Konstrukts RhoAd.....	86
Abbildung 9	Nachweis der funktionellen Aktivität des Konstrukts RhoCd	86
Abbildung 10	Rekrutierungsverhalten des Konstrukts RhoAd während der Invasion von <i>Shigella flexneri</i> in HeLa-Zellen.....	87
Abbildung 11	Rekrutierungsverhalten des Konstrukts RhoCd während der Invasion von <i>Shigella flexneri</i> in HeLa-Zellen.....	87
Abbildung 12	Nachweis der funktionellen Aktivität des Konstrukts RhoABd	88
Abbildung 13	Rekrutierungsverhalten des Konstrukts RhoABd während der Invasion von <i>Shigella flexneri</i> in HeLa-Zellen.....	88
Abbildung 14	Nachweis der funktionellen Aktivität des Konstrukts RhoACA	89
Abbildung 15	Nachweis der funktionellen Aktivität des Konstrukts RhoACC.....	89
Abbildung 16	Rekrutierungsverhalten des Konstrukts RhoACA während der Invasion von <i>Shigella flexneri</i> in HeLa-Zellen.....	90
Abbildung 17	Rekrutierungsverhalten des Konstrukts RhoACC während der Invasion von <i>Shigella flexneri</i> in HeLa-Zellen.....	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht über die Rho-Konstrukte	34
Tabelle 2	Verwendete Oligonukleotide	37
Tabelle 3	Transfektionsergebnisse ausgewählter Rho-Konstrukte in HeLa-Zellen	91

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
'	Minuten
''	Sekunden
>	größer als
<	kleiner als
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µg/µl	Mikrogramm pro Mikroliter
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
0,2 M	0,2 molar
2 x	2 mal
2 X	2fach konzentriert
A	Adenin
A. bid.	Aqua bidest
A _{260nm}	Absorption bei einer Wellenlänge von 260 Nanometern
aa ₁₋₅₀	Aminosäuren 1 bis 50
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bid.	Aqua bidest
AV	Ausgangsvolumen
b	Basen
BBS	Puffer, s. 2.3.2.2
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	Konzentration
ca.	circa
Caco2	humane Colonepithelzelllinie
CHO	Epithelzelllinie von Hamsterovarien
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase, Phosphatase
CO ₂	Kohlendioxid
d.h.	das heißt
ddNTP	didesoxy-Nukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
E-Phorese	Elektrophorese
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor = epidermaler Wachstumsfaktor
F-Aktin	filamentäres Aktin
FCS	Fötale Kälberserum
fmol	femtomol
G	Guanin
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
g/mol	Gramm pro mol
G-Aktin	globuläres Aktin
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HeLa	humane Cervixkarzinomzelllinie
Henle 407	humane, fötale intestinale Epithelzelllinie
HGF	hepatocyte growth factor = Hepatozyten-Wachstumsfaktor
ICE	Interleukin-1β converting enzyme
IL-1β	Interleukin-1β
kb	Kilobasen

KB	Epithelzelllinie, von humanen epidermalen Karzinomzellen abstammend
l	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
LPS	Lipopolysaccharid
m	Masse
m/v	Masse pro Volumen
MDCK	Epithelzelllinie, von Hundenierenrindenzellen abstammend
m _{DNA}	Menge an DNA
MEM	Minimal Essential Medium, Zellmedium
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mol	mol
MW	Molekulargewicht
nm	Nanometer
nM	nanomolar
o/n	over night = über Nacht
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline, Phosphatpuffer
PCR	polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
PDGF	platelet-derived growth factor = Thrombozyten-Wachstumsfaktor
PEG	Polyethylenglykoll
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositoldiphosphat
PKN	Proteinkinase N
pmol	picomol
RhoA ₁₋₁₈₉	RhoA mit den Aminosäuren 1 bis 189
RhoA ₅	RhoA mit Aminosäure 5 beginnend
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
S.	Seite
SC 301	Stamm von <i>Shigella flexneri</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, Detergens
SSPE	Natriumchlorid-Natriumphosphat-EDTA
T	Thymin
T84	humane Colonepithelzelllinie
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TG 1	Stamm von <i>Escherichia coli</i>
Tm	Hybridisierungstemperatur
TPA	Tetradecanoylphorbol-Acetat
TSB	Tryptic soy broth, Medium
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
U/μl	Units pro Mikroliter
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
V/cm	Volt pro Zentimeter

Lebenslauf

Name: Birgit Bohm
Geburtsdatum: 02. 09. 1970
Geburtsort: Berlin

Schulbildung

1977 -1987 Besuch der Polytechnischen Oberschule mit Abschluß der mittleren Reifeprüfung
1987 - 1989 Besuch der Erweiterten Oberschule in Berlin-Mitte, Abitur

Hochschulbildung

1989 - 1990 Vorpraktikum im Städtischen Krankenhaus Berlin-Mitte als Voraussetzung für die Zulassung zum Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität Berlin

1990 - 1998 Studium der Humanmedizin an der Charité, der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin

1993 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1995 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1995 - 1996 experimentelles Arbeiten in einem Forschungslabor des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene der Charité im Rahmen einer Promotionsarbeit, Erhalt eines Stipendiums der Forschungskommission der Charité

1996 – 1997 Praktisches Jahr an der Charité, dem Klinikum Kröllwitz der Martin-Luther-Universität Halle und dem Krankenhaus Lichtenberg in Berlin

1997 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

ab 1998 Tätigkeit als AIP im Werner Forßmann Krankenhaus in Eberswalde

Selbständigkeitserklärung

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

11. 02. 1999, Bernau Birgit Bohm