
Neue Interaktionen des IQGAP1 Proteins

Annika Heil

2010

Biologie

Neue Interaktionen des IQGAP1 Proteins

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Annika Heil

aus Datteln

2010

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Christian Klämbt

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Volker Gerke

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Alexander Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2010

Tag der Promotion: 16.07.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Die Bedeutung von Ca^{2+} -Ionen als <i>second messenger</i>	3
2.2	Die S100 Proteinfamilie	5
2.2.1	Struktureller Aufbau der S100 Proteine	5
2.2.2	Funktionen der S100 Proteine	8
2.3	S100P	10
2.4	Die IQGAP Proteinfamilie	13
2.5	IQGAP1	14
2.5.1	IQGAP1 als Regulator des Zytoskeletts	16
2.5.2	Die Bedeutung von IQGAP1 bei der Zell-Zell-Adhäsion	17
2.5.3	Die Bedeutung von IQGAP1 bei Transkriptionsprozessen	18
2.5.4	Die Bedeutung von IQGAP1 in der Signaltransduktion aktivierter RTKs	19
2.5.5	Regulation des IQGAP1 Proteins	21
2.6	Die ERM Proteinfamilie	24
2.7	Ezrin	26
2.8	Zielsetzung	28
3	Material und Methoden	29
3.1	Material	29
3.1.1	Verwendete Organismen und Zelllinien	29
3.1.2	Vektoren	30
3.1.3	DNA-Konstrukte	31
3.1.4	Oligonukleotide	34
3.1.5	Antikörper	34
3.1.6	Enzyme	35
3.1.7	Chemikalien	35
3.1.8	Sonstige Materialien	38
3.1.9	Geräte	38
3.2	Molekularbiologische Methoden	40
3.2.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	40
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	40
3.2.3	Gelextraktion	41
3.2.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	41
3.2.5	Reinigung von DNA-Fragmenten über eine Spinsäule	41

3.2.6	Ligation.....	41
3.2.7	Kultivierung von <i>E. coli</i>	42
3.2.8	Bestimmung des Bakterienwachstums.....	42
3.2.9	Herstellung CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i>	42
3.2.10	Transformation CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i>	43
3.2.11	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	43
3.2.12	Mutagenese-PCR.....	44
3.2.13	Zweistufige Mutagenese-PCR.....	46
3.2.14	DNA-Sequenzierung.....	48
3.3	Zellbiologische Methoden.....	49
3.3.1	Passagieren adhärent wachsender Zellen.....	49
3.3.2	Passagieren semiadhärent wachsender Zellen.....	49
3.3.3	Langzeitaufbewahrung von Zellen.....	49
3.3.4	Zellzahlbestimmung.....	50
3.3.5	Liposomen vermittelte Transfektion von Zellen.....	50
3.3.6	Stimulierung von Zellen.....	50
3.3.7	Immunfluoreszenz-Analyse.....	51
3.3.8	Migrationsassay.....	52
3.3.9	Herstellung von Zelllysaten.....	53
3.3.10	Immunpräzipitation mittels Protein A-Sepharose.....	54
3.3.11	Immunpräzipitation mittels magnetischer Dynabeads.....	55
3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	56
3.4.1	SDS-PAGE.....	56
3.4.2	Proteinfärbung mittels Coomassie Brilliant Blau.....	57
3.4.3	Western Blot-Analyse.....	57
3.4.4	Strippen von Membranen.....	58
3.4.5	Bradford-Assay.....	58
3.4.6	Schätzung der Proteinkonzentration mittels SDS-PAGE.....	58
3.4.7	<i>In-vitro</i> -Transkription/Translation.....	59
3.4.8	Autoradiographie.....	59
3.4.9	Rekombinante Proteinexpression in <i>E. coli</i>	59
3.4.10	Rekombinante Proteinexpression in SF9-Zellen.....	61
3.4.11	Reinigung von S100 Proteinen.....	62
3.4.12	Reinigung (His) ₆ -fusionierter Proteine.....	62
3.4.13	Reinigung GST-fusionierter Proteine.....	63

3.4.14	<i>In-vitro</i> -Bindungsstudien mit immobilisierten GST-Fusionsproteinen	64
3.4.15	<i>In-vitro</i> -Bindungsstudien mit immobilisierten (His) ₆ -Fusionsproteinen	65
3.4.16	Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie.....	67
4	Ergebnisse	69
4.1	Analyse der S100P/IQGAP1-Komplexbildung in Zellen.....	70
4.1.1	Immunfluoreszenz-Analyse.....	70
4.1.2	Co-Immunpräzipitation.....	72
4.2	Biochemische Charakterisierung der S100P/IQGAP1-Interaktion	73
4.2.1	Expression von GST-IQGAP1 in SF9-Zellen.....	73
4.2.2	Expression rekombinanter S100 Derivate in <i>E. coli</i>	75
4.2.3	Analyse der S100P/IQGAP1-Interaktion	79
4.2.4	Kartierung der IQGAP1-Bindungsstelle im S100P Protein	80
4.2.5	Charakterisierung der Mutante S100P Δ 21-25.....	85
4.2.6	Kartierung der S100P-Bindungsstelle im IQGAP1 Protein	89
4.2.7	<i>Surface Plasmon Resonance</i> (SPR)-Analyse	91
4.3	Funktionelle Analyse der S100P/IQGAP1-Interaktion	93
4.3.1	Analyse des Einflusses der S100P/IQGAP1-Interaktion auf Zellmigration.....	93
4.3.2	Einfluss der S100P/IQGAP1-Interaktion auf die MAPK-Signaltransduktion	95
4.4	Analyse der potenziell direkten IQGAP1/Ezrin-Interaktion	99
4.4.1	Analyse der IQGAP1/Ezrin-Komplexbildung in Zellen.....	99
4.4.2	Expression rekombinanter Ezrin Derivate in <i>E. coli</i>	103
4.4.3	<i>In-vitro</i> -Bindungsstudien mit isolierten IQGAP1 und Ezrin Derivaten	105
5	Diskussion	109
5.1	Rekombinante bzw. zellfreie Proteinexpression	110
5.2	Charakterisierung der S100P/IQGAP1-Interaktion	112
5.2.1	Nachweis der direkten und Ca ²⁺ -abhängigen S100P/IQGAP1-Interaktion	112
5.2.2	Die S100P/IQGAP1-Komplexbildung in Zellen	112
5.2.3	Kartierung der S100P/IQGAP1-Interaktionsmotive	113
5.3	Einfluss der S100P/IQGAP1-Interaktion auf die MAPK-Kaskade	117
5.4	Analyse des IQGAP1/Ezrin-Komplexes.....	121
5.5	Die Interaktionen von S100P, IQGAP1 und Ezrin im kortikalen Zytoskelett.....	124
6	Literaturverzeichnis	127
7	Anhang	139
7.1	Plasmidkarten	139
7.2	Abkürzungsverzeichnis.....	143

1 Zusammenfassung

Ca²⁺-bindende Proteine der S100-Familie sind wichtige Komponenten bei der Umwandlung transien-ter Ca²⁺-Signale in zelluläre Antworten. Die Bindung von Ca²⁺-Ionen führt dabei zu einer Konformationsänderung der S100 Proteine, die es ihnen ermöglicht mit Zielproteinen zu interagieren und darüber deren Funktionen zu beeinflussen. Als ein derartiger Ca²⁺-abhängiger Bindungspartner des S100 Proteins S100P konnte das Multidomänenprotein IQGAP1 identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um ein ubiquitär exprimiertes Mitglied der IQGAP Proteinfamilie, welches durch die Interaktion mit diversen Bindungspartnern an einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie beispielsweise der Organisation des Zytoskeletts und dem MAPK-Signalweg, beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei der S100P/IQGAP1-Interaktion um eine strikt Ca²⁺-abhängige Bindung handelt, die durch eine Dissoziationskonstante von 0,08 µM charakterisiert ist. Die Bindung erfolgt im Wesentlichen durch die IQ-Domäne des IQGAP1 Proteins und einen Bereich innerhalb des ersten EF-Hand-Loops des S100P Proteins. Hierdurch konnte ein neues strukturelles Motiv identifiziert werden, über das S100 Proteine mit ihren Zielproteinen interagieren.

Zudem konnte gezeigt werden, dass es nach EGF-Stimulierung von Zellen zu einer Co-Lokalisation von S100P und IQGAP1 an oder in der Nähe der Plasmamembran kommt und dass diese Komplexbil- dung mit einer reduzierten Tyrosinphosphorylierung des IQGAP1 Proteins einhergeht. Diese IQGAP1- Tyrosinphosphorylierung kann die Funktion des IQGAP1 Proteins bei Rezeptor-Tyrosinkinase stimu- lierten Signalwegen regulieren (Yamaoka-Tojo *et al.* 2004, Yamaoka-Tojo *et al.* 2006, Meyer *et al.* 2008, Smith *et al.* 2010). Überexpressionsstudien konnten einen negativen Einfluss der S100P- Bindung auf die Funktion des IQGAP1 Proteins bei der B-Raf/MEK/ERK-Signaltransduktion zu Tage fördern. Spezifisch bedingt S100P eine reduzierte Assoziation von B-Raf mit IQGAP1 und eine verminderte MEK1/2-Aktivierung. Somit handelt es sich beim S100P um einen neuen Ca²⁺- abhängigen Regulator der IQGAP1-Funktion in der EGF-induzierten Signalweiterleitung.

In der vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus erstmals eine direkte Interaktion von IQGAP1 und Ezrin dokumentiert werden. Ezrin ist ein Membran/Aktinzytoskelett-verbindendes Mitglied der ERM Proteinfamilie, das im Zytoplasma der Zelle in einer inaktiven Konformation vorliegt. In dieser Form sind durch intramolekulare Assoziation der N- und der C-terminalen Domäne wichtige Bindungsstel- len für Membranproteine und F-Aktin maskiert. Erst nach Aktivierung durch Bindung an PI(4,5)P₂ und Phosphorylierung eines konservierten Threoninrestes oder durch die Interaktion mit S100P werden diese Bindungsstellen freigelegt. Die Wechselwirkung zwischen IQGAP1 und Ezrin erfolgt offenbar sowohl in stimulierten als auch in unstimulierten Zellen und wird innerhalb des Ezrin Proteins über

einen Bereich der N-terminalen Domäne vermittelt, der nur in der geöffneten Konformation des Proteins zugänglich ist.

Da eine Stimulus-induzierte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Rekrutierung der drei hier untersuchten Proteine in Regionen in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran bewirkt, besteht die Möglichkeit, dass S100P, IQGAP1 und Ezrin in einem trimeren Komplex vorliegen und gemeinsam an der koordinierten Regulation des kortikalen Zytoskeletts und der MAPK-Signaltransduktion nach Aktivierung der Zelle mit Wachstumsfaktoren beteiligt sind.

2 Einleitung

2.1 Die Bedeutung von Ca^{2+} -Ionen als *second messenger*

Calcium (Ca^{2+}) spielt als sog. *second messenger* eine wesentliche Rolle bei diversen zellulären Prozessen. Der Begriff *second messenger* bedeutet, dass intrazellulär freigesetztes Ca^{2+} als intermediäres und transientes Signal als Folge eines externen Stimulus dient. Bei solchen Stimuli kann es sich um die Bindung extrazellulärer Signalmoleküle wie z.B. Hormone, Wachstumsfaktoren oder Neurotransmitter an ihre entsprechenden Rezeptoren oder auch um eine Spannungsänderung an der Membran handeln. An den durch solche Stimuli ausgelösten Vorgängen – Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, Stimulierung Ca^{2+} -sensitiver Prozesse sowie Beseitigung der Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytoplasma – ist eine ganze Maschinerie von zellulären Komponenten beteiligt, die auch als *Ca²⁺-toolkit* bezeichnet werden (Berridge *et al.* 2000).

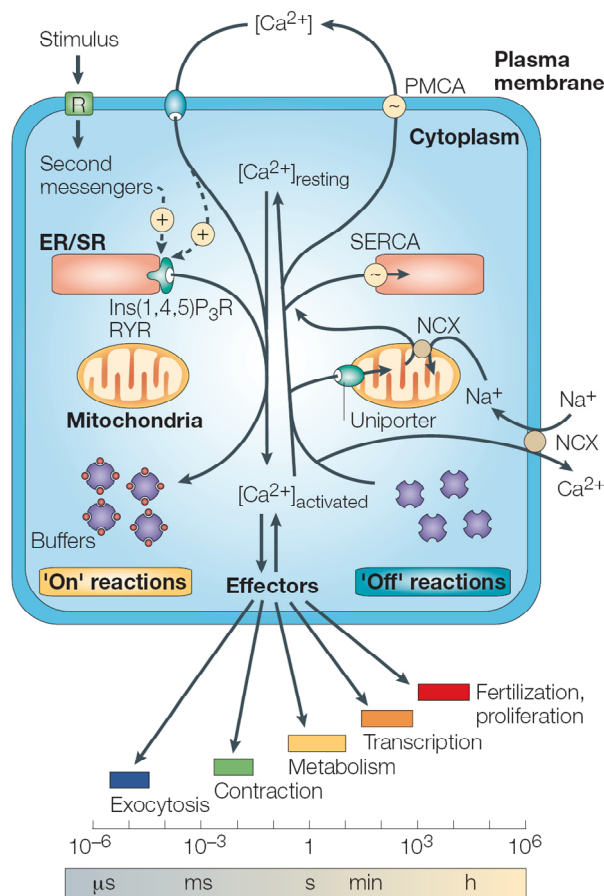


Abb. 2.1: Ca^{2+} -Signale und -Homöostase

Durch die Bindung extrazellulärer Signalmoleküle an ihre entsprechenden Rezeptoren (R) wird zum einen der Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum sowie die Bildung von *second messengern* wie Inositol-1,4,5-trisphosphat induziert. Die Bindung von Inositol-1,4,5-trisphosphat an seinen Rezeptor (Ins(1,4,5) P_3R) sowie die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an den Ryanodinrezeptor (RyR) bewirken die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem endo- bzw. sarkoplasmatischen Retikulum (ER/SR). Die freigesetzten Ca^{2+} -Ionen werden zum einen von Ca^{2+} -puffernden Proteinen abgefangen, zum anderen aktivieren sie diverse Effektor-Proteine, welche das Ca^{2+} -Signal in spezifische zelluläre Antworten umwandeln. Durch schnellen Rücktransport der Ca^{2+} -Ionen in den extrazellulären Raum und in das ER/SR wird die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration auf den Wert im Ruhezustand der Zelle gebracht. Hierfür sorgen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) und Ca^{2+} -ATPasen in der Plasmamembran (PMCA) und im sarko-/endoplasmatischen Retikulum (SERCA). Die Mitochondrien unterstützen diesen Vorgang, indem sie ebenfalls Ca^{2+} -Ionen aufnehmen und diese erst später langsam ins Zytosol zurück entlassen. Abbildung aus Berridge *et al.* 2003.

Die Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma einer ruhenden Zelle liegt bei ungefähr 100 nM. Demgegenüber stehen Ca^{2+} -Konzentrationen von ca. 1 mM im extrazellulären Raum und von ca. 0,5 mM im endo- bzw. sarkoplasmatischen Retikulum (ER/SR), welches als intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher dient. Die geringe Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol wird strikt kontrolliert und beibehalten. Dies erfolgt durch verschiedene Transporter, welche die Ca^{2+} -Ionen entgegen des starken elektrochemischen Gradienten in den Extrazellulärraum oder ins endo- bzw. sarkoplasmatische Retikulum (ER/SR) pumpen (Strehler *et al.* 2004).

Durch das Öffnen spannungsabhängiger oder ligandenkontrollierter Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran und im ER bzw. SR kommt es zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration auf $\geq 1 \mu\text{M}$. Der größte Teil der einströmenden Ca^{2+} -Ionen wird durch Ca^{2+} -puffernde Proteine abgefangen sowie kurzzeitig in die Mitochondrien gepumpt, von wo aus sie später allmählich wieder ins Zytosol abgegeben werden (Berridge *et al.* 2000, Ganitkevich 2003). Der Rest der einströmenden Ca^{2+} -Ionen aktiviert entweder direkt Ca^{2+} -sensitive Enzyme oder übt seine Wirkung indirekt über die Aktivierung Ca^{2+} -bindender Proteine aus, welche ihrerseits wieder die Aktivität vieler verschiedener Zielproteine regulieren. Hierdurch werden verschiedene Prozesse in Gang gesetzt, die von schnellen zellulären Vorgängen wie Exozytose bis hin zu länger dauernden Vorgängen wie Fertilisation reichen (siehe Abb. 2.1).

Die individuelle Kombination der Komponenten des Ca^{2+} -*toolkits*, bestehend aus den verschiedenen Rezeptoren, Kanälen, Ca^{2+} -Transportern, Ca^{2+} -Puffern sowie Ca^{2+} -Sensorproteinen, ermöglicht es den verschiedenen Zelltypen, ganz individuell auf ein Ca^{2+} -Signal zu reagieren. Hierdurch entsteht die große Vielfalt innerhalb der Ca^{2+} -abhängigen zellulären Antworten.

2.2 Die S100 Proteinfamilie

Die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration infolge eines externen Stimulus muss auf molekularer Ebene derart umgewandelt werden, dass eine spezifische zelluläre Antwort erfolgt. Den ersten Schritt bei dieser Umwandlung übernehmen Ca^{2+} -Sensorproteine, welche durch die Bindung von Ca^{2+} -Ionen aktiviert werden und durch Interaktion mit ihren spezifischen Zielproteinen weitere zelluläre Prozesse in Gang setzen.

Bei den meisten dieser Ca^{2+} -Sensorproteine handelt es sich um sogenannte EF-Hand Ca^{2+} -bindende Proteine. Zu dieser Proteinfamilie gehören bekannte Vertreter wie Calmodulin, Troponin C sowie Parvalbumin. Die größte Untergruppe innerhalb dieser Proteinfamilie wird allerdings von den S100 Proteinen gebildet (Heizmann *et al.* 2007).

Die S100 Proteine sind kleine, azide Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10 und 12 kDa, die bislang ausschließlich in Vertebraten identifiziert wurden (Santamaria-Kisiel *et al.* 2006). Die ersten zwei von bislang 21 bekannten S100 Proteinen wurden erstmalig 1965 von B. W. Moore isoliert (Moore 1965). Die Namensgebung „S100“ erfolgte aufgrund ihrer Löslichkeit (engl. *Solubility*) in 100%iger Ammoniumsulfatlösung. Intrazellulär agieren sie als Homo- oder Heterodimere (Zimmer *et al.* 1995) und weisen einen stark konservierten strukturellen Aufbau auf.

2.2.1 Struktureller Aufbau der S100 Proteine

Das EF-Hand-Motiv stellt die eigentliche Ca^{2+} -bindende Struktur der S100 Proteine dar. Diese auch Helix-Loop-Helix-Motiv genannte strukturelle Einheit besteht aus zwei α -Helices, welche durch eine Ca^{2+} -bindende Schleife (Loop) miteinander verbunden sind. Der Ca^{2+} -Bindungsloop zeichnet sich typischerweise durch 12 Aminosäuren nach dem Muster [X a Y a Z a -Y a -X a a -Z] aus, wobei X, Y und Z für die an der Koordination des Ca^{2+} -Ions beteiligten Liganden stehen und a für nicht beteiligte, beliebige Reste. Somit wird pro EF-Hand ein Ca^{2+} -Ion pentagonal bipyramidal koordiniert (Abb. 2.2) (Kretsinger *et al.* 1973).

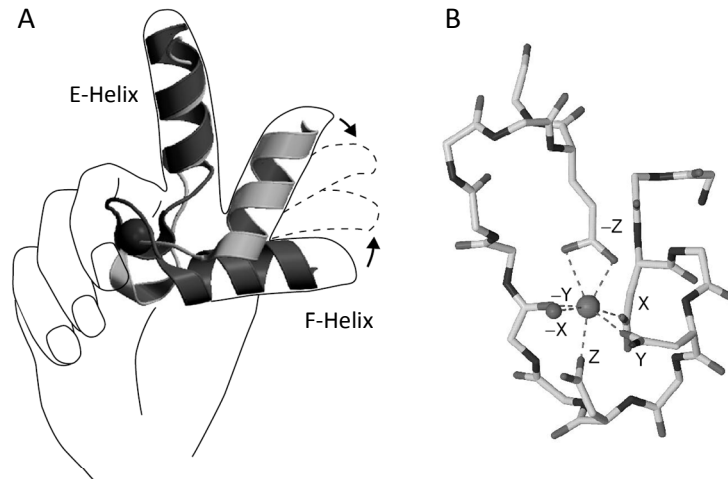


Abb. 2.2: Das Ca^{2+} -bindende EF-Hand Motiv

(A) Schematische Darstellung eines klassischen EF-Hand-Motivs. Dieses weist eine Helix-Loop-Helix-Topologie auf, die einem gespreizten Zeigefinger (E-Helix), einem gekrümmten Mittelfinger (Loop) und einem gespreizten Daumen (F-Helix) einer rechten Hand entspricht. Durch die Koordination eines Ca^{2+} -Ions ändert sich die Position der F-Helix und die Struktur geht von einer geschlossenen Konformation (hellgrau) in eine geöffnete Konformation (dunkelgrau) über. Im Gegensatz zu den meisten EF-Hand Proteinen erfolgt bei den S100 Proteinen die Öffnung der Struktur durch die Umorientierung der zweiten E-Helix. (B) Das Ca^{2+} -Ion wird im Ca^{2+} -Bindungsloop über sechs Reste pentagonal bipyramidal koordiniert. Dabei handelt es sich an den Positionen X und Y meist um die Seitenketten von Aspartat oder Asparagin, an Position Z um die Seitenketten von Aspartat, Asparagin oder Serin und an Position -Y um ein Carbonylsauerstoff der Hauptkette. Die Position -X wird üblicherweise von einem Wassermolekül eingenommen und an Position -Z ist entweder die Seitenkette von Glutamat oder Aspartat zu finden, welches als bidentater Ligand fungiert (B). Abbildung verändert nach Lewit-Bentley *et al.* 2000.

S100 Proteine bestehen aus zwei EF-Hand-Motiven, die durch eine kurze flexible Region miteinander verbunden sind und von N- und C-terminalen Extensionen flankiert werden (Abb. 2.3) (Marenholz *et al.* 2004). Bei der C-terminalen EF-Hand der S100 Proteine handelt es sich um eine klassische EF-Hand, da sie den typischen aus 12 Aminosäuren bestehenden Ca^{2+} -Bindungsloop aufweist, welcher von den Helices III und IV eingerahmt wird. Die N-terminale EF-Hand weist einen leicht modifizierten Ca^{2+} -Bindungsloop bestehend aus 14 Aminosäuren auf, der charakteristisch für S100 Proteine ist. Daher wird diese EF-Hand auch „S100 spezifische“ oder „Pseudo“ EF-Hand genannt. Diese veränderte Struktur resultiert im Vergleich zur klassischen EF-Hand ($K_D = 1\text{-}50 \mu\text{M}$) in einer geringeren Ca^{2+} -Affinität ($K_D = 200\text{-}500 \mu\text{M}$). Daher ist anzunehmen, dass nach Aktivierung der Zelle und Ca^{2+} -Einstrom eine Koordination von Ca^{2+} -Ionen nur über die C-terminale EF-Hand erfolgt (Santamaria-Kisiel *et al.* 2006).

Einige S100 Proteine binden neben Ca^{2+} - auch Mg^{2+} -, Zn^{2+} - oder Cu^{2+} -Ionen. Die Koordination von Mg^{2+} -Ionen erfolgt dabei mit sehr geringer Affinität und bei einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration werden diese sofort durch Ca^{2+} -Ionen ersetzt (Allouche *et al.* 1999). Die Bindung von Cu^{2+} -Ionen konnte bislang für S100B ($K_D = 0,46 \mu\text{M}$) und S100A5 ($K_D = 4 \mu\text{M}$) gezeigt werden (Nishikawa *et al.* 1997, Schafer *et al.* 2000), wobei dies bei S100B in Zusammenhang mit einer neuroprotektiven Funktion gebracht wurde (Nishikawa *et al.* 1997). Die Affinitäten für Zn^{2+} -Ionen

bewegen sich in einem weiten Bereich mit Dissoziationskonstanten zwischen 4 nM und 2 mM (Heizmann *et al.* 1998). Bei den im Zytoplasma üblichen Zn^{2+} -Konzentrationen von 1-5 nM scheint eine Bindung von Zn^{2+} -Ionen intrazellulär eher von geringer Bedeutung zu sein. Im Extrazellularraum hingegen, wo die Zn^{2+} -Konzentrationen im mikromolaren Bereich liegen (Perrin *et al.* 1971), kann die Zn^{2+} -Bindung eine wichtige regulatorische Funktion für S100 Proteine darstellen (Marenholz *et al.* 2004).

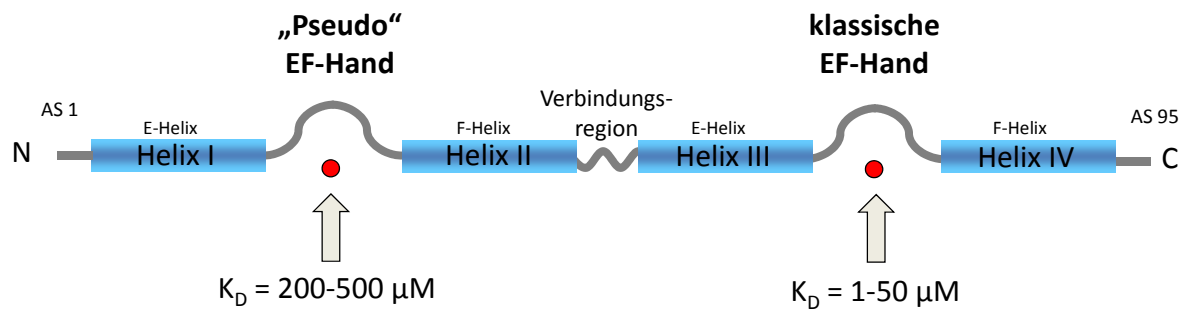


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des S100 Proteins

Die S100 Proteine verfügen über zwei EF-Hand Strukturmodule, die über eine kurze flexible Region verbunden sind und von kurzen N- und C-terminalen Extensionen flankiert werden. Jede EF-Hand besteht aus zwei α -Helices und einem Ca^{2+} -Bindungsloop. Bei der N-terminalen EF-Hand handelt es sich um eine „Pseudo“ EF-Hand, die spezifisch für S100 Proteine ist. Die C-terminale EF-Hand weist einen klassischen Aufbau auf, was sich auch in der höheren Ca^{2+} -Affinität (geringerer K_D -Wert) widerspiegelt.

S100 Proteine bilden symmetrische Homo- und Heterodimere (Bhattacharya *et al.* 2004). Diese nicht-kovalente Dimerbildung erfolgt durch Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Aminosäuren der Helices I und I' sowie der Helices IV und IV'. Die Bildung von Dimeren wird weithin als essenziell für ihre Interaktion mit spezifischen Zielproteinen betrachtet und ist für alle S100 Proteine beschrieben worden. Lediglich S100G liegt ausschließlich als Monomer vor, was sich auch in seiner Funktion als Ca^{2+} -pufferndem anstelle eines Ca^{2+} -Signal umwandelnden Proteins widerspiegelt (Schwaller 2009).

Eine weitere Abweichung von der Norm stellen S100 Proteine mit nicht-funktionellen EF-Händen dar. So weisen die N-terminalen EF-Hände der S100 Proteine S100A7 und S100A16 sowie die C-terminale EF-Hand des S100A14 Proteins Mutationen innerhalb des Ca^{2+} -Bindungsloops auf, die eine Koordination von Ca^{2+} -Ionen verhindern (Marenholz *et al.* 2004, Brodersen *et al.* 1998). Im S100A10 Protein sind sogar beide EF-Hände unfähig Ca^{2+} zu koordinieren. Allerdings nimmt es eine Konformation an, die der Ca^{2+} -gebundenen Konformation der anderen S100 Proteine entspricht, wodurch eine Ca^{2+} -insensitive Interaktion mit seinen spezifischen Zielproteinen gewährleistet ist (Rety *et al.* 1999).

Die Ca^{2+} -induzierte Konformationsänderung der S100 Proteine zeichnet sich vor allem durch die starke Umorientierung der Helix III (zweite E-Helix) aus. Hierin unterscheiden sich die S100 Proteine von den meisten anderen EF-Hand Proteinen wie z.B. Calmodulin oder Troponin C, bei welchen die Helix F nach Ca^{2+} -Bindung einer starken Umorientierung unterliegt (Abb. 2.2) (Yap *et al.* 1999). Die

Position der Helix IV (zweite F-Helix) bleibt hingegen bei den S100 Proteinen weitgehend unverändert, da sie an der Dimerisierung beteiligt ist. Gleiches gilt für die Positionen der Helices I und II der N-terminalen EF-Hand. Durch die Positionsänderung der Helix III kommt es zu einer räumlichen Öffnung der S100 Proteine, welche in der Bildung einer hydrophoben Spalte resultiert. Dieser hydrophobe Bereich wird durch Aminosäureseitenketten der Helix III und IV und der Verbindungsregion gebildet. Er gilt weithin als der Bereich, über den die Interaktion mit den jeweiligen Zielproteinen erfolgt (Santamaria-Kisiel *et al.* 2006, Bhattacharya *et al.* 2004). Allerdings konnte für das S100B Protein gezeigt werden, dass Peptidderivate der Ndr-Kinase sowie p53 und CapZ im Komplex mit S100B jeweils unterschiedliche Orientierungen einnehmen (Bhattacharya *et al.* 2003, Inman *et al.* 2002, Rustandi *et al.* 2000). Dies zeigt, dass einzelne S100 Proteine ihre verschiedenen Zielproteine auf unterschiedliche Weise binden können.

2.2.2 Funktionen der S100 Proteine

Trotz hoher Konservierung der EF-Hand Motive und Sequenzidentitäten von 25-65 % sind die einzelnen S100 Proteine an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse beteiligt. Durch Interaktion mit ihren Zielproteinen haben die S100 Proteine direkten Einfluss auf enzymatische Aktivität, auf die Regulation von Zellmorphologie und -bewegung sowie auf verschiedene Signalkaskaden. Zudem sind sie an der Ca^{2+} -Homöostase beteiligt (Santamaria-Kisiel *et al.* 2006).

Die hohe Diversität der Funktionen wird durch verschiedene Faktoren erreicht. So zeigen die S100 Proteine eine sehr unterschiedliche zell- und gewebespezifische Verteilung. Außerdem wird durch starke Sequenzvariationen im C-terminalen Bereich, welcher in der Regel entscheidend an der Interaktion mit den Zielproteinen beteiligt ist, eine hohe Spezifität gegenüber den jeweiligen Bindungspartnern erreicht. Auch durch die Bildung verschiedener Homo- und Heterodimere und durch die Bindung von Metallionen wie Zn^{2+} - oder Cu^{2+} -Ionen kommt es zu einer erhöhten Vielfalt bezüglich der Interaktion mit den jeweiligen Bindungspartnern (Nishikawa *et al.* 1997, Heizmann *et al.* 1998, Fritz *et al.* 1998).

Die Gesamtheit dieser Unterschiede entscheidet für jedes S100 Protein über die Interaktionen mit bestimmten Zielproteinen. Hierdurch werden in jedem Zelltyp ganz spezifische zelluläre Antworten als Resultat einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt.

Neben intrazellulären Funktionen konnten einigen S100 Proteinen auch extrazelluläre Funktionen zugewiesen werden. So wurde gezeigt, dass eine Reihe von S100 Proteinen in den Extrazellulärraum sekretiert werden (Übersicht in Leclerc *et al.* 2009). Die Sekretion der S100 Proteine erfolgt vermutlich infolge eines Ca^{2+} -Signals, allerdings über einen nichtklassischen Sekretionsweg (Davey *et al.* 2001, Gerlach *et al.* 2006). Extrazellulär agieren sie hauptsächlich über die Bindung an den *Receptor*

for Advanced Glycation Endproducts (RAGE), wodurch es wiederum zur Auslösung intrazellulärer Signalkaskaden kommt, die meist in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB resultieren (Leclerc *et al.* 2009, Bierhaus *et al.* 2005). Der Aktivierungsmechanismus dieses Transmembranrezeptors der Immunglobulin-Superfamilie, der mit einigen inflammatorischen Krankheiten, Diabetes, Alzheimer und Tumorbildung in Zusammenhang gebracht wird, ist noch nicht vollkommen geklärt. Vermutlich ist eine Oligomerisierung des Rezeptors für dessen Aktivierung nötig (Xie *et al.* 2008). Es wird angenommen, dass die S100 Proteine selbst als oligomere Einheiten an den AGE-Rezeptor binden. Die Bildung solcher oligomerer Strukturen im Extrazellulärraum, welche durch die dort auftretenden hohen Ca^{2+} - und Zn^{2+} -Konzentrationen gefördert werden, und die anschließende Bindung an den AGE-Rezeptor konnte bislang für S100B sowie S100A12 gezeigt werden (Ostendorp *et al.* 2007, Moroz *et al.* 2002).

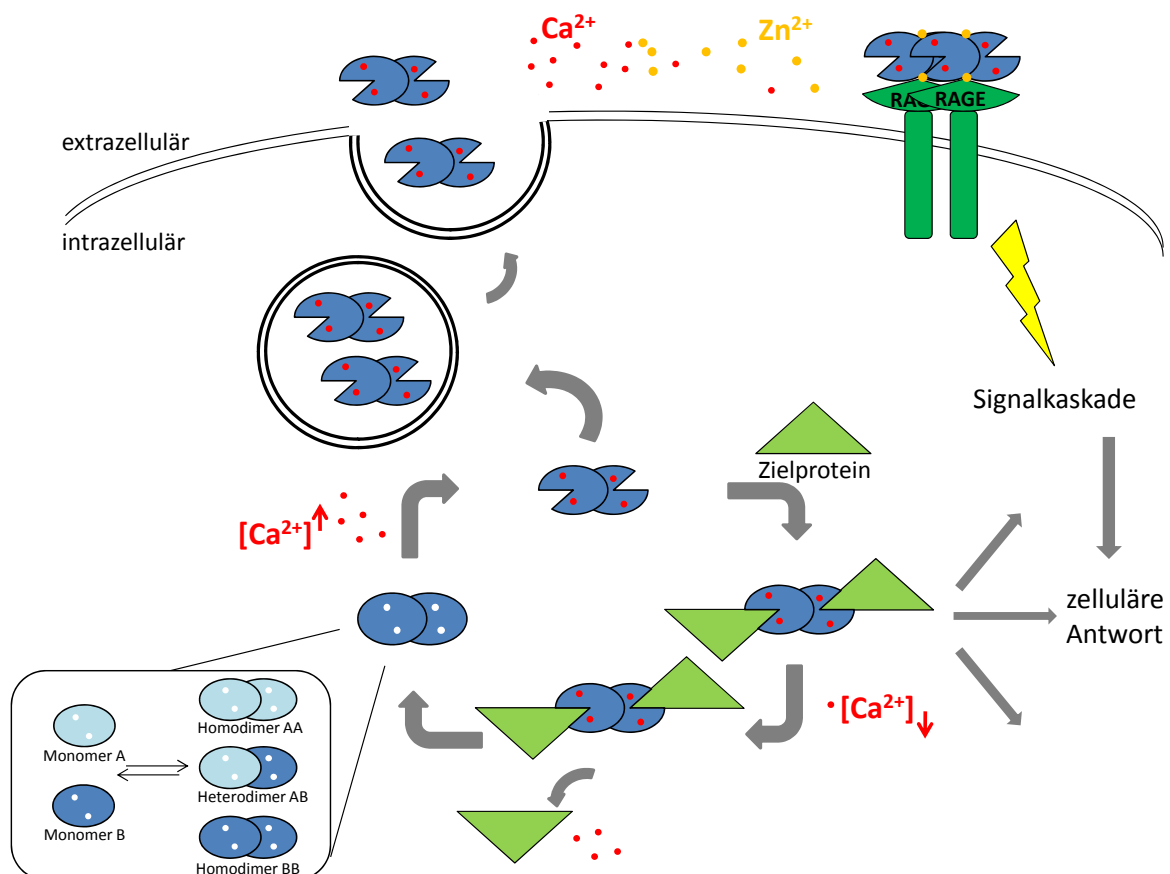


Abb. 2.4: Intra- und extrazelluläre Funktionen der S100 Proteine

Bei niedrigen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen verbleiben S100 Proteine in ihrer inaktiven Konformation. Durch Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration binden S100 Proteine Ca^{2+} über ihre EF-Hände und vollziehen eine Konformationsänderung, die sie zur Interaktion mit ihren Zielproteinen befähigt. Hierdurch werden vielfältige zelluläre Antworten bewirkt. Sinkt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen, erfolgt die Dissoziation der gebundenen Ca^{2+} -Ionen und folglich der Zielproteine und die S100 Proteine befinden sich wieder in ihrem Ca^{2+} -freien (Apo-)Zustand. Infolge einer gestiegenen Ca^{2+} -Konzentration können einige S100 Proteine auch sekretiert werden. Im extrazellulären Raum können sie in Gegenwart hoher Ca^{2+} - und Zn^{2+} -Konzentrationen oligomere Strukturen bilden und an den AGE-Rezeptor binden. Hierdurch werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die ebenfalls zu zellulären Antworten führen. Durch die Fähigkeit einiger S100 Proteine verschiedene heterodimere Formen zu bilden, wird weitere Vielfalt in der zellulären Wirkungsweise der S100 Proteine erzeugt. Abbildung modifiziert nach Santamaria-Kisiel *et al.* 2006, Marenholz *et al.* 2004.

Veränderte Expressionslevel von S100 Proteinen sind vor allem mit Krebserkrankungen, aber auch neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer-Demenz oder entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis assoziiert (Heizmann *et al.* 2007, Peskind *et al.* 2001, Foell *et al.* 2004, Remppis *et al.* 1996). Obwohl in vielen Fällen die eigentlichen Funktionen der S100 Proteine bei der jeweiligen Pathogenese nicht bekannt sind, können jedoch deren spezifische Expressionsmuster als diagnostische sowie prognostische Marker genutzt werden (Heizmann *et al.* 2007, Salama *et al.* 2008).

2.3 S100P

Das erstmalig 1992 aus humaner Plazenta isolierte Protein S100P weist die für S100 Proteine typischen Charakteristika auf. So zeigt es eine gewebespezifische Verteilung, wobei es am stärksten in Plazenta, Lunge, Skelettmuskel, Milz und Leukozyten exprimiert wird (Jin *et al.* 2003).

S100P verfügt über die charakteristische N-terminale „Pseudo“ EF-Hand mit niedriger Ca^{2+} -Affinität ($K_D = 800 \mu\text{M}$), welche über eine kurze Verbindungsregion mit der C-terminalen EF-Hand verbunden ist. Diese klassische EF-Hand verfügt im Vergleich dazu über eine hohe Affinität gegenüber Ca^{2+} -Ionen ($K_D = 1,6 \mu\text{M}$) (Becker *et al.* 1992).

Der Sequenzvergleich mit den anderen Mitgliedern der S100 Proteinfamilie zeigt, dass die größte Sequenzübereinstimmung mit S100A1 und S100B besteht (jeweils eine AS-Identität von 44 % sowie eine AS-Ähnlichkeit von 59 bzw. 57 %) (Jin *et al.* 2003).

Die S100P Monomere weisen eine starke Affinität zueinander auf, allerdings wurde auch eine Heterodimerbildung mit S100A1 und in *in-vitro*-Experimenten mit S100Z und S100A6 gezeigt (Gribenko *et al.* 2001, Wang *et al.* 2004, Whiteman *et al.* 2007). An der Bildung des S100P Homodimers sind eine Reihe hydrophober Reste in Helix I und Helix IV beteiligt. Das Phenylalanin an Position 15 ist dabei essenziell für die Dimerbildung, da der Austausch dieses Phenylalanins durch ein Alanin in einer strikt monomeren Mutante resultiert (Koltzsch *et al.* 2000).

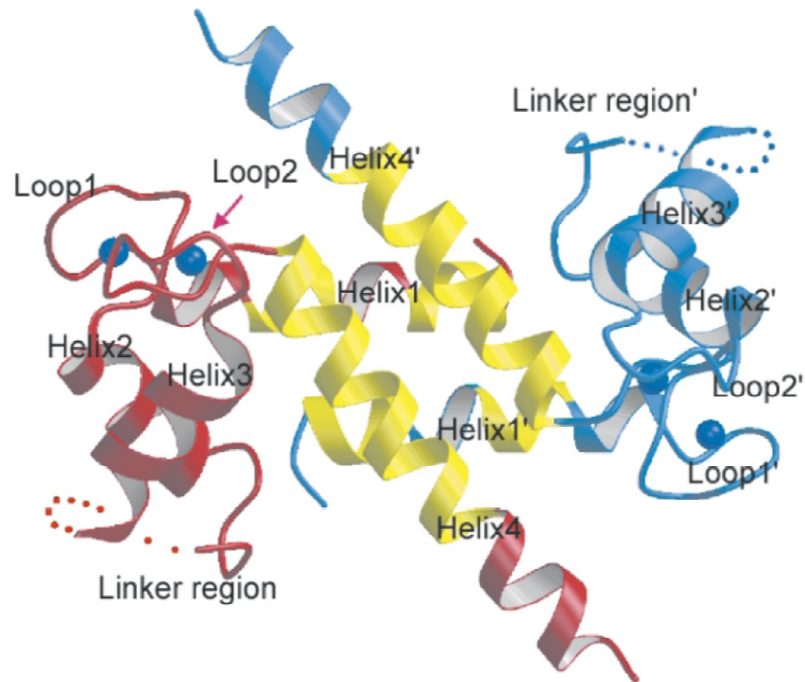


Abb. 2.5: Strukturmodell des S100P Dimers

Die zwei S100P Monomere sind in rot bzw. blau dargestellt. Pro Monomer werden zwei Ca^{2+} -Ionen über die Ca^{2+} -Bindungsloops koordiniert. Die Kristallstruktur der flexiblen Verbindungsregion (Aminosäuren 46-51) konnte nicht bestimmt werden und ist durch die gepunkteten Linien angedeutet. Die Kontaktregionen zwischen den beiden Monomeren sind gelb markiert. Abbildung aus Zhang *et al.* 2003.

Ein stark erhöhtes Expressionslevel von S100P wurde für verschiedene Krebsformen dokumentiert. So wurde eine Hochregulierung der S100P Expression bei Brust-, Lungen-, Prostata-, Darm-, Eierstock- und Gebärmutterhalskrebs sowie bei Pankreastumoren nachgewiesen (Whiteman *et al.* 2007, Mackay *et al.* 2003, Diederichs *et al.* 2004, Hammacher *et al.* 2005, Kita *et al.* 2006, He *et al.* 2008, Chao *et al.* 2007). Die S100P Überexpression in Tumoren wurde zum einen mit einer Hypomethylierung des S100P Gens in Zusammenhang gebracht (Sato *et al.* 2004, Wang *et al.* 2007a), zum anderen auch infolge einer erhöhten ER-Stressantwort beobachtet (Namba *et al.* 2009). Zudem wurde ein erhöhtes S100P-Expressionslevel auch mit Resistenzen gegen Chemotherapeutika in Zusammenhang gebracht (Bertram *et al.* 1998, Gao *et al.* 2008).

Trotz der Bedeutung bei verschiedenen Krebsarten ist über die eigentliche Wirkungsweise des S100P Proteins bisher relativ wenig bekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass S100P extrazelluläre Funktionen aufweist. So wurde gezeigt, dass S100P nach Überexpression in NIH3T3- und Panc-1-Zellen in das Kulturmedium sekretiert wird und RAGE-abhängig die Aktivierung von Erk1/2 und NF κ B bewirkt, wodurch es zu verstärkter Zellproliferation und Tumorwachstum kommt (Arumugam *et al.* 2004, Arumugam *et al.* 2005).

Als spezifische intrazelluläre Interaktionspartner des S100P Dimers wurden bislang S100PBPR (*S100P Binding Protein*), CacyBP/SIP (*Calcyclin and Siah-1-Interacting Protein*) sowie das Membran/F-Aktin

verbindende Protein Ezrin identifiziert, auf welches später noch genauer eingegangen wird (Downen *et al.* 2005, Filipek *et al.* 2002, Koltzsch *et al.* 2003). Dabei konnte für die Ca^{2+} -abhängige Bindung von S100P an Ezrin gezeigt werden, dass es zur Aktivierung des Ezrin Proteins in Form der Freilegung der F-Aktinbindungsstelle kommt. Da diese Interaktion in Zusammenhang mit einer gesteigerten transendothelialen Migration von Tumorzellen gebracht wurde (Austermann *et al.* 2008), kann darin eine prometastatische Funktion des S100P Proteins gesehen werden.

Zusätzlich zu den oben genannten Zielproteinen konnte auch das IQGAP1 Protein als intrazellulärer Bindungspartner des S100P Dimers identifiziert werden (unveröffentlichte Daten). IQGAP1 und die Proteinfamilie, zu der es gehört, werden im Folgenden vorgestellt.

2.4 Die IQGAP Proteinfamilie

Bei den Mitgliedern der IQGAP Proteinfamilie handelt es sich um Multidomänenproteine. Diese Domänen beinhalten verschiedene Proteininteraktionsmotive, welche die Bindung an diverse Zielproteine vermitteln. Dadurch können IQGAP Proteine extrazelluläre Signale weiterleiten und somit mitotische, morphologische und migratorische Zellprozesse beeinflussen.

Die IQGAP Proteinfamilie umfasst drei Mitglieder – IQGAP1, IQGAP2 und IQGAP3 – die 1994, 1996 und 2007 identifiziert wurden. Der Name „IQGAP“ wurde aufgrund zweier struktureller Merkmale gewählt. So verfügen die Proteine zum einen über Calmodulin-bindende IQ-Motive und weisen zum anderen eine gewisse Homologie zu Ras GTPase aktivierenden Proteinen (RasGAPs) auf. Die kleinen GTPasen der Ras Superfamilie dienen als molekulare Schalter, indem sie zwischen einem aktiven GTP-gebundenen und einem inaktiven GDP gebundenen Zustand wechseln. GAPs stimulieren die intrinsische GTPase-Aktivität solcher kleinen GTPasen und inaktivieren diese somit (Bos *et al.* 2007). Interessanterweise wirken IQGAP Proteine im Gegensatz zu Ras GAPs – trotz ihrer Homologie zu diesen – inhibierend auf die intrinsische GTPase Aktivität der kleinen GTPasen. Somit stabilisieren IQGAP Proteine durch Interaktion mit Cdc42 und Rac1 deren aktiven Zustand (Brill *et al.* 1996, Hart *et al.* 1996, Noritake *et al.* 2004). Der Grund für die fehlende GTPase-stimulierende Funktion der IQGAP Proteine ist vermutlich das Fehlen eines bei den GAPs evolutionär konservierten Arginin-Fingers, welcher essenziell an der GAP-Katalyse beteiligt ist (Scheffzek *et al.* 1998, Wang *et al.* 2007b).

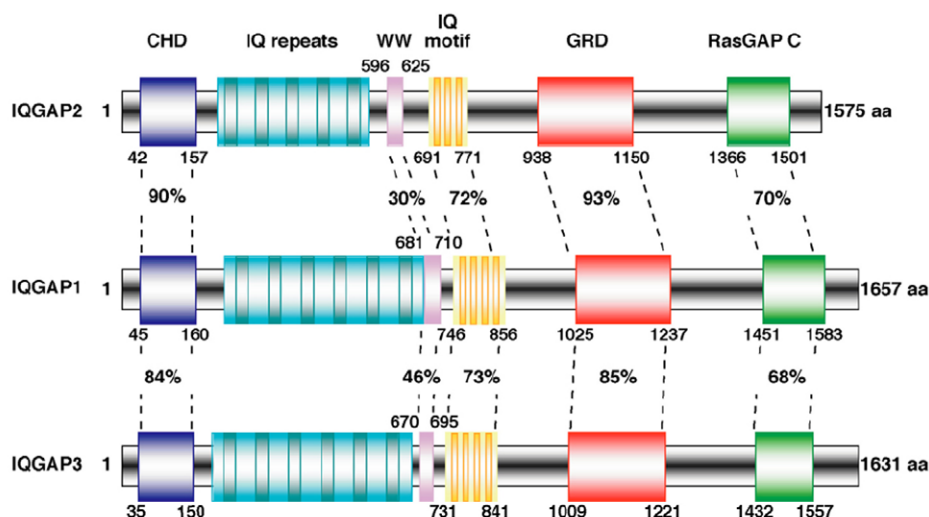


Abb. 2.6: Schematische Darstellung der IQGAP Proteine

Bei den IQGAP Proteinen handelt es sich um Multidomänenproteine bestehend aus einer Calponin-Homologie-Domäne (CHD), einer Domäne mit IQGAP-spezifischen Sequenzwiederholungen (IQ repeats), einer prolinreichen Domäne mit zwei konservierten Tryptophanresten (WW), einer Domäne mit drei bis vier IQ-Motiven (IQ motif), einer Domäne mit Homologie zu RasGAPs (GRD, GAP Related Domain) sowie einer C-terminalen Domäne (RasGAP C). Abbildung aus Wang *et al.* 2007b.

IQGAP Proteine sind evolutionär konserviert. So sind sie in diversen Organismen von *S. cerevisiae* über *C. elegans* und *X. laevis* bis hin zu Säugetieren identifiziert worden (White *et al.* 2009, Briggs *et al.* 2003a). Dies legt nahe, dass ihre Funktionen von fundamentaler Bedeutung sind.

Die humanen IQGAP Proteine weisen eine recht hohe Sequenzhomologie auf (Abb. 2.6), unterscheiden sich aber stark hinsichtlich ihrer Gewebeverteilung. So ist IQGAP1 ein ubiquitär vorkommendes Protein, wohingegen IQGAP2 hauptsächlich in der Leber, im Magen sowie in Thrombozyten und IQGAP3 vor allem im Gehirn und in der Lunge detektiert wurden (Wang *et al.* 2007b, Schmidt *et al.* 2003).

Die Proteininteraktionen und Funktionen von IQGAP1 sind sehr genau untersucht worden. Für IQGAP2 und IQGAP3 gibt es diesbezüglich weniger Informationen. Daher ist es derzeit schwierig, genaue Aussagen über Gemeinsamkeiten und Unterschiede der drei Proteine zu treffen. Aufgrund ihres ähnlichen modularen Aufbaus und aus den bisherigen Untersuchungen kann aber angenommen werden, dass alle IQGAP-Vertreter eine Vielfalt von Proteinen binden und somit als Integrationspunkte verschiedener Signalwege dienen können.

2.5 IQGAP1

Das 189 kDa Protein IQGAP1 ist 1994 als erstes Mitglied der IQGAP Proteinfamilie identifiziert und seitdem intensiv untersucht worden. Es enthält die IQGAP-spezifischen Domänen, über welche die Interaktionen mit vielen Zielproteinen erfolgen (Noritake *et al.* 2005).

N-terminal befindet sich eine Domäne, welche Homologie zu dem Ca^{2+} - und Calmodulin-bindenden Protein Calponin aufweist (*Calponin Homology Domain*, CHD) (Winder *et al.* 1990). Über diese Domäne interagiert auch IQGAP1 schwach mit Calmodulin und auch eine Bindung von Ca^{2+} -Ionen innerhalb dieser Region konnte nachgewiesen werden (Ho *et al.* 1999). Zusätzlich dazu bindet IQGAP1 mit seiner CHD direkt an F-Aktin (Bashour *et al.* 1997). Über eine Region, die sechs IQGAP-spezifische Sequenzwiederholungen bestehend aus den Aminosäuren LNEALDEGDAQ aufweist (*Internal Repeats*, IR), ist die CHD mit einer prolinreichen Region verbunden, welche zwei konservierte Tryptophanreste (WW) enthält. Über diese WW-Domäne erfolgt die Interaktion mit den Proteinkinasen ERK1 und 2 (Roy *et al.* 2004). Hierauf folgt die IQ-Domäne, welche vier IQ-Motive beinhaltet. Bei diesen IQ-Motiven handelt es sich jeweils um eine Sequenz aus 20-25 Aminosäuren, deren Kern die Konsensussequenz IQXXRGXXR bildet. Dieses Motiv vermittelt die Interaktion von IQGAP1 mit den EF-Hand Ca^{2+} -bindenden Proteinen Calmodulin, Myosin ELC (*Essential Light Chain*) sowie S100B (Hart *et al.* 1996, Weissbach *et al.* 1998, Mbele *et al.* 2002). Weiterhin konnten in dieser Domäne auch die Bindungsstellen für die Proteinkinasen MEK1/2 und B-Raf identifiziert werden (Roy

et al. 2005, Ren *et al.* 2007). Dieser Domäne schließt sich die GRD (*RasGAP Related Domain*) an, welche eine Homologie zu RasGAPs aufweist und die Interaktion mit den kleinen Ras-GTPasen Cdc42 und Rac1 vermittelt (Hart *et al.* 1996, Kuroda *et al.* 1996). Auf diese folgt die C-terminalen RGCT-Domäne (*RasGAP C-Terminus*), innerhalb welcher IQGAP1 über Bindungsstellen für Proteine verfügt, die an Zelladhäsionsprozessen beteiligt sind, wie z.B. E-Cadherin und β -Catenin (Kuroda *et al.* 1998, Fukata *et al.* 1999). Ebenso existieren dort Bindungsstellen für N-WASP, einem Promotor der Aktinfilament-Verzweigung, für das Mikrotubuli assoziierten Protein CLIP-170 sowie für APC, einem wichtigen Tumorsuppressor-Protein ((Le Clairche *et al.* 2007, Fukata *et al.* 2002, Watanabe *et al.* 2004).

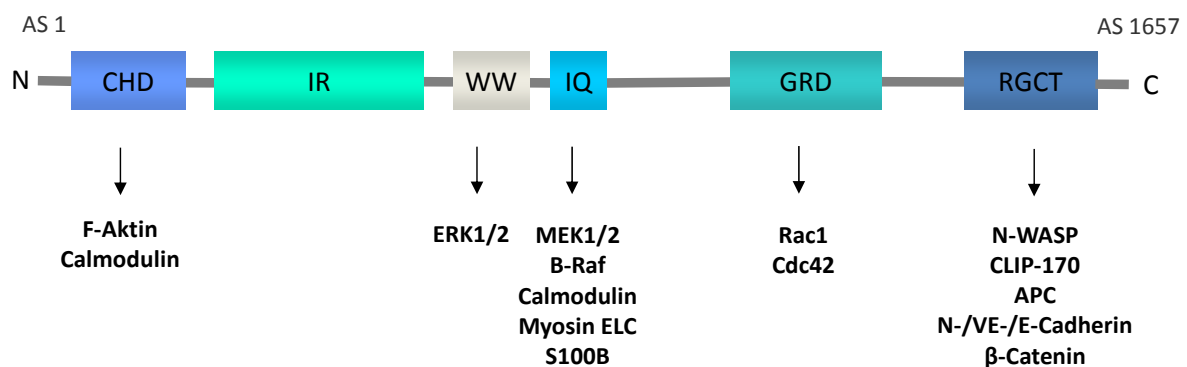


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der Proteininteraktionsdomänen des IQGAP1 Proteins

Der modulare Aufbau des IQGAP1 Proteins und die Bindungsstellen einiger gut untersuchter Bindungspartner sind dargestellt. CHD, Calponin-Homologie-Domäne; IR, *Internal Repeats*; WW, Region mit zwei konservierten Tryptophanresten; IQ, vier konservierte IQ-Motive; GRD, *RasGAP Related Domain*; RGCT, *RasGAP C-Terminus*.

Durch seinen modularen Aufbau und die dadurch bedingte Fähigkeit verschiedene Proteine gleichzeitig zu binden ist IQGAP1 an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt und kann verschiedene Signalwege miteinander verknüpfen. Im Folgenden wird ein Überblick über die wichtigsten Funktionen des IQGAP1 Proteins sowie dessen Regulation gegeben.

2.5.1 IQGAP1 als Regulator des Zytoskeletts

IQGAP1 ist ein wichtiger Regulator des Aktin-Zytoskeletts. So bindet IQGAP1 mit seiner Calponin-Homologie-Domäne direkt an F-Aktin, was *in vitro* zu einer verstärkten Quervernetzung von Aktinfilamenten führt (Bashour *et al.* 1997). Diese Funktion wird positiv reguliert durch die Oligomerisierung von IQGAP1 sowie durch die Bindung von aktivem Cdc42 (Fukata *et al.* 1997). IQGAP1 fungiert somit nicht nur als Aktivator der kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1, sondern auch als deren Effektor.

In seiner Funktion als Aktivator von Cdc42 und Rac1 stimuliert IQGAP1 die Ausbildung von Filopodien bzw. Lamellipodien am Leitsaum migrierender Zellen (Swart-Mataraza *et al.* 2002). Diese aktinreichen Strukturen sind essenziell für die Fortbewegung von Zellen und es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von IQGAP1 auf diesem Weg zu einer verstärkten Migration von Zellen führt (Mataraza *et al.* 2003).

Auch durch die Interaktion mit N-WASP nimmt IQGAP1 Einfluss auf die Aktin-Zytoskelett-Dynamik. Bei N-WASP handelt es sich um ein Mitglied der Wiskott-Aldrich Syndrom Proteinfamilie, welche an der Bildung verzweigter Aktinfilamente beteiligt ist (Pollitt *et al.* 2009). Durch die Bindung von IQGAP1 an N-WASP wird dessen autoinhibierter Zustand aufgelöst. Infolgedessen kann N-WASP mit dem Arp2/3-Komplex interagieren und diesen somit aktivieren. *In vitro* führt dies zu einer verstärkten Polymerisierung und Verzweigung von Aktinfilamenten (Le Clainche *et al.* 2007).

Die Modulation des Aktin-Netzwerks und dessen asymmetrische Verteilung führen zu einer Polarisierung der Zelle und sind ein essenzieller Schritt bei der Zellmigration. Die Polarisierung von Zellen benötigt allerdings nicht nur ein asymmetrisches Aktin-Netzwerk, welches Lamellipodien und Filopodien am Leitsaum ausbildet, sondern auch eine gezielte Stabilisierung der wachsenden Enden von Mikrotubuli in der Nähe des Leitsaums. Dies sorgt für die Aufrechterhaltung des gerichteten Vesikeltransports entlang der Mikrotubuli mittels der Motorproteine Dynein und Kinesin (Fukata *et al.* 2003).

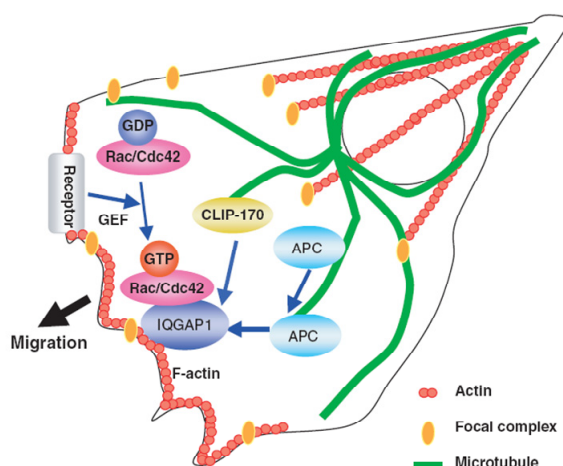


Abb. 2.8: Die Rolle von IQGAP1 bei Zellpolarisierung und gerichteter Migration

Infolge von Rezeptoraktivierung durch extrazelluläre Signale werden Cdc42 und Rac1 durch verschiedene GEFs aktiviert. Aktives Cdc42 und Rac1 binden an diverse Zielproteine und induzieren die Aktinpolymerisierung am Leitsaum. Durch die Interaktion von aktivem Cdc42 und Rac1 mit IQGAP1 wird auch dessen F-Aktinverknüpfende Aktivität stimuliert. Zusätzlich dazu werden die Mikrotubuli-assoziierten Proteine CLIP-170 und APC durch Interaktion mit IQGAP1 zu den Aktinfilamenten rekrutiert. Hierdurch wird das Aktin-Netzwerk am Leitsaum stabilisiert. GEF, *Guanine nucleotide Exchange Factor*. Abbildung aus Noritake *et al.* 2005.

Diese Reorganisation von Aktin-Netzwerk und Mikrotubuli bei der Zellpolarisierung muss genau koordiniert werden. Hierbei spielt unter anderem auch IQGAP1 eine wichtige Rolle. Es wurde eine direkte Interaktion von IQGAP1 mit dem an wachsenden Enden von Mikrotubuli lokalisierenden Protein CLIP-170 gezeigt (Fukata *et al.* 2002). Diese Interaktion wird durch die Bindung von aktivem Cdc42 und Rac1 an IQGAP1 verstärkt, wodurch CLIP-170 an der Basis des Leitsaums stabilisiert wird. Desweiteren interagiert IQGAP1 mit dem Mikrotubuli assoziierten Protein APC, was zu einer zusätzlichen Stabilisierung der Mikrotubuli und dadurch auch zu einem stabilen Aktin-Netzwerk am Leitsaum führt (Watanabe *et al.* 2004). Dies ist wiederum eine Voraussetzung für die effektive Migration von Zellen.

2.5.2 Die Bedeutung von IQGAP1 bei der Zell-Zell-Adhäsion

IQGAP1 bindet über seine C-terminale Domäne unter anderem N-, VE-, und E-Cadherin sowie β -Catenin (Yamaoka-Tojo *et al.* 2006, Kuroda *et al.* 1998, Schrick *et al.* 2007), bei denen es sich um essenzielle Komponenten von interzellulären Adhäsionsverbindungen (*Adherens Junctions*) handelt. Bei solchen Adhäsionsverbindungen lagern sich Cadherine, bei denen es sich um Ca^{2+} -abhängige, dimere Transmembranproteine handelt, mit ihren extrazellulären Domänen an die Cadherine einer Nachbarzelle an. Intrazellulär sind die Cadherine über verschiedene Ankerproteine, wie z.B. α - und β -Catenin, mit Aktinfilamenten verbunden. Somit können durch solche Adhäsionsverbindungen die Aktin-Zytoskelette zweier benachbarter Zellen indirekt miteinander verknüpft werden (Yap *et al.* 1997).

In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass eine Überexpression von IQGAP1 inhibierend auf die E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion wirkt. Dies resultiert aus der Bindung von IQGAP1 an β -Catenin, das dadurch nicht mehr mit α -Catenin interagieren kann, wodurch die Verbindung zwischen den Cadherinen und dem kortikalen Aktin-Netzwerk gelöst wird (Kuroda *et al.* 1998). Diese Vorgänge werden durch Cdc42 und Rac1 reguliert. So konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Cdc42 und Rac1 mit IQGAP1 zu einer verminderten Bindung von IQGAP1 an β -Catenin führt, was wiederum eine Stabilisierung der Zell-Zell-Verbindungen zur Folge hat (Fukata *et al.* 1999).

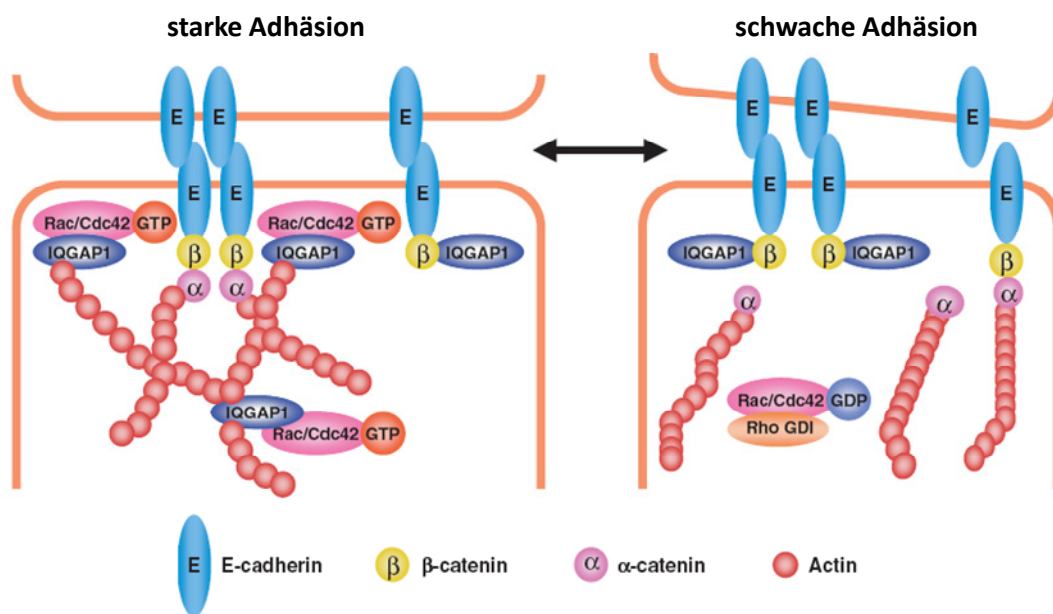


Abb. 2.9: Die Rolle von IQGAP1 in der Regulation E-Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Adhäsion

Ist die intrazelluläre Konzentration an aktivem (GTP-gebundenem) Rac1 oder Cdc42 hoch, so ist die Interaktion mit IQGAP1 favorisiert. Dies stimuliert die F-Aktin verbindende Funktion des IQGAP1 Proteins. In diesem Fall liegt eine starke Zell-Zell-Adhäsion vor, da E-Cadherin über β-Catenin und α-Catenin mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft ist. Liegen Rac1 und Cdc42 überwiegend in ihrer inaktiven (GDP-gebundenen) Form vor, findet keine Interaktion mit IQGAP1 statt. IQGAP1 kann nun mit β-Catenin interagieren wodurch α-Catenin aus dem Cadherin-Catenin-Komplex verdrängt wird. Hieraus resultiert eine verminderte Zell-Zell-Adhäsion. Abbildung aus Noritake *et al.* 2005.

Für die Vorgänge bei der Zell-Zell-Adhäsion wurde ein Modell vorgeschlagen (Abb. 2.9), nach welchem ein dynamisches Gleichgewicht aus dem E-Cadherin/β-Catenin/α-Catenin-Komplex einerseits und dem E-Cadherin/β-Catenin/IQGAP1-Komplex andererseits vorliegt (Noritake *et al.* 2005). Das Verhältnis von Komplex I zu Komplex II entscheidet somit über die Stärke der Adhäsion.

2.5.3 Die Bedeutung von IQGAP1 bei Transkriptionsprozessen

Durch die Interaktion mit β-Catenin beeinflusst IQGAP1 nicht nur Zelladhäsions-, sondern auch Transkriptionsprozesse, da β-Catenin zwar eine wichtige Komponente des Zelladhäsionskomplexes ist, aber auch eine entscheidende Rolle innerhalb des Wnt-1 Signalweges spielt (Bullions *et al.* 1998). In normalen oder unstimulierten Epithelzellen ist der größte Teil des vorhandenen β-Catenins an der Membran lokalisiert, wo es mit E-Cadherin assoziiert und somit an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt ist. Die zytoplasmatische β-Catenin-Konzentration wird niedrig gehalten, indem es von einem Proteinkomplex bestehend aus APC, Axin-1 und Glycogen Synthase Kinase-3β (GSK3β) gebunden und phosphoryliert wird. Dies bewirkt die schnelle Ubiquitylierung und den Abbau des β-Catenins im Proteasom (Aberle *et al.* 1997). Die Aktivierung des Wnt-1-Signalweges inhibiert GSK3β,

wodurch es zur Stabilisierung und Translokation des β -Catenins in den Zellkern kommt (Young *et al.* 1998, Hsu *et al.* 1998). Im Zellkern fungiert β -Catenin als Co-Aktivatoren für Mitglieder der TCF/LEF Familie von Transkriptionsfaktoren und aktiviert auf diese Weise spezifische Zielgene. Aufgrund dieser Funktion handelt es sich bei β -Catenin um ein Onkoprotein (Polakis 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von IQGAP1 zu einer verstärkten Aktivierung β -Catenin coaktivierter Gene führt (Briggs *et al.* 2002). Dies ist die Folge der veränderten intrazellulären Lokalisation von β -Catenin. Durch die Interaktion mit IQGAP1 wird die Assoziation von β -Catenin mit E-Cadherin und α -Catenin an der Zellmembran geschwächt, so dass mehr β -Catenin im Zytoplasma vorliegt. Dies führt zu einem erhöhten Anteil von β -Catenin, das in den Zellkern wandert und dort die Transkription beeinflusst.

So bewirkt ein erhöhtes IQGAP1 Proteinlevel über diesen Weg eine verstärkte Transkription von Genen, die mit Zelltransformations- und Zellmigrationsprozessen assoziiert sind (Polakis 2000, Lustig *et al.* 2003).

2.5.4 Die Bedeutung von IQGAP1 in der Signaltransduktion aktivierter RTKs

IQGAP1 agiert *downstream* verschiedener Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) als Gerüstprotein um das Fortschreiten verschiedener Signalkaskaden effektiv zu organisieren (Yamaoka-Tojo *et al.* 2004, Meyer *et al.* 2008). Die meisten dieser Transmembran-Rezeptoren für Hormone, Cytokine oder Wachstumsfaktoren wie z.B. EGF oder VEGF liegen in der Plasmamembran als Monomere vor. Durch die Bindung ihrer extrazellulären Liganden werden die Rezeptoren dimerisiert oder sogar oligomerisiert, wodurch sie sich mit ihren intrazellulären Kinasedomänen autophosphorylieren und somit aktivieren können. In ihrer aktivierten Form dienen sie als Plattform großer Signalkomplexe und phosphorylieren weitere Zielproteine, so dass diverse zelluläre Prozesse initiiert werden, die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellüberleben beeinflussen (Schlessinger 2000).

So spielt IQGAP1 z.B. eine wesentliche Rolle bei der VEGF-induzierten Migration und Proliferation von Endothelzellen. Die Bindung von VEGF an den VEGF-Rezeptor bewirkt dessen Aktivierung, was u.a. auch die Aktivierung Mitogen aktivierter Protein (MAP)-Kinasen sowie der Proteinkinase Akt zur Folge hat. Dies sind Schlüsselenzyme bei der Angiogenese, der Bildung neuer Blutgefäße (Matsumoto *et al.* 2001). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass IQGAP1 als wichtige Komponente bei der VEGF-induzierten intrazellulären Signalweiterleitung dient. Nach VEGF-Stimulierung wird IQGAP1 direkt vom VEGF-Rezeptor Typ2 an Tyrosinresten phosphoryliert. Dieser Vorgang wird von der zellulären Tyrosinkinase c-Src katalysiert, die ihrerseits selbst auch IQGAP1 phosphorylieren kann, wie *in-vitro*-Experimente gezeigt haben (Meyer *et al.* 2008). Es konnte auch gezeigt werden, dass das aktivierte IQGAP1 essenziell ist für die VEGF-induzierte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies

(*reactive oxygen species*, ROS) und die dadurch geförderte Aktivierung von Akt sowie für die Aktivierung von B-Raf (Yamaoka-Tojo *et al.* 2004, Meyer *et al.* 2008). Durch die Beteiligung an der VEGF-Signalweiterleitung hin zu diesen beiden Schlüsselenzymen ist IQGAP1 eine wichtige Komponente bei der Proliferation und Migration von Endothelzellen und damit der Angiogenese.

Intensiv untersucht wurde auch die Rolle von IQGAP1 bei der EGF-induzierten MAPK-Kaskade bestehend aus B-Raf, den MEK-Isoformen 1 und 2 sowie den ERK-Isoformen 1 und 2.

Mitogen aktivierte Proteinkinase-Kaskaden sind mehrstufige Signaltransduktionswege, die jeweils drei hintereinander geschaltete Proteinkinasen beinhalten. Es gibt verschiedene solcher Kaskaden, aber sie alle enthalten eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MKKK), welche – wenn aktiviert – eine MAP-Kinase-Kinase (MKK) phosphoryliert und aktiviert, welche daraufhin ihrerseits eine MAP-Kinase (MAPK) phosphoryliert und somit aktiviert. Die aktivierten MAP-Kinasen leiten das Signal weiter, indem sie verschiedene zytosolische Proteine und Transkriptionsfaktoren phosphorylieren, wodurch die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen reguliert wird (Widmann *et al.* 1999). Die räumliche und zeitliche Koordinierung der verschiedenen Kaskaden wird zum Teil durch den Einsatz von Gerüstproteinen erreicht, welche die einzelnen Komponenten einer bestimmten MAPK-Kaskade binden und somit die Effizienz der Signalweiterleitung erhöhen (Kolch 2005).

Eine dieser MAPK-Kaskaden besteht aus den Komponenten B-Raf (MKKK), den MEK-Isoformen 1 und 2 (MKK) sowie den ERK-Isoformen 1 und 2 (MAPK). Ihre Aktivierung erfolgt durch Stimulierung der Zelle mit Wachstumsfaktoren wie z.B. EGF. Die Bindung von EGF an den EGF-Rezeptor bewirkt dessen Autophosphorylierung an Tyrosinresten und die Assemblierung eines Signalkomplexes bestehend aus dem Adaptorprotein Grb2 und Sos, einem GTP-Austauschfaktor (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF). Sos bewirkt den Austausch von GDP zu GTP in der kleinen GTPase Ras, wodurch diese aktiviert wird. Ras aktiviert daraufhin B-Raf wodurch die MAPK-Kaskade in Gang gesetzt wird (McCormick 1993, Campbell *et al.* 1998, Morrison *et al.* 1997, Vojtek *et al.* 1993).

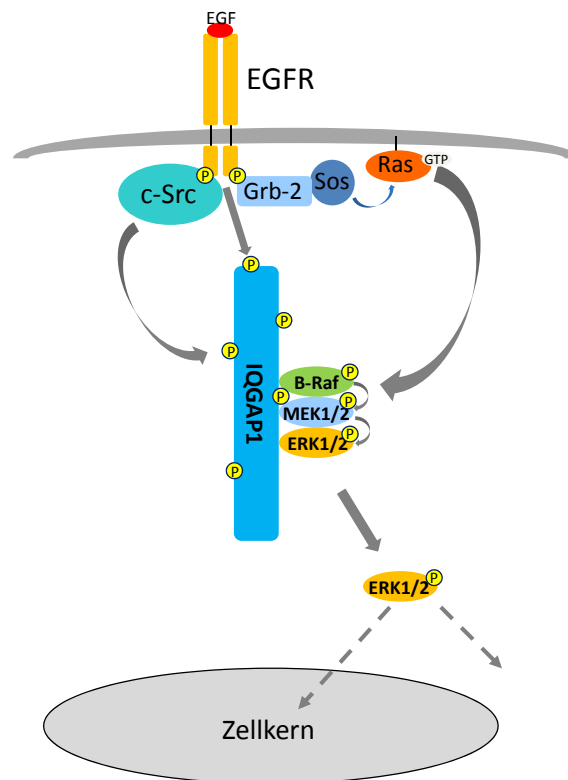


Abb. 2.10: Modell der Funktion von IQGAP1 im MAPK-Signalweg

Durch Aktivierung des EGF-Rezeptors (EGFR) kommt es zur Assemblierung eines Signalkomplexes, der in der Aktivierung einer MAPK-Kaskade bestehend aus B-Raf, MEK1/2 und ERK1/2 resultiert. IQGAP1 wird selbst vom aktivierten Rezeptor und/oder c-Src an Tyrosinresten phosphoryliert und dient als Gerüst für die Komponenten der MAPK-Kaskade. Dadurch wird eine effiziente Signalweiterleitung ermöglicht.

IQGAP1, das nach EGF-Stimulierung vom EGF-Rezeptor an Tyrosinresten phosphoryliert wird (Meyer *et al.* 2008), dient innerhalb dieser Signalkaskade als eines der Gerüstproteine. So wurden direkte Interaktionen zwischen IQGAP1 und B-Raf, MEK1/2 und ERK1/2 nachgewiesen und gezeigt, dass eine normales intrazelluläres Level an IQGAP1 nötig ist, um eine optimale EGF-induzierte Aktivierung aller drei Komponenten zu ermöglichen (Roy *et al.* 2004, Roy *et al.* 2005, Ren *et al.* 2007).

2.5.5 Regulation des IQGAP1 Proteins

Die Aktivität des IQGAP1 Proteins wird durch verschiedene Faktoren reguliert. Als wohl wichtigster Regulator der IQGAP1 Funktionen kann das EF-Hand Ca^{2+} -bindende Protein Calmodulin gesehen werden. Calmodulin interagiert sowohl in seiner Ca^{2+} -freien (Apo-)Form als auch in seiner Ca^{2+} -gebundenen Form mit IQGAP1. Allerdings verstärkt die Anwesenheit von Ca^{2+} die Affinität von Calmodulin gegenüber IQGAP1 um das 2-3-fache (Joyal *et al.* 1997, Mateer *et al.* 2002). Ca^{2+} /Calmodulin wirkt kompetitiv zu den meisten der bisher identifizierten IQGAP1 Bindungspart-

nern. So verhindert die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin an IQGAP1 dessen Interaktion mit aktivem Cdc42 und damit den stabilisierenden Einfluss auf die kleine GTPase (Ho *et al.* 1999). Außerdem hemmt Ca^{2+} /Calmodulin die aktin-polymerisierungsfördernde Wirkung von IQGAP1 (Mateer *et al.* 2002) und die Interaktion von IQGAP1 mit E-Cadherin, β -Catenin sowie B-Raf (Briggs *et al.* 2002, Li *et al.* 1999, Ren *et al.* 2008). Dieser inhibierende Einfluss von Ca^{2+} /Calmodulin auf IQGAP1 ist vermutlich auf eine Konformationsänderung des IQGAP1 Proteins zurückzuführen (Briggs *et al.* 2003b). Diese selektive Konformationsänderung, die offensichtlich nur durch Ca^{2+} /Calmodulin induziert wird, kann darauf zurückgeführt werden, dass Apo-Calmodulin nur an die IQ-Motive IQ3 und IQ4 bindet, wohingegen Ca^{2+} /Calmodulin zusätzlich auch an IQ1 und IQ2 binden kann (Li *et al.* 2003).

Zusätzlich zur Regulation durch Calmodulin wird die IQGAP1 Aktivität auch durch die Bindung von aktivem Cdc42 und Rac1 beeinflusst. So verhindert die Bindung von Cdc42 und Rac1 an IQGAP1 dessen Interaktion mit E-Cadherin und β -Catenin. Hierüber wird die Stabilität von Zell-Zell-Adhäsionsverbindungen beeinflusst (Kuroda *et al.* 1998). Cdc42 und Rac1 regulieren aber auch positiv die Interaktion von IQGAP1 mit CLIP-170 und APC, wodurch Polarisation und Migration von Zellen gefördert werden (Fukata *et al.* 2002, Watanabe *et al.* 2004).

Auch durch Oligomerisierung können IQGAP1-Funktionen reguliert werden. Sie erfolgt über Bereiche innerhalb der IR-Domäne und wird durch die Bindung von aktivem Cdc42 an IQGAP1 positiv reguliert. Die IQGAP1 Oligomerisierung wurde als Ursache für dessen Fähigkeit F-Aktin zu vernetzen vorgeschlagen (Fukata *et al.* 1997).

Ein weiterer wichtiger Faktor, der die IQGAP1 Aktivität beeinflusst, ist die Phosphorylierung des Proteins an Serin- und Tyrosinresten. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung an Ser1443 durch die PKC ϵ (Proteinkinase C Isoform ϵ) eine intramolekulare Assoziation zwischen der GRD und RGCT-Domäne des IQGAP1 Proteins aufhebt und dieser Teil des Proteins damit zugänglich wird (Grohmanova *et al.* 2004). Desweiteren wurde auch gezeigt, dass sich diese Serinphosphorylierung an Position 1443 positiv auf das Wachstum neuronaler Zellen auswirkt (Li *et al.* 2005).

Neben der Phosphorylierung an Serinresten kommt es auch zur Phosphorylierung von Tyrosinresten innerhalb des IQGAP1 Proteins. Die Tyrosinphosphorylierung von IQGAP1 konnte infolge von Zellstimulierung mit den Wachstumsfaktoren EGF, VEGF, PDGF sowie FGF beobachtet werden (Yamaoka-Tojo *et al.* 2004, Meyer *et al.* 2008, Blagoev *et al.* 2004, Kratchmarova *et al.* 2005, Bensenor *et al.* 2007). Es wurde dabei gezeigt, dass IQGAP1 direkt von den Rezeptor-Tyrosinkinasen phosphoryliert werden kann, aber auch Substrat der zellulären Tyrosinkinase c-Src ist (Meyer *et al.* 2008). Die eigentliche Funktion der IQGAP1-Tyrosinphosphorylierung ist noch unbekannt, da IQGAP1 nicht über die klassischen SH2-/PTB-Domänen-Erkennungssequenzen verfügt (Yamaoka-Tojo *et al.* 2004). Auch über die für das Entfernen des Phosphatrestes zuständigen Phosphatasen ist noch wenig bekannt. So konnte zwar eine direkte Interaktion mit der Protein-Tyrosin-Phosphatase μ (PTP μ) nachgewiesen

werden, unklar ist allerdings, ob IQGAP1 tatsächlich auch ein Substrat dieser Phosphatase ist (Phillips-Mason *et al.* 2006). Nichtsdestotrotz kann aber die Tyrosinphosphorylierung als Zeichen der Aktivität des IQGAP1 Proteins in seiner Funktion als Gerüstprotein *downstream* aktivierter Rezeptor-Tyrosinkinasen betrachtet werden (Yamaoka-Tojo *et al.* 2004, Yamaoka-Tojo *et al.* 2006, Meyer *et al.* 2008).

2.6 Die ERM Proteinfamilie

Die ERM Proteinfamilie besteht aus den eng verwandten Proteinen **Ezrin**, **Radixin** und **Moesin**, deren Hauptfunktion darin besteht, Komponenten der Zellmembran mit filamentösem Aktin zu verbinden. Sie kontrollieren dadurch Struktur und Funktion spezieller Regionen des Zellkortex, wie z.B. die der Mikrovilli in Epithelzellen. Zudem beeinflussen sie zelluläre Prozesse wie Zellbewegung, -adhäsion, und -morphologie sowie zelluläre Signalwege (Hughes *et al.* 2007).

Die ERM Proteine zeigen ein zellspezifisches Expressionsmuster. So exprimieren Epithelzellen vornehmlich Ezrin und Endothelzellen hauptsächlich Moesin, wohingegen in Hepatozyten lediglich Radixin detektiert werden konnte (Bretscher *et al.* 2002, Amieva *et al.* 1994). Zudem scheinen sie teilweise redundante Funktionen zu haben, da die entsprechenden *knockout*-Mäuse relativ milde Phänotypen aufweisen (Doi *et al.* 1999, Kikuchi *et al.* 2002, Bonilha *et al.* 2006).

Dieses spiegelt sich auch in ihrer strukturellen Homologie und in Sequenzidentitäten von ca. 75 % wider. Die ERM Proteine gehören zur Protein-4.1-Superfamilie und weisen an ihrem N-Terminus die für die Mitglieder dieser Superfamilie typische FERM (*Four-point one*, Ezrin, Radixin, Moesin)-Domäne auf. Hierbei handelt es sich um eine globuläre Domäne aus drei Untereinheiten (F1, F2, F3), welche kleeblattartig angeordnet sind (Pearson *et al.* 2000). Über diese FERM-Domäne interagieren ERM Proteine entweder direkt oder indirekt über Adaptorproteine mit verschiedenen Membranproteinen. Eine direkte Interaktion erfolgt beispielsweise mit dem Hyaluronanrezeptor CD44, dem Na⁺/H⁺-Antiporter NHE-1 oder den interzellulären Adhäsionsmolekülen ICAM-1,-2 und -3 (Tsukita *et al.* 1994, Denker *et al.* 2000, Heiska *et al.* 1998, Serrador *et al.* 1997). Durch Wechselwirkung der ERM-Proteine mit Adaptorproteinen wie EBP50 oder E3KARP werden indirekte Bindungen z.B. mit dem Chloridionenkanal CFTR oder dem PDGF-Rezeptor eingegangen (Short *et al.* 1998, Maudsley *et al.* 2000). Diese Interaktionen werden über die in den Adaptorproteinen vorhandenen PDZ-Domänen vermittelt.

Über eine zentrale α -helikale Domäne ist die N-terminale FERM-Domäne der ERM Proteine mit der C-terminalen Domäne verbunden, in welcher die F-Aktinbindungsstelle lokalisiert ist (Algrain *et al.* 1993). Hierdurch besitzen ERM Proteine die Fähigkeit Membranproteine mit dem kortikalen Zytoskelett zu verbinden.

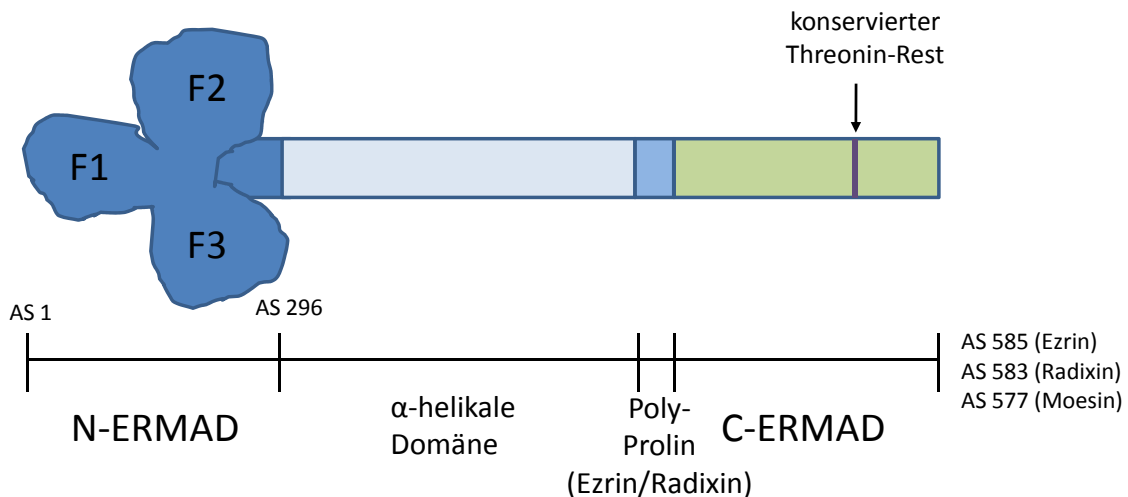


Abb. 2.11: Schematische Darstellung der ERM Proteindomänen

Über ihre N-ERMAD bzw. FERM-Domäne interagieren ERM Proteine mit Transmembranproteinen oder mit Adaptorproteinen, die eine Bindung an z.B. den PDGF-Rezeptor vermitteln. Daran schließt sich eine α -helikale Domäne und im Falle von Ezrin und Radixin eine kurze prolinreiche Region an. Innerhalb der C-ERMAD, welche die Bindungsstelle für F-Aktin beinhaltet, verfügt jedes ERM Protein über einen konservierten Threonin-Rest (Ezrin: T567, Radixin: T564, Moesin: T558), dessen Phosphorylierung zur Aktivierung des ERM Proteins beiträgt.

Im Zytoplasma liegen die ERM Proteine in einer inaktiven Konformation vor. Das bedeutet, dass die C-terminale Domäne derart mit der N-terminalen Domäne interagiert, dass in beiden Domänen Bindungsstellen für Transmembran- sowie Adaptorproteine und F-Aktin maskiert sind (Pearson *et al.* 2000, Gary *et al.* 1995). Aufgrund dieser intramolekularen Interaktion werden die beiden Domänen auch N-ERMAD und C-ERMAD (N- bzw. C-terminale ERM Association Domain) genannt.

ERM Proteine müssen daher aktiviert werden, um als Membranprotein/F-Aktin-verbindende Proteine fungieren zu können (Ishikawa *et al.* 2001). Die Aktivierung der ERM Proteine erfolgt über die Bindung an das in der Plasmamembran vorkommende Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂) (Niggli *et al.* 1995, Barret *et al.* 2000) und die Phosphorylierung eines konservierten Threoninrestes in der C-terminalen Domäne (Nakamura *et al.* 1995). Diese Phosphorylierung kann durch verschiedene Kinasen erfolgen, wie durch *in-vivo*- und *in-vitro*-Experimente gezeigt wurde. Zu diesen Kinasen gehören u.a. zwei Isoformen der Proteinkinase C, PKC α und PKC θ , sowie die Rho-Kinase (Ng *et al.* 2001, Pietromonaco *et al.* 1998, Matsui *et al.* 1998, Matsui *et al.* 1999).

Interessanterweise scheinen die ERM Proteine nicht nur *downstream* Effektoren der Rho-Kinase zu sein, sondern selbst auch *upstream* deren Aktivierung zu beeinflussen. So konnte eine Interaktion zwischen der FERM-Domäne von aktivierten ERM Proteinen und RhoGDI, einem negativen Regulator der kleinen GTPase RhoA gezeigt werden (Takahashi *et al.* 1997). RhoA ist essenziell an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts und damit an der Zellmorphologie, sowie an Prozessen wie Zytokinese oder Zellmigration beteiligt (Burrige *et al.* 2006). Binden die ERM Proteine an RhoGDI, wird RhoA freigesetzt und ein Austausch von GDP durch GTP kann erfolgen, wodurch RhoA in seinen aktiven

Zustand versetzt wird. So kann es unter anderem die Rho-Kinase aktivieren, was zu einem positiven *Feedback-Loop* bezüglich der Aktivierung der ERM Proteine führt.

Es gibt allerdings auch Untersuchungen, wonach das in *Drosophila melanogaster* einzig vorhandene ERM Protein Moesin einen inhibierenden Einfluss auf die RhoA-Aktivität zu haben scheint (Speck *et al.* 2003). Diese unterschiedlichen Befunde können möglicherweise auf unterschiedliche experimentelle Vorgehensweisen zurückzuführen sein, oder als Hinweis gesehen werden, dass ERM Proteine kontextspezifisch agieren. Der Einfluss auf die Regulation der RhoA Aktivität – positiv oder negativ – zeigt jedoch die Bedeutung der ERM Proteine als wichtige Komponenten bei der Organisation des kortikalen Zytoskeletts.

2.7 Ezrin

Ezrin ist das am intensivsten untersuchte Mitglied der ERM Proteinfamilie. 1983 wurde es erstmalig von A. Bretscher aus den Mikrovilli des Hühner-Darmepithels isoliert (Bretscher 1983).

Ezrin weist ein Molekulargewicht von 69 kDa auf, positioniert sich jedoch im SDS-Gel in der Höhe eines 81 kDa-Proteins, weshalb es ursprünglich auch p81 genannt wurde. Eine Erklärung für dieses abnorme Wanderungsverhalten könnte der relativ stark geladene Charakter des Proteins sein (Gould *et al.* 1989).

Im Vergleich zu Moesin und Radixin wurden für Ezrin die Interaktionen mit PIP_2 und F-Aktin etwas eingehender untersucht. So konnte den Lysinresten an Position 253, 254, 262 und 263 eine essenzielle Funktion bei der $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -Bindung zugewiesen werden (Barret *et al.* 2000). Diese Lysine sind Teil eines innerhalb der ERM Familie konservierten $\text{KK}(\text{X})_n\text{K/RK}$ Motivs, was dafür spricht, dass den entsprechenden Lysinresten im Moesin und Radixin dieselbe Funktion zukommt. Arginin 579 des Ezrin Proteins konnte bezüglich der F-Aktinbindung als essenzieller Rest identifiziert werden. Er ist zudem auch wesentlich an der intramolekularen Interaktion zwischen N- und C-ERMAD beteiligt (Saleh *et al.* 2009).

Die genauesten Untersuchungen bezüglich des Aktivierungsvorgangs der ERM-Proteine wurden ebenfalls mit Ezrin durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Aktivierung um einen Zwei-Schritt-Prozess handelt. Danach muss zunächst die $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -Bindung erfolgen, um die Thr567-Phosphorylierung zu ermöglichen. Es sind allerdings beide Ereignisse nötig um die korrekte apikale Lokalisation des Proteins zu bewirken (Fievet *et al.* 2004). Kürzlich haben *in-vitro*-Untersuchungen allerdings gezeigt, dass allein die Bindung von Ezrin an $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ die Interaktion mit F-Aktin ermöglicht (Janke *et al.* 2008).

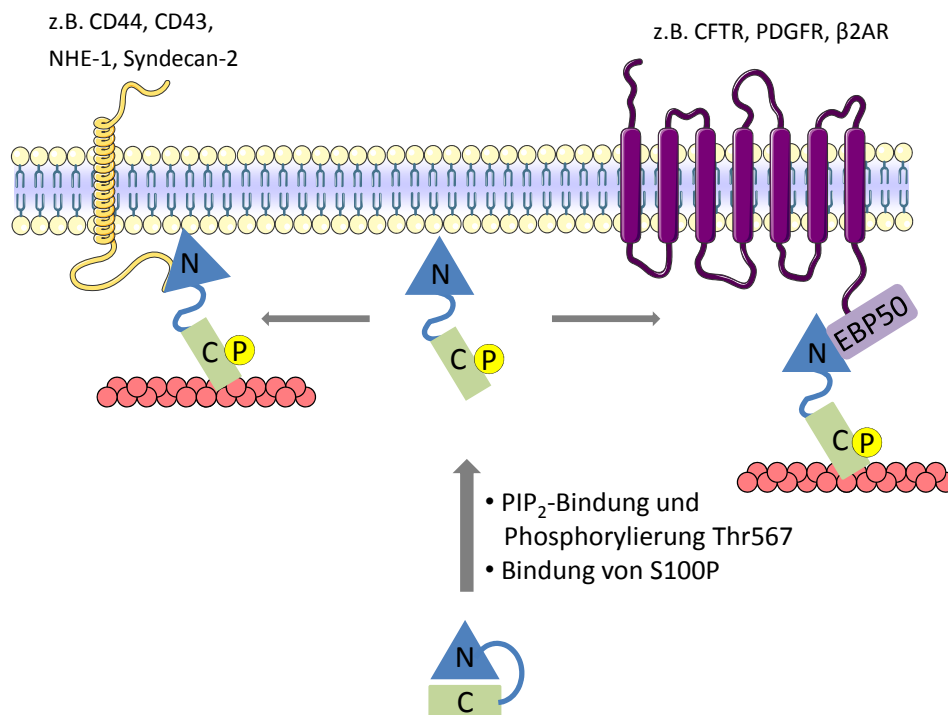


Abb. 2.12: Schematische Darstellung der Aktivierung von Ezrin

Durch intramolekulare Assoziation von N- und C-ERMAD liegt das Ezrin Protein im Zytoplasma in einem autoinhibierten Zustand vor. Die Aktivierung erfolgt entweder durch Bindung des in der Plasmamembran vorhandenen PI(4,5)P₂ und Phosphorylierung von Threonin 567 oder durch die Ca²⁺-abhängige Bindung von S100P. In seiner „geöffneten“ Konformation interagiert das Ezrin Protein über seine N-ERMAD entweder direkt oder indirekt mit Transmembranproteinen und über seine C-ERMAD mit dem Aktin-Zytoskelett. Abbildung verändert nach Bretscher *et al.* 2002.

Neben der klassischen Aktivierung des Ezrin Proteins in Form von PI(4,5)P₂-Bindung und Threonin-Phosphorylierung konnte zudem ein S100P-vermittelter Aktivierungsmechanismus demonstriert werden. So bewirkt ein Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in A431-Zellen die Translokation beider Proteine zur Plasmamembran und in die dort induzierten Mikrovilli. Wie *in-vitro*-Studien gezeigt haben, erfolgt eine direkte Ca²⁺-abhängige Interaktion zwischen S100P und der FERM-Domäne des Ezrin Proteins, wodurch die Bindung von Ezrin an F-Aktin ermöglicht wird (Koltzsch *et al.* 2003). Diese Bindung von S100P an Ezrin erfolgt kompetitiv zur PI(4,5)P₂-Bindung und stellt somit einen alternativen Ca²⁺-induzierten Aktivierungsmechanismus dar (Austermann *et al.* 2008).

2.8 Zielsetzung

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war der Befund, dass IQGAP1 als potenzieller Ca^{2+} -abhängiger Bindungspartner von S100P in einem Affinitätschromatographischen Ansatz mit Plazentalysat identifiziert werden konnte. Um dieses zu bestätigen und eine möglicherweise direkte Protein-Protein-Interaktion nachzuweisen, sollten zunächst *in-vitro*-Bindungsstudien mit den rekombinant exprimierten und gereinigten Proteinen durchgeführt werden. Eine nähere Charakterisierung der Interaktion sollte anschließend sowohl durch *in-vivo*-Lokalisationsstudien als auch durch Identifikation der beteiligten Bindungsmotive innerhalb beider Proteine erfolgen. Funktionelle Analysen sollten die mögliche Bedeutung der S100P/IQGAP1-Interaktion auf zellulärer Ebene zu Tage fördern. Da es sich bei IQGAP1 um einen wichtigen Regulator des kortikalen Zytoskeletts und ein wichtiges Gerüstprotein innerhalb des EGF-induzierten MAPK-Signalwegs handelt, sollten insbesondere mögliche Auswirkungen der S100P-Bindung an IQGAP1 auf diese Prozesse untersucht werden.

Neben IQGAP1 konnte auch Ezrin als Ca^{2+} -abhängiger Interaktionspartner von S100P identifiziert werden (Koltzsch *et al.* 2003). Da sowohl IQGAP1 als auch Ezrin bereits mehrfach gemeinsam als Komponenten größerer Proteinkomplexe identifiziert werden konnten (Berryman *et al.* 2000, Paradela *et al.* 2005), lag ein weiteres Ziel dieser Arbeit in der Analyse einer möglicherweise direkten Interaktion von IQGAP1 und Ezrin. Aufschluss darüber sollten ebenfalls *in-vivo*-Analysen zur zellulären Lokalisation beider Proteine sowie *in-vitro*-Bindungsstudien mit rekombinant exprimiertem IQGAP1 und Ezrin liefern.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Organismen und Zelllinien

Baculoviren	Beschreibung
AcNPV-GST-IQGAP1.....	Transgene <i>Autographa californica</i> Nucleopolyhedroviren. AcNPV sind zirkuläre dsDNA-Viren, die lediglich Schmetterlinge (Lepidoptera) befallen. Sie werden zur rekombinanten Proteinexpression in Insektenzellen genutzt (SF9). Das unter Zellkulturbedingungen nicht-essenzielle Virusgen Polyhedrin ist in diesem Fall durch GST-IQGAP1-cDNA ersetzt worden. Dadurch steht diese cDNA unter der Kontrolle des sehr starken Polyhedrin-Promotors.

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.....	F ⁻ <i>ompT hsd S_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^r)
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁺ , <i>deoR, endA1, gyrA96, hsdR17, (r_k⁻ m_k⁺), glnV44, thi-1, recA1, relA1, supE44, Φ80Δ<i>lacZ</i>ΔM15, thi-1, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169</i>
<i>E. coli</i> TOP10F'	F', <i>mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80Δ<i>lacZ</i>ΔM15, Δ<i>lacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu), 7697, galU, galK, λ-, rspL, (Str^R), endA1, nupG</i></i>

Zelllinie	Beschreibung / Kultivierung
BxPC3.....	Humane Adenokarzinomzelllinie aus dem Pankreas. Kultivierung in RPMI mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin / Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO ₂ -Atmosphäre.
HEK 293T	Humane embryonale Nierenkarzinomzelllinie, die das T-Antigen von SV 40 exprimiert. Kultivierung in DMEM mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin / Streptomycin bei 37 °C und 7 % CO ₂ -Atmosphäre.
HeLa.....	Epithelartig wachsende Zelllinie aus humanem Cervix-Karzinom. Kultivierung in DMEM mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin / Streptomycin bei 37 °C und 7 % CO ₂ -Atmosphäre.
SF9	Insektenzelllinie aus dem Ovargewebe des Nachtfalters (<i>Spodoptera frugiperda</i>). Eignet sich zur Expression rekombinanter Proteine durch Infektion mit transgenen Baculoviren. Kultivierung in TC-100 Medium mit 10 % FCS und 0,26 % Tryptose Phosphat Broth bei 28 °C ohne CO ₂ -Begasung.

3.1.2 Vektoren

Vektor	Beschreibung
pKK223-3	Vektor mit tac-Promotor zur Expression von Proteinen ohne <i>tag</i> in <i>E. coli</i> .
pet23a(+)-mod	Vektor mit modifizierter MCS und T7-Promotor zur Expression von Proteinen ohne <i>tag</i> in <i>E. coli</i> .
pet28a(+)	Vektor mit T7-Promotor zur Expression von Proteinen mit N- oder C-terminalem (His) ₆ - <i>tag</i> in <i>E. coli</i> .
pet32a/b(+/-).....	Vektor mit T7-Promotor zur Expression von Proteinen mit N-terminal fusioniertem Trx-, S- oder (His) ₆ - <i>tag</i> in <i>E. coli</i> .
pGEX-4T-1.....	Vektor mit T7-Promotor zur Expression von Proteinen mit N-terminal fusioniertem GST in <i>E. coli</i> .

pCDNA3.1(+/-)Vektor mit CMV-Promotor zur Proteinexpression in Säugerzellen.

pCantagVektor mit CMV- und T7-Promotor zur Expression in Säugerzellen sowie in *E. coli*.

pEGFP-C2Vektor mit CMV-Promotor zur Expression von Proteinen mit N-terminal fusioniertem *enhanced* GFP in Säugerzellen.

pEYFP-C1Vektor mit CMV-Promotor zur Expression von Proteinen mit N-terminal fusioniertem *enhanced* YFP in Säugerzellen.

3.1.3 DNA-Konstrukte

Tab. 3.1: Übersicht über die verwendeten DNA-Konstrukte

Name	Insert	Vektor	Klonierungs-enzyme	Referenz
S100Pwt	humane S100P cDNA	pKK223-3	<i>EcoRI/HindIII</i>	V. Gerke
His-S100Pwt	humane S100P cDNA	pet28a(+)	<i>EcoRI/Sall</i>	M. Koltzsch
GFP-S100Pwt	humane S100P cDNA	pEGFP-C2	<i>EcoRI/Sall</i>	M. Koltzsch
GST-S100Pwt	humane S100P cDNA	pGex-4T-1	<i>EcoRI/Sall</i>	eigene Arbeit
His-S100Pwt	humane S100P cDNA + 5' terminaler (His) ₆ -tag cDNA	pCDNA3.1(+)	<i>EcoRV/NotI</i>	eigene Arbeit
S100PΔ21-25	humane S100P cDNA, Deletion der AS 21-25	pet23a(+)- mod	<i>EcoRI/Sall</i>	eigene Arbeit
His-S100PΔ21-25	humane S100P cDNA, Deletion der AS 21-25	pet28a(+)	<i>EcoRI/Sall</i>	eigene Arbeit
GFP-S100PΔ21-25	humane S100P cDNA, Deletion der AS 21-25	pEGFP-C2	<i>EcoRI/Sall</i>	eigene Arbeit
GST-S100PΔ21-25	humane S100P cDNA, Deletion der AS 21-25	pGex-4T-1	<i>EcoRI/Sall</i>	eigene Arbeit
His-S100PΔ21-25	humane S100P cDNA, Deletion der AS 21-25 + 5' terminale (His) ₆ -tag cDNA	pCDNA3.1(+)	<i>EcoRV/NotI</i>	eigene Arbeit
His-S100PΔ21-23	humane S100P cDNA, Deletion der AS 21-23	pet28a(+)	<i>EcoRI/Sall</i>	J. Austermann

Name	Insert	Vektor	Klonierungs-enzyme	Referenz
His-S100P Δ 25-27	humane S100P cDNA, Deletion der AS 25-27	pet28a(+)	<i>EcoRI/Sall</i>	eigene Arbeit
pet28a-S100P-91aa	humane S100P cDNA kodierend für AS 1-91	pet28a(+)	<i>EcoRI/Sall</i>	J. Austermann
pet28a-S100P-87aa	humane S100P cDNA kodierend für AS 1-87	pet28a(+)	<i>EcoRI/Sall</i>	J. Austermann
pet28a-S100P-87aa-mut	humane S100P cDNA kodierend für AS 1-87, Substitution T82A, S83L, H86N	pet28a(+)	<i>EcoRI/Sall</i>	eigene Arbeit
pet28a-S100P-84aa	humane S100P cDNA kodierend für AS 1-84	pet28a(+)	<i>EcoRI/Sall</i>	eigene Arbeit
His-S100P-84aa-mut	humane S100P cDNA kodierend für AS 1-84, Substitution T82A, S83L	pet28a(+)	<i>EcoRI/Sall</i>	eigene Arbeit
GST-IQGAP1	humane IQGAP1 cDNA	pAcYM1-GST	<i>XhoI/NotI</i>	K. Kobayashi
IQGAP1	humane IQGAP1 cDNA + 3'UTR	pCantag	<i>BamHI/XbaI</i>	J. Erickson
N-ter	humane IQGAP1 cDNA kodierend für AS 1-862	pCDNA3.1(+)	<i>BamHI</i>	G.O. M'Bele
His-N-ter	humane IQGAP1 cDNA kodierend für AS 1-862	pet32a(+)	<i>BamHI</i>	G.O. M'Bele
His-C-ter	humane IQGAP1 cDNA kodierend für AS 863-1933	pet32b(+)	<i>BamHI/HindIII</i>	G.O. M'Bele
CHD	humane IQGAP1 cDNA kodierend für AS 1-230	pCDNA3.1(+)	<i>BamHI/EcoRI</i>	G.O. M'Bele
His-CHD	humane IQGAP1 cDNA kodierend für AS 1-230	pet32a(+)	<i>BamHI/EcoRI</i>	G.O. M'Bele
CHD-IQ	humane IQGAP1 cDNA kodierend für AS 1-230 + 745-862	pCDNA3.1(+)	<i>BamHI</i>	G.O. M'Bele

Name	Insert	Vektor	Klonierungs-enzyme	Referenz
His-CHD-IQ	humane IQGAP1 cDNA kodierend für AS 1-230 + 745-862	pet32a(+)	<i>Bam</i> HI/ <i>Stu</i> I	G.O. M'Bele
IQ	humane IQGAP1 cDNA kodierend für AS 745-862	pCDNA3.1(-)	<i>Stu</i> I/ <i>Bam</i> HI	G.O. M'Bele
His-IQ	humane IQGAP1 cDNA kodierend für AS 745-862	pet32b(+)	<i>Stu</i> I/ <i>Bam</i> HI	G.O. M'Bele
IR-WW	humane IQGAP1 cDNA kodierend für AS 162-744	pCDNA3.1(+)	<i>Stu</i> I	G.O. M'Bele
His-IR-WW	humane IQGAP1 cDNA kodierend für AS 162-744	pet32b(+)	<i>Stu</i> I	G.O. M'Bele
IR-WW-IQ	humane IQGAP1 cDNA kodierend für AS 162-862	pCDNA3.1(+)	<i>Eco</i> RV/ <i>Bam</i> HI	G.O. M'Bele
His-IR-WW-IQ	humane IQGAP1 cDNA kodierend für AS 162-862	pet32a(+)	<i>Hin</i> clI/ <i>Bam</i> HI	G.O. M'Bele
His-CHD-IR-WW	humane IQGAP1 cDNA kodierend für AS 1-745	pet32a(+)	MSC2	G.O. M'Bele
His-Ezrin	humane Ezrin cDNA	pet28a(+)	<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I	M. Koltzsch
His-EzrinT567D	humane Ezrin cDNA, Substitution T567D	pet28a(+)	<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I	J. Austermann
His-N-ERMAD	humane Ezrin cDNA kodierend für AS 1-296	pet28a(+)	<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I	M. Koltzsch
GST-N-ERMAD	humane Ezrin cDNA kodierend für AS 1-296	pGex-4T-1	<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I	J. Austermann
His-C-ERMAD	humane Ezrin cDNA kodierend für AS 465-586	pet28a(+)	<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I	M. Koltzsch
YFP-S100A10	humane S100A10 cDNA	pEYFP-C1	<i>Xho</i> I	N. Zobiack
His-S100A10	humane S100A10 cDNA	pet28a(+)	<i>Eco</i> RI/ <i>Hin</i> dIII	I. Rojo Pulido
His-S100A2	humane S100A2 cDNA	pet28a(+)	<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I	B. Kaiser

3.1.4 Oligonukleotide

Die für die Klonierungen verwendeten Oligonukleotide sind im Folgenden aufgeführt. Sie wurden in Auftragsarbeit von der Firma Sigma hergestellt.

Name	Sequenz (5' → 3')
5'S100Pwt	GATCGAATTCATGACGGAACTAGAGACAGCCATG
3'S100Pwt	GATCGTCGACTCATTGAGTCCTGCCTTCTCAAAG
5'S100PΔ21-25	TCGGGCCAGACCCTGACCAAGGGGGA
3'S100PΔ21-25	GTCTGGCCCGAATATCGGGAAAAGACGT
5'S100PΔ25-27	GGCAGCCTGACCAAGGGGGAGCTCA
3' S100PΔ25-27	GTCAGGCTGCCCTCGCTGCCCGAATATC
87aa_mut_FW	CGTGGCTGCAATCGCGTTGGCCTGTAACAAGTAAGTCGACAAGC
87aa_mut_RV	GCTTGTGCTGACTTACTTGTACAGGCCAACGCGATTGCAGCCACG
S100P_84aa_FW	GCTGCAATCACGTCTGCCTAAGTCGACAAGCTTGC
S100P_84aa_RV	GCAAGCTTGTGCTGACTTAGGCAGACGTGATTGCAGC
S100P_84aa_mut_FW	GCTGCAATCGCGTTGGCCTAAGTCGACAAGCTTGC
S100P_84aa_mut_RV	GCAAGCTTGTGCTGACTTAGGCCAACGCGATTGCAGC
5'EcoRV-pet28a	AGGAGATATACCGATATCATGGGCAGCA
3'pet28a	CTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGT

3.1.5 Antikörper

Tab. 3.2: Verwendete Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Blockierlösung	Bezugsquelle
IQGAP1	Maus	WB: 1:5000	5 % Milch/TBS-T	BD Biosciences
IQGAP1	Kaninchen	IF: 1:500	2 % BSA/PBS	K. Kaibuchi
IQGAP1 (H-108)	Kaninchen	IP: 1 µg	–	Santa Cruz
S100P ascitis	Maus	WB: 1:1000 IF: 1:50	5 % Milch/TBS-T 2 % BSA/PBS	V. Gerke
S100P (Mab-18-9)	Maus	WB: unverd. IF: 1:10	5 % Milch/TBS-T	A. Gibadulinova
Ezrin	Kaninchen	WB: 1:500	5 % Milch/TBS-T	Upstate
Ezrin	Maus	IF: 1:200	2 % BSA/PBS	Covance
Penta-His	Maus	WB: 1:10.000	5 % Milch/TBS-T	Qiagen

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Blockierlösung	Bezugsquelle
GFP	Maus	WB: 1:2000	5 % Milch/TBS-T	Clontech
GST (B-12)	Maus	WB: 1:5000	5 % Milch/TBS-T	Santa Cruz
Phospho-Tyr 4G10	Maus	WB: 1:2000	5 % BSA/TBS-T	Millipore
B-Raf (F-3)	Maus	WB: 1:700	5 % BSA/TBS-T	Santa Cruz
MEK1/2	Kaninchen	WB: 1:1000	5 % BSA/TBS-T	Cell Signaling
Phospho-MEK1/2	Kaninchen	WB: 1:1000	5 % BSA/TBS-T	Cell Signaling
Rac1	Maus	WB: 1:1000	5 % Milch/TBS-T	BD Biosciences
cdc42 (sc-87)	Kaninchen	WB: 1:500	5 % Milch/TBS-T	Santa Cruz

Tab. 3.3: Verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Blockierlösung	Bezugsquelle
POX- α -Maus	Ziege	1:2500	5 % Milch/TBS-T	Dianova
POX- α -Kaninchen	Ziege	1:2500	5 % Milch/TBS-T	Dianova
TexasRed- α -Maus	Ziege	1:200	2 % BSA/PBS	Dianova
Alexa-Fluor488- α -Kaninchen	Ziege	1:400	2 % BSA/PBS	Invitrogen

3.1.6 Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>Pfu</i> Polymerase (und Puffer)	Stratagene
Restriktionsendonukleasen (und Puffer)	Fermentas
Ribonuklease A	Sigma
T4-DNA-Ligase (und Puffer).....	Fermentas

3.1.7 Chemikalien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
Acrylamid Rotiphorese-Gel 30	Roth
Agarose LE	Biozym Diagnostik GmbH
Ampicillin	Roth
Amersham <i>Amplify™ Fluorographic Reagent</i>	GE Healthcare
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth

Bacto-Agar	AppliChem
Bromphenolblau.....	Roth
BSA Fraktion V	PAA
CaCl ₂	Merck
<i>Complete Protease Inhibitor Cocktail</i>	Roche
Coomassie Brillant Blau R-250.....	AppliChem
<i>Coomassie Plus Protein Assay Reagent</i>	Thermo Scientific
Developer G153.....	Agfa
DMEM High Glucose.....	PAA Laboratories
DNA Molekulargewichtsstandard 1kb.....	Fermentas
dNTP Mix	Fermentas
DTT	AppliChem
Dynabeads® M-280 Sheep-anti-Rabbit IgG.....	Invitrogen
EDTA	AppliChem
EGF.....	Sigma
EGTA	AppliChem
Essigsäure	AppliChem
Ethanol	AppliChem
Ethidiumbromid	Sigma
FCS	Biochrom
Formaldehyd 37 %.....	Roth
Glycerol.....	Sigma
L-Glutamin	Biochrom AG
L-Glutathion (reduziert).....	AppliChem
Glutathionsepharose 4B.....	GE Healthcare
Hefeextrakt.....	AppliChem
HEKfectin	BioRad
HEPES.....	AppliChem
Imidazol	Roth
IPTG	AppliChem
Isopropanol	AppliChem
Kaliumacetat.....	Roth
Kanamycin	AppliChem
Leupeptin.....	Sigma
Lipofectamine 2000.....	Invitrogen

<i>Loading Dye (6x)</i>	Fermentas
Magermilchpulver	AppliChem
Methanol	AppliChem
β -Mercaptoethanol	Roth
Magnesiumchlorid.....	Merck
Mowiol 4-88	Calbiochem
Natriumazid	AppliChem
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumhydroxid	AppliChem
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
PBS.....	PAA Laboratories
Penicillin/Streptomycin	Cambrex
Phenyl Sepharose 6 <i>Fast Flow</i>	Pharmacia Biosciences
<i>PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail</i>	Roche
PMSF.....	AppliChem
<i>Prestained Proteinmarker (Broad Range)</i>	New England Biolabs
Protein A-Sepharose CL-4B	GE Healthcare
Redivue L- ³⁵ S]Methionin (15mC/ml)	GE Healthcare
Rapid Fixer G354	Agfa
Salzsäure 37 %	AppliChem
SDS Ultra Pure	AppliChem
Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate.....	Pierce
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce
TC-100 Medium	PAA
TEMED	Biomol
Triton X-100.....	AppliChem
Tris	AppliChem
Trypan Blue Stain.....	Invitrogen
Tryptose Phosphate Broth	Sigma-Aldrich
Trypsin	Gibco
Trypton	AppliChem
Tween 20	AppliChem

3.1.8 Sonstige Materialien

Materialien / Kits	Hersteller
3MM Chromatographiepapier (Whatman).....	Hartenstein
CM5 Sensorchip.....	GE Healthcare
Dialyseschläuche	Roth
<i>Handee™</i> Centrifuge Columns; 0,8 ml.....	Pierce
Protran Nitrocellulose Transfer Membran.....	Schleicher & Schuell
Röntgenfilme Super RX.....	Fujifilm
UVette 220-1600 nm	Eppendorf
<i>Qiagen Gel Extraction Kit</i>	Qiagen
<i>Qiagen PCR Purification Kit</i>	Qiagen
<i>Jetstar 2.0 LFU Maxi Kit</i>	Genomed
<i>TnT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System</i>	Promega

3.1.9 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose-Gelsystem: Perfect Blue	Peqlab
Avanti J-25 Zentrifuge	Beckman
LSM 510 Meta Laser Scanning Mikroskop	Zeiss
Biofuge <i>fresco</i>	Heraeus Instruments
Biofuge <i>pico</i>	Heraeus Instruments
BioPhotometer	Eppendorf
Bronson Sonifier 250	Heinemann
Brutschrank	Memmert
CCD-Kamera	Cybertech
DM RXA Mikroskop	Leica
Entwicklermaschine Curix60	Agfa
Geltrockner.....	Hoefer Drygel Sr.
Magnetständer MPC®-E	Dynal
Mastercycler.....	Eppendorf
Megafuge 1.0R, Rotor 7750	Heraeus Instruments
Mini-Gel Laufkammer.....	Biometra
Mini-Trans-Blot Kammer	BioRad
Optima L-70K Ultrazentrifuge	Beckman

Optima TL Ultrazentrifuge.....	Beckman
Rocking-Plattform.....	Biometra
Schüttelinkubator innova 4000.....	New Brunswick Scientific
Sonifier Vial Tweeter.....	Hielscher
Sterilwerkbank.....	BDK, Heraeus Instruments
Thermomixer 5436.....	Eppendorf
Überkopfschüttler 3025.....	GFL
UV-Transluminator.....	Biometra
UV/VIS Spektrophotometer DU® 530.....	Beckman
Zählkammer.....	Brand Neubauer
Zell-Inkubatoren.....	Heraeus, Forma Scientific

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für einen präparativen Restriktionsverdau wurden standardmäßig 3 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die benötigte Enzymmenge orientierte sich an den Herstellerangaben für den Verdau von Phage λ-DNA. Der Ansatz wurde für 3 h mit dem vom Hersteller empfohlenen Restriktionspuffer und bei der für die Enzymaktivität optimalen Temperatur inkubiert. Im Falle eines analytischen Restriktionsverdaus wurden lediglich 0,5 µg Plasmid-DNA eingesetzt und die Inkubationszeit verkürzte sich auf 1 h.

Bei Verwendung von zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen wurden die Temperatur und der Puffer gewählt, die eine möglichst hohe Aktivität beider Endonukleasen gewährleisteten. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 65 °C für 20 min beendet.

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die durch einen Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit 0,5–3 % (w/v) Agarose und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit 6x *Loading Dye* versetzt und das Gel mit den Proben sowie 5 µl eines Molekulargewichtsstandards beladen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 V in TAE-Puffer für 20-60 min. Anschließend konnten die aufgetrennten DNA-Fragmente durch den in die DNA interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid am UV-Tisch detektiert werden.

TAE-Puffer: 40 mM Tris-HCl pH 8,0
40 mM Eisessig
1 mM EDTA
1 mM Guanosinhydrat

3.2.3 Gelextraktion

Die im Rahmen von Klonierungen benötigten DNA-Fragmente wurden auf dem UV-Tisch mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Dabei wurde mit schwacher UV-Beleuchtung und möglichst kurzer Exposition gearbeitet, um eine Schädigung der DNA zu vermeiden. Die Extraktion der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit dem *Gel Extraction Kit* von Qiagen.

3.2.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm am BioPhotometer. Für die Absorption sind dabei die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Einer OD_{260} von 1 entsprechen ca. 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngige DNA. Standardmäßig wurde die zu untersuchende Nukleinsäurelösung 1:50 verdünnt.

3.2.5 Reinigung von DNA-Fragmenten über eine Spinsäule

Mussten nach einem Restriktionsverdau lediglich Enzyme, Pufferbestandteile sowie sehr kleine Spaltnebenprodukte von dem benötigten DNA-Fragment abgetrennt werden, konnte alternativ zu der Reinigung durch Gelelektrophorese, auch eine Reinigung über eine Spinsäule erfolgen. Hierzu wurde das *PCR Purification Kit* von Qiagen verwendet.

3.2.6 Ligation

Für die kovalente Verknüpfung von Vektor-DNA mit Insert-DNA mussten diese zuvor von der- bzw. denselben Restriktionsendonukleasen restringiert worden sein. Standardmäßig wurden 50 ng Vektor-DNA sowie 150 ng Insert-DNA mit der T4 Ligase und dem T4 Ligase Puffer über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde zudem immer ein Religationskontrollansatz mitgeführt, der keine Insert-DNA enthielt.

3.2.7 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung der *E. coli* Stämme DH5 α , Top10F' und BL21 erfolgte in sterilem LB-Medium bei 37 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator oder auf LB-Agarplatten, die ebenfalls bei 37 °C inkubiert wurden. Zur Selektion von plasmidhaltenden *E. coli* Zellen wurde das dem Resistenzgen des Plasmids entsprechende Antibiotikum zugesetzt.

LB-Medium: 1 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
1 % NaCl

LB-Agarplatten: 1 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
1 % NaCl
1,5 % Bacto-Agar

Ampicillin: 100 μ g/ml

Kanamycin: 30 μ g/ml

3.2.8 Bestimmung des Bakterienwachstums

Das Bakterienwachstum in einer Flüssigkultur wurde durch die Messung der optischen Dichte mit dem UV/VIS Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm überwacht. Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht einer ungefähren Zelldichte von $1 \cdot 10^9$ Zellen/ml.

3.2.9 Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli*

Für die Erzeugung CaCl₂-kompetenter *E. coli* Zellen wurde eine 50 ml Hauptkultur 1:50 mit einer Startkultur inokuliert. Es folgte die Kultivierung auf dem Schüttelinkubator bei 250 rpm und 37 °C bis eine OD₆₀₀ = 0,3-0,4 erreicht war. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 2500 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R). Die sedimentierten Bakterien wurden in 40 ml einer eiskalten 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Bakterienpellet in 2 ml einer Lösung aus 100 mM CaCl₂ und 20 % (v/v) Glycerol resuspendiert. 200 μ l Aliquots dieser Suspension wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Nutzung bei -80 °C gelagert.

3.2.10 Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli*

Für die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurden zunächst 50 µl (DH5α und Top 10) bzw. 200 µl (BL21) der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1 µg Plasmid-DNA bzw. 1 µl eines Ligationsansatzes oder 10 µl einer PCR-Reaktion folgte eine Inkubation auf Eis für 30 min. Anschließend wurden die Bakterien für 1 min einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Zur Regeneration wurden die Bakterien durch eine 5-10-minütige Inkubation auf Eis abgekühlt und dann für 1 h in 1 ml LB-Medium auf einem Schüttelinkubator bei 250 rpm und 37 °C kultiviert. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde die Bakteriensuspension anschließend auf entsprechenden antibiotikumhaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.11 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur für 5 min bei 500 rpm (Biofuge *pico*) zentrifugiert. Die pelletierten Bakterien wurden anschließend in 300 µl kaltem Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl Puffer P2 und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurden die Bakterien lysiert. Anschließend wurden 300 µl kalter Puffer P3 zugesetzt und das Gemisch für 5 min auf Eis inkubiert. Durch eine Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C (Biofuge *fresco*) wurden die chromosomale DNA sowie Zelltrümmer und Proteine sedimentiert. Der resultierende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 630 µl 100%igem Isopropanol und Zentrifugation bei 13.000 rpm für 30 min bei 4 °C. Das entstandene DNA-Pellet wurde mit 100 µl 70%igem Ethanol versetzt und erneut für 5 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde die pelletierte Plasmid-DNA getrocknet und in 30 µl ddH₂O resuspendiert.

Puffer P1: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase A

Puffer P2: 200 mM NaOH
1 % (w/v) SDS

Puffer P3: 3,0 M KAc, pH 5,5

Zur Plasmid-Präparation im größeren Maßstab und in höherer Reinheit wurde das *Jetstar 2.0 LFU Maxi Kit* verwendet. Ausgehend von einer 200 ml Übernachtskultur der transformierten *E. coli* Zellen wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

3.2.12 Mutagenese-PCR

Die Erzeugung der Konstrukte pcDNA3.1-His-S100Pwt bzw. pcDNA3.1-His-S100PΔ21-25, welche eine Expression der beiden S100 Proteine in Säugerzellen ermöglichen, erfolgte durch Umklonierung der jeweiligen cDNA inklusive der (His)₆-tag-cDNA aus den entsprechenden pet28a-Konstrukten in den pcDNA3.1(+)-Vektor. Dazu musste zuvor in den beiden Plasmiden, pet28a-S100Pwt sowie pet28a-S100PΔ21-25, eine *EcoRV*-Schnittstelle 5'-terminal des (His)₆-tags eingefügt werden. Dies erfolgte durch Mutagenese-PCR unter Verwendung des mutagenen Primers „5'EcoRV-pet28a“, des Primers „3'pet28a“ sowie des entsprechenden pet-28a-Konstrukts als DNA-*template*.

DNA- <i>template</i>	100 ng
Forward-Primer (10 μM)	2 μl
Reverse-Primer (10 μM)	2 μl
dNTP Mix (10 mM)	1 μl
10x <i>Pfu</i> Puffer	5 μl
<i>Pfu</i> Turbo Polymerase	1 μl
ddH ₂ O	ad 50 μl

Tab. 3.4: PCR-Programm zwecks zielgerichteter Mutagenese

Prozess	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95 °C	2 min	1 x
Denaturierung	95 °C	30 sec	5 x
Primer-Anlagerung	45 °C	30 sec	
Elongation	68 °C	30 sec	
Denaturierung	95 °C	30 sec	23 x
Primer-Anlagerung	66 °C	30 sec	
Elongation	68 °C	30 sec	
finale Elongation	68 °C	8 min	1 x

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese identifiziert und mittels Gelextraktion gereinigt. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden anschließend einem Restriktionsverdau mit den Enzymen *EcoRV* und *NotI* unterzogen und standen dann für die Ligation mit dem ebenfalls *EcoRV/NotI*-restringierten Vektor pcDNA3.1(+) zur Verfügung.

Die Erzeugung der S100P-Mutanten His-S100P-87aa-mut, His-S100P-84aa und His-S100P-84aa-mut erfolgte ebenfalls durch eine zielgerichtete Mutagenese-PCR.

Allerdings wurde dabei unter Verwendung zweier mutagener Primer jeweils das gesamte Plasmid amplifiziert. Die nichtmutierte parentale DNA wurde anschließend durch Inkubation mit der Endonuklease *DpnI* abgebaut, welche spezifisch methylierte sowie hemimethylierte DNA spaltet.

Für die Erzeugung von His-S100P-87aa-mut, bei welcher die Mutationen T82A, S83L und H86N eingeführt werden mussten, sowie für die Erzeugung von His-S100P-84aa, diente das Plasmid pet28a-S100P-87aa als DNA-*template*. Zur Erzeugung von His-S100P-84aa-mut diente das neu generierte Plasmid pet28a-S100P-87aa-mut als DNA-*template*.

DNA- <i>template</i>	200 ng
Forward-Primer (10 µM)	2 µl
Reverse-Primer (10 µM)	2 µl
dNTP Mix (10 mM)	1 µl
10x <i>Pfu</i> Puffer	5 µl
<i>Pfu</i> Turbo Polymerase	1 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Tab. 3.5: PCR-Programm zwecks zielgerichteter Mutagenese bei Amplifikation des gesamten Plasmids

Prozess	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95 °C	2 min	1 x
Denaturierung	95 °C	30 sec	24 x
Primer-Anlagerung	55 °C	30 sec	
Elongation	68 °C	6 min	
finale Elongation	68 °C	10 min	1 x

Der Erfolg der PCR wurde überprüft, indem 1 µl des PCR-Ansatzes für eine analytische Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt wurde. Der restliche PCR-Ansatz wurde anschließend mit 1 µl *DpnI* für 1 h bei 37 °C inkubiert. 10 µl dieses Ansatzes wurden für die Transformation von CaCl₂-kompetenten *E. coli* Top 10 eingesetzt.

3.2.13 Zweistufige Mutagenese-PCR

Die Erzeugung der S100P Deletionsmutanten His-S100P Δ 21-25 sowie His-S100P Δ 25-27 erfolgte durch eine zweistufige PCR (Abb. 3.1).

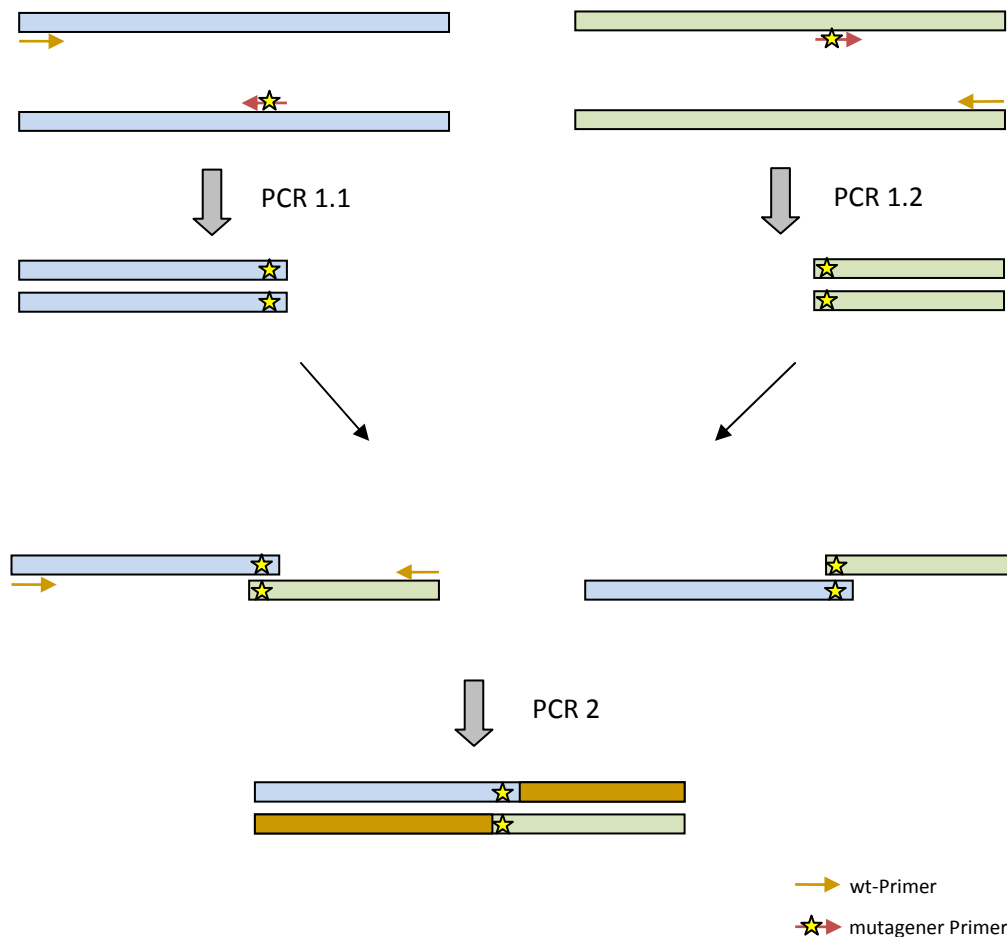


Abb. 3.1: Schematische Darstellung einer zweistufigen PCR

Im ersten Schritt werden parallel zwei Amplifikationen einmal proximal und einmal distal bis zur gewünschten Mutationsposition durchgeführt. Dies erfolgte durch Verwendung jeweils eines wt- und eines mutagenen Primers. In einem zweiten Schritt dienen die PCR-Produkte aus Schritt 1.1 und 1.2 nach Gelreinigung gemeinsam als DNA-*template* und werden durch Verwendung beider wt-Primer, die nur in einem Fall binden können, zu dem gewünschten durchgängigen DNA-Fragment vereinigt.

Als DNA-*template* für die PCR-Ansätze des ersten Schrittes diente sowohl bei der Erzeugung von His-S100P Δ 21-25 als auch von His-S100P Δ 25-27, das Plasmid pet28a-S100Pwt. Die jeweiligen DNA-Fragmente wurden mittels des PCR Programms, welches in Tab. 3.6 aufgeführt ist, amplifiziert. Die Annealing-Temperatur betrug stets 62 °C mit Ausnahme von Ansatz 1.2 bei der Erzeugung von His-S100P Δ 21-25. In diesem Ansatz wurde eine Annealing-Temperatur von 58 °C gewählt.

PCR-Ansatz 1.1

DNA- <i>template</i>	10 ng
5'-wt Primer (10 µM)	2 µl
3'-mutagener Primer (10 µM)	2 µl
dNTP Mix (10 mM)	5 µl
10x <i>Pfu</i> Puffer	5 µl
<i>Pfu</i> Turbo Polymerase	1 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

PCR-Ansatz 1.2

DNA- <i>template</i>	10 ng
5'-mutagener Primer (10 µM)	2 µl
3'-wt Primer (10 µM)	2 µl
dNTP Mix (10 mM)	5 µl
10x <i>Pfu</i> Puffer	5 µl
<i>Pfu</i> Turbo Polymerase	1 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Tab. 3.6: PCR-Programm für Schritt 1 einer zweistufigen PCR

Prozess	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95 °C	2 min	1 x
Denaturierung	95 °C	45 sec	36 x
Primer-Anlagerung	58 °C / 62 °C	45 sec	
Elongation	68 °C	2 min	
finale Elongation	68 °C	10 min	1 x

Die im ersten Schritt erzeugten PCR-Produkte 1.1 und 1.2 wurden durch Auftrennung im Agarosegel identifiziert und durch Gelextraktion gereinigt. Sie dienen gemeinsam als DNA-*template* für den zweiten Schritt der zweistufigen PCR (Tab. 3.7).

PCR-Ansatz 2

PCR-Produkt 1.1	26 µl
PCR-Produkt 1.2	26 µl
5'-wt Primer (10 µM)	5 µl
3'-wt Primer (10 µM)	5 µl
dNTP Mix (10 mM)	8 µl
10x <i>Pfu</i> Puffer	8 µl
<i>Pfu</i> Turbo Polymerase	2 µl

Tab. 3.7: PCR-Programm für Schritt 2 einer zweistufigen PCR

Prozess	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95 °C	2 min	1 x
Denaturierung	95 °C	30 sec	36 x
Primer-Anlagerung	58 °C	30 sec	
Elongation	68 °C	30 sec	
finale Elongation	68 °C	10 min	1 x

Das resultierende PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese identifiziert und mittels Gelextraktion gereinigt. Das gereinigte DNA-Fragment stand nun für die Spaltung mit den DNA-Endonukleasen *EcoRI* und *SalI* und für die sich daran anschließende Ligation mit dem ebenfalls *EcoRI/SalI*-restringierten Vektor *pet28a(+)* zur Verfügung.

3.2.14 DNA-Sequenzierung

Die in der vorliegenden Arbeit neu generierten DNA-Konstrukte wurden auf ihre Korrektheit geprüft. Dies erfolgte durch Sequenzierung der entsprechenden Plasmid-DNA in Auftragsarbeit bei der Firma Seqlab (Göttingen).

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Passagieren adhärent wachsender Zellen

Die adhärent wachsenden humanen Zelllinien HeLa, HEK 293T und BxPC3 wurden bis zu einer Konfluenz von bis zu 90 % unter den für sie optimalen Bedingungen kultiviert. Zur Passagierung der Zellen wurde unter sterilen Bedingungen das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit PBS^{-/-} gewaschen. Die Ablösung der Zellen von der Kulturschale erfolgte durch Inkubation mit TE-Lösung bei 37 °C für 2-5 min. Durch Zugabe von frischem Medium oder Serum wurde die Reaktion gestoppt und die abgelösten Zellen wurden durch eine 4-minütige Zentrifugation bei 800 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in geeigneter Verdünnung in neue Kulturschalen ausgesät.

TE-Lösung: 0,05 % Trypsin
0,2 % EDTA

3.3.2 Passagieren semiadhärent wachsender Zellen

Die Passagierung der semiadhärent wachsenden Insektenzelllinie SF9 erfolgte durch vorsichtiges Abschaben der leicht adhären Zellen mit einem Zellschaber. Nach 4-minütiger Zentrifugation bei 800 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) wurden die sedimentierten Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und in geeigneter Verdünnung in neue Gewebekulturflaschen überführt.

3.3.3 Langzeitaufbewahrung von Zellen

Zur langfristigen Lagerung von Zellen wurden diese bei Erreichen von ca. 60%iger Konfluenz von der Kulturschale abgelöst. Die durch Zentrifugation sedimentierten Zellen wurden in 1 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Nach ca. 2-stündiger Lagerung bei -20 °C und ca. 16-stündiger Lagerung bei -80 °C, wurden sie anschließend für die Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium: 90 % FCS
10 % DMSO

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch kurze Inkubation im 37 °C warmen Wasserbad. Nach anschließender Zentrifugation für 4 min bei 800 rpm (Megafuge Heraeus 1.0R) wurde das Zellpellet in einem geeigneten Volumen des entsprechenden Kulturmediums aufgenommen und in eine frische Kulturschale überführt.

3.3.4 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension wurde eine Neubauer-Zählkammer genutzt. Ein Aliquot der abgelösten und in frischem Medium resuspendierten Zellen wurde mit Trypan-Blau versetzt und die Mischung in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Anzahl der lebenden (nicht blau gefärbten) Zellen in 4 Großquadraten wurde am Mikroskop bestimmt. Die Lebendzellzahl in der Ausgangssuspension ließ sich über folgende Gleichung ermitteln:

$$\text{Mittelwert (Zellen/Großquadrat)} * 10^4 * \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellen/ml}$$

3.3.5 Liposomen vermittelte Transfektion von Zellen

Die Transfektion von HeLa-Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 von Invitrogen, HEK293T-Zellen wurden mit HEKfectin transfiziert. Die jeweiligen Zellen wurden dazu am Tag zuvor in ggf. mit Deckgläschen bestückten Kulturschalen ausgesät. Die Transfektion der Zellen wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Die anschließende Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank für bis zu 24 Stunden.

3.3.6 Stimulierung von Zellen

Zur Stimulierung wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS^{+/+} gewaschen und anschließend für 16 h in serumfreiem Medium kultiviert. Die Stimulierung erfolgte entweder durch Zugabe von 50 ng/ml EGF und Inkubation bei 37 °C für 5 min oder durch 30-minütige Kultivierung der Zellen in FCS-haltigem Medium. Im Anschluss an die Stimulierung folgte entweder eine Fixierung und Immunfärbung der Zellen oder die Herstellung von Zelllysaten für weitere Untersuchungen.

3.3.7 Immunfluoreszenz-Analyse

Zur Lokalisation von Proteinen innerhalb der Zelle wurden diese Proteine entweder als GFP- bzw. YFP-Fusionsproteine exprimiert oder mittels indirekter Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. In beiden Fällen wurden die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen zunächst zweimal vorsichtig mit PBS^{+/+} gewaschen, woraufhin die Fixierung der Zellen durch eine 10-minütige Inkubation mit Fixierlösung erfolgte.

Im Falle GFP- oder YFP-Fusionsproteine exprimierender Zellen, bei denen keine Co-Färbung durchgeführt werden sollte, wurden die Deckgläschen nach der Fixierung mit PBS und ddH₂O gewaschen und auf einem Objektträger in einem Tropfen Mowiol-Lösung eingebettet.

Im Falle einer Antikörperfärbung der Präparate wurden nach der Fixierung freie Aldehydgruppen des Formaldehyds durch Inkubation mit Ammoniumchloridlösung gequenchet. Nach 2-maligem Waschen mit PBS^{+/+} wurden die fixierten Zellen 2 min mit 0,2 % Triton X-100 in PBS^{+/+} permeabilisiert und erneut gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die auf den Deckgläschen fixierten Zellen für 30 min mit Blockierlösung inkubiert. Hiernach folgte eine 45-minütige Inkubation mit dem in Blockierlösung verdünnten Primärantikörper. Nach wiederholtem Waschen mit PBS^{+/+} wurden die Zellen für 45 min mit dem in Blockierlösung verdünnten Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen erneut gründlich gewaschen. Im Falle einer Doppelfärbung wurde die Prozedur mit dem zweiten Primär- und dem entsprechenden Sekundärantikörper wiederholt. Nach der Antikörperfärbung wurden die Deckgläschen mit ddH₂O gewaschen und in Mowiol-Lösung eingebettet. Nach Trocknung des Mowioles konnten die fixierten und ggf. gefärbten Zellen mit dem LSM510 Meta Konfokalmikroskop der Firma Zeiss untersucht werden.

Fixierlösung: 3,7 % (v/v) Formaldehyd in PBS^{+/+}

Ammoniumchloridlösung: 50 mM NH₄Cl₂ in PBS^{+/+}

Permeabilisierungslösung: 0,2 % (v/v) Triton X-100 in PBS^{+/+}

Blockierlösung: 2 % (w/v) BSA in PBS^{+/+}

Mowiol-Lösung: 2,4 g Mowiol 4-88
6 g Glycerol
12 ml 0,2 M Tris-HCl pH 8,0
6 ml ddH₂O

3.3.8 Migrationsassay

Für den Migrationsassay wurden 48-*well*-Platten verwendet, welche mit speziell angefertigten Metallstempeln bestückt wurden (Abb. 3.2). Die am Tag zuvor transfizierten Zellen wurden mit TE-Lösung abgelöst und gezählt. Pro 48er *well* wurden 1×10^6 Zellen in 700 μl Medium durch die beiden Öffnungen des Metallzylinders pipettiert (350 μl pro Öffnung). Für jeden experimentellen Ansatz wurden jeweils zwei *wells* mit Zellen versehen (Doppelansatz).

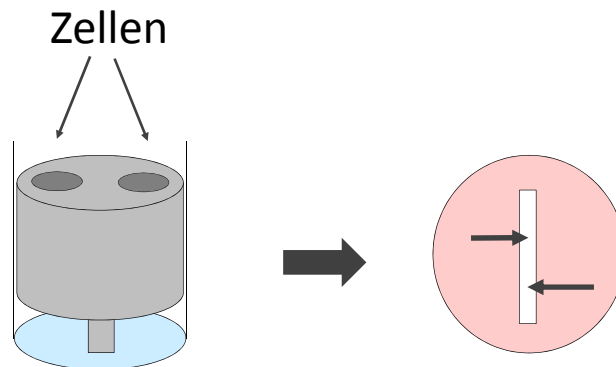


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Migrationsassays

Die transfizierten Zellen werden durch die beiden Öffnungen im Metallstempel in das 48er *well* pipettiert. Nach ca. 2 h wird der Metallstempel entfernt und die Zellen migrieren in den zellfreien Spalt.

Nach 2-stündiger Inkubation im Brutschrank, während der die Adhäsion der Zellen erfolgte, wurde der Metallstempel vorsichtig mit einer Pinzette aus den *wells* entfernt. Nach 3-maligem Waschen mit PBS^{+/+} und Zugabe von 1 ml Medium pro *well* wurden von jedem *well* 2 Fotos des zellfreien Spaltes zum Zeitpunkt 0 h aufgenommen. Hierzu wurde eine digitale Spiegelreflexkamera an das inverse Lichtmikroskop angeschlossen. Nach 24, 48 sowie 72 h wurden erneut jeweils zwei Aufnahmen von den gleichen Stellen des Spaltes gemacht. Die Ermittlung der Zellmigration erfolgte durch Messung der Breite des zellfreien Spaltes mit dem Programm Adobe Photoshop. Als Referenz diente ein Foto einer Neubauerzählkammer, bei welchem der zwischen zwei Linien bekannte Abstand (0,05 mm) auf dieselbe Art vermessen wurde.

3.3.9 Herstellung von Zelllysaten

Die Herstellung von Zelllysaten wurde, abhängig von der darauf folgenden Untersuchung, auf verschiedene Arten durchgeführt.

Methode A:

Zur Herstellung eines Totallysats wurden die ggf. transfizierten Zellen einer 60 mm Schale mit PBS^{-/-} gewaschen und in 1,5 ml kaltem PBS^{-/-} abgeschabt. Die durch Zentrifugation pelletierten Zellen wurden in 50 µl kaltem Lysispuffer A aufgenommen. Die Zelllyse erfolgte durch 30-minütige Inkubation auf Eis. Durch wiederholtes Vortexen während der Inkubation wurde eine gute Durchmischung der Probe gewährleistet. Das Totallysat wurde anschließend mit 4x SDS-Probenpuffer (siehe 3.4.1) versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt.

Lysispuffer A: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4

100 mM NaCl

1 % Triton X-100

10 % Glycerol

0.1 % SDS

1 mM EDTA, pH 8,0

1 mM EGTA, pH 8,0

Complete protease inhibitor cocktail

PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail (falls Phosphorylierungszustand von Proteinen untersucht werden sollte)

Methode B:

Diese Methode wurde im Falle einer nachfolgenden Immunpräzipitation mittels Protein A-Sepharose verwendet. Dazu mussten die unlöslichen Membranbestandteile usw. von den löslichen Proteinen getrennt werden. Die ggf. transfizierten Zellen einer 100 mm Kulturschale wurden in 0,5 ml kaltem Lysispuffer B (+ 0,5 mM CaCl₂ oder 2 mM EGTA) abgeschabt. Die Zelllyse erfolgte durch 30-minütige Inkubation bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler. Anschließend wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch 30-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 2000 rpm (Biofuge *fresco*) pelletiert. Der resultierende proteinhaltige Überstand wurde dann für die Immunpräzipitation eingesetzt.

Lysispuffer B: 20 mM Imidazol, pH 6,8
100 mM NaCl
1 % Triton X-100
0,04 % NaN₃
Complete protease inhibitor cocktail
ggf. 0,5 mM CaCl₂ oder 2 mM EGTA

Methode C:

Diese Methode diente ebenfalls zur Trennung unlöslicher Zellbestandteile von den löslichen Proteinen und wurde im Falle einer anschließenden Immunpräzipitation mittels magnetischer Dynabeads angewendet. Dazu wurden zunächst die ggf. transfizierten Zellen einer 60 mm Kulturschale einmal mit kaltem PBS^{-/-} gewaschen und in 0,5 ml kaltem Lysispuffer C abgeschabt. Anschließend wurde die Probe für 15 sec mit Ultraschall behandelt (Vial Tweeter; Amplitude: 100 %, Cycle: 0,5). Hierauf folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 8500 rpm und 4 °C (Biofuge *fresco*). Der resultierende proteinhaltige Überstand konnte dann für die Immunpräzipitation eingesetzt werden.

Lysispuffer C: 50 mM Hepes, pH 7,4
50 mM NaCl
1 % Triton X-100
5 mM EDTA, pH 8,0
1 mM PMSF
Complete protease inhibitor cocktail
PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail (falls Phosphorylierungszustand von Proteinen untersucht werden sollte)

3.3.10 Immunpräzipitation mittels Protein A-Sepharose

Zur Vorbereitung der Protein-A-Sepharose wurden 0,5 g davon für 30 min bei 4 °C mit 50 ml ddH₂O aufgequollen. Nach zweimaligem Waschen mit je 50 ml PBS^{-/-} (3 min bei 3000 rpm und 4 °C, Heraeus Megafuge 1.0R) folgte eine 30-minütige Inkubation mit 15 ml Lysispuffer B (siehe 3.3.9). Hiernach wurde ein 1:1 Slurry mit Lysispuffer B angesetzt.

Für die Immunpräzipitation wurden pro Ansatz 50 µl des vorbereiteten Protein A-Sepharose-Slurrys mit Lysispuffer B (+ 0,5 mM CaCl₂ oder 2 mM EGTA) äquilibriert (3 min bei 3000 rpm und 4 °C, Biofuge *fresco*). Die Inkubation mit Antikörper (5 µg) und Zelllysate (3 mg, siehe 3.3.9, Methode B)

erfolgte durch sehr langsame Rotation auf einem Überkopfschüttler für 2 h bei 4 °C. Nach 5-maligem Waschen mit je 1 ml des entsprechenden Lysispuffers B (+ 0,5 mM CaCl₂ oder 2 mM EGTA), erfolgte die Elution der präzipitierten Proteine durch Zugabe von 25 µl 1,5x SDS-Probenpuffer und Erhitzen auf 95 °C für 5 min.

1,5x SDS-Probenpuffer: 100 mM Tris-HCl, pH 6,8
3 % SDS
15 % Glycerol
0,0075 % Bromphenolblau
75 mM DTT (frisch zugesetzt)

3.3.11 Immunpräzipitation mittels magnetischer Dynabeads

Pro Ansatz wurden 100 µl magnetische Dynabeads verwendet. Vor der Kopplung der Antikörper an die *Beads* (1 µg/ 100 µl) wurden diese zunächst viermal mit 1 ml kaltem Waschpuffer gewaschen. Die Bindung der Antikörper erfolgte durch eine mindestens 2-stündige Inkubation der Antikörper mit den Dynabeads in ca. 400 µl Waschpuffer auf dem Überkopfschüttler bei 4 °C. Nichtgebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit 1 ml Waschpuffer entfernt. Zur Vorbereitung auf die Inkubation mit den Zelllysaten (siehe 3.3.9, Methode C) wurden die *Beads* anschließend mit 0,5 ml Lysispuffer C (3.3.9) äquilibriert. Pro Ansatz wurden jeweils die gleichen Mengen an Totalprotein (1 mg) eingesetzt. Die Präzipitation der Proteine erfolgte durch eine 2-stündige langsame Rotation auf dem Überkopfschüttler bei 4 °C. Nichtgebundene Proteine wurden anschließend durch dreimaliges Waschen mit je 0,5 ml Lysispuffer C entfernt. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zugabe von 25 µl 4x SDS-Probenpuffer und Erhitzen auf 95 °C für 5 min von den Dynabeads eluiert.

Waschpuffer: PBS^{-/-} + 0,1 % (w/v) BSA

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 SDS-PAGE

Die Trennung von Proteinen in einer Probe entsprechend ihrer molaren Massen erfolgte durch die denaturierende Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine wurden Trenngele mit 6-15 % Polyacrylamid verwendet (Acrylamid:Bisacrylamid 30:0,8). Die zu untersuchenden Proben wurden zur Vorbereitung auf die Elektrophorese in SDS-Probenpuffer bei 95 °C für 5 min erhitzt. Zur Größenbestimmung diente der *Prestained* Proteinmarker (*Broad Range*). Die Fokussierung der Proteine im Sammelgel erfolgte bei einer Stromstärke von 20 mA, die anschließende Auftrennung im Trenngel bei 30 mA. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die im Trenngel befindlichen Proteine entweder durch Färbung mit Coomassie Brillant Blau oder immunologisch durch Western Blot-Analyse sichtbar gemacht.

<u>4X SDS-Probenpuffer:</u>	250 mM Tris-HCl, pH 6,8	<u>SDS-Laufpuffer:</u>	25 mM Tris-HCl, pH 8,8
	2,86 M β -Mercaptoethanol		0,1 % (w/v) SDS
	40 % (v/v) Glycerol		192 mM Glycin
	6 % (w/v) SDS		
	0,02 % (w/v) Bromphenol Blau		

<u>Trenngel:</u>	6-15 % Acrylamid/Bisacrylamid	<u>Sammelgel:</u>	4 % Acrylamid/Bisacrylamid
	390 mM Tris-HCl, pH 8,8		125 mM Tris-HCl, pH 6,8
	0,1 % (w/v) SDS		0,1 % (w/v) SDS
	0,1 % (w/v) APS		0,1 % (w/v) APS
	0,06 % (v/v) TEMED		1 % (v/v) TEMED

3.4.2 Proteinfärbung mittels Coomassie Brilliant Blau

Die in einem Polyacrylamidgel befindlichen Proteine konnten durch den Farbstoff Coomassie Brilliant R-250 angefärbt werden. Dazu wurde das Gel im Anschluss an die Elektrophorese für ca. 20 min in Coomassie-Färbelösung auf einem Kippschüttler inkubiert. Darauf folgte die Inkubation des Gels in Entfärbelösung, bis die gefärbten Proteinbanden gut sichtbar waren. Nach kurzem Waschen in ddH₂O erfolgte die Trocknung des Gels für 2 h bei 55 °C unter Vakuum im Gelrockner.

Coomassie-Färbelösung: 0,5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250
40 % (v/v) Methanol
20 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung: 40 % (v/v) Methanol
20 % (v/v) Essigsäure

3.4.3 Western Blot-Analyse

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen in einer Probe wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine durch Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte im Eisbad bei 300 mA für 1 h. Zum immunologischen Nachweis der immobilisierten Proteine wurde die Nitrocellulosemembran zunächst für eine Stunde mit Blockierlösung inkubiert. Der jeweilige Primärantikörper wurde, wie in Tab. 3.2 aufgeführt, in der entsprechenden Blockierlösung verdünnt und je nach Herstellerangaben für eine Stunde oder über Nacht auf dem Blot belassen. Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit TBS-T erfolgte die 1-stündige Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe Tab. 3.3). Dieser wurde ebenfalls in Blockierlösung verdünnt. Anschließend wurde der Blot erneut mehrfach mit TBS-T gewaschen und die Detektion der immobilisierten Proteine erfolgte durch Zugabe des ECL-Reagenz. Die Chemilumineszenz wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms und dessen anschließende Entwicklung dokumentiert.

Transfer-Puffer: 50 mM Tris
50 mM Borsäure

TBS-T: 20 mM Tris, pH 7,5
150 mM NaCl
0,1 % (v/v) Tween 20

3.4.4 Strippen von Membranen

Das Strippen von Membranen erfolgte durch halbstündige Inkubation der Blotmembran in Stripppuffer bei 50 °C. Dabei wurden Primär- und Sekundärantikörper von den auf der Membran fixierten Proteinen gelöst, so dass eine erneute Immundetektion dieser Proteine mit einem anderen Antikörper möglich war. Im Anschluss an das Strippen wurde der Blot zweimal für 20 min mit einem großen Volumen TBS-T gewaschen. Nach Inkubation in Blockierlösung konnte mit der erneuten Immundetektion begonnen werden.

Strip-Puffer: 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7
2 % (w/v) SDS
100 mM β -Mercaptoethanol

3.4.5 Bradford-Assay

Zum quantitativen Nachweis von Proteinen in einer Lösung wurde der Bradford-Test durchgeführt. Dazu wurde die zu untersuchende Lösung 1:500 mit ddH₂O verdünnt und anschließend 1:1 mit *Protein Assay Coomassie Plus* versetzt. Nach Inkubation für 10 min wurde die Extinktion der Probe bei 595 nm am UV/VIS Spektrophotometer bestimmt. Die Messung von BSA-Proben mit Konzentrationen im Bereich von 1-10 μ g/ml lieferte eine Standardgerade, deren Geradengleichung zur Berechnung der Proteinkonzentration der zu untersuchenden Probe diente.

3.4.6 Schätzung der Proteinkonzentration mittels SDS-PAGE

Die Schätzung der Proteinkonzentration einer sehr schwach konzentrierten Proteinlösung erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung. Hierzu wurde die Proteinlösung mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Eine anschließende SDS-PAGE mit parallel aufgetragenen BSA-Proben bekannter Konzentrationen und Coomassie-Färbung der Gele diente zur vergleichenden Abschätzung der Intensität der Proteinbanden.

Auf diese Weise erfolgte auch die Bestimmung der an eine Matrix gebundenen Proteinmenge. Dazu wurde ein Aliquot der Matrix mit SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die hiernach im Probenpuffer befindlichen Proteine wurden dann ebenfalls zusammen mit den BSA-Proben einer SDS-PAGE und Coomassie-Färbung unterzogen.

3.4.7 *In-vitro*-Transkription/Translation

Die *in-vitro*-Expression und gleichzeitige radioaktive Markierung von Proteinen erfolgte mit Hilfe des TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System von Promega. Abweichend von den Herstellerangaben wurde dazu 1 µg des entsprechenden Plasmids mit 12 µl vom TNT® Quick Master Mix (Kaninchen-Retikulozytenlysat) und 0,6 µl Redivue® L-[³⁵S]Methionin für 60 min bei 30 °C inkubiert. 1 µl des Reaktionsansatzes wurde anschließend mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert, um den Erfolg der Reaktion zu überprüfen. Die entstandenen Produkte wurden anschließend für *in-vitro*-Bindungsstudien eingesetzt.

3.4.8 Autoradiographie

Zum Nachweis [³⁵S]Methionin-markierter Proteine bzw. Proteindomänen in einer Probe wurde diese einer SDS-PAGE unterzogen. Das Polyacrylamidgel wurde im Anschluss daran zunächst für 20 min in 10%iger Essigsäure und dann für 20 min in *Amplifier Solution* inkubiert. Nach der Trocknung des Gels auf dem Geltrockner wurde die vom Isotop ausgehende Betastrahlung durch Auflegen eines Röntgenfilms für 12-48 h bei -80 °C und anschließender Entwicklung sichtbar gemacht.

3.4.9 Rekombinante Proteinexpression in *E. coli*

Für die Expression von Proteinen in *E. coli* wurde der *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS verwendet. Zunächst wurde eine 10 ml Vorkultur mit einem transformierten Zellklon angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm unter Selektionsdruck kultiviert. Anschließend wurde eine 250 ml Hauptkultur 1:50 mit der Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Durch Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Proteinexpression in den Bakterien induziert, welche daraufhin für weitere 3 h kultiviert wurden. Im Anschluss daran wurden die Bakterien für 10 min auf Eis gekühlt und durch Zentrifugation für 10 min bei 4000 rpm und 4 °C (Avanti J-25 Zentrifuge, Rotor JLA 16.250) sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde in einer geeigneten Menge Lysispuffer 1 oder 2 (siehe Tab. 3.8) resuspendiert. Für den Zellaufschluss wurden die Bakterien dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurden sie viermal für 30 sec sonifiziert (Branson Sonifier 250, Richtzyklus 50, Abgabekontrolle 5). Nach der anschließenden Zentrifugation für 1 h bei 100.000 x g und 4 °C (Optima L-70K Ultrazentrifuge) lagen die löslichen Proteine im Überstand vor.

<u>Lysispuffer 1:</u>	40 mM Hepes, pH 7,4	<u>Lysispuffer 2:</u>	40 mM Hepes, pH 7,4
	20 mM Imidazol, pH 7,4		300 mM NaCl
	300 mM NaCl		1 mM EDTA, pH 8,0
	1 mM EDTA, pH 8,0		10 mM β -Mercaptoethanol
	10 mM β -Mercaptoethanol		1 mM PMSF
	1 mM PMSF		

Tab. 3.8: Zur Bakterienlyse verwendete Puffer + Volumina

Protein	Volumen an Lysispuffer
S100Pwt <i>tagless</i>	12,5 ml Lysispuffer 2
His-S100Pwt	12,5 ml Lysispuffer 1
His-S100P Δ 21-25	12,5 ml Lysispuffer 1
His-S100P Δ 25-27	12,5 ml Lysispuffer 1
His-S100P-91aa	12,5 ml Lysispuffer 1
His-S100P-87aa	12,5 ml Lysispuffer 1
His-S100P-87aa-mut	12,5 ml Lysispuffer 1
His-S100P-84aa	12,5 ml Lysispuffer 1
His-S100P-84aa-mut	12,5 ml Lysispuffer 1
His-S100A2	12,5 ml Lysispuffer 1
His-S100A10	12,5 ml Lysispuffer 1
His-CHD	12,5 ml Lysispuffer 1
His-IQ	12,5 ml Lysispuffer 1
His-IR-WW	12,5 ml Lysispuffer 1
His-Ezrin	25 ml Lysispuffer 1
His-EzrinT567D	25 ml Lysispuffer 1
His-N-ERMAD	25 ml Lysispuffer 1
His-C-ERMAD	25 ml Lysispuffer 1
GST-NERMAD	25 ml Lysispuffer 2

3.4.10 Rekombinante Proteinexpression in SF9-Zellen

Die Expression von GST-IQGAP1 erfolgte in SF9-Insektenzellen. Hierzu wurden die Zellen mit AcNPV-Baculoviren infiziert, welche die cDNA für GST-fusioniertes IQGAP1 trugen. Zur Vorbereitung auf die Infektion wurden die SF9-Zellen in 225 cm² Gewebekulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 80–90 % kultiviert. Nach Absaugen des Kulturmediums und Waschen der Zellen mit PBS^{-/-}, wurden 4 ml eines virushaltigen Zellkulturüberstandes auf die Zellen gegeben und 1 h bei 28 °C inkubiert. Nach Hinzufügen von 20 ml frischem Kulturmedium wurden die Zellen für weitere 72 h im Brutschrank belassen.

Für die Zellernte wurden die Zellen von drei 225 cm² Gewebekulturflaschen vorsichtig mit einem Zellschaber gelöst und für 15 min bei 1400 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde abgezogen und als virushaltiger Überstand bei 4 °C aufbewahrt. Er konnte zur Infektion weiterer SF9 Zellen verwendet werden. Die durch die Zentrifugation pelletierten Zellen wurden in PBS^{-/-} resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet konnte bis zu einem Monat bei -80 °C gelagert werden.

Der Zellaufschluss erfolgte durch Resuspension des Zellpellets in 1,5 ml Puffer R und dreimaliger Sonifizierung für 10 sec (Branson Sonifier 250, Richtzyklus 30, Abgabekontrolle 3). Nach Zentrifugation für 1 h bei 100.000 x g und 4 °C (Optima TL Ultrazentrifuge, Rotor TLA 120.2) lag das GST-IQGAP1 im proteinhaltigen Überstand vor und konnte daraus weiter gereinigt werden (siehe 3.4.13).

Puffer R: 20 mM Tris-HCl, pH 8,0
500 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM DTT
10 µM PMSF
10 µg/µl Leupeptin

3.4.11 Reinigung von S100 Proteinen

Sämtliche Schritte der Proteinreinigung wurden im Kühlraum und mit vorgekühlten Puffern durchgeführt.

Die Reinigung von unfusioniertem S100P sowie der erste Schritt der Reinigung (His)₆-fusionierter S100 Proteine erfolgte durch Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC). Dazu wurden zunächst 3 ml (Bettvolumen) Phenylsepharose mit Waschpuffer PS äquilibriert. Der aus der Ultrazentrifugation hervorgegangene proteinhaltige Überstand (siehe 3.4.9) wurde auf 5 mM Ca²⁺ eingestellt und anschließend für 1 h mit der Phenylsepharose inkubiert. Hierauf folgte die Überführung in eine Glassäule mit Fritte. Nach Waschen der Matrix mit 40 ml Waschpuffer PS erfolgte die Elution der S100-Proteine durch Zugabe von 10 ml Elutionspuffer PS.

Im Falle der (His)₆-fusionierten S100-Proteine wurden diese anschließend über Nacht gegen Dialysepuffer PS dialysiert und einer weiteren Reinigung mittels Ni-NTA Agarose unterzogen (siehe 3.4.12).

<u>Waschpuffer PS:</u>	40 mM Hepes, pH 7,4	<u>Elutionspuffer PS:</u>	40 mM Hepes , pH 7,4
	20 mM Imidazol, pH 7,4		20 mM Imidazol, pH 7,4
	300 mM NaCl		300 mM NaCl
	0,5 mM CaCl ₂		1 mM EGTA, pH 8,0
	10 mM β-Mercaptoethanol		1 mM EDTA, pH 8,0
	1 mM PMSF		10 mM β-Mercaptoethanol
			1 mM PMSF

<u>Dialysepuffer PS:</u>	20 mM Imidazol, pH 7,4
	150 mM NaCl
	10 mM β-Mercaptoethanol
	1 mM PMSF

3.4.12 Reinigung (His)₆-fusionierter Proteine

Die Reinigung der (His)₆-Fusionsproteine erfolgte über eine affinitätschromatographische Bindung an Ni-NTA-Agarose und Elution durch einen hochkonzentrierten Imidazol-Puffer.

Im Falle der (His)₆-fusionierten S100-Proteine wurde dieser affinitätschromatographischen Reinigung allerdings zunächst eine Reinigung über Phenylsepharose (HIC) vorangestellt (siehe 3.4.11). Zur weiteren Reinigung wurden 1,5 ml Ni-NTA-Agarose (Bettvolumen) in Dialysepuffer PS äquilibriert. Die

von der Phenylsepharose eluierten sowie dialysierten (His)₆-fusionierten S100-Proteine wurden anschließend für 1 h mit der Ni-NTA-Agarose inkubiert. Nach Überführung in eine Glassäule und Waschen mit 25 ml Dialysepuffer PS erfolgte die Elution der Proteine durch Zugabe von 10 ml Elutionspuffer N.

Die Reinigung aller anderen (His)₆-Fusionsproteine fand lediglich über Ni-NTA Agarose statt. Hierzu wurde die Matrix in Lysispuffer 1 (siehe 3.4.9) äquilibriert und mit dem aus der Ultrazentrifugation hervorgegangenen proteinhaltigen Überstand (siehe 3.4.9) für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Matrix in eine Glassäule überführt und zunächst mit 60 ml Waschpuffer N1, gefolgt von 30 ml Waschpuffer N2 gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit 10 ml Elutionspuffer N eluiert.

<u>Waschpuffer N1:</u>	40 mM Hepes, pH 7,4	<u>Waschpuffer N2:</u>	40 mM Hepes, pH 7,4
	25 mM Imidazol, pH 7,4		35 mM Imidazol, pH 7,4
	150 mM NaCl		150 mM NaCl
	10 mM β-Mercaptoethanol		10 mM β-Mercaptoethanol
	1 mM PMSF		1 mM PMSF

<u>Elutionspuffer N:</u>	250 mM Imidazol, pH 7,4
	150 mM NaCl
	10 mM β-Mercaptoethanol
	1 mM PMSF

3.4.13 Reinigung GST-fusionierter Proteine

Die Reinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte über eine affinitätschromatographische Bindung an Glutathionsepharose 4B und anschließender Elution durch Puffer mit reduziertem Glutathion (GSH).

Zur Reinigung des in SF9-Zellen exprimierten GST-fusionierten IQGAP1, wurde die Glutathionsepharose 4B (Bettvolumen 200 µl) zunächst mit TED-Puffer und anschließend mit N-TED-Puffer äquilibriert. Der durch die Ultrazentrifugation erzeugte Überstand mit den löslichen Proteinen (siehe 3.4.10) wurde zunächst durch einen Filter mit 0,45 µm Porengröße filtriert und anschließend für 1 h bei 4 °C mit der zuvor äquilibrierten Sepharose inkubiert. Nach Waschen mit ca. 25fachem Säulenvolumen erfolgte die Elution des gebundenen GST-IQGAP1 mit 1 ml N-TED-G-Puffer in 200 µl-Fractionen.

Im Falle einer nachfolgenden Bindungsstudie wurde das immobilisierte GST-IQGAP1 an der Matrix belassen. Zur Schätzung der an die Matrix gebundenen Proteinmenge mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (siehe 3.4.6) wurde ein 1:1 Slurry in N-TED-Puffer hergestellt.

TED-Puffer:	20 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA; pH 8,0 1 mM DTT	N-TED-Puffer:	20 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA; pH 8,0 1 mM DTT 500 mM NaCl
N-TED-G-Puffer:	20 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA; pH 8,0 1 mM DTT 500 mM NaCl 20 mM GSH		

Zur Reinigung der in *E. coli* exprimierten GST-Fusionsproteine wurde die Glutathionsepharose 4B (Bettvolumen 500 µl) zunächst in Lysispuffer 2 (siehe 3.4.9) äquilibriert und anschließend für 1 h bei 4 °C mit dem proteinhaltigen Überstand aus der 100.000 x *g* Zentrifugation (siehe 3.4.9) inkubiert. Anschließend wurde die Matrix in eine Glassäule überführt und mit 40 ml PBS^{-/-} gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit 10 ml Elutionspuffer G eluiert.

Elutionspuffer G: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
100 mM GSH

3.4.14 *In-vitro*-Bindungsstudien mit immobilisierten GST-Fusionsproteinen

Zur Analyse potenzieller Interaktionen zwischen IQGAP1 und verschiedenen S100P- bzw. Ezrin-Mutanten wurden Bindungsstudien mit immobilisiertem GST-IQGAP1 durchgeführt. Hierzu wurde als Matrixmaterial pro Ansatz Glutathionsepharose mit ca. 3 µg immobilisiertem GST-IQGAP1 eingesetzt. Zudem wurde stets parallel ein Kontrollansatz mit immobilisiertem GST *alone* mitgeführt.

Die Glutathionsepharose mit immobilisiertem GST-IQGAP1 bzw. GST *alone* wurde in eine Handee™-Spinsäule überführt und mit Bindungspuffer A bzw. B durch Zentrifugation für 10 sec bei 4 °C (Biofuge *fresco*) äquilibriert. Es folgte eine 1-stündige Inkubation mit 30 µg des gegen Bindungspuffer A bzw. Bindungspuffer B dialysierten (His)₆-S100P Proteins bzw. der (His)₆-Ezrin-Mutante. Nach mehrmaligem Waschen mit dem entsprechenden Bindungspuffer erfolgte im Falle einer Inkubation

mit den S100P-Proteinen die Elution Ca^{2+} -abhängig gebundenen Proteins mit 1 ml Puffer E in 200 μl -Fraktionen. Die Elution gebundener Ezrin-Mutanten zusammen mit GST-IQGAP1 erfolgte mittels Puffer G. Proben sämtlicher Elutionsfraktionen sowie vom Durchfluss, der ersten und letzten Waschfraktion und von der Matrix wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

<u>Bindungspuffer A:</u>	40 mM HEPES, pH 7,4	<u>Bindungspuffer B:</u>	40 mM HEPES, pH 7,4
	20 mM Imidazol, pH 7,4		20 mM Imidazol, pH 7,4
	150 mM NaCl		150 mM NaCl
	1 mM DTT		1 mM DTT
	1,5 mM PMSF		1,5 mM PMSF
	0,5 mM CaCl_2		2 mM EGTA

<u>Puffer E:</u>	40 mM HEPES, pH 7,4	<u>Puffer G:</u>	40 mM HEPES, pH 7,4
	20 mM Imidazol, pH 7,4		100 mM GSH
	150 mM NaCl		
	1 mM DTT		
	1,5 mM PMSF		
	5 mM EGTA		

3.4.15 *In-vitro*-Bindungsstudien mit immobilisierten $(\text{His})_6$ -Fusionsproteinen

Zur Identifizierung der S100P-IQGAP1 Bindungsstellen sowie zur Analyse einer potenziellen Interaktion zwischen IQGAP1 und Ezrin wurden Affinitätschromatographien mit immobilisierten $(\text{His})_6$ -fusionierten S100P- bzw. Ezrin-Mutanten und $[^{35}\text{S}]$ -markierten *full length* IQGAP1 oder IQGAP1-Mutanten durchgeführt.

Dazu wurden die bakteriell exprimierten und gereinigten $(\text{His})_6$ -fusionierten S100P- bzw. Ezrin-Mutanten über Nacht bei 4 °C gegen Bindungspuffer A oder Bindungspuffer B dialysiert. 8 μg der dialysierten Proteine wurden dann durch Inkubation für 30 min bei 4 °C in Bindungspuffer A bzw. B an 50 μl (Bettvolumen) Ni-NTA-Agarose immobilisiert. Durch mehrmaliges Waschen mit dem entsprechenden Bindungspuffer wurden anschließend ungebundene Proteine entfernt. Parallel wurde stets Ni-NTA-Agarose ohne immobilisiertes Protein als Kontrolle mitgeführt. Es folgte die Inkubation mit *in-vitro*-translatiertem *full length* IQGAP1 bzw. *in-vitro*-translatierten IQGAP1-Mutanten. Pro Experiment wurden dabei jeweils 10 μl eines *in-vitro*-Translationsansatzes eingesetzt und mit 900 μl Bindungspuffer A oder B aufgefüllt. Nach mehrmaligem Waschen mit Bindungspuffer A bzw. B wurden die an die Ni-NTA-Agarose gebundenen Proteine durch Aufkochen mit 4x SDS-

Probenpuffer eluiert. Das [³⁵S]-markierte *full length* IQGAP1 bzw. die IQGAP1-Mutanten wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Autoradiographie nachgewiesen.

Zum Vergleich des Bindungsverhaltens von S100Pwt und S100PΔ21-25 gegenüber Ezrin wurden zunächst jeweils 150 µl (Bettvolumen) Ni-NTA-Agarose in eine *Handee*TM-Spinsäule überführt und mit Bindungspuffer A durch Zentrifugation für 10 sec bei 4 °C (Biofuge *fresco*) äquilibriert. Die Immobilisierung der S100 Proteine erfolgte durch 30-minütige Inkubation der Matrix mit je 30 µg His-S100Pwt bzw. His-S100PΔ21-25, welche zuvor gegen Bindungspuffer A dialysiert worden waren. Durch mehrmaliges Waschen mit Bindungspuffer A wurden nicht gebundene Proteine entfernt. Es folgte eine 2-stündige Inkubation mit 100 µg des gegen Bindungspuffer A dialysierten GST-N-ERMAD Proteins. Nach mehrmaligem Waschen mit Bindungspuffer, erfolgte die Elution gebundener GST-N-ERMAD Proteine mit 1 ml Elutionspuffer E in 200 µl-Fractionen. Proben sämtlicher Elutionsfraktionen sowie vom Durchfluss, der ersten und letzten Waschfraktion und von der Matrix wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

<u>Bindungspuffer A:</u>	40 mM HEPES, pH 7,4	<u>Bindungspuffer B:</u>	40 mM HEPES, pH 7,4
	20 mM Imidazol, pH 7,4		20 mM Imidazol, pH 7,4
	150 mM NaCl		150 mM NaCl
	1 mM DTT		1 mM DTT
	1,5 mM PMSF		1,5 mM PMSF
	0,5 mM CaCl ₂		2 mM EGTA

<u>Elutionspuffer E:</u>	40 mM Hepes, pH 7,4
	20 mM Imidazol, pH 7,4
	150 mM NaCl
	1 mM DTT
	1,5 mM PMSF
	5 mM EGTA

3.4.16 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie

Zur quantitativen Analyse der Interaktion zwischen S100P und der CHD und IQ-Domäne des IQGAP1 Proteins mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie wurde das Biacore 3000 System sowie ein CM5-Sensorchip von GE Healthcare genutzt.

Für die Untersuchungen wurden ca. 200 Resonanzeinheiten (*resonance units*, RU) des gereinigten S100Pwt *tagless* Proteins auf dem CM5 Sensorchip mittels Aminkopplung immobilisiert. Dazu wurde die Carboxymethyl-dextran-Oberfläche des Chips zunächst durch eine 7-minütige Injektion von Puffer A bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ aktiviert. Es folgte die Injektion von 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ S100P in Puffer B. Nachdem das angestrebte Level an immobilisiertem S100P erreicht war, erfolgte die Blockierung noch freier N-hydroxysuccinimid-Ester-Reste durch 7-minütige Injektion von Puffer C. Jedes Sensorgramm wurde bei 25 °C, einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ sowie einer Injektionszeit von 3 min aufgenommen. Parallel diente stets eine der anderen Flusszellen als Kontrollansatz, in welchem kein Protein immobilisiert wurde, sondern die Sensorchip-Oberfläche lediglich aktiviert und blockiert wurde. Die Änderung des Brechungsindex in dieser Flusszelle wurde von der Änderung des Brechungsindex in der Flusszelle mit immobilisiertem Protein subtrahiert. Als weitere Kontrolle wurde zudem die Änderung des Brechungsindex nach Injektion des Laufpuffers registriert und ebenfalls von den erhaltenen Messwerten subtrahiert.

Die Bindung der CHD bzw. der IQ-Domänen von IQGAP1 an immobilisiertes S100Pwt Protein wurde verglichen, indem gleiche molare Konzentrationen dieser in *E. coli* exprimierten Proteine injiziert wurden. Die Regeneration der Sensorchip-Oberfläche erfolgte durch zweimalige Injektion von Puffer D.

Zur Ermittlung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) und damit der Bindungsaffinität zwischen S100P und der IQ-Domäne des IQGAP1-Proteins, wurde ein Titrationsexperiment durchgeführt. Dazu wurde die IQ-Domäne jeweils in steigender Konzentration (0,03-35 μM in Laufpuffer) injiziert. Die Ermittlung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) erfolgte durch Bestimmung der Resonanzeinheiten bei Erreichen des Bindungsgleichgewichts der Titrationsexperimente. Unter Verwendung der Scatchard Gleichung konnte dann zunächst die Gleichgewichtsassoziationskonstante und darüber anschließend die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ermittelt werden. Die Berechnungen wurden mit der BIAevaluation Software Version 4.1 durchgeführt.

Scatchard-Gleichung:

$$R_{\text{eq}} / C = K_A R_{\text{max}} - R_{\text{eq}} K_A$$

R_{max} = Resonanzsignal bei Sättigung

C = Konzentration des freien Analyten

K_A = Gleichgewichtsassoziationskonstante

R_{eq} = Resonanzsignal im Gleichgewicht

Puffer A: 0,1 M N-ethyl-N(3-diethylaminopropyl)carbodiimid
0,25 M N-hydroxysuccinimide

Puffer B: 10 mM NaOAc, pH 4,5

Puffer C: 1 M Ethanolaminhydrochlorid

Puffer D: 50 mM NaOH

Laufpuffer: 10 mM HEPES, pH 7,4
150 mM NaCl
0,5 mM CaCl₂
0,005 % Tween 20

Sämtliche Puffer wurden vor ihrer Verwendung durch Filter mit 0,22 µm Porengröße filtriert und entgast.

4 Ergebnisse

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war das Ergebnis eines Experiments zur Identifikation neuartiger Interaktionspartner des S100P Proteins. Bei diesem von M. Koltzschler durchgeführten Experiment handelte es sich um einen Affinitätschromatographischen Ansatz, in welchem Ca^{2+} -abhängig und dimerspezifisch gebundene S100P-Zielproteine aus einem Plazentalysat isoliert wurden (Abb. 4.1). Die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Proteininteraktionen wurde dabei durch Verwendung eines Ca^{2+} -haltigen Bindungspuffers und eines EGTA-haltigen Elutionspuffers gewährleistet. Die Spezifität für das S100P Dimer, welches als die biologisch aktive Einheit betrachtet wird (Bhattacharya *et al.* 2004), wurde durch einen Kontrollansatz mit der strikt monomeren S100P-F15A-Mutante überprüft.

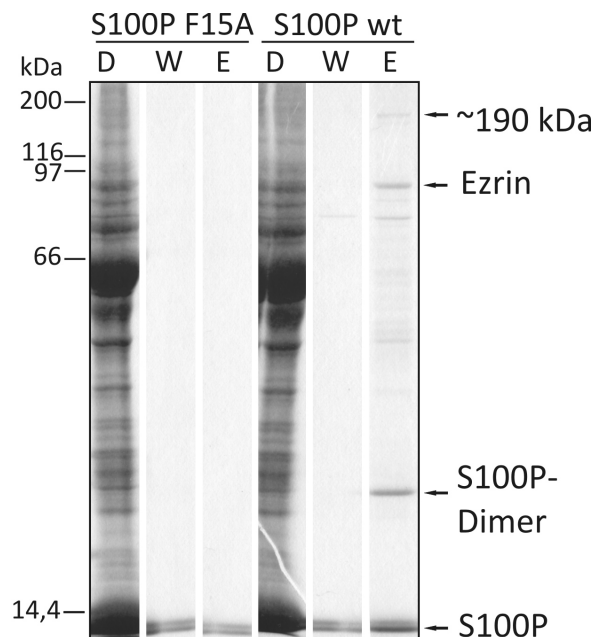


Abb. 4.1: Affinitätschromatographische Isolierung von dimerspezifischen S100P Zielproteinen aus Plazentalysat

Gleiche Mengen eines Plazenta-Proteinextrakts wurden in einem Ca^{2+} -haltigen Puffer auf Ni-NTA-Agarose-Säulen mit immobilisiertem S100Pwt oder S100P-F15A gegeben (D). Nach dem Waschen der Säulen mit Ca^{2+} -haltigem Puffer (W), wurden die Ca^{2+} -abhängig gebundenen Proteine mit einem EGTA-haltigen Puffer eluiert (E). Die in den einzelnen Fraktionen vorhandenen Proteine wurden in einer Gradienten-SDS-PAGE (7-15 %) voneinander getrennt und mittels Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht. Das nur in der Elutionsfraktion des S100Pwt-Ansatzes vorhandene ~190 kDa Protein konnte durch MALDI-TOF Analyse als humanes IQGAP1 identifiziert werden. Das Experiment wurde durchgeführt von M. Koltzschler.

Die Ca^{2+} -abhängig und dimerspezifisch gebundenen S100P-Zielproteine wurden einer MALDI-TOF Analyse unterzogen. Hierdurch konnte das Membran/Aktin-verbindende Protein Ezrin identifiziert werden, dessen Interaktion mit S100P daraufhin genauer analysiert wurde (Koltzschler *et al.* 2003,

Austermann *et al.* 2008). Es konnte jedoch noch ein weiteres Protein identifiziert werden, nämlich das in Abb. 4.1 markierte ~190 kDa Protein IQGAP1.

Der Fokus dieser Arbeit lag daher auf der genauen Analyse der S100P/IQGAP1-Interaktion. Hierzu gehörte, neben dem Nachweis der direkten und Ca^{2+} -abhängigen Interaktion, die Identifizierung der entsprechenden Bindungsmotive in beiden Proteinen. Zudem wurde die biologische Relevanz dieser Interaktion auf zellulärer Ebene untersucht.

Da sowohl IQGAP1 als auch Ezrin im Komplex mit S100P zu finden sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch untersucht, ob möglicherweise eine direkte Interaktion zwischen IQGAP1 und Ezrin vorliegt.

4.1 Analyse der S100P/IQGAP1-Komplexbildung in Zellen

Aufgrund der Entdeckung, dass IQGAP1 durch immobilisiertes S100P aus einem Plazentalysat isoliert werden kann, wurde untersucht, ob eine S100P/IQGAP1-Komplexbildung auch in Zellen zu beobachten ist. Daher wurden zunächst eine Immunfluoreszenz-Analyse und eine Immunpräzipitation durchgeführt.

4.1.1 Immunfluoreszenz-Analyse

Für die Analyse der intrazellulären Lokalisation von endogenem S100P und endogenem IQGAP1 wurden HeLa-Zellen verwendet, da diese aufgrund der sehr guten Transfektionsraten das präferierte Zellmodell für die späteren funktionellen Analysen darstellten. Wie zuvor schon für verschiedene Zelllinien wie A431- und SKBR3-Zellen gezeigt werden konnte führt der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Stimulierung der Zellen mit Wachstumsfaktoren, Serum oder Ca^{2+} -Ionophor zu einer Umverteilung des S100P und des IQGAP1 Proteins innerhalb der Zelle und einer Anreicherung innerhalb von Membranstrukturen (Diplomarbeit M. Pöter, 2006; Dissertation J. Austermann, 2007). Daher wurden die HeLa-Zellen für 16 h serumdepletiert und anschließend entweder für 5 min mit EGF stimuliert oder im unstimulierten Zustand belassen. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen folgte die Inkubation mit IQGAP1- bzw. S100P-spezifischen Primärantikörpern und den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpern. Die Detektion der Antikörper erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop.

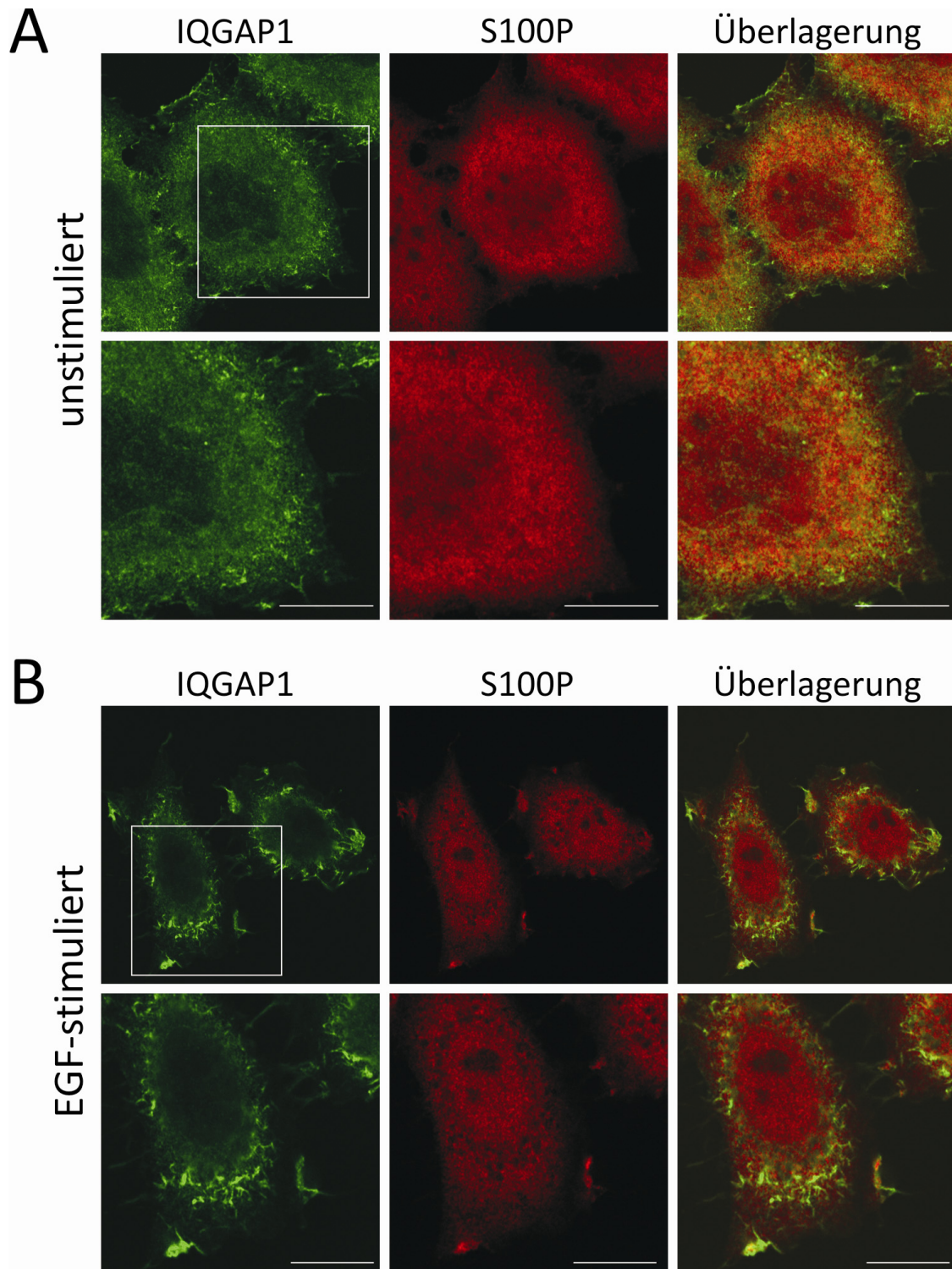


Abb. 4.2: EGF-induzierte Co-Lokalisation von S100P und IQGAP1

HeLa-Zellen wurden nach 16-stündiger Serumdepletion entweder im unstimulierten Zustand belassen (A) oder für 5 min mit 50 ng/ml EGF stimuliert (B). Nach PFA-Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit einem polyklonalen α -IQGAP1-Antikörper (K. Kaibuchi) sowie einem monoklonalen α -S100P-Antikörper (Mab-18-9), gefolgt von den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpern, inkubiert. Die Detektion der Antikörper erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops. Die unteren Abschnitte stellen jeweils Vergrößerungen der oberen Bilder dar. Größenbalken entsprechen 10 μ m.

In serumdepletierten, unstimulierten HeLa-Zellen zeigt sich für IQGAP1 eine gleichmäßige Verteilung im Zytoplasma mit einer leichten Anreicherung in kurzen Zellfortsätzen (Abb. 4.2A). S100P ist hingegen in der gesamten Zelle gleichmäßig verteilt. Eine 5-minütige EGF-Stimulierung, die u.a. zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt, bewirkt eine Translokation beider Proteine zu „gekräuselten“ Membranstrukturen, sog. *membrane ruffles* (Abb. 4.2B). Innerhalb dieser Strukturen kommt es zu einer Co-Lokalisation von S100P und IQGAP1, was wiederum als Hinweis auf die Bildung eines intrazellulären S100P/IQGAP1-Komplexes betrachtet werden kann.

4.1.2 Co-Immunpräzipitation

Die Komplexbildung von S100P und IQGAP1 auf zellulärer Ebene wurde auch mittels eines Immunpräzipitationsansatzes untersucht. Aufgrund der Schwierigkeiten endogenes S100P im Western Blot nachzuweisen, wurden hierfür HeLa-Zellen, welche ein GFP-S100P Fusionsprotein exprimierten, genutzt. Von diesen Zellen wurde zunächst ein Zelllysats hergestellt. Nach Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile konnte der resultierende PNS (*Post Nuclear Supernatant*) für die Immunpräzipitation eingesetzt werden. Diese erfolgte mittels eines polyklonalen α -IQGAP1-Antikörpers, der an Protein A-Sepharose immobilisiert wurde. Da es sich bei der Komplexbildung um einen Ca^{2+} -abhängigen Prozess zu handeln scheint, wurden sämtliche Schritte in Gegenwart von CaCl_2 durchgeführt.

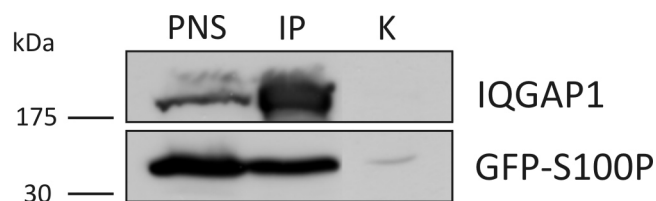


Abb. 4.3: Co-Immunpräzipitation von GFP-S100P mit IQGAP1

HeLa Zellen wurden mit dem Konstrukt pEGFP-S100Pwt transient transfiziert und nach 24 h lysiert. Gleiche Mengen an proteinhaltigem Überstand (PNS) wurden für die Immunpräzipitation mittels Protein A-Sepharose und eines polyklonalen α -IQGAP1-Antikörpers (IP) bzw. unspezifischer polyklonaler α -Maus IgGs (K) eingesetzt. Die Zellyse sowie die Immunpräzipitation erfolgten dabei in Gegenwart von 0,5 mM CaCl_2 . Der PNS und die präzipitierten Proteine wurden mittels einer 12 %igen SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert. Die Detektion der Proteine erfolgte dabei mit einem monoklonalen α -IQGAP1-Antikörper und einem monoklonalen α -GFP-Antikörper.

Die Western Blot-Analyse (Abb. 4.3) zeigt, dass sowohl IQGAP1 als auch das GFP-S100P Fusionsprotein nach Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile als lösliche Proteine im PNS vorliegen. IQGAP1 kann zudem mittels des polyklonalen Antikörpers α -IQGAP1 (H-108, Santa Cruz) effizient aus dem

Zellysat präzipitiert werden. Diese Präzipitation kann als spezifisch betrachtet werden, da keine Präzipitation von IQGAP1 bei Verwendung unspezifischer α -Maus-IgGs nachzuweisen ist. In Gegenwart von CaCl_2 wird das GFP-S100P Fusionsprotein mit IQGAP1 co-präzipitiert. Die Detektion von GFP-S100P in diesem Ansatz ist auf die direkte oder indirekte S100P/IQGAP1-Komplexbildung zurückzuführen, da GFP-S100P im Kontrollansatz nur in einer vernachlässigbar geringen Menge vorliegt. Dies ist vermutlich auf eine schwache unspezifische Wechselwirkung des GFP-S100P mit der Protein A-Sepharose Matrix zurückzuführen. Die Co-Immunpräzipitation von GFP-S100P mit IQGAP1 zeigt außerdem, dass der im Vergleich zum S100 Protein relativ große GFP-tag (MW \sim 27 kDa) keinen negativen Einfluss auf die *in-vivo*-Komplexbildung zu haben scheint. Demnach kann dieses Fusionsprotein in weiteren Untersuchungen als S100P-Analog genutzt werden.

4.2 Biochemische Charakterisierung der S100P/IQGAP1-Interaktion

Nachdem durch das *Pulldown*-Experiment, die Immunfluoreszenz-Analyse und die Co-Immunpräzipitationen starke Hinweise auf die intrazelluläre Interaktion von IQGAP1 und S100P vorhanden waren, wurde untersucht, ob diese Komplexbildung durch andere Proteine vermittelt wird oder direkt erfolgt. Hierzu und zur späteren Identifizierung der relevanten Bindungsmotive wurden *in-vitro*-Bindungsstudien mit den isolierten Proteinen bzw. Protein-Derivaten durchgeführt, die eine direkte Wechselwirkung zu Tage fördern sollten. Für diese Untersuchungen mussten die unterschiedlichen Proteinderivate allerdings zunächst rekombinant exprimiert und gereinigt werden.

4.2.1 Expression von GST-IQGAP1 in SF9-Zellen

Zur rekombinanten Expression von IQGAP1 wurden SF9-Insektenzellen genutzt. Dieses System wurde gewählt, da eine Expression des *full length* IQGAP1 in *E. coli* Zellen auf Grund von Proteindegradation nicht möglich ist (siehe Diplomarbeit M. Pöter, 2006).

Die Proteinexpression erfolgte durch Infektion der SF9-Zellen mit Baculoviren, bei denen unter der Kontrolle des starken Polyhedrin-Promotors eine für GST-IQGAP1 kodierende cDNA stand. 72 h nach der Infektion konnte das rekombinant exprimierte GST-IQGAP1 aus den Insektenzellen gereinigt werden. Dies erfolgte durch Lyse der Zellen und affinitätschromatographische Bindung des Fusionsproteins über seinen GST-tag an eine Glutathionsepharose Matrix sowie anschließender Elution des GST-IQGAP1 Proteins durch Applikation eines Glutathion-haltigen Puffers.

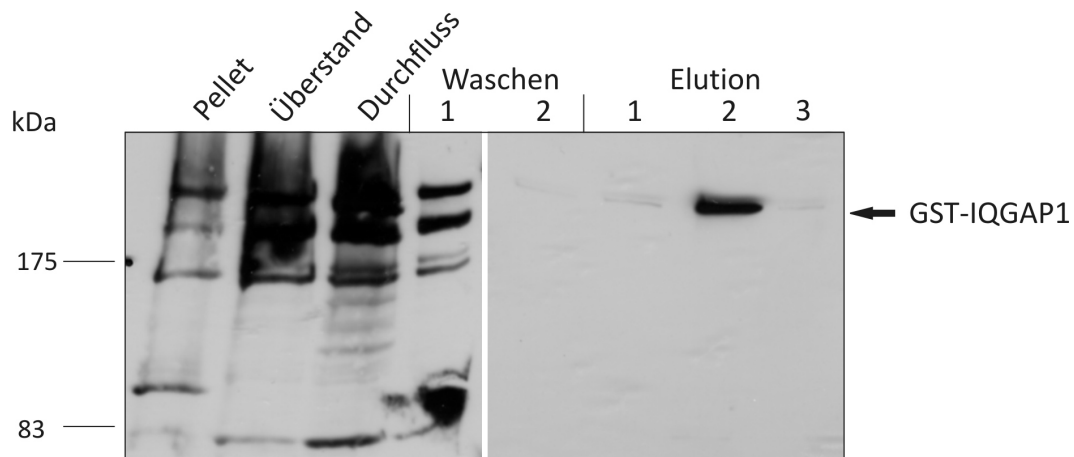


Abb. 4.4: Reinigung des in SF9-Zellen exprimierten GST-IQGAP1-Fusionsproteins

Das Zelllysat infizierter SF9-Zellen wurde einer hochtourigen Zentrifugation unterzogen, wodurch unlösliche Zellbestandteile (Pellet) von den löslichen Proteinen (Überstand) getrennt wurden. Dieser proteinhaltige Überstand wurde anschließend auf eine Glutathionsepharose Matrix gegeben (Durchfluss). Nach mehrmaligem Waschen der Matrix erfolgte die Elution des GST-IQGAP1 Proteins durch Applikation eines Puffers mit 100 mM Glutathion. Das in den Proben der gesammelten Fraktionen vorhandene GST-IQGAP1 wurde durch eine 6 %ige SDS-PAGE und anschließenden Western Blot mittels eines monoklonalen α -IQGAP1-Antikörpers nachgewiesen.

Wie in Abb. 4.4 gut zu erkennen ist, führt die Infektion von SF9-Insektenzellen mit AcNPV-GST-IQGAP1 Baculoviren zur Expression des rekombinanten GST-IQGAP1 Fusionsproteins in diesen Zellen. Dieses Fusionsprotein, das ein Molekulargewicht von ca. 210 kDa aufweist, liegt nach Aufschluss der Zellen und Ultrazentrifugation überwiegend als lösliches Protein im Überstand vor. Eine effektive Bindung des Fusionsproteins über den GST-*tag* an die Glutathionsepharose Matrix sowie die Elution des Proteins durch Applikation von reduziertem Glutathion ist möglich. Die in den Proben von Überstand, Durchfluss und Waschfraktionen auftretenden Proteinfragmente mit einem geringeren Molekulargewicht lassen darauf schließen, dass das Fusionsprotein in geringem Maße degradiert wird. Da diese Proteinfragmente in den Elutionsfraktionen nicht zu detektieren sind, handelt es sich wohl um Fragmente ohne oder mit nur unvollständigem GST-*tag*. Eine effiziente Expression des *full length* GST-IQGAP1 Fusionsproteins in SF9-Zellen und Reinigung über Glutathionsepharose ist somit möglich. Das auf diese Weise exprimierte Protein konnte im Anschluss an die Reinigung für *in-vitro*-Bindungsstudien eingesetzt werden.

4.2.2 Expression rekombinanter S100 Derivate in *E. coli*

Die *in-vitro*-Analyse der S100P/IQGAP1-Interaktion erfolgte auf der S100 Seite mit unfusioniertem Protein (S100Pwt *tagless*) sowie mit (His)₆-fusioniertem S100Pwt. Für die Kartierung der IQGAP1-Bindungsstelle im S100P wurden zudem verschiedene S100P Mutanten sowie als Kontrollen S100A2 und S100A10 genutzt (Abb. 4.5), die ebenfalls als (His)₆-Fusionsproteine exprimiert wurden.

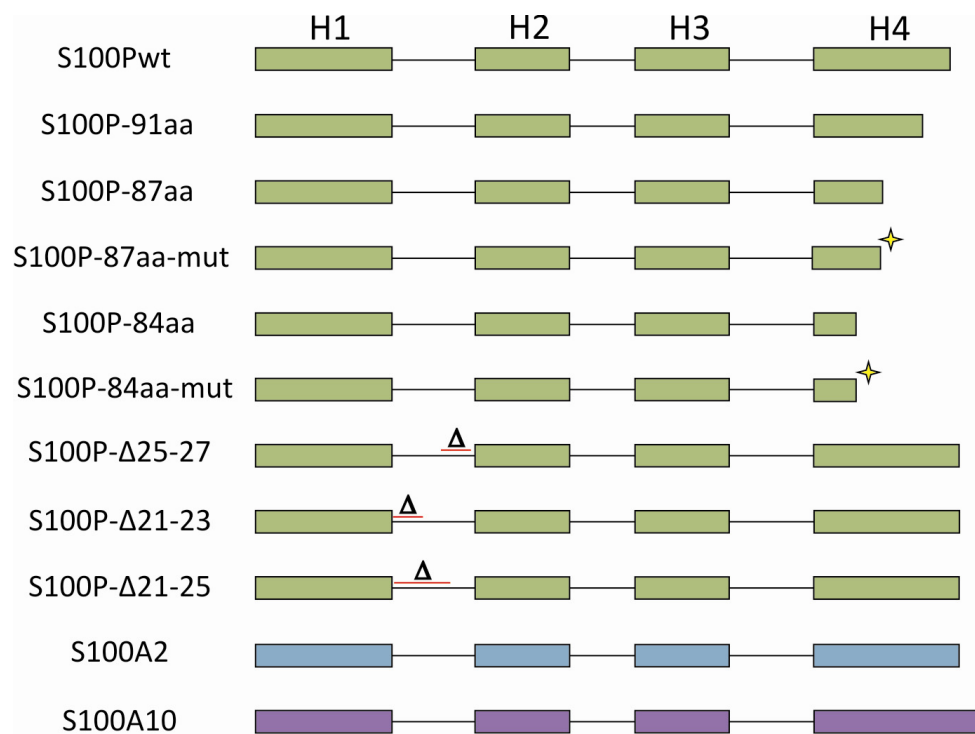


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der rekombinant exprimierten S100 Proteine

Neben dem S100Pwt, S100A2 und S100A10 Protein wurden zum einen C-terminal verkürzte S100P Derivate sowie S100P Mutanten mit Deletionen in der ersten EF-Hand bezüglich ihrer Fähigkeit, IQGAP1 zu binden, analysiert. Einige der C-terminal verkürzten S100P Derivate weisen zusätzliche Mutationen in Helix 4 auf (angedeutet durch Stern). Hierbei handelt es sich um die Mutationen T82A, S83L und H86N im Derivat S100P-87aa-mut sowie T82A und S83L im Derivat S100P-84aa-mut. Sämtliche S100 Proteine wurden als Fusionsproteine mit N-terminalem (His)₆-tag exprimiert.

Für die rekombinante Expression der S100 Proteine wurden *E. coli* BL21(DE3)pLysS Kulturen verwendet, wobei die Proteinexpression in den transformierten Bakterien durch IPTG-Zugabe induziert wurde. Die Reinigung von S100Pwt *tagless* erfolgte zunächst durch Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) an einer Phenylsepharose Matrix. Die Reinigung der verschiedenen (His)₆-Fusionsproteine erfolgte entweder über eine HIC mit nachgeschalteter affinitätschromatographischer Reinigung über Ni-NTA-Agarose oder in nur einem Schritt direkt über eine Ni-NTA-Agarose Matrix.

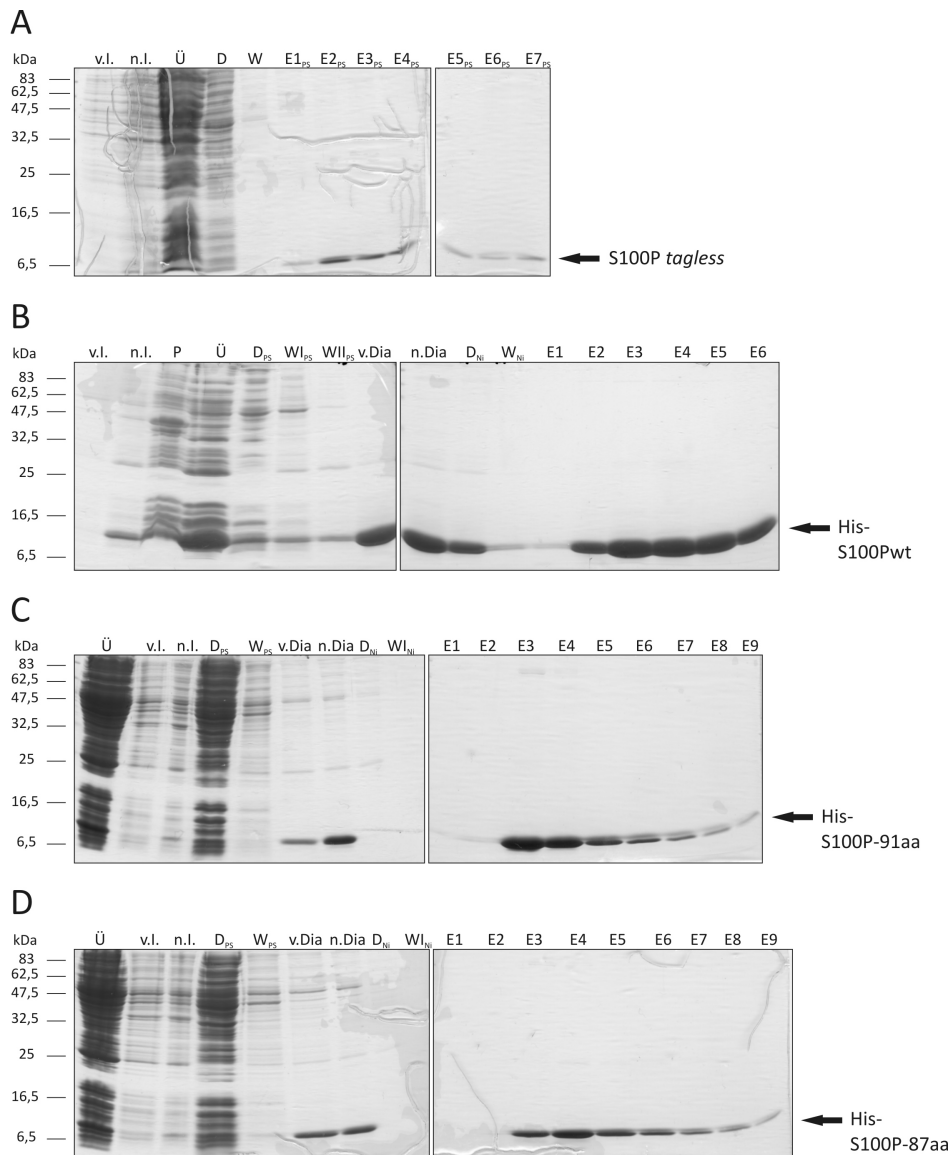


Abb. 4.6: Expression und Reinigung von S100Pwt *tagless* sowie His-S100Pwt/-91aa/-87aa

In den transformierten *E. coli* Zellen (v.l.) wurde die rekombinante Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert (n.l.). Nach dem Zellaufschluss wurden unlösliche Zellbestandteile (P) durch Ultrazentrifugation von den löslichen Proteinen (Ü) getrennt. Diese wurden in Gegenwart von Ca²⁺ auf eine Phenylsepharose Matrix gegeben, wodurch die stark hydrophoben S100P Derivate an der Matrix zurückgehalten und von nicht bindenden Proteinen getrennt wurden (D_{ps}). Nach intensivem Waschen mit Ca²⁺-haltigem Puffer (W_{ps}) wurden die S100P Proteine durch einen EGTA-haltigen Puffer von der Phenylsepharose Matrix eluiert (E1-E7 bzw. v.Dia). Im Falle der (His)₆-Fusionsproteine folgte nach einer Dialyse (n.Dia) die affinitätschromatographische Bindung an Ni-NTA Agarose, wodurch weitere Verunreinigungen entfernt wurden (D_{Ni}). Nach erneutem Waschen (W_{Ni}) erfolgte die Elution der über den (His)₆-tag immobilisierten S100P Derivate durch einen hochkonzentrierten Imidazolpuffer (E1-E9). Proben der gesammelten Fraktionen wurden in einer 15 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und die darin befindlichen Proteine mittels Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht.

Die in Abb. 4.6 und Abb. 4.7 dargestellte SDS-PAGE-Analyse der einzelnen Schritte der Proteinexpression von S100Pwt *tagless*, His-S100Pwt sowie den C-terminal verkürzten S100P Derivaten zeigt, dass die Expression der ca. 10 kDa großen Proteine durch IPTG-Zugabe induziert wird und sie als lösliche Proteine im Überstand vorliegen. Durch die Reinigung über die Phenylsepharose Matrix können die meisten bakteriellen Verunreinigungen entfernt werden, jedoch erhöht der zweite Reinigungsschritt

über die Ni-NTA-Agarose die Reinheit der $(\text{His})_6$ -Proteine zusätzlich. Die Proteine lassen sich zudem effizient von der Matrix eluieren, so dass sie für *in-vitro*-Bindungsstudien eingesetzt werden konnten.

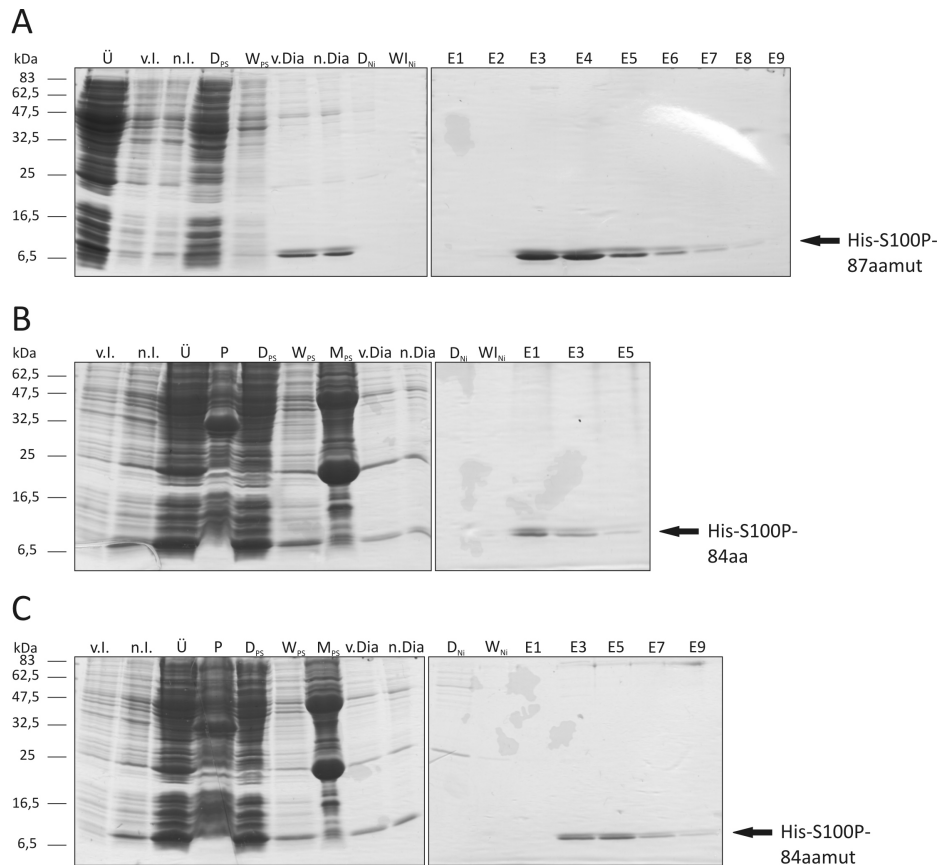


Abb. 4.7: Expression und Reinigung von His-S100P87aamut/-84aa/-84aamut

In den transformierten *E. coli* Zellen (v.l.) wurde die rekombinante Proteinexpression durch IPTG-Zugabe induziert (n.l.). Nach Zellaufschluss wurden unlösliche Zellbestandteile (P) durch Ultrazentrifugation von den löslichen Proteinen getrennt (Ü), welche anschließend in Gegenwart von Ca^{2+} auf eine Phenylsepharose Matrix gegeben wurden. Hierdurch wurden die stark hydrophoben S100P Derivate an der Matrix zurückgehalten und von nicht bindenden Proteinen getrennt (D_{PS}). Nach intensivem Waschen mit Ca^{2+} -haltigem Puffer (W_{PS}) wurden die S100P Proteine durch einen EGTA-haltigen Puffer von der Phenylsepharose Matrix eluiert (E1-E7 bzw. v.Dia). Nach einer Dialyse (n.Dia) erfolgte die affinitätschromatographische Bindung an Ni-NTA Agarose, wodurch Proteine ohne His-tag entfernt wurden (D_{Ni}). Nach erneutem Waschen (W_{Ni}) erfolgte die Elution der über den $(\text{His})_6$ -tag immobilisierten S100P Derivate durch einen hochkonzentrierten Imidazolpuffer (E1-E9). Proben der gesammelten Fraktionen wurden in einer 15 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und die darin befindlichen Proteine mittels Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht.

Die Reinigung der verschiedenen S100P Deletionsmutanten sowie der zur Kontrolle eingesetzten S100 Proteine His-S100A2 und His-S100A10 erfolgte lediglich über Ni-NTA-Agarose. Die in Abb. 4.8 gezeigten SDS-PAGE-Analysen lassen erkennen, dass die Proteine löslich sind und über die Bindung an Ni-NTA-Agarose gereinigt und konzentriert werden können. Die Elutionsfraktionen weisen einige zusätzliche Proteinbanden auf. Hierbei kann es sich um dimere Strukturen der S100 Proteine handeln, aber auch um bakterielle Verunreinigungen. Da ihr Anteil in den Elutionsfraktionen aber gering ist, wurden die eluierten Proteine trotzdem für *in-vitro*-Bindungsstudien eingesetzt.

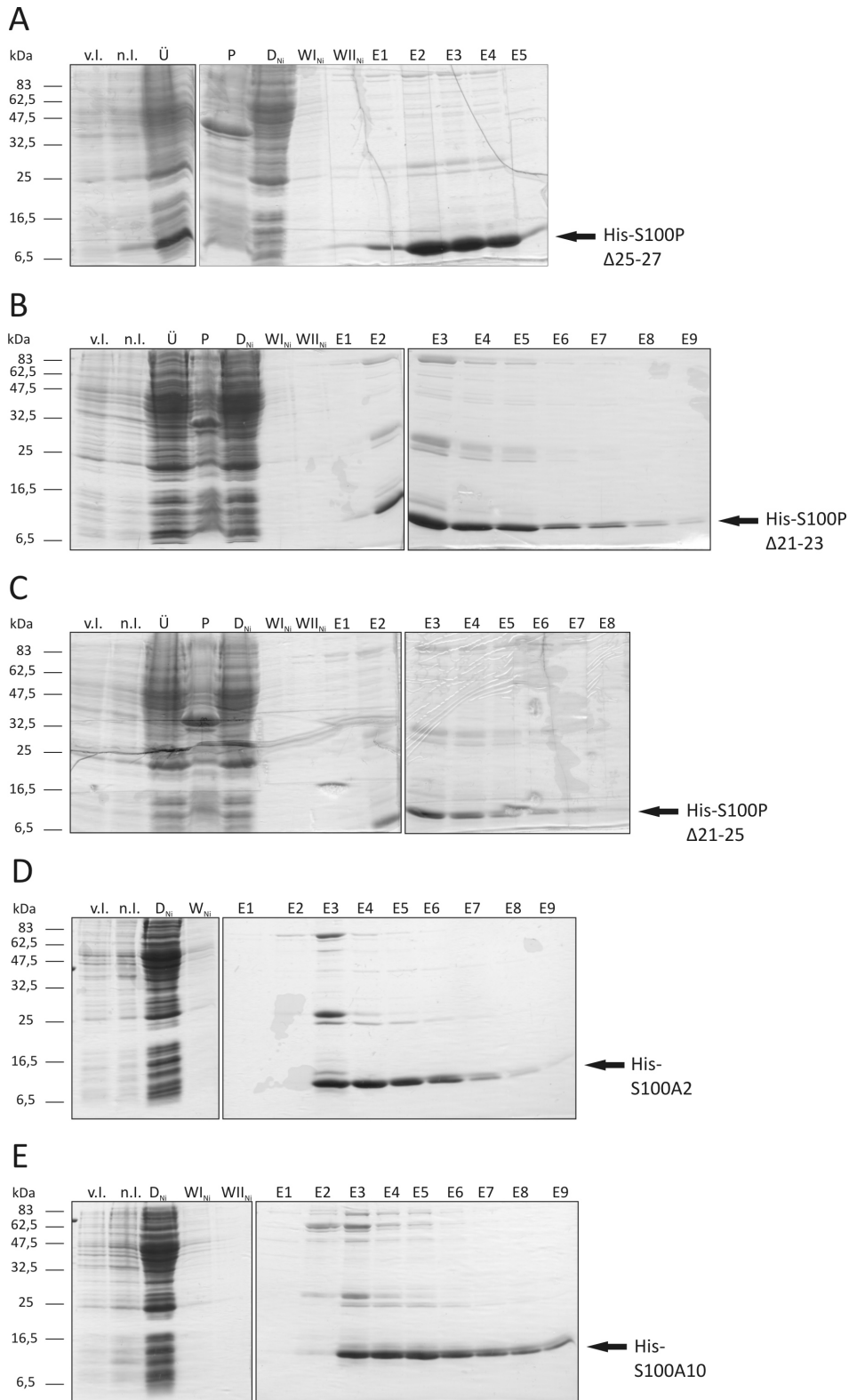


Abb. 4.8: Expression und Reinigung von (His)₆-fusionierten S100P Deletionsmutanten sowie von (His)₆-S100A2 und (His)₆-S100A10

In den transformierten *E. coli* Zellen (v.l.) wurde die Expression der S100P Deletionsmutanten und der S100 Proteine S100A2 und S100A10 durch IPTG-Zugabe induziert (n.l.). Nach Zellyse wurden durch eine Ultrazentrifugation unlösliche Zellbestandteile (P) von den löslichen Proteinen (Ü) getrennt. Diese wurden an Ni-NTA Agarose gebunden, wodurch Verunreinigungen entfernt werden konnten (D_{Ni}). Nach mehrmaligem Waschen mit steigender Imidazolkonzentration (W_{Ni}/WII_{Ni}) erfolgte die Elution der über den (His)₆-tag immobilisierten S100 Proteine durch einen hochkonzentrierten Imidazolpuffer (E1-E9). Proben der gesammelten Fraktionen wurden in einer 15 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und die darin befindlichen Proteine mittels Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht.

4.2.3 Analyse der S100P/IQGAP1-Interaktion

Zum Nachweis einer direkten Interaktion zwischen IQGAP1 und S100P wurden *in-vitro*-Bindungsstudien mit den rekombinant exprimierten und gereinigten Proteinen durchgeführt.

Für diese Untersuchungen wurde eine Glutathionsepharose Matrix mit immobilisiertem GST-IQGAP1 bzw. in einem Kontrollansatz Matrix mit immobilisiertem GST *alone* eingesetzt. In der löslichen Phase wurden zum einen S100Pwt *tagless* Protein und zum anderen das (His)₆-S100Pwt Fusionsprotein zugegeben. Die Versuche wurden parallel mit Ca²⁺- bzw. EGTA-haltigen Bindungspuffern durchgeführt um die etwaige Ca²⁺-Abhängigkeit der Interaktion zu überprüfen.

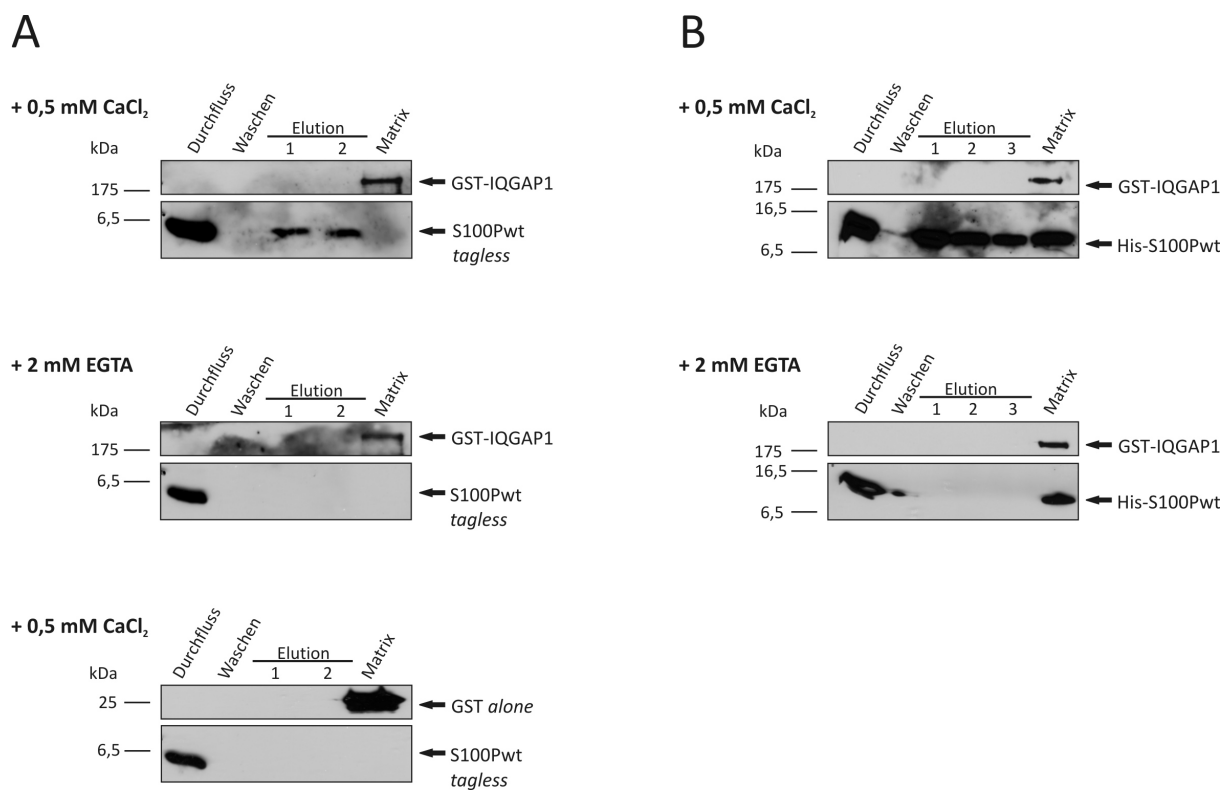


Abb. 4.9: Die S100P/IQGAP1-Interaktion ist direkt und Ca²⁺-abhängig

Die *in-vitro*-Bindungsstudien wurden mit an Glutathionsepharose immobilisiertem GST-IQGAP1 bzw. GST *alone* und S100Pwt *tagless* (A) oder His-S100Pwt (B) in der Flüssigphase durchgeführt. Die Bindung der Proteine und die Waschschritte wurden entweder in Gegenwart von CaCl₂ oder EGTA durchgeführt. Die Elution der Ca²⁺-abhängig gebundenen Proteine erfolgte mit 5 mM EGTA. Proben aller gesammelten Fraktionen sowie der Matrix wurden einer 15 %igen SDS-PAGE unterzogen und mittels Western Blot-Analyse untersucht. Die Detektion der S100P Proteine erfolgte dabei mit einem monoklonalen α-S100P-Antikörper (S100P *ascitis*), die des IQGAP1 Proteins mittels eines monoklonalen α-IQGAP1-Antikörpers und der Nachweis des GST *alone* erfolgte durch Verwendung eines monoklonalen α-GST-Antikörpers.

Die in Abb. 4.9 gezeigte Western Blot-Analyse der *in-vitro*-Bindungsstudie lässt erkennen, dass eine direkte Bindung sowohl von S100Pwt *tagless* als auch von His-S100Pwt an IQGAP1 vorliegt. Diese Interaktion ist zudem Ca^{2+} -abhängig, da die Bindung der Proteine durch Applikation eines EGTA-haltigen Puffers beendet werden kann und in den Ansätzen mit EGTA-haltigem Bindungspuffer nicht auftritt. Auch liegt eine spezifische Interaktion vor, da keine Bindung des S100P Proteins an den GST-*tag* zu detektieren ist (wie für S100Pwt *tagless* in Abschnitt A beispielhaft gezeigt). Auch der His-*tag* behindert die Interaktion mit IQGAP1 nicht wesentlich. Allerdings ist eine Hintergrundbindung von His-S100Pwt an GST-IQGAP1 im EGTA-Ansatz zu erkennen, die sich jedoch nur in der Matrixfraktion findet. Hierbei handelt es sich vermutlich um eine unspezifische Wechselwirkung des His-*tags* mit der Glutathionsepharose.

4.2.4 Kartierung der IQGAP1-Bindungsstelle im S100P Protein

Die Identifizierung der IQGAP1-Bindungsstelle innerhalb des S100P Proteins erfolgte über *in-vitro*-Bindungsstudien unter Verwendung verschiedener S100P Mutanten (Abb. 4.5). Zunächst wurden C-terminal verkürzte S100P Derivate untersucht, da innerhalb der C-terminalen Extensionen der S100 Proteine die stärksten Sequenzvariationen zu finden sind und dieser Bereich an den meisten S100 Proteininteraktionen beteiligt ist (Marenholz *et al.* 2004). So konnte zuvor auch für das S100P Protein gezeigt werden, dass die Aminosäuren 88-90 essenziell für die Bindung von Ezrin sind (Austermann *et al.* 2008). Dieser Nachweis gelang mit Hilfe zweier C-terminal verkürzter S100P Mutanten. So findet bei der um vier Aminosäuren verkürzten S100P-91aa Mutante noch eine Ca^{2+} -abhängige Bindung an Ezrin statt, die jedoch nach Deletion weiterer vier Aminosäuren bei der S100P-87aa Mutante aufgehoben ist.

Für die Untersuchung, ob Gleiches auch für die Bindung von IQGAP1 gilt, wurden daher diese beiden Mutanten für eine *in-vitro*-Bindungsstudie mit immobilisiertem GST-IQGAP1 eingesetzt. Die Experimente wurden sowohl in Ca^{2+} - als auch in EGTA-haltigen Puffern und mit den entsprechenden GST *alone* Kontrollen durchgeführt.

Die Western Blot-Analyse der *in-vitro*-Bindungsstudie (Abb. 4.10) zeigt, dass sowohl die S100P-91aa wie auch die S100P-87aa Mutante, welche nicht mehr mit Ezrin interagieren kann, Ca^{2+} -abhängig an IQGAP1 binden. Analog zum S100Pwt Protein wird auch diese Interaktion nicht durch den GST-*tag* vermittelt, wie die GST *alone* Kontrolle zeigt, die beispielhaft für das S100P-91aa-Experiment abgebildet wurde. Das Bindungsmotiv für IQGAP1 im S100P Protein wird somit nicht durch die letzten vier Aminosäuren und im Gegensatz zum Bindungsmotiv für Ezrin auch nicht durch die Aminosäuren 88-90 gebildet.

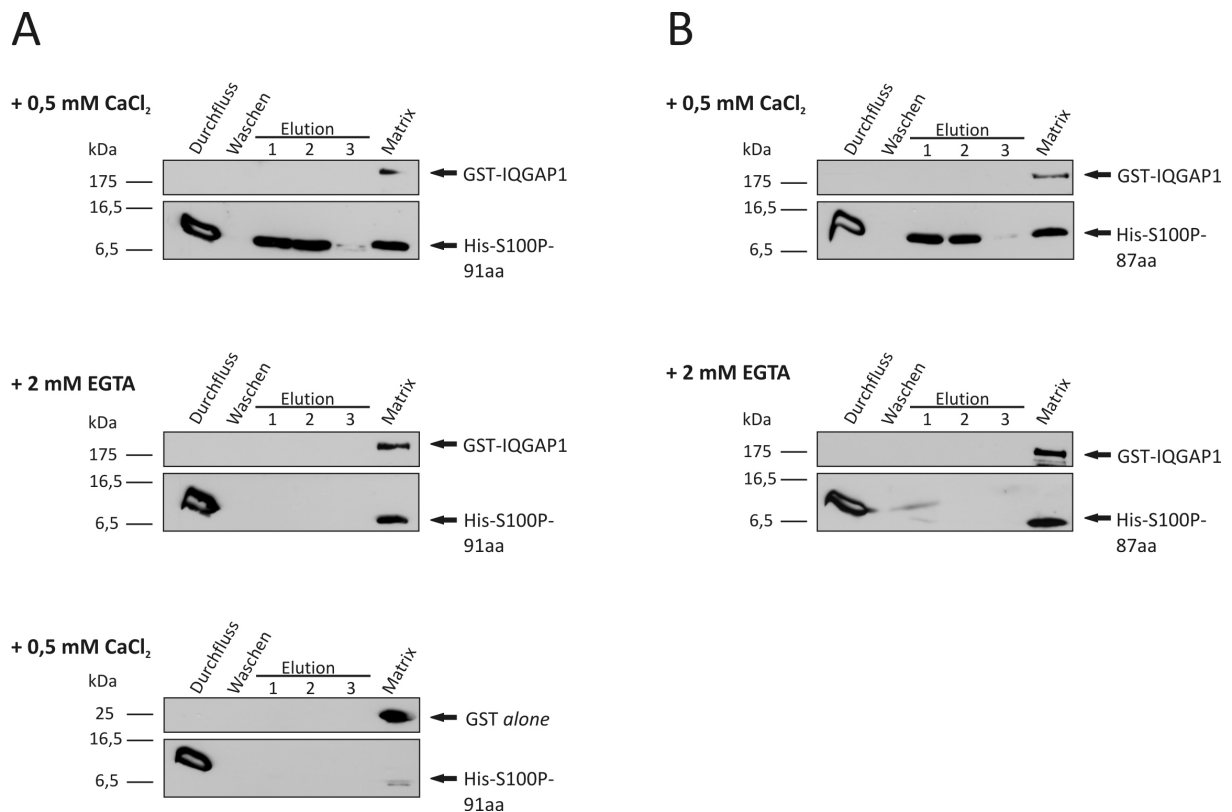


Abb. 4.10: Die für die Ezrin-Bindung verantwortlichen AS 88-90 im S100P Protein sind nicht an der IQGAP1-Bindung beteiligt

Die C-terminal verkürzten S100P Derivate His-S100P-91aa (A) sowie His-S100P-87aa, welches nicht mehr an Ezrin bindet (B), wurden auf Affinitätsäulen mit immobilisiertem GST-IQGAP1 bzw. GST *alone* gegeben. Bindung der Proteine und Waschschritte wurden entweder in Gegenwart von CaCl₂ oder EGTA durchgeführt und die Elution der Ca²⁺-abhängig gebundenen S100P Derivate erfolgte mit 5 mM EGTA. Proben aller gesammelten Fraktionen sowie der Matrix wurden einer 15 %igen SDS-PAGE unterzogen und mittels Western Blot-Analyse untersucht. Monoklonale α-(His)₆-Antikörper, α-IQGAP1-Antikörper sowie α-GST-Antikörper dienten zur Detektion der Proteine.

Die weiteren Analysen zur Identifizierung des IQGAP1-Bindungsmotivs innerhalb des S100P Proteins wurden ebenfalls über *in-vitro*-Bindungsstudien, aber mittels eines veränderten experimentellen Aufbaus durchgeführt. So wurden die rekombinant exprimierten, (His)₆-fusionierten S100P Derivate an eine Ni-NTA-Agarose Matrix gekoppelt und *in-vitro* translatiertes, [³⁵S]Methionin markiertes *full length* IQGAP1 Protein in der Flüssigphase zugegeben. Die jeweiligen Kontrollansätze bestanden dementsprechend aus Ni-NTA-Agarose *Beads* ohne immobilisiertem Protein. Die Experimente erfolgten zunächst lediglich in der Gegenwart von CaCl₂. Der Nachweis einer Interaktion zwischen S100P Derivat und radioaktiv markiertem IQGAP1 Protein erfolgte mittels Autoradiographie.

Nachdem die letzten acht Aminosäuren des S100P Proteins als Bindungsmotiv für IQGAP1 ausgeschlossen werden konnten, wurde ein Sequenzvergleich von S100P und den nicht an IQGAP1 bindenden S100 Proteinen S100A6 und S100A11 (Mbele *et al.* 2002) vorgenommen. Daraufhin wurde die S100P-87aa-mut Mutante generiert, bei welcher drei Aminosäuren (T82A, S83L und H86N)

ausgetauscht sind, um ihre Struktur der von S100A6 und S100A11 anzupassen. Diese Mutante wurde für eine *in-vitro*-Bindungsstudie eingesetzt.

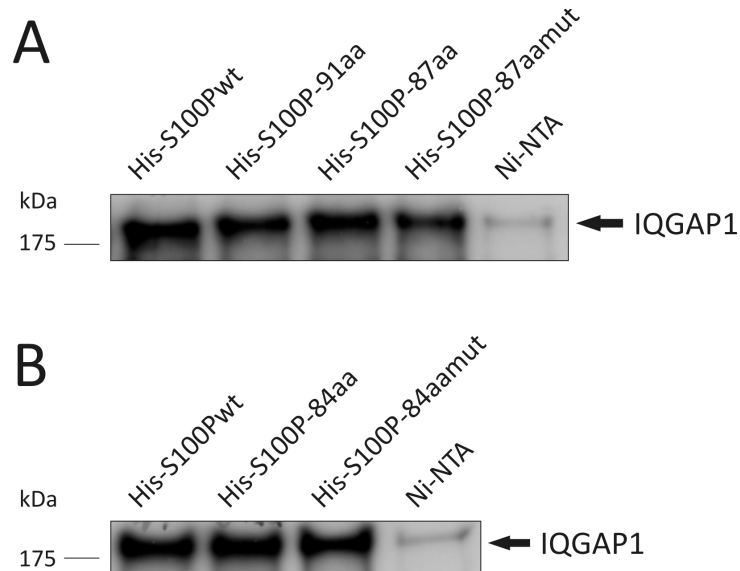


Abb. 4.11: Der C-terminale Bereich des S100P ist nicht an der IQGAP1-Bindung beteiligt

In-vitro-Bindungsstudien mit immobilisierten (His)₆-S100P Derivaten und [³⁵S]Methionin markiertem *full length* IQGAP1 Protein in der Flüssigphase. Die Bindung der Proteine fand in Gegenwart von 0,5 mM CaCl₂ statt. Nach dem Waschen mit Ca²⁺-haltigem Puffer erfolgte die Elution der Proteinkomplexe von der Ni-NTA-Agarose durch Aufkochen mit SDS-Probenpuffer. Die eluierten Proteine wurden mittels 10 %iger SDS-PAGE voneinander getrennt und das [³⁵S]Methionin markierte IQGAP1 mittels Autoradiographie nachgewiesen.

Wie in Abb. 4.11A zu erkennen ist bindet IQGAP1 wie erwartet an die zuvor getesteten S100P Mutanten S100P-91aa und S100P-87aa, jedoch wirken sich auch die in der S100P-87aa-mut Mutante neu eingeführten Mutationen nicht negativ auf die Interaktion mit IQGAP1 aus. Da nur eine vernachlässigbar geringe Bindung von IQGAP1 an die Ni-NTA-Agarose Matrix zu beobachten ist, kann auch bei diesem veränderten experimentellen Aufbau von spezifischen Interaktionen ausgegangen werden.

Im Anschluss daran wurden die S100P Derivate S100P-87aa und S100P-87aa-mut jeweils um drei weitere Aminosäuren verkürzt. Jedoch auch an diese neu generierten Mutanten, S100P-84aa und S100P-84aa-mut, bindet IQGAP1 eindeutig (Abb. 4.11B). Der C-terminale Bereich des S100P Proteins ist somit nicht wesentlich an der Interaktion mit IQGAP1 beteiligt.

In demselben experimentellen Ansatz wurden zwei weitere S100 Proteine auf ihre Fähigkeit IQGAP1 zu binden überprüft (Abb. 4.12A). Zum einen wurde S100A10 untersucht, ein S100 Protein mit zwei nicht funktionellen EF-Händen, welches jedoch eine Konformation einnimmt, die der Ca^{2+} -gebundenen Form anderer S100 Proteine entspricht (Rety *et al.* 1999). Zum anderen wurde S100A2 getestet, bei dem es sich ebenfalls um ein Ezrin-bindendes S100 Protein handelt (B. Kaiser und V. Gerke, unveröffentlichte Daten).

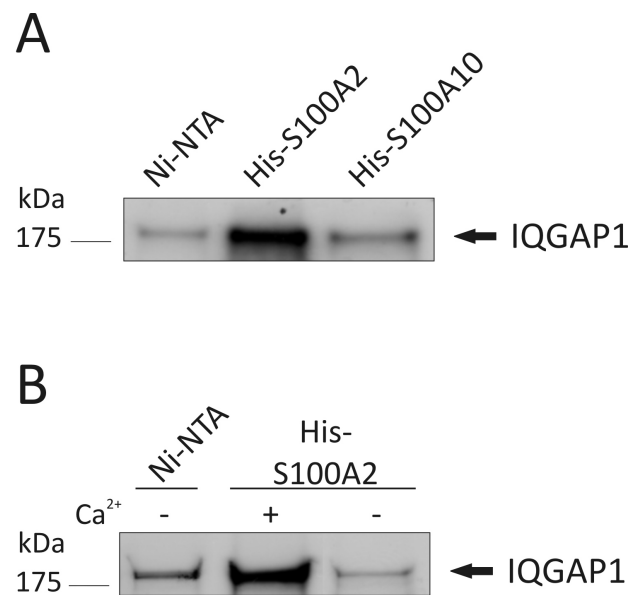


Abb. 4.12: IQGAP1 bindet Ca^{2+} -abhängig an S100A2 und nicht an S100A10

(A) *In-vitro*-Bindungsstudien mit immobilisiertem $(\text{His})_6$ -fusioniertem S100A2 bzw. S100A10 und [³⁵S]Methionin markiertem *full length* IQGAP1 Protein in der Flüssigphase. Die Bindung der Proteine fand in Gegenwart von 0,5 mM CaCl_2 statt. Nach dem Waschen mit Ca^{2+} -haltigem Bindungspuffer erfolgte die Elution der Proteinkomplexe von der Ni-NTA-Agarose durch Aufkochen mit SDS-Probenpuffer. Die eluierten Proteine wurden mittels 10 %iger SDS-PAGE voneinander getrennt und das [³⁵S]Methionin markierte IQGAP1 mittels Autoradiographie nachgewiesen. (B) Zur Überprüfung der Ca^{2+} -Abhängigkeit der IQGAP1/S100A2-Interaktion wurden für die Bindung und die Waschschrte Ca^{2+} (+)- bzw. EGTA(-)-haltige Bindungspuffer verwendet. Im Weiteren wurden die Proben wie unter A beschrieben behandelt.

Hierbei zeigte sich, dass S100A2 ebenfalls Ca^{2+} -abhängig an IQGAP1 bindet (Abb. 4.12B). Für S100A10 hingegen konnte keine Interaktion mit IQGAP1 festgestellt werden (Abb. 4.12A). Daraufhin wurde ein Vergleich der dreidimensionalen Strukturen von Ca^{2+} /S100P und S100A10 auf der Basis der bei der RCSB Protein Data Bank hinterlegten Strukturinformationen durchgeführt.

A

S100P -MTELETAMGMIIDVFSRYSGSEGSTQTLTKGELKVLMEKELPGFLQSGKDKDAVDKLLK
 S100A10 MPSQMEHAMETMMFTFHKFAG---DKGYLTKEDLRVLMKEKEFPGFLENQKDFLAVDKIMK

S100P DLDANGDAQVDFSEFIVFVAAITTSACHKYF----EKAGLK
 S100A10 DLDQCRDQKVGFGQSFSLIAGLTIACNDYFVVHMKQKGGK

B

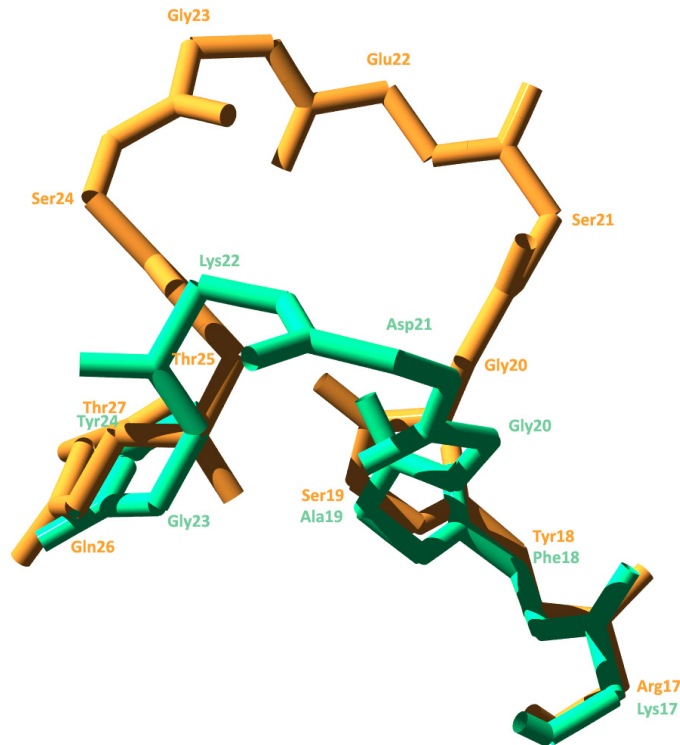


Abb. 4.13: Vergleich der Primär- und Tertiärstruktur von S100P und S100A10

Vergleich der Primärstruktur von S100P und S100A10 (A) und der Tertiärstruktur im Bereich des ersten EF-Hand-Loops der beiden Proteine (B). Die Aminosäuren 17-27 von S100P sind in orange, die Aminosäuren 17-24 von S100A10 in grün dargestellt. PDB-ID: S100P = 1j55, S100A10 = 1A4P.

Der Vergleich der Primärstruktur von S100P mit S100A10 lässt u.a. einen starken Unterschied im Bereich der ersten EF-Hand erkennen (Abb. 4.13A). S100A10 weist dort eine Deletion von drei Aminosäuren (SEG) auf. Werden die räumlichen Anordnungen der Aminosäuren in diesem Bereich verglichen, so ist zu erkennen, dass einige Aminosäuren von S100P einen Loop bilden (Abb. 4.13B). Um zu überprüfen, ob dieser Loop an der IQGAP1-Bindung beteiligt ist, wurden S100P Mutanten mit verschiedenen Deletionen im Bereich der ersten EF-Hand erzeugt (siehe Abb. 4.5) und analysiert.

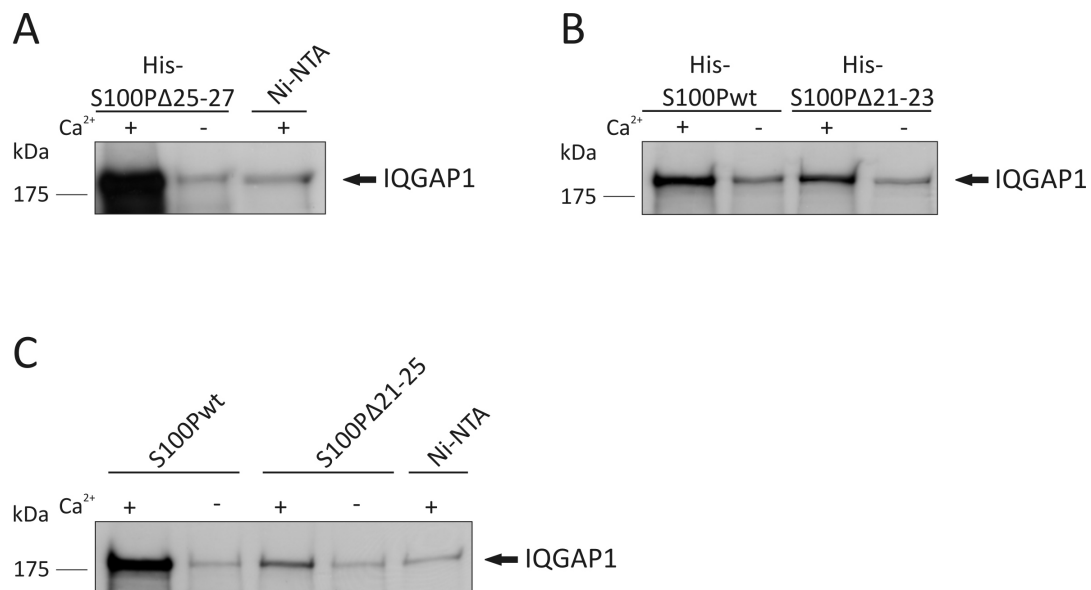


Abb. 4.14: Die Bindungsstelle für IQGAP1 im S100P Protein liegt innerhalb der ersten EF-Hand

Es wurden *In-vitro*-Bindungsstudien mit immobilisiertem His-S100PΔ25-27 (A), His-S100Pwt und His-S100PΔ21-23 (B) oder His-S100Pwt und His-S100PΔ21-25 durchgeführt (C). [³⁵S]Methionin markiertes *full length* IQGAP1 Protein wurde entweder in Gegenwart von 0,5 mM CaCl₂ oder 2 mM EGTA auf die Affinitätsäulen gegeben. Nach dem Waschen mit den Ca²⁺- bzw. EGTA-haltigen Bindungspuffern erfolgte die Elution der Proteinkomplexe von der Ni-NTA-Agarose durch Aufkochen mit SDS-Probenpuffer. Die eluierten Proteine wurden mittels 10 %iger SDS-PAGE voneinander getrennt und das [³⁵S]Methionin markierte IQGAP1 mittels Autoradiographie nachgewiesen.

Die in Abb. 4.14 gezeigten Autoradiographien lassen erkennen, dass die vorgenommenen Deletionen unterschiedliche Auswirkungen auf die S100P/IQGAP1-Interaktion haben. Die Deletion der Aminosäuren 25-27 hat keinen Einfluss auf die Bindung von IQGAP1, wohingegen die Deletion der Aminosäuren 21-23 in einer schwach verminderten Interaktion resultiert. Werden allerdings zwei weitere Aminosäuren deletiert, wie im Fall der S100PΔ21-25 Mutante, so führt dies zu einer sehr stark verminderten Interaktion der Mutante mit IQGAP1 im Vergleich zum S100Pwt Protein (Abb. 4.14C). Die Aminosäuren 21-25 in der ersten EF-Hand des S100P Proteins sind demnach wesentlich an der Interaktion mit IQGAP1 beteiligt.

4.2.5 Charakterisierung der Mutante S100PΔ21-25

Für die S100PΔ21-25 Mutante konnte gezeigt werden, dass sie nur noch sehr schwach an IQGAP1 bindet. Sie musste allerdings etwas genauer charakterisiert werden, um für funktionelle Analysen eingesetzt werden zu können. Eine wichtige biologische Eigenschaft des S100P Proteins ist die Interaktion mit der N-terminalen Domäne des Ezrin Proteins (N-ERMAD), welche zu einer Aktivierung von Ezrin führt (Koltzsch *et al.* 2003). Es wurde daher untersucht, ob sich die in der S100PΔ21-25

Mutante eingeführte Deletion nicht nur auf die Interaktion mit IQGAP1, sondern auch auf die Interaktion mit Ezrin auswirkt.

Hierzu wurden *in-vitro*-Bindungsstudien mit His-S100Pwt bzw. His-S100PΔ21-25, welche an einer Ni-NTA-Agarose Matrix immobilisiert waren, durchgeführt. Das zuvor ebenfalls in *E. coli* BL21(DE3)pLysS Kulturen exprimierte und über Glutathion Sepharose gereinigte GST-N-ERMAD wurde in der Flüssigphase auf die Affinitätssäulen gegeben.

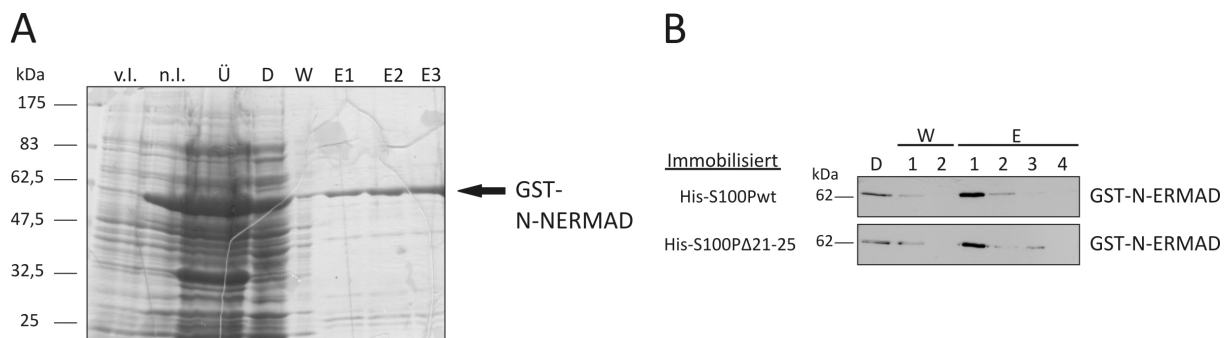


Abb. 4.15: Vergleich von S100Pwt und S100PΔ21-25 bezgl. ihrer Interaktion mit Ezrin

(A) Die Expression des GST-N-ERMAD in *E. coli* wurde durch Zugabe von IPTG induziert (v.l./n.l.). Nach dem Zellaufschluss wurden unlösliche Zellbestandteile durch Ultrazentrifugation von den löslichen Proteinen (Ü) getrennt. Über seinen GST-tag wurde das N-ERMAD Protein an Glutathionsepharose gebunden, wodurch Verunreinigungen entfernt werden konnten (D). Nach dem Waschen (W) erfolgte die Elution des GST-N-ERMAD Proteins durch einen Glutathion-haltigen Puffer (E1-E3). Proben der gesammelten Fraktionen wurden einer 12 %igen SDS-PAGE unterzogen und die darin befindlichen Proteine mittels Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht. (B) Das rekombinant exprimierte GST-N-ERMAD wurde in Gegenwart von CaCl_2 auf Affinitätssäulen mit immobilisiertem His-S100Pwt (oben) oder His-S100PΔ21-25 (unten) gegeben. Der Durchfluss (D) wurde gesammelt und die Säulen mit Ca^{2+} -haltigem Puffer gewaschen (W). Die Elution (E) von Ca^{2+} -abhängig gebundenem N-ERMAD erfolgte durch einen EGTA-haltigen Puffer. Proben aller gesammelten Fraktionen wurden einer 15 %igen SDS-PAGE unterzogen und mittels Western Blot-Analyse untersucht. Die Detektion des GST-N-ERMAD erfolgte dabei mit einem monoklonalen α -GST-Antikörper.

In Abb. 4.15 ist zu erkennen, dass kein Unterschied zwischen S100Pwt und S100PΔ21-25 bezüglich der Ca^{2+} -abhängigen Interaktion mit N-ERMAD besteht.

Zusätzlich wurde die intrazelluläre Lokalisation der S100PΔ21-25-Mutante im Vergleich zum S100Pwt Protein näher untersucht. Dazu wurden Immunfluoreszenz-Analysen sowohl mit den entsprechenden GFP-Fusionsproteinen (Daten nicht gezeigt), als auch mit den $(\text{His})_6$ -Fusionsproteinen durchgeführt (Abb. 4.16 und Abb. 4.17).

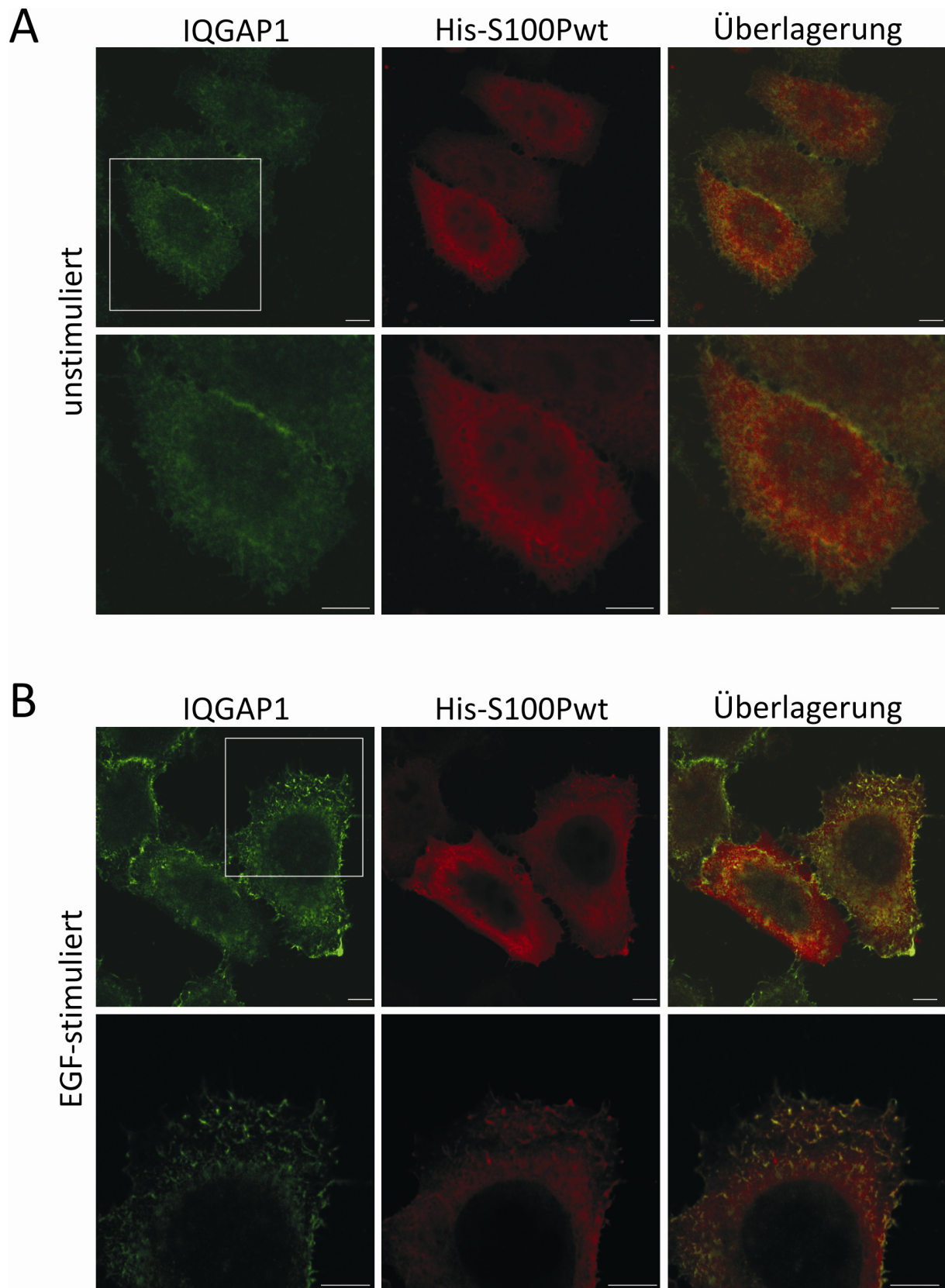


Abb. 4.16: Intrazelluläre Lokalisation von IQGAP1 und His-S100Pwt

HeLa-Zellen wurden transient mit dem Plasmid pCDNA3.1-His-S100Pwt transfiziert und nach 16-stündiger Serumdepletion entweder im unstimulierten Zustand belassen (A) oder für 5 min mit 50 ng/ml EGF stimuliert (B). Nach PFA-Fixierung und Permeabilisierung erfolgte die Inkubation der Zellen mit einem polyklonalen α -IQGAP1-Antikörper (K. Kaibuchi) sowie einem monoklonalen α -His-Antikörper, gefolgt von den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundäntikörpern. Die Detektion der Antikörper erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops. Die unteren Abschnitte stellen jeweils Vergrößerungen der oberen Bilder dar. Größenbalken entsprechen 5 μ m.

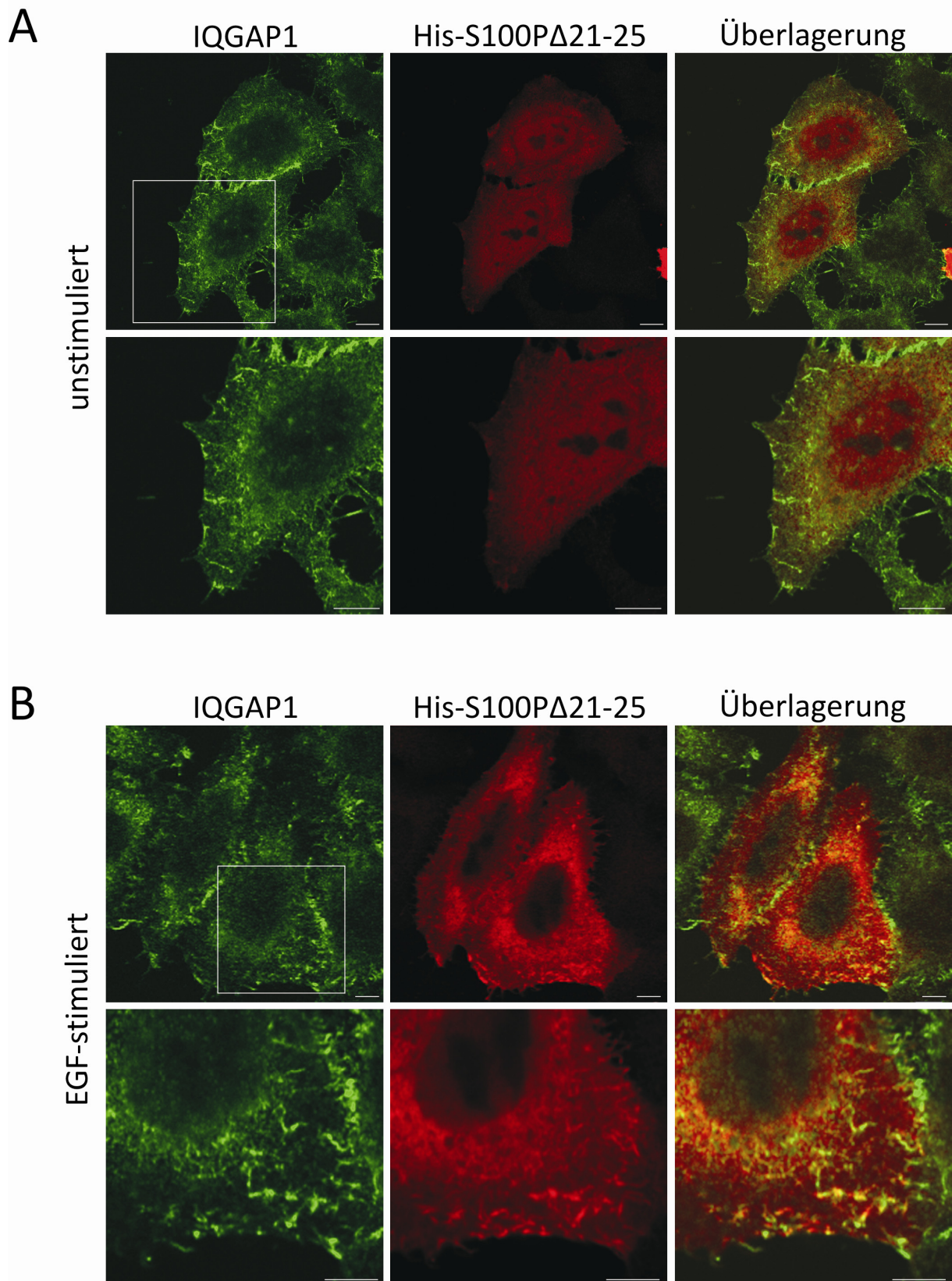


Abb. 4.17: Intrazelluläre Lokalisation von IQGAP1 und His-S100P Δ 21-25

HeLa-Zellen wurden transient mit dem Plasmid pCDNA3.1-His-S100P Δ 21-25 transfiziert und nach 16-stündiger Serumdepletion entweder im unstimulierten Zustand belassen (A) oder für 5 min mit 50 ng/ml EGF stimuliert (B). Nach PFA-Fixierung und Permeabilisierung erfolgte die Inkubation der Zellen mit einem polyklonalen α -IQGAP1-Antikörper (K. Kaibuchi) sowie einem monoklonalen α -His-Antikörper, gefolgt von den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärintikörpern. Die Detektion der Antikörper erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops. Die unteren Abschnitte stellen jeweils Vergrößerungen der oberen Bilder dar. Größenbalken entsprechen 5 μ m.

Die in Abb. 4.16A und Abb. 4.17A gezeigten Immunfluoreszenz-Aufnahmen zeigen, dass sowohl His-S100Pwt wie auch His-S100P Δ 21-25 in serumdepletierten und unstimulierten HeLa-Zellen in der gesamten Zelle gleichmäßig verteilt sind. Das endogene IQGAP1 lokalisiert im Zytoplasma mit Anreicherungen an Zell-Zell-Kontakten und im Falle der His-S100P Δ 21-25 exprimierenden Zellen auch in kurzen Zellfortsätzen. Eine 5-minütige EGF-Stimulierung der Zellen führt in beiden Fällen zu einer Translokation des S100P Proteins in Membranstrukturen, bei welchen es sich um Mikrovilli handeln könnte (Abb. 4.16B und Abb. 4.17B).

Die gemeinsame Translokation von IQGAP1 und His-S100Pwt nach EGF-Stimulierung lässt auf eine durch die erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration induzierte Komplexbildung der beiden Proteine schließen. Dass auch in den His-S100P Δ 21-25 exprimierenden Zellen eine Translokation des Proteins nach EGF-Stimulierung zu beobachten ist, kann auf die nicht beeinträchtigte Interaktion mit Ezrin zurückzuführen sein; denn auch für den S100P/Ezrin-Komplex wurde eine Translokation in Mikrovilli-Strukturen an der Plasmamembran nach Stimulierung der Zellen gezeigt (Koltzsch *et al.* 2003).

Bei S100P Δ 21-25 scheint es sich somit um ein geeignetes S100P Kontrollderivat zu handeln, mit dem zelluläre Effekte der S100P/IQGAP1-Interaktion analysiert werden können, da spezifisch die Interaktion mit IQGAP1 nicht aber mit Ezrin gestört ist.

4.2.6 Kartierung der S100P-Bindungsstelle im IQGAP1 Protein

Zur Identifizierung des S100P-Bindungsmotivs innerhalb des IQGAP1 Proteins wurden Bindungsstudien mit *in-vitro*-translatierten und [³⁵S]Methionin markierten IQGAP1 Mutanten bzw. IQGAP1 *full length* Protein durchgeführt. In einem ersten Experiment konnte eine Interaktion mit der C-terminalen Hälfte des IQGAP1 Proteins ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurden die in Abb. 4.18A gezeigten N-terminalen IQGAP1-Domänen auf ihre Fähigkeit hin überprüft, in Gegenwart von CaCl₂ an bakteriell exprimiertes, immobilisiertes His-S100Pwt Protein zu binden. Als Kontrolle diente zum einen *in-vitro*-translatiertes *full length* IQGAP1 (positiv), zum anderen Ni-NTA Agarose ohne immobilisiertes Protein (negativ). Eine Interaktion der radioaktiv markierten Proteine mit dem S100Pwt Protein bzw. mit der Ni-NTA-Agarose wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen.

Abb. 4.18B lässt erkennen, dass sämtliche IQGAP1 Derivate, welche die IQ-Domäne beinhalten, eindeutig an das immobilisierte S100Pwt binden. Auch kann eine sehr schwache Interaktion der isolierten CHD mit dem immobilisierten S100Pwt detektiert werden. Die IR-WW-Domäne hingegen zeigt keinerlei Bindung an S100Pwt. Diese Domäne verfügt im Vergleich zu den anderen Domänen weder über die CHD noch über die IQ-Domäne. Diese beiden Domänen des IQGAP1 Proteins müssen somit Bindungsstellen für S100P enthalten.

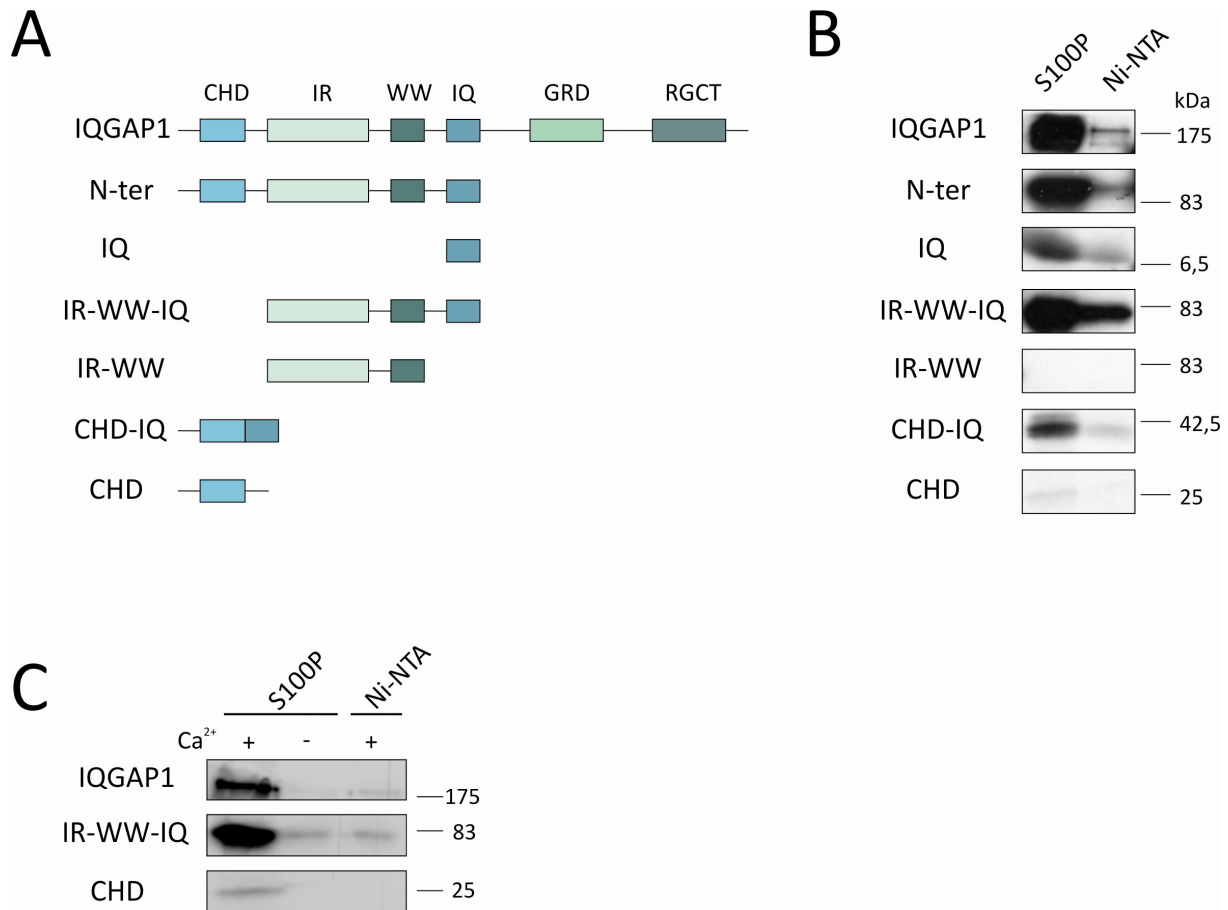


Abb. 4.18: S100P bindet Ca^{2+} -abhängig an die CHD und die IQ-Domäne im IQGAP1 Protein

(A) Schematische Darstellung verschiedener *in vitro* translatierter und [^{35}S]Methionin markierter IQGAP1 Mutanten, die auf ihre Fähigkeit an S100P zu binden analysiert wurden. (B) Die verschiedenen IQGAP1 Mutanten sowie *full length* IQGAP1 wurden *in vitro* translatiert und radioaktiv markiert. Anschließend wurden sie in Gegenwart von CaCl_2 auf Ni-NTA-Agarose *Beads alone* oder *Beads* mit immobilisiertem His-S100Pwt geladen. Nach dem Waschen mit Ca^{2+} -haltigem Puffer wurden die gebundenen Proteine mit heißem Probenpuffer von den *Beads* eluiert und IQGAP1 mittels Autoradiographie nachgewiesen. (C) Analyse der Ca^{2+} -abhängigen Interaktion von S100P mit der CHD und der IQ-Domäne. [^{35}S]Methionin markiertes *full length* IQGAP1, bzw. die CHD oder die IR-WW-IQ-Domäne wurden auf Ni-NTA-Agarose *Beads alone* oder *Beads* mit immobilisiertem His-S100Pwt geladen, welche im weiteren wie oben beschrieben behandelt wurden. Die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Interaktion wurde durch Verwendung Ca^{2+} - bzw. EGTA-haltiger Puffer analysiert.

CHD, Calponin-Homologie Domäne; IR, Domäne mit sechs IQGAP1 spezifischen *Internal Repeats*; WW, Domäne mit zwei konservierten Trp(W)-Resten; IQ, Domäne mit vier IQ-Motiven; GRD, GAP Related Domain; RGCT, Ras GAP C-Terminus.

Um nun die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Interaktion zwischen S100P und der CHD bzw. der IQ-Domäne zu überprüfen, wurden anschließend die *in-vitro*-Bindungsstudien mit zusätzlichen EGTA-Kontrollansätzen wiederholt. Abb. 4.18C zeigt, dass sowohl die Interaktion von S100P mit der CHD als auch mit der IQ-Domäne Ca^{2+} -abhängig ist.

4.2.7 Surface Plasmon Resonance (SPR)-Analyse

Nachdem innerhalb des IQGAP1 Proteins Bindungsstellen für S100P in der CHD und der IQ-Domäne identifiziert werden konnten, wurde die Interaktion zwischen S100P und den beiden isolierten Domänen mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie an einem Biacore 3000 System untersucht. Hierfür verwendet wurden rekombinant exprimiertes S100Pwt *tagless* Protein und die ebenfalls bakteriell exprimierte und über einen $(\text{His})_6$ -*tag* gereinigte CHD bzw. IQ-Domäne.

Zunächst wurden die Interaktionen der CHD und der IQ-Domäne mit dem immobilisierten S100Pwt Protein verglichen. Dazu wurden die beiden Analyten in Gegenwart von CaCl_2 in gleichen molaren Konzentrationen in die Flusszelle injiziert und die bei Bindung des Analyten an das immobilisierte Protein auftretende Änderung der Oberflächenplasmonenresonanz detektiert.

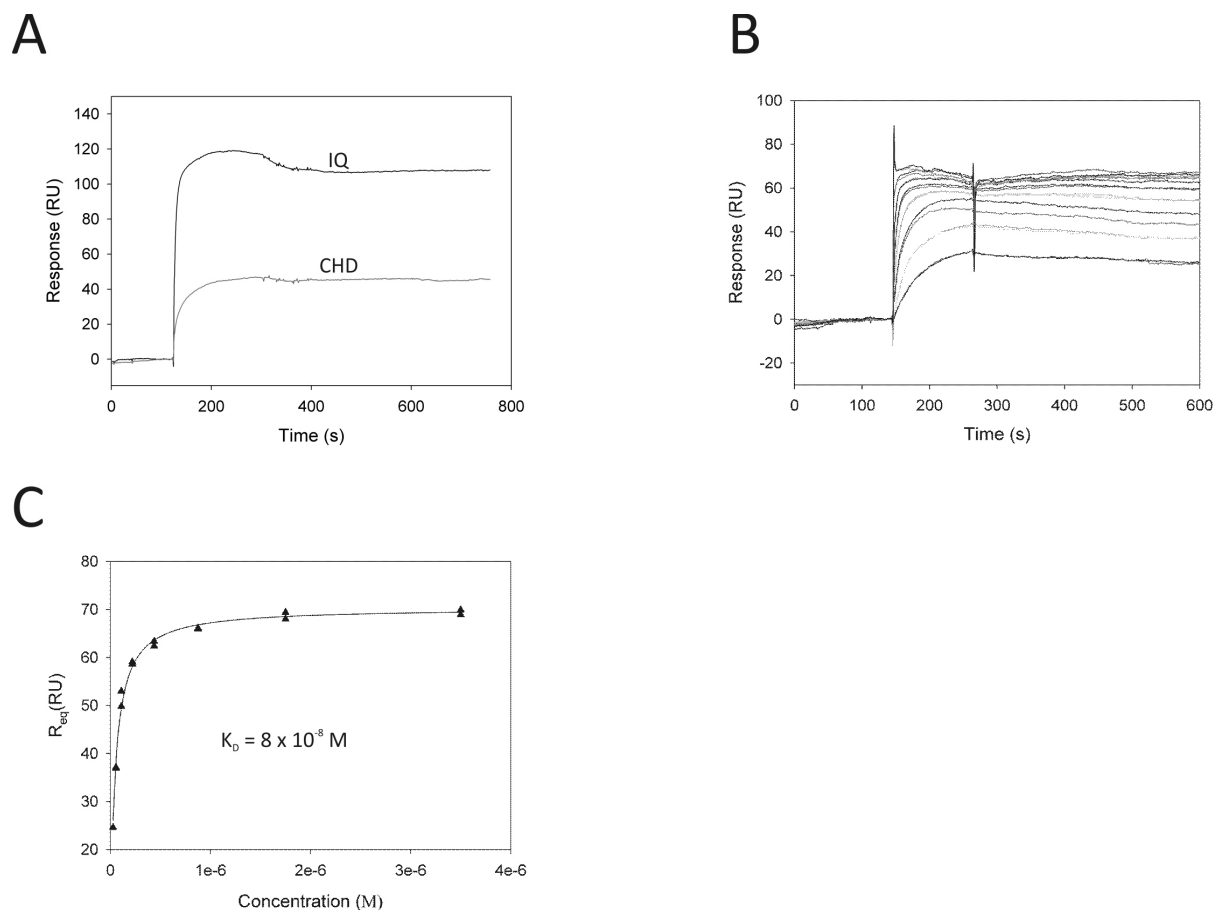


Abb. 4.19: SPR-Analyse der Interaktion von S100P mit der IQ-Domäne des IQGAP1 Proteins

(A) S100P *tagless* Protein wurde auf einem CM5 Sensorchip immobilisiert und bakteriell exprimierte und über einen $(\text{His})_6$ -*tag* gereinigte IQGAP1-Domänen (CHD bzw. IQ) wurden in Gegenwart von CaCl_2 in gleichen molaren Konzentrationen in die Flusszelle injiziert. Die mit der Bindung der freien Analyten an das immobilisierte Protein einhergehende Änderung des Brechungsindex des Sensorchips wurde in einem Sensorgramm aufgezeichnet. (B) Die rekombinant exprimierte IQ-Domäne wurde in jeweils steigender Konzentration (0,03-3,5 μM) in die Flusszelle injiziert und die Interaktion mit dem auf einem CM5 Sensorchip immobilisierten S100P *tagless* Protein für jede Konzentration aufgezeichnet. (C) Die bei Erreichen des Bindungsgleichgewichts der S100P/IQ-Interaktion durchschnittlichen Bindungslevel (R_{eq}) wurden in Abhängigkeit von der IQ-Konzentration dargestellt. Sie dienen zur Berechnung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D der S100P/IQ-Interaktion mittels BIAevaluation Software Version 4.1. Die Experimente wurden in Kooperation mit Dr. A. R. Nazmi durchgeführt.

Das in Abb. 4.19A gezeigte Sensorgramm bestätigt die zuvor in den *in-vitro*-Bindungsstudien erhaltenen Ergebnisse, wonach sowohl die CHD als auch die IQ-Domäne an S100P binden. Auch hier zeigt sich, dass S100P eine sehr starke Bindung mit der IQ-Domäne eingeht und eine wesentlich schwächere mit der CHD. Demzufolge scheint es sich bei der IQ-Domäne um die primäre Bindungsstelle für S100P im IQGAP1 Protein zu handeln.

Daher wurde im Anschluss daran die Bindungsaffinität zwischen S100P und der IQ-Domäne des IQGAP1 Proteins bestimmt. Dazu wurde ein Titrationsexperiment mit steigender Konzentration der IQ-Domäne als freiem Analyten und immobilisiertem S100Pwt *tagless* Protein durchgeführt (Abb. 4.19B). Die bei dem Titrationsexperiment ermittelten durchschnittlichen Bindungslevel (R_{eq}) bei Erreichen des Bindungsgleichgewichts (Abb. 4.19C) dienten zur Berechnung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D . So konnte für die S100P/IQ-Interaktion eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante von $0,08 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ermittelt werden.

4.3 Funktionelle Analyse der S100P/IQGAP1-Interaktion

Nachdem die direkte und Ca^{2+} -abhängige Interaktion zwischen S100P und IQGAP1 verifiziert und biochemisch charakterisiert war, konnte eine funktionelle Analyse dieser Proteinkomplexbildung erfolgen. Diese Untersuchungen erfolgten in erster Linie durch Überexpression des S100P in verschiedenen Zellkulturmodellen. Um nachweisen zu können, dass es sich bei beobachteten Effekten um eine spezifische Auswirkung der S100P/IQGAP1-Interaktion handelt, wurde für diese Untersuchungen die IQGAP1-bindungsdefiziente S100P Δ 21-25 Mutante genutzt. Zusätzlich wurde S100A10, für das ebenfalls keine Interaktion mit IQGAP1 beobachtet wurde, als Vergleich herangezogen.

4.3.1 Analyse des Einflusses der S100P/IQGAP1-Interaktion auf Zellmigration

Bei IQGAP1 handelt es sich um einen wichtigen Regulator der Aktin-Zytoskelett-Dynamik. Zum einen kann es die Assemblierung von F-Aktinfilamenten durch direkte Interaktion mit diesen beeinflussen (Bashour *et al.* 1997), zum anderen interagiert IQGAP1 auch mit an solchen Prozessen beteiligten Proteinen, wodurch es einen indirekten Einfluss auf das Aktin-Netzwerk ausüben kann (Le Clairche *et al.* 2007, Swart-Mataraza *et al.* 2002). In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass IQGAP1 über die Bindung solcher Aktin-Regulatoren wie Cdc42 und Rac1 die Migration von Zellen entscheidend beeinflussen kann (Mataraza *et al.* 2003). Auf der anderen Seite konnte auch dem S100P eine regulierende Funktion bei Zellmigrationsprozessen zugeschrieben werden, die auf der Interaktion mit dem Membran/F-Aktin-verbindenden Protein Ezrin beruht (Austermann *et al.* 2008). Daher wurde zunächst untersucht, ob die S100P/IQGAP1-Komplexbildung einen Einfluss auf die Assoziation von IQGAP1 mit Cdc42 und Rac1 hat. Die Komplexbildung wurde verstärkt, indem HeLa-Zellen transient mit einem pEGFP-S100Pwt Expressionskonstrukt transfiziert und die Zellen nach Serumdepletion mit EGF stimuliert wurden. Die EGF-Stimulierung führt u.a. zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und fördert zudem die Interaktion von IQGAP1 mit Cdc42 und Rac1 (Erickson *et al.* 1997). Zusätzlich wurden Kontrollexperimente mit HeLa-Zellen, welche die IQGAP1-bindungsdefizienten GFP-S100P Δ 21-25 Mutante oder das ebenfalls nicht an IQGAP1 bindende YFP-S100A10 exprimierten, durchgeführt. Der Einfluss der Expression der S100 Derivate auf die IQGAP1/Cdc42- bzw. die IQGAP1/Rac1-Assoziation wurde mittels Co-Immunpräzipitationsexperimenten untersucht.

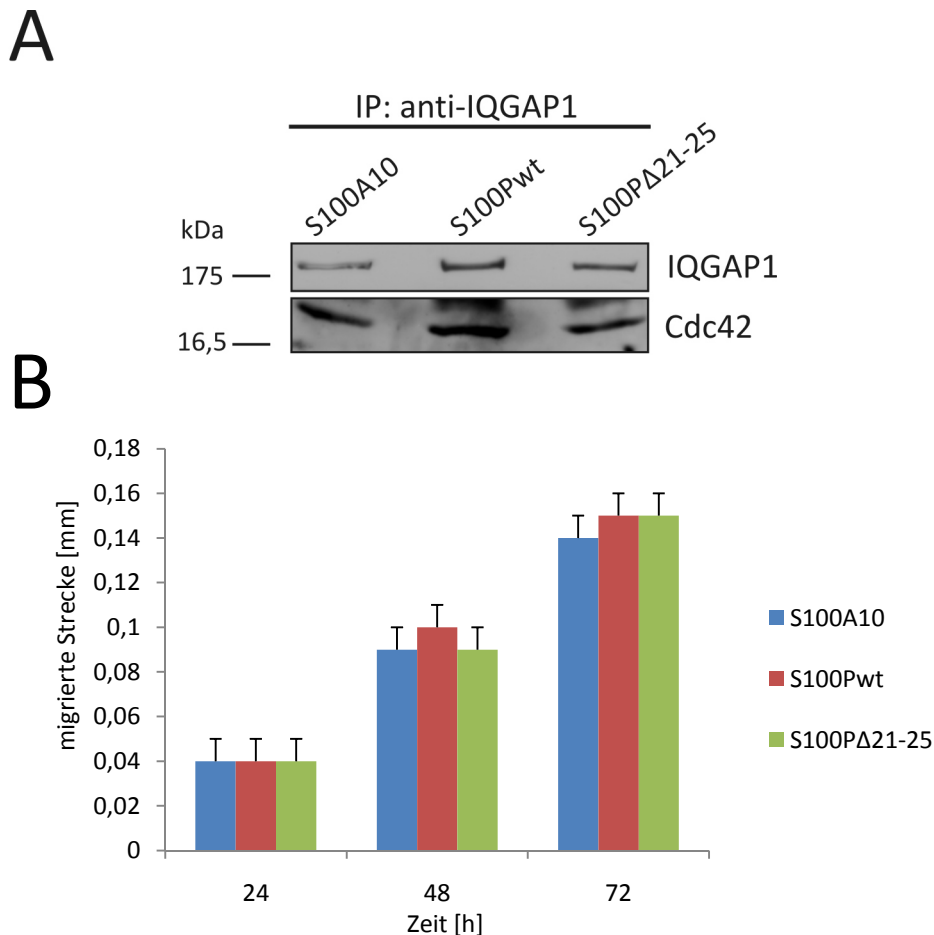


Abb. 4.20: Die S100P/IQGAP1-Komplexbildung hat weder einen Effekt auf IQGAP1/Cdc42-Komplexbildung noch auf Zellmigration

(A) Serumdepletierte HeLa-Zellen, die entweder GFP-S100Pwt, GFP-S100PΔ21-25 oder YFP-S100A10 exprimierten, wurden für 5 min mit 50 ng/ml EGF stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und die geklärten Lysate wurden für eine Immunpräzipitation mit einem polyklonalen α -IQGAP1-Antikörper (H-108, St. Cruz) eingesetzt. Präzipitiertes IQGAP1 und co-präzipitiertes Cdc42 oder Rac1 wurden mittels Western Blot unter Verwendung eines monoklonalen α -IQGAP1- und eines polyklonalen α -Cdc42-Antikörpers bzw. eines monoklonalen α -Rac1-Antikörpers nachgewiesen. Die Analyse der Komplexbildung in den verschiedenen Proben erfolgte durch densitometrische Vermessung der ECL-Signale der co-präzipitierten GTPasen unter Berücksichtigung der in der jeweiligen Probe vorhandenen Gesamtmenge an präzipitiertem IQGAP1. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen S100-exprimierenden Zellen. Beispielhaft wird hier ein Blot für Cdc42 gezeigt. (B) Die Migration verschiedener S100 Derivat-exprimierender HeLa-Zellen in einen zellfreien Spalt wurde analysiert. Dabei wurde die Migration der Zellen nach 24, 48 und 72 h erfasst. Gezeigt sind die Ergebnisse von 4 unabhängigen Experimenten, wobei kein signifikanter Unterschied zu detektieren war.

Wie in Abb. 4.20A beispielhaft für Cdc42 gezeigt, hat die S100P/IQGAP1-Komplexbildung keinen Einfluss auf die IQGAP1/Cdc42- bzw. IQGAP1/Rac1-Assoziation. Dieses Ergebnis wird gestützt von der in Abb. 4.20B gezeigten Auswertung der durchgeführten Migrationsassays. Hierbei wurde die Migration von S100Pwt-, S100PΔ21-25- oder S100A10-exprimierenden HeLa-Zellen in einen zellfreien Spalt analysiert. Es zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die S100P/IQGAP1-Interaktion keinen Einfluss auf die IQGAP1-Assoziation mit den Aktin-Regulatoren Cdc42 und Rac1 und somit auch nicht auf die mit Zellmigration einhergehenden Modulationen des Aktin-Zytoskeletts hat.

4.3.2 Einfluss der S100P/IQGAP1-Interaktion auf die MAPK-Signaltransduktion

Nachdem kein Einfluss der S100P/IQGAP1-Interaktion auf die Assoziation von IQGAP1 mit Cdc42 und Rac1 und kein Einfluss auf die Zellmigration nachgewiesen werden konnte, wurde eine weitere regulatorische Funktion des IQGAP1 Proteins analysiert.

IQGAP1 ist ein wichtiges Gerüstprotein bei der Signalweiterleitung *downstream* aktivierter Rezeptor-Tyrosinkinase (Brown *et al.* 2006). Der Einfluss von IQGAP1 auf den MAPK-Signalweg B-Raf-MEK1/2-ERK1/2 wurde dabei am intensivsten untersucht. Hierfür konnte gezeigt werden, dass IQGAP1 mit allen Komponenten direkt interagiert und für eine effiziente Signalweiterleitung benötigt wird (Roy *et al.* 2004, Roy *et al.* 2005, Ren *et al.* 2007). Im Zusammenhang mit der Aktivität von IQGAP1 bei Signaltransduktionsprozessen konnte zudem eine erhöhte Tyrosinphosphorylierung des IQGAP1 Proteins nachgewiesen werden (Yamaoka-Tojo *et al.* 2004, Meyer *et al.* 2008, Usatyuk *et al.* 2009).

Auch in HeLa-Zellen bewirkt eine EGF-Stimulierung, welche u.a. zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der Aktivierung des MAPK-Signalweges führt, eine zeitabhängige Tyrosinphosphorylierung von IQGAP1 (Abb. 4.21A).

Daher konnte in diesem Zellsystem analysiert werden, ob die Überexpression von S100P die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung von IQGAP1 beeinflusst. Dazu wurden die Zellen transient mit pEGFP-S100Pwt bzw. -S100P Δ 21-25 oder pYFP-S100A10 transfiziert und die gleich starke Expression der Fusionsproteine am Fluoreszenzmikroskop überprüft (nicht gezeigt). Es zeigten sich dabei in der Regel Transfektionsraten von ca. 80 %.

Die Expression von GFP-S100Pwt führte zu einer signifikanten Reduktion der IQGAP1-Tyrosinphosphorylierung im Vergleich zu jenen Zellen, welche die IQGAP1-bindungsdefiziente GFP-S100P Δ 21-25 Mutante exprimierten (Abb. 4.21B und C). Bei diesen Zellen entsprach die IQGAP1-Tyrosinphosphorylierung ungefähr der in den Zellen, welche das ebenfalls nicht mit IQGAP1 interagierende YFP-S100A10 Protein exprimierten.

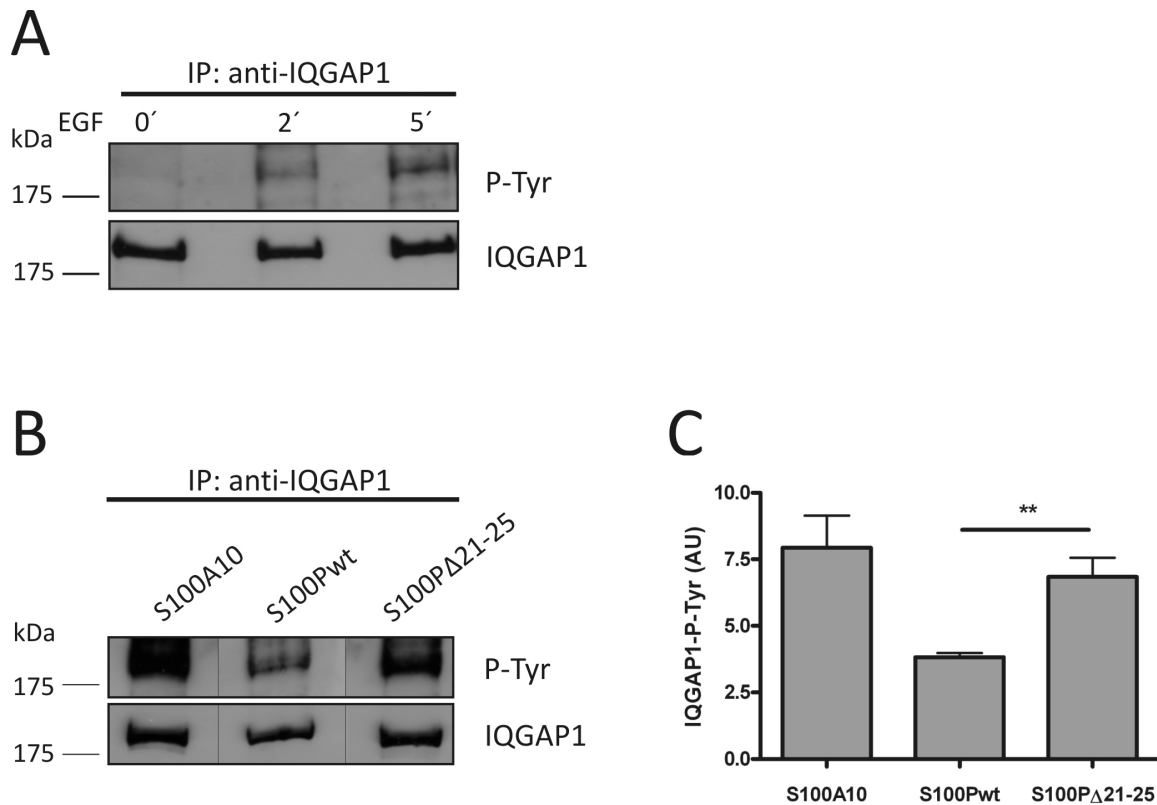


Abb. 4.21: S100P interferiert mit EGF-induzierter IQGAP1-Tyrosinphosphorylierung

(A) Serumdepletierte HeLa-Zellen wurden im nicht stimulierten Zustand belassen oder für 2 bzw. 5 min mit 50 ng/ml EGF stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und die geklärten Lysate wurden für eine Immunpräzipitation mit einem polyklonalen α -IQGAP1-Antikörper (H-108, St. Cruz) eingesetzt. Die zeitabhängige Tyrosinphosphorylierung des präzipitierten IQGAP1 Proteins wurde mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung eines monoklonalen α -Phospho-Tyrosin-Antikörpers nachgewiesen. Durch Strippen und erneute Entwicklung des Western Blots mit einem monoklonalen α -IQGAP1-Antikörper wurde verifiziert, dass gleiche Mengen an immunpräzipitiertem IQGAP1 auf das SDS-Gel geladen worden waren. (B) GFP-S100Pwt-, GFP-S100P Δ 21-25- und YFP-S100A10-exprimierende HeLa-Zellen wurden serumdepletiert und für 5 min mit 50 ng/ml EGF stimuliert. Die Tyrosinphosphorylierung des IQGAP1 Proteins wurde wie in Abschnitt A beschrieben analysiert. (C) Statistische Auswertung der beispielhaft in Abschnitt B gezeigten EGF-induzierten Tyrosinphosphorylierung von IQGAP1 in Abhängigkeit der Expression verschiedener S100 Derivate. Die ECL-Signalintensitäten von präzipitiertem, tyrosinphosphoryliertem IQGAP1 wurden densitometrisch vermessen (ImageJ Software). Unter Berücksichtigung der Gesamtmenge an IQGAP1 in den jeweiligen Proben wurde die statistische Signifikanz mittels Zweistichproben t-Test ermittelt (GraphPad Prism Version 4.00). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SE von 5 unabhängigen Experimenten ($P^{***}<0,01$).

Die reduzierte IQGAP1-Tyrosinphosphorylierung in S100Pwt überexprimierenden Zellen indiziert einen Einfluss der S100P/IQGAP1-Interaktion auf die Aktivität von IQGAP1 bei der Signalweiterleitung innerhalb EGF-stimulierter Signalkaskaden. Da, wie zuvor erwähnt, ein direkter Einfluss der IQGAP1-Interaktion mit B-Raf, MEK1/2 und ERK1/2 auf deren Aktivität nachgewiesen worden war, wurde diese MAPK-Kaskade genauer analysiert.

Eine EGF-Stimulierung führt zur Assemblierung eines Signalkomplexes am EGF-Rezeptor, was u.a. in der Phosphorylierung und damit der Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase B-Raf resultiert (Vojtek *et al.* 1993). Eine direkte Untersuchung des Einflusses der S100P/IQGAP1-Interaktion auf die B-Raf-Aktivität durch Analyse dessen Phosphorylierungszustandes scheiterte an mangelnder Sensitivität des zur Verfügung stehenden α -Phospho-B-Raf-Antikörpers (nicht gezeigt). Daher wurde ein anderer

Ansatz gewählt. Dieser beruht auf der Beobachtung, dass sich an IQGAP1 gebundenes B-Raf in seinem aktiven Zustand befindet (Ren *et al.* 2007). Daher wurde in Co-Immunpräzipitationsexperimenten die Assoziation von B-Raf mit IQGAP1 nach EGF-Stimulierung in Abhängigkeit von der Expression der drei verschiedenen S100 Proteine analysiert.

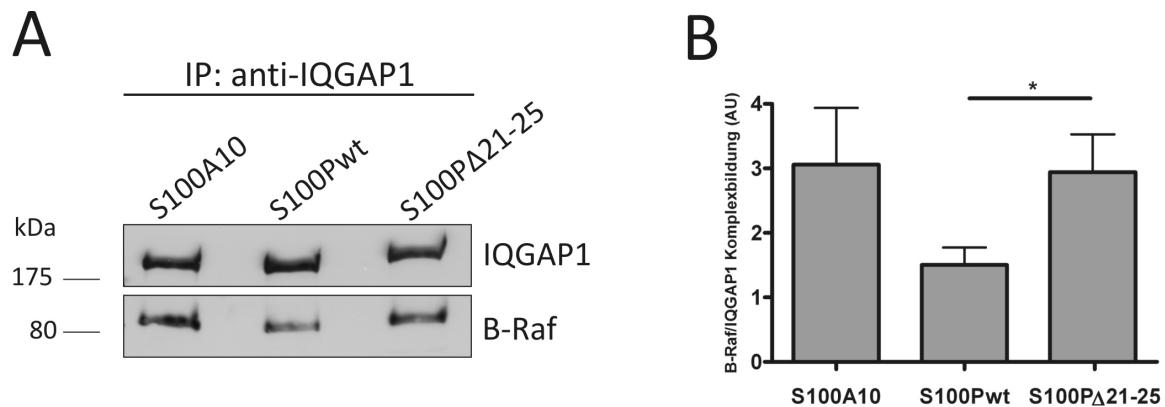


Abb. 4.22: S100P interferiert mit EGF-induzierter IQGAP1/B-Raf-Komplexbildung

(A) Serumdepletierte HeLa-Zellen, die entweder GFP-S100Pwt, GFP-S100P Δ 21-25 oder YFP-S100A10 exprimierten, wurden für 5 min mit 50 ng/ml EGF stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und die geklärten Lysate wurden für eine Immunpräzipitation mit einem polyklonalen α -IQGAP1-Antikörper (H-108, St. Cruz) eingesetzt. Präzipitiertes IQGAP1 und co-präzipitiertes B-Raf wurden mittels Western Blot unter Verwendung eines monoklonalen α -IQGAP1- und eines monoklonalen α -B-Raf-Antikörpers nachgewiesen. (B) Statistische Auswertung der beispielhaft in Abschnitt A gezeigten EGF-induzierten IQGAP1/B-Raf-Komplexbildung in Abhängigkeit der Expression verschiedener S100 Derivate. Die ECL-Signalintensitäten von co-präzipitiertem B-Raf wurden densitometrisch vermessen (ImageJ Software). Unter Berücksichtigung der Gesamtmenge an präzipitiertem IQGAP1 in den entsprechenden Proben wurde die statistische Signifikanz mittels Zweistichproben t-Test ermittelt (GraphPad Prism Version 4.00). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SE von 7 unabhängigen Experimenten ($P^* < 0,05$).

Abb. 4.22 zeigt, dass die S100P/IQGAP1-Komplexbildung, die in den S100P-, aber nicht in den S100P Δ 21-25- oder S100A10-überexprimierenden Zellen auftritt, die Interaktion von B-Raf mit IQGAP1 signifikant einschränkt. Hieraus kann geschlossen werden, dass sich weniger B-Raf in seinem aktiven Zustand befindet. Auch bei diesem Effekt handelt es sich um eine spezifische Folge der S100P/IQGAP1-Interaktion, da die Reduktion der IQGAP1/B-Raf-Komplexbildung in den Zellen, welche die S100P Δ 21-25 Mutante exprimieren, nicht vorliegt. Bei diesen Zellen ist die Menge an co-präzipitiertem B-Raf vergleichbar mit jener in den S100A10 exprimierenden Zellen. Das Ergebnis korreliert folglich mit der zuvor beobachteten reduzierten Tyrosinphosphorylierung des IQGAP1 Proteins in S100Pwt-überexprimierenden Zellen.

Als nächstes wurde ermittelt, ob sich die S100P/IQGAP1-Interaktion auf die Aktivität der *downstream* von B-Raf gelegenen Komponenten innerhalb dieser MAPK-Kaskade auswirkt. Hierbei handelt es sich um die Proteinkinasen MEK1 und MEK2, welche durch aktives B-Raf an zwei Serinresten phosphory-

liert und dadurch ebenfalls aktiviert werden. Für diese Analyse wurden erneut HeLa-Zellen, welche die drei verschiedenen GFP- bzw. YFP-fusionierten S100 Derivate exprimierten, herangezogen. Durch EGF-Stimulierung wurde die MAPK-Kaskade ausgelöst und gleichzeitig das intrazelluläre Ca^{2+} -Level erhöht, wodurch die S100P/IQGAP1-Interaktion gefördert wird. Der Grad der MEK1/2-Aktivierung in diesen Zellen wurde durch Detektion der phosphorylierten Serinreste 217/221 im MEK1/2 mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse der jeweiligen Totallysate ermittelt.

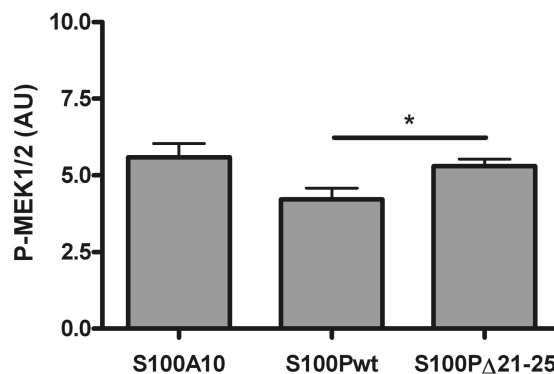


Abb. 4.23: S100P reduziert die EGF-induzierte MEK1/2-Aktivität

Serumdepletierte HeLa-Zellen, die entweder GFP-S100Pwt, GFP-S100P Δ 21-25 oder YFP-S100A10 exprimierten, wurden für 5 min mit 50 ng/ml EGF stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und die Totallysate einer SDS-PAGE und Western Blot-Analyse unterzogen. Zunächst erfolgte die Detektion von aktiviertem MEK1/2 mit einem monoklonalen α -Phospho-MEK1/2-Antikörper und nach Strippen des Blots die Detektion von aktiviertem und nicht aktiviertem MEK1/2 mit einem monoklonalen α -MEK1/2-Antikörper. Die Analyse der MEK1/2-Aktivierung in den verschiedenen Proben erfolgte durch densitometrische Vermessung der ECL-Signale des phosphorylierten MEK1/2, unter Berücksichtigung der in der jeweiligen Probe vorhandenen Gesamtmenge an MEK1/2. Die statistische Signifikanz wurde mittels Zweistichproben t-Test ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SE von 6 unabhängigen Experimenten ($P^* < 0,05$).

Die Analyse sechs unabhängiger Experimente ergab, dass in S100P-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu solchen, die S100P Δ 21-25 oder S100A10 überexprimieren, eine signifikante Reduktion der EGF-induzierten MEK1/2-Aktivierung vorliegt (Abb. 4.23). Dieser Effekt der S100P-IQGAP1-Interaktion ist allerdings im Vergleich zu den Effekten auf die IQGAP1-Tyrosinphosphorylierung und die IQGAP1/B-Raf-Assoziation etwas schwächer ausgeprägt.

4.4 Analyse der potenziell direkten IQGAP1/Ezrin-Interaktion

Die beiden S100P-Zielproteine IQGAP1 und Ezrin sind schon mehrfach gemeinsam als Komponenten größerer Proteinkomplexe detektiert worden. So wurden beide Proteine in einem Affinitätschromatographischen Ansatz durch immobilisiertes S100P aus Plazentalysat isoliert (siehe Abb. 4.1). Auch mittels einer Affinitätschromatographie mit der immobilisierten C-terminalen Domäne des Ezrin Proteins (GST-C-ERMAD) konnte aus plazentalen Mikrovilli ein Proteinkomplex isoliert werden, in dem IQGAP1 zusammen mit Ezrin, Aktin, α -Actinin, Gelsolin und CLIC5 zu finden war (Berryman *et al.* 2000). Zudem konnten beide Proteine als mit Mikrovilli-Membranen humaner Syncytiotrophoblastenzellen assoziierte Proteine identifiziert werden (Paradela *et al.* 2005). Sowohl bei IQGAP1 als auch bei Ezrin handelt es sich um wichtige Regulatoren im Zellkortex, die u.a. Vorgänge wie Zellmigration und Zellform beeinflussen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch untersucht, ob eine direkte Interaktion zwischen IQGAP1 und Ezrin existiert.

4.4.1 Analyse der IQGAP1/Ezrin-Komplexbildung in Zellen

Zunächst wurde die intrazelluläre Lokalisation von Ezrin und IQGAP1 in verschiedenen Zelllinien mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert.

Dazu wurden BxPC3-Zellen für 16 h serumdepletiert und daraufhin für 30 min mit FCS-haltigem Medium stimuliert.

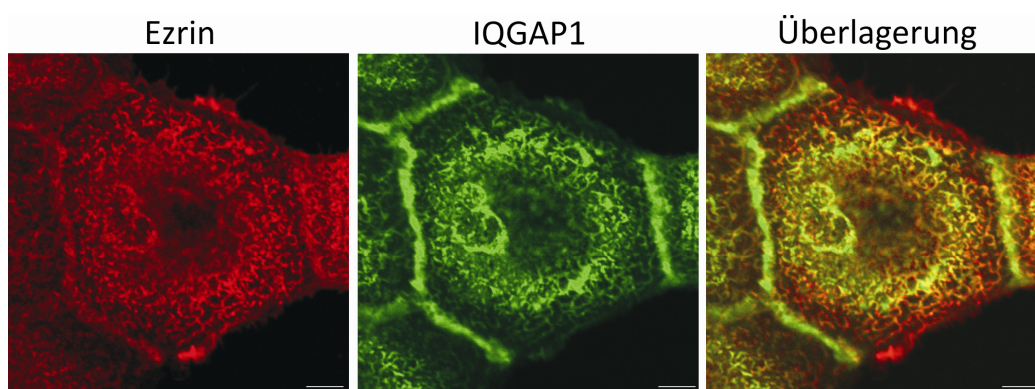


Abb. 4.24: Intrazelluläre Lokalisation von IQGAP1 und Ezrin in BxPC3-Zellen

BxPC3-Zellen wurden nach 16-stündiger Serumdepletion für 30 min mit FCS-haltigem Kulturmedium stimuliert, PFA-fixiert und permeabilisiert. Es folgte die Inkubation der Zellen mit einem polyklonalen α -IQGAP1-Antikörper (K. Kaibuchi) sowie einem monoklonalen α -Ezrin-Antikörper, gefolgt von den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundäntikörpern. Die Detektion der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proteine erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie. Größenbalken entsprechen 5 μ m.

Die in Abb. 4.24 gezeigten immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Ezrin und IQGAP1 in FCS-stimulierten BxPC3-Zellen lassen eine deutliche Co-Lokalisation der beiden Proteine in Mikrovilli-Strukturen erkennen. IQGAP1 zeigt zudem eine typische Anreicherung an Zell-Zell-Kontakten, wo es vermutlich im Komplex mit Zelladhäsionsproteinen wie E-Cadherin und β -Catenin vorliegt (Noritake *et al.* 2004, Kuroda *et al.* 1998).

Die Lokalisation von Ezrin und IQGAP1 wurde auch in HeLa-Zellen untersucht. Diese wurden hierzu für 16 h serumdepletiert und anschließend entweder für 5 min mit EGF stimuliert oder unstimuliert belassen.

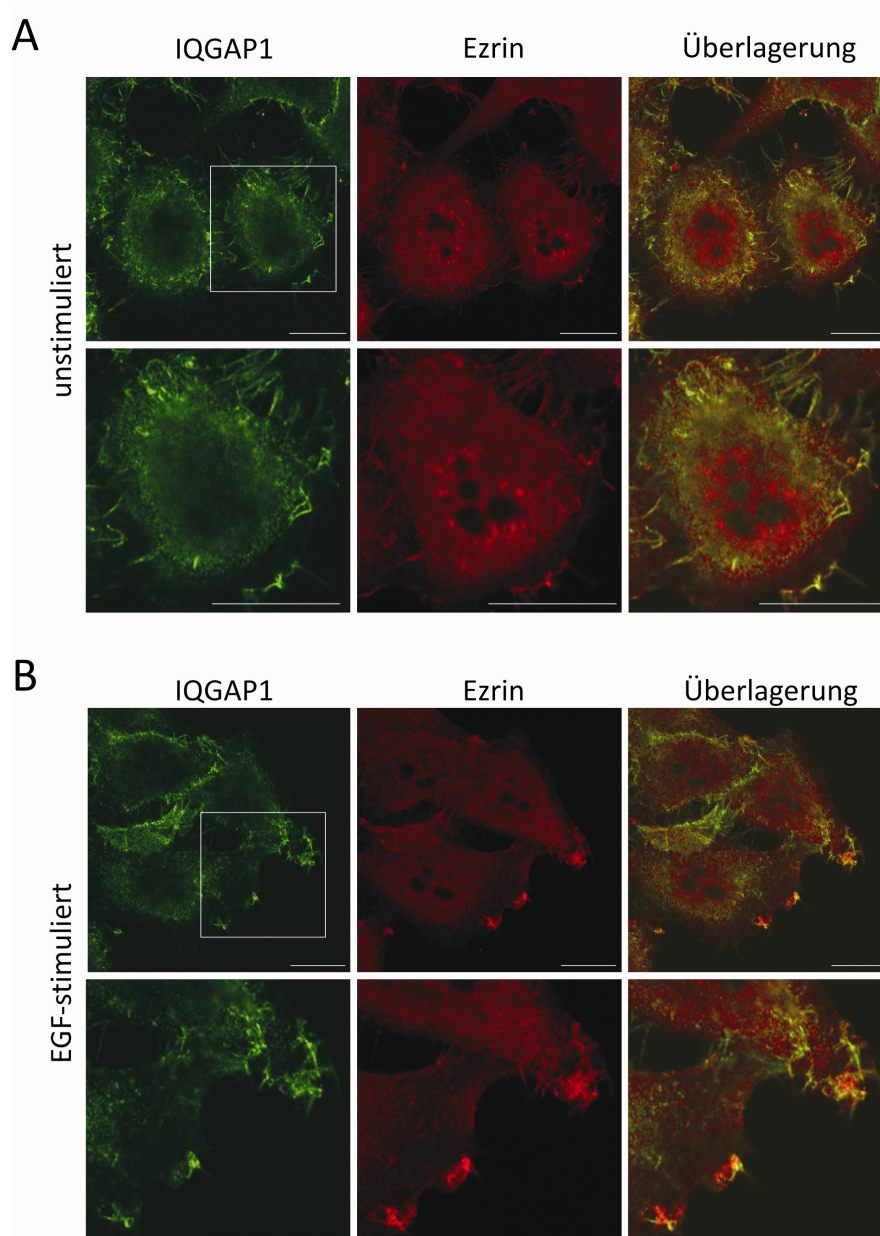


Abb. 4.25: Intrazelluläre Lokalisation von IQGAP1 und Ezrin in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden nach 16-stündiger Serumdepletion entweder im unstimulierten Zustand belassen (A) oder für 5 min mit 50 ng/ml EGF stimuliert (B). Nach PFA-Fixierung und Permeabilisierung erfolgte die Inkubation der Zellen mit einem polyklonalen α -IQGAP1-Antikörper (K. Kaibuchi) sowie einem monoklonalen α -Ezrin-Antikörper, gefolgt von den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpern. Die Analyse erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops. Die unteren Abschnitte stellen jeweils Vergrößerungen der oberen Bilder dar. Größenbalken entsprechen 10 μ m.

In serumdepletierten, unstimulierten HeLa-Zellen ist IQGAP1 im Zytoplasma mit Anreicherung in einigen Zellfortsätzen, bei denen es sich um *microspikes* handeln könnte, lokalisiert (Abb. 4.25A). Im Vergleich dazu ist Ezrin diffuser und mit Ausnahme der Nucleoli in der gesamten Zelle verteilt, wie auch schon anderweitig beschrieben wurde (Batchelor *et al.* 2004). Eine gewisse Co-Lokalisation beider Proteine in den kurzen Zellfortsätzen ist zu beobachten. Noch eindeutiger ist die Co-Lokalisation beider Proteine aber nach einer 5-minütigen EGF-Stimulierung. Hierdurch kommt es zu einer Translokation beider Proteine in *membrane ruffles* (Abb. 4.25B).

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass IQGAP1 und Ezrin sowohl in stimulierten BxPC3 als auch in stimulierten HeLa-Zellen eindeutig in Mikrovilli bzw. *membrane ruffles* co-lokalisieren.

Während die mikroskopischen Analysen nur Rückschlüsse über eine räumliche Nähe erlauben, wurde eine mögliche Komplexbildung von IQGAP1 und Ezrin auch mittels Immunpräzipitationsexperimenten untersucht. Um zu analysieren, inwiefern die beobachtete IQGAP1/Ezrin-Komplexbildung über S100P vermittelt wird, wurden Experimente zum einen mit nicht transfizierten und zum anderen mit S100P-überexprimierenden HeLa-Zellen durchgeführt. Da sowohl für die S100P/Ezrin- als auch für die S100P/IQGAP1-Interaktion der GFP-tag als nicht hinderlich identifiziert wurde (Koltzsch *et al.* 2003, vorliegende Arbeit), konnte mit dem GFP-S100P Fusionsprotein gearbeitet werden. Die Präzipitation der Proteinkomplexe erfolgte mittels eines polyklonalen α -IQGAP1-Antikörpers und in Gegenwart von CaCl_2 .

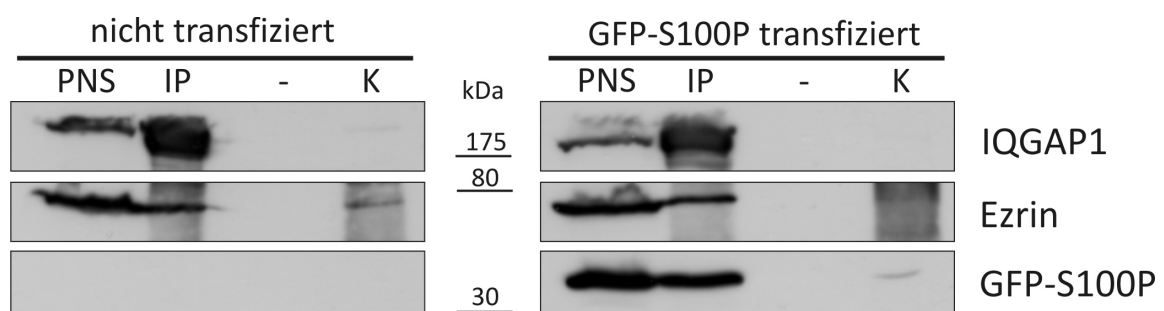


Abb. 4.26: Co-Immunpräzipitation von Ezrin mit IQGAP1 ist unabhängig von S100P

HeLa Zellen wurden entweder mit dem Konstrukt pEGFP-S100Pwt transient transfiziert oder nicht transfiziert belassen und nach 24 h lysiert. Gleiche Mengen an proteinhaltigem Überstand (PNS) wurden für die Immunpräzipitation mittels Protein A-Sepharose und des polyklonalen α -IQGAP1-Antikörpers H-108 (IP) bzw. unspezifischer polyklonaler α -Maus IgGs (K) eingesetzt. Die Zellyse sowie die Immunpräzipitation erfolgten dabei in Gegenwart von 0,5 mM CaCl_2 . Der PNS und die präzipitierten Proteine wurden mittels 12 %iger SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Detektion der Proteine erfolgte dabei mit einem monoklonalen α -IQGAP1-Antikörper, einem polyklonalen α -Ezrin-Antikörper sowie einem monoklonalen α -GFP-Antikörper.

Die Western Blot-Analyse (Abb. 4.26) zeigt, dass IQGAP1, Ezrin und das ektopisch exprimierte GFP-S100P Fusionsprotein nach Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile als lösliche Proteine im PNS vorliegen. In beiden experimentellen Ansätzen kann IQGAP1 zudem spezifisch aus dem PNS präzipitiert werden, da keine Präzipitation von IQGAP1 in den Kontrollansätzen mit unspezifischen α -Maus IgGs vorliegt. Aufgrund der Durchführung der Experimente in Gegenwart von CaCl_2 ist die erwartete Co-Immünpräzipitation von GFP-S100P mit IQGAP1 zu beobachten. Ezrin wird sowohl aus dem Lysat der transfizierten Zellen als auch aus dem Lysat der nicht transfizierten Zellen zusammen mit IQGAP1 präzipitiert. In den beiden Kontrollansätzen (K) können sowohl Ezrin als auch GFP-S100P detektiert werden, wobei es sich in beiden Fällen im Vergleich zu den IP-Ansätzen um vernachlässigbar geringe Proteinmengen handelt. Sie sind vermutlich auf schwache, unspezifische Wechselwirkungen der Proteine mit der Protein A-Sepharose zurückzuführen, möglicherweise aufgrund einer im Vergleich zum Standardprotokoll niedrigeren Salzkonzentration im hier verwendeten Lysispuffer. Nichtsdestotrotz zeigt dieses Experiment, dass die Menge an Ezrin, die mit IQGAP1 co-präzipitiert, durch S100P-Überexpression nicht signifikant beeinflusst wird. Eine Erhöhung der Menge an co-präzipitiertem Ezrin in den S100P-überexprimierenden Zellen und in Gegenwart von Ca^{2+} hätte als Hinweis auf eine S100P-vermittelte IQGAP1/Ezrin-Komplexbildung gedeutet werden können.

Um die Möglichkeit einer durch endogenes S100P vermittelten indirekten Ezrin/IQGAP1-Interaktion völlig auszuschließen, wurden Immünpräzipitationen mit nicht transfizierten HeLa-Zellen in Gegenwart von CaCl_2 bzw. EGTA durchgeführt und verglichen.

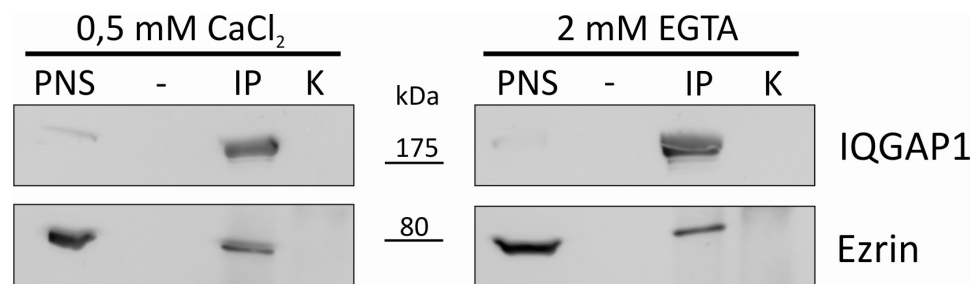


Abb. 4.27: Die Co-Immünpräzipitation von Ezrin mit IQGAP1 ist Ca^{2+} -unabhängig

HeLa-Zellen wurden lysiert und gleiche Mengen an proteinhaltigem Überstand (PNS) wurden für Immünpräzipitationen mittels Protein A-Sepharose und eines polyklonalen α -IQGAP1-Antikörpers (IP) bzw. unspezifischer polyklonaler α -Maus IgGs (K) eingesetzt. Die Zellyse sowie die Immünpräzipitationen erfolgten dabei entweder in Ca^{2+} - oder EGTA-haltigen Puffern. PNS-Proben und die präzipitierten Proteine wurden durch eine 12 %ige SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Detektion der Proteine erfolgte dabei mit einem monoklonalen α -IQGAP1-Antikörper und einem polyklonalen α -Ezrin-Antikörper.

Die Western Blot-Analyse der Immünpräzipitationen (Abb. 4.27) zeigt deutlich, dass Ezrin sowohl in Gegenwart von CaCl_2 als auch von EGTA zusammen mit IQGAP1 präzipitiert wird. Auch sind in etwa gleiche Mengen an co-präzipitiertem Ezrin zu detektieren. Eine S100P-vermittelte Interaktion

zwischen Ezrin und IQGAP1 kann somit ausgeschlossen werden, da es sich sowohl bei der S100P/Ezrin- als auch der S100P/IQGAP1-Interaktion um strikt Ca^{2+} -abhängige Bindungen handelt. Trotz allem kann dieses Ergebnis allenfalls als Hinweis auf eine direkte Interaktion von Ezrin und IQGAP1 betrachtet werden, da die beobachtete Co-Immünpräzipitation auch über andere zelluläre Proteine vermittelt werden kann.

Ein Nachweis einer direkten Proteininteraktion kann nur durch Bindungsstudien mit den isolierten Proteinen erbracht werden. Diese wurden nachfolgend nach rekombinanter Expression und Reinigung der jeweiligen Proteine durchgeführt.

4.4.2 Expression rekombinanter Ezrin Derivate in *E. coli*

Aufgrund der geschlossenen Konformation, in welcher nicht aktiviertes Ezrin vorliegt und in welcher diverse Bindungsstellen innerhalb der N-ERMAD und der C-ERMAD maskiert sind (Gary *et al.* 1995), wurden neben den *in-vitro*-Bindungsstudien mit dem *full length* Ezrin zusätzliche Untersuchungen mit den beiden isolierten Domänen durchgeführt. Außerdem wurden auch Experimente mit der phosphomimetischen Mutante EzrinT567D vorgenommen. Zwar verringert die Phosphorylierung des Threoninrestes 567 die Affinität zwischen der C-ERMAD und der N-ERMAD (Matsui *et al.* 1998), allerdings wurde für die T567D Mutante gezeigt, dass sie nicht der vollkommen aktivierten Form des Ezrin Proteins entspricht (Chambers *et al.* 2005).

Die für die *in-vitro*-Bindungsstudien benötigten Ezrin Derivate (siehe Abb. 4.28) wurden als $(\text{His})_6$ - bzw. GST-Fusionsproteine rekombinant in *E. coli* BL21(DE3)pLysS Kulturen exprimiert und über die Bindung an eine Ni-NTA-Agarose bzw. Glutathionsepharose Matrix gereinigt.

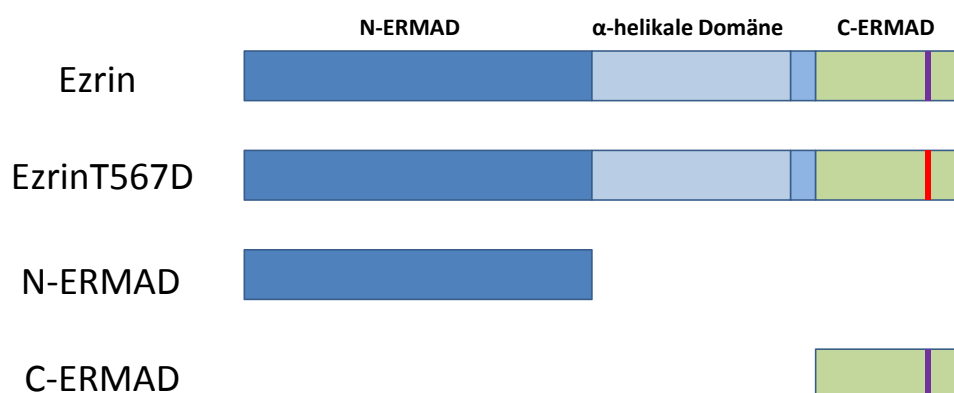
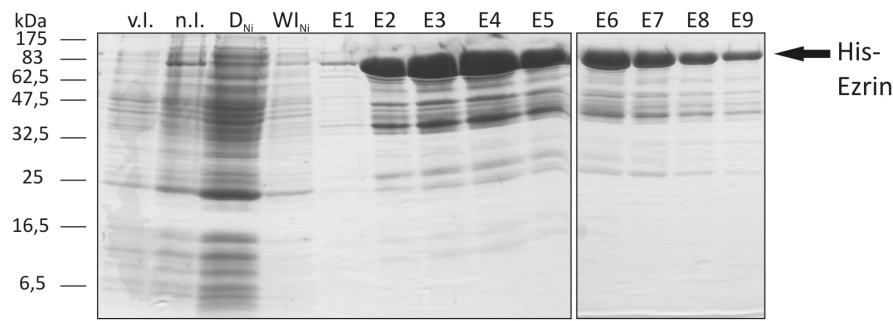


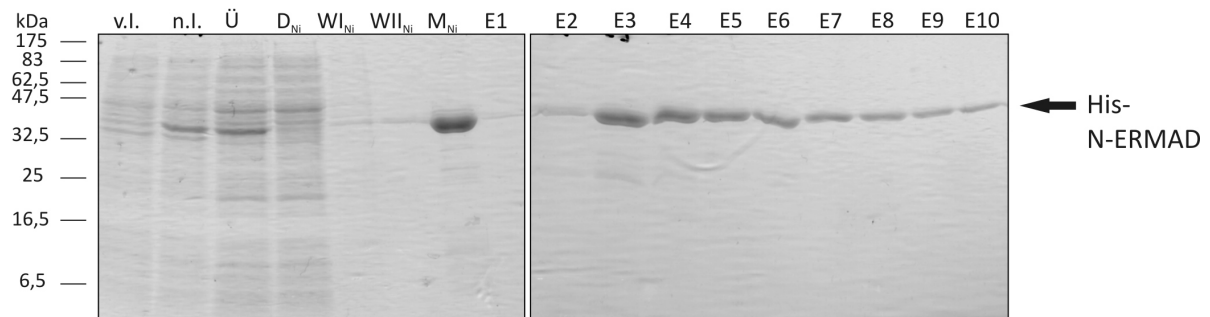
Abb. 4.28: Schematische Darstellung der rekombinant exprimierten Ezrin Derivate

Die gezeigten Ezrin Derivate wurden als $(\text{His})_6$ -Fusionsproteine, N-ERMAD auch als GST-Fusionsprotein, exprimiert. Das nicht aktivierte Ezrin liegt in einer „ruhenden“ Konformation vor, in der die N- und die C-ERMAD miteinander interagieren, so dass die Bindungsstellen für verschiedene Membranproteine in der N-ERMAD bzw. für F-Aktin in der C-ERMAD maskiert sind. Der mutierte Threoninrest bei der phosphomimetischen Mutante EzrinT567D ist durch die rote Linie dargestellt.

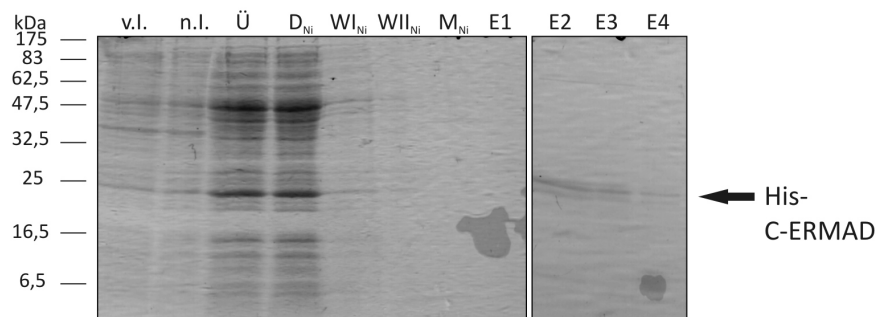
A



B



C



D

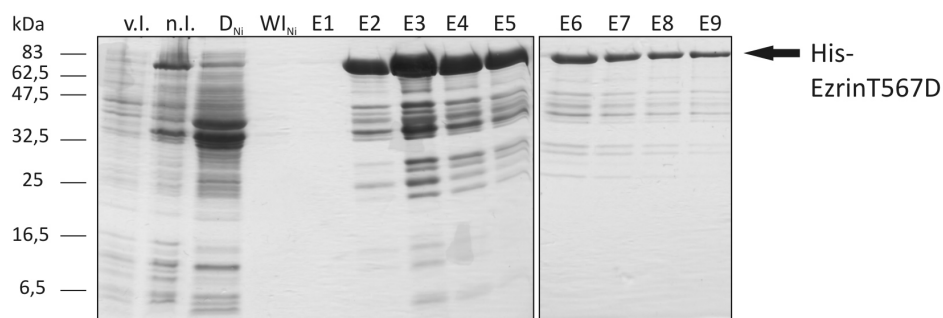


Abb. 4.29: Expression und Reinigung (His)₆-fusionierter Ezrin-Derivate

In den transformierten *E. coli* Zellen (v.l.) wurde die rekombinante Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert (n.l.). Nach Zellaufschluss wurden unlösliche Zellbestandteile (P) durch Ultrazentrifugation von den löslichen Proteinen (Ü) getrennt. Diese wurden an Ni-NTA Agarose gebunden, wodurch einige Verunreinigungen entfernt werden konnten (D_{Ni}). Nach mehrmaligem Waschen mit steigender Imidazolkonzentration (Wl_{Ni}/WII_{Ni}) erfolgte die Elution der über den (His)₆-tag an die Ni-NTA-Agarose (M_{Ni}) immobilisierten Ezrin Derivate durch einen hochkonzentrierten Imidazolpuffer (E1-E9). Proben der gesammelten Fraktionen wurden in einer 15 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und die darin befindlichen Proteine mittels Coomassie Brilliant Blau gefärbt.

Die Expression und Reinigung von GST-N-ERMAD wurde bereits in Abb. 4.15A gezeigt und beschrieben.

Die in Abb. 4.29 dargestellte SDS-PAGE-Analyse der einzelnen Schritte der Expression verschiedener (His)₆-fusionierter Ezrin Derivate zeigt, dass in allen Fällen die Expression der Proteine durch IPTG-Zugabe induziert wird und sie als lösliche Proteine im Überstand vorliegen. Zudem lassen sich alle Proteine von der Ni-NTA-Agarose Matrix eluieren. Die Expression von His-C-ERMAD ist allerdings recht schwach, so dass hierbei aus einer 200 ml Kultur nur ca. 0,2 mg an isoliertem Protein gewonnen werden können im Vergleich zu ca. 10-15 mg im Falle der anderen Ezrin Derivate. Für His-Ezrin und His-Ezrin-T567D zeigen sich allerdings in den Elutionsfraktionen viele niedermolekulare Proteinbanden, die vermutlich aufgrund von Proteindegradation entstanden sind.

4.4.3 *In-vitro*-Bindungsstudien mit isolierten IQGAP1 und Ezrin Derivaten

Zur Aufklärung, ob es sich bei der beobachteten IQGAP1/Ezrin-Komplexbildung um eine direkte Proteininteraktion handelt, wurden *in-vitro*-Bindungsstudien mit den isolierten Proteinen durchgeführt.

Zunächst wurde die Bindung der in *E. coli* exprimierten Ezrin Derivate an das in Insektenzellen exprimierte GST-IQGAP1 analysiert. Für diese Untersuchungen wurde Glutathionsepharose Matrix mit immobilisiertem GST-IQGAP1 bzw. in einem Kontrollansatz Matrix mit immobilisiertem GST *alone* eingesetzt und die Ezrin Derivate in der Flüssigphase zugegeben. Eine Bindung der Ezrin Derivate an das immobilisierte IQGAP1 wurde durch Elution der gesamten Proteinkomplexe von der Glutathionsepharose Matrix mittels eines GSH-haltigen Puffers und anschließender SDS-PAGE und Western Blot-Analyse nachgewiesen.

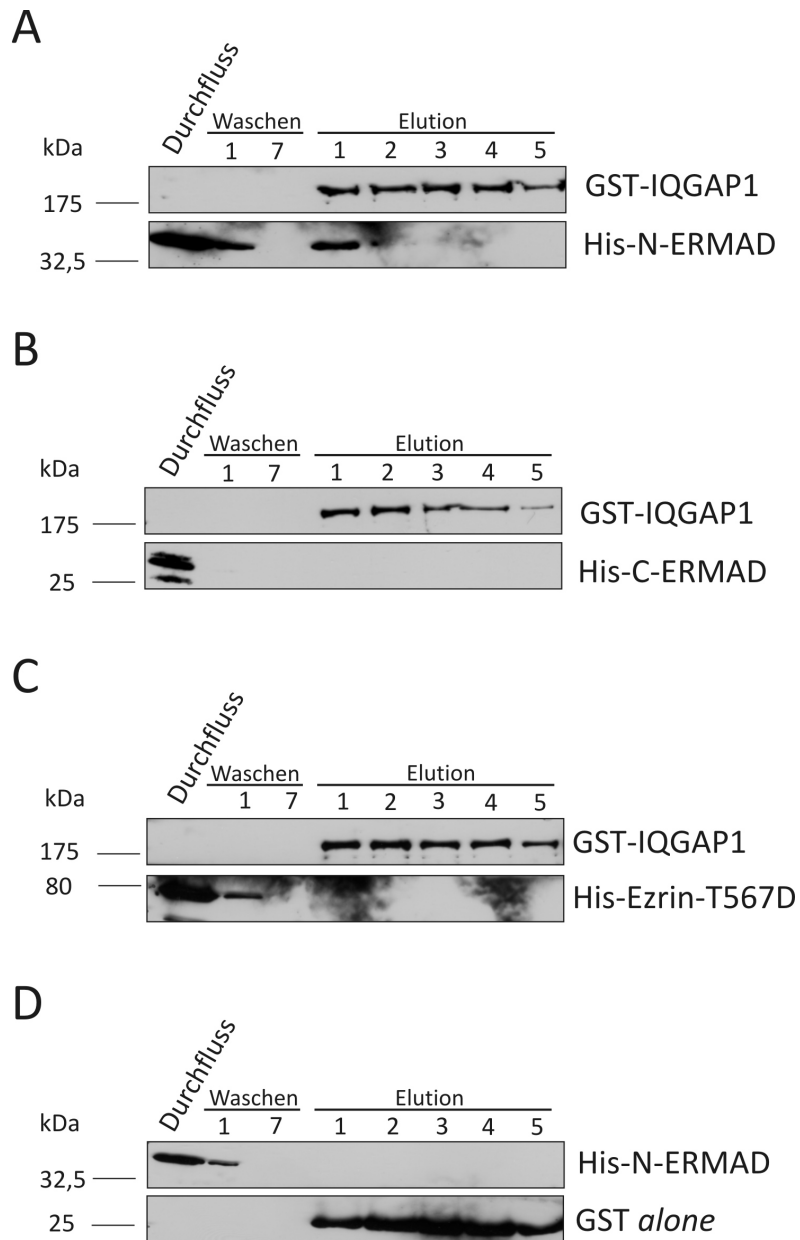


Abb. 4.30: Ezrins N-ERMAD bindet Ca^{2+} -unabhängig an IQGAP1

Die $(\text{His})_6$ -fusionierten Ezrin Derivate N-ERMAD (A), C-ERMAD (B) oder Ezrin-T567D (C) wurden auf Affinitätsäulen mit immobilisiertem GST-IQGAP1 bzw. – wie für N-ERMAD beispielhaft gezeigt – zur Kontrolle auf GST *alone* (D) gegeben. Die Bindung der Proteine und die Waschschritte wurden in Gegenwart von EGTA durchgeführt und die Elution der Proteinkomplexe von der Glutathionsepharose erfolgte durch einen GSH-haltigen Puffer. Proben aller gesammelten Fraktionen wurden einer 12 %igen SDS-PAGE unterzogen und mittels Western Blot-Analyse untersucht. Monoklonale α - $(\text{His})_6$ -Antikörper, α -IQGAP1-Antikörper sowie α -GST-Antikörper dienten zur Detektion der Proteine.

Die in Abb. 4.30 gezeigte Western Blot-Analyse der *in-vitro*-Bindungsstudien lässt erkennen, dass His-N-ERMAD zusammen mit GST-IQGAP1 von der Glutathionsepharose Matrix eluiert wird. His-C-ERMAD und His-EzrinT567D sind hingegen nur in den Durchfluss- und Waschfraktionen zu detektieren. Die beobachtete Interaktion von N-ERMAD und IQGAP1 scheint zudem spezifisch zu sein, da keine Interaktion zwischen N-ERMAD und dem GST *alone* erkennbar ist.

Die in Abb. 4.30 gezeigten Bindungsstudien wurden mittels eines alternativen experimentellen Aufbaus wiederholt. Hierbei wurden die $(\text{His})_6$ -fusionierten Ezrin Derivate an Ni-NTA-Agarose bzw. das GST-N-ERMAD an Glutathionsepharose immobilisiert und *in-vitro*-translatiertes [^{35}S]Methionin markiertes *full length* IQGAP1 Protein in der Flüssigphase dazugegeben. Der Nachweis von gebundenem IQGAP1 erfolgte durch Elution der Proteinkomplexe von der Matrix, Trennung der Proteine in einer SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie.

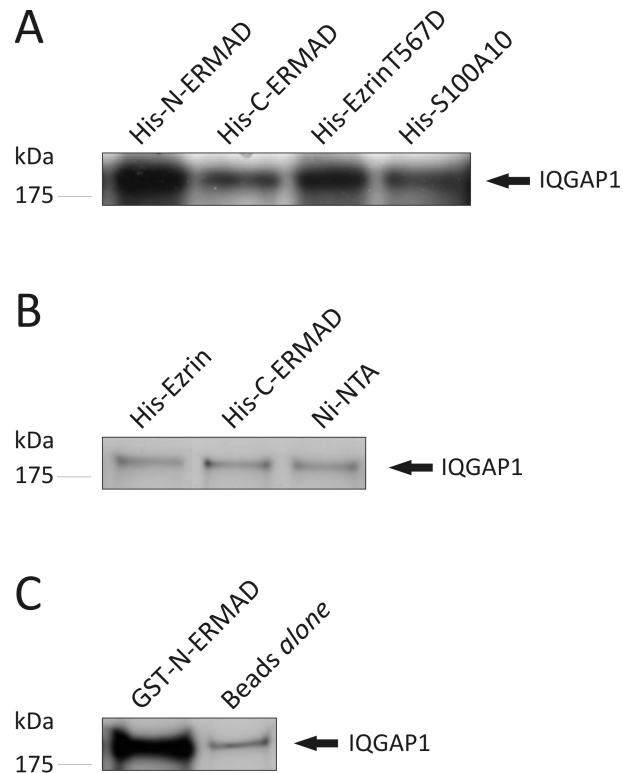


Abb. 4.31: IQGAP1/Ezrin-Interaktionsstudien mit immobilisierten Ezrin-Derivaten

In-vitro-Bindungsstudien mit immobilisierten $(\text{His})_6$ -fusionierten Ezrin Derivaten (A) und (B) bzw. immobilisiertem GST-fusioniertem N-ERMAD (C) und [^{35}S]Methionin markiertem *full length* IQGAP1 Protein in der Flüssigphase. Die Bindung der Proteine fand in Gegenwart von EGTA statt. Nach dem Waschen mit EGTA-haltigem Puffer erfolgte die Elution der Proteinkomplexe von der Ni-NTA-Agarose bzw. der Glutathionsepharose durch Aufkochen mit SDS-Probenpuffer. Die eluierten Proteine wurden mittels 10 %iger SDS-PAGE voneinander getrennt und das in den Proben vorhandene [^{35}S]Methionin markierte IQGAP1 mittels Autoradiographie nachgewiesen.

Die Analyse der mittels des veränderten experimentellen Aufbaus untersuchten IQGAP1/Ezrin-Interaktion lieferte widersprüchliche Ergebnisse. Die in Abb. 4.31A gezeigte Autoradiographie der Bindungsstudie mit immobilisierten $(\text{His})_6$ -fusionierten Ezrin Derivaten, in welcher His-S100A10 als Negativkontrolle diente, bestätigt nur zum Teil das Ergebnis der in Abb. 4.30 gezeigten Bindungsstudie. So sind auch hier eine Interaktion von N-ERMAD mit IQGAP1 und keine Interaktion von C-ERMAD mit IQGAP1 nachzuweisen. Allerdings scheint in diesem Fall auch eine Bindung von IQGAP1 an die EzrinT567D Mutante vorzuliegen, die zuvor nicht beobachtet werden konnte. Jedoch zeigt sich bei

diesem Experiment generell ein starker unspezifischer Hintergrund. Abb. 4.31B zeigt hingegen eindeutig, dass keine Interaktion zwischen *full length* Ezrin und IQGAP1 stattfindet.

Die in Abb. 4.31C gezeigte Autoradiographie der Bindungsstudie mit immobilisiertem GST-N-ERMAD lässt erneut eine eindeutige Bindung von IQGAP1 an die N-terminale Domäne des Ezrin Proteins im Vergleich zu der Kontrolle erkennen, in welcher Glutathionsepharose Matrix ohne immobilisiertes Protein eingesetzt wurde.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch die *in-vitro*-Bindungsstudien eine Interaktion von IQGAP1 mit *full length* Ezrin, welches in der geschlossenen Konformation vorliegen sollte, sowie mit der C-ERMAD offensichtlich ausgeschlossen werden kann. Eine Ca^{2+} -unabhängige Interaktion von IQGAP1 mit der N-ERMAD innerhalb eines Bereichs, der in der geschlossenen Konformation des *full length* Ezrin Proteins unzugänglich ist, ist hingegen sehr wahrscheinlich. Innerhalb der EzrinT567D Mutante scheint die IQGAP1-Bindungsstelle nicht zugänglich zu sein, da sie sich vermutlich in einem nicht vollkommen aktiviertem Zustand befindet. Die zwischen EzrinT567D und IQGAP1 beobachtete Interaktion in einem der Experimente ist möglicherweise auf die starke Proteindegradation am C-Terminus (siehe Abb. 4.29) und eine dadurch erzeugte Freilegung der Bindungsstelle innerhalb der N-ERMAD zurückzuführen.

5 Diskussion

Zellen reagieren auf extrazelluläre Signale häufig mit der Erhöhung ihrer intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Dieses Sekundärsignal wird intrazellulär in eine spezifische Zellantwort umgewandelt. Den ersten Schritt dieser Umwandlung übernehmen in vielen Fällen EF-Hand Ca^{2+} -bindende Proteine wie die Mitglieder der S100 Familie. Durch die Ca^{2+} -induzierte Konformationsänderung sind sie in der Lage, Interaktionen mit spezifischen Zielproteinen einzugehen und so deren Beteiligung an zellulären Prozessen zu beeinflussen (Donato 1999). Die Identifizierung und Charakterisierung solcher spezifischen Interaktionen zwischen S100 Proteinen und ihren Bindungspartnern trägt zum Verständnis bei, wie ein einfaches Ca^{2+} -Signal zu unterschiedlichen zellulären Antworten führen kann.

Für das S100 Protein S100P konnte in einer Affinitätschromatographischen Untersuchung IQGAP1 als potenziell direkter und Ca^{2+} -abhängiger Interaktionspartner identifiziert werden. Es handelt sich dabei um ein Multidomänenprotein, das durch Interaktion mit diversen Proteinen an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt ist. So ist IQGAP1 u.a. ein wichtiger Regulator des kortikalen Zytoskeletts sowie mitogener Signaltransduktionskaskaden. Durch seine Fähigkeit mehrere Proteine gleichzeitig zu binden ist es in der Lage, verschiedene Signalwege miteinander zu verknüpfen (Brown *et al.* 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die S100P/IQGAP1-Interaktion eingehend untersucht. So wurden Analysen zur *in-vivo*-Komplexbildung durchgeführt und die Interaktion biochemisch durch *in-vitro*-Bindungsstudien und SPR-Messungen charakterisiert. Dabei konnten die für die Interaktion relevanten Bindungsmotive innerhalb beider Proteine identifiziert werden. Mit Hilfe einer S100P Mutante, die kein IQGAP1 mehr bindet, konnte anschließend die Relevanz dieser Proteininteraktion auf zellulärer Ebene analysiert werden.

Gemeinsam mit IQGAP1 war das Aktin-Zytoskelett/Membranprotein-verknüpfende Protein Ezrin als S100P Interaktionspartner identifiziert worden. Für diese Interaktion konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie direkt und Ca^{2+} -abhängig stattfindet und dass die Bindung von S100P an Ezrin zu einer Aktivierung des Ezrin Moleküls in Form der Freilegung von dessen F-Aktin-Bindungsstelle führt und somit einen Einfluss auf die Zellmigration hat (Koltzsch *et al.* 2003, Austermann *et al.* 2008). Da es sich sowohl bei IQGAP1 als auch bei Ezrin um S100P Zielproteine und wichtige Regulatoren des kortikalen Zytoskeletts handelt, wurde zudem die Existenz eines direkten IQGAP1/Ezrin-Komplexes untersucht. Hierbei wurde zum einen die *in-vivo*-Komplexbildung analysiert und zum anderen mittels *in-vitro*-Bindungsstudien überprüft, ob eine direkte Interaktion der beiden Proteine nachgewiesen werden kann.

5.1 Rekombinante bzw. zellfreie Proteinexpression

Zum Nachweis direkter Proteininteraktionen wurden *in-vitro*-Bindungsstudien mit isolierten Proteinen bzw. Proteinderivaten durchgeführt. Diese wurden entweder rekombinant in *E. coli* Kulturen bzw. SF9 Insektenzellen exprimiert und anschließend affinitätschromatographisch gereinigt oder *in vitro* mittels eines Kaninchen-Retikulozytenlysats synthetisiert.

Da durch die rekombinante Expression von GST- bzw. (His)₆-IQGAP1 in *E. coli* Kulturen kein bzw. keine zufriedenstellenden Mengen an *full length* Protein erzeugt werden konnten (siehe Diplomarbeit M. Pöter), wurde GST-IQGAP1 im Rahmen dieser Arbeit rekombinant in SF9-Insektenzellen exprimiert. Die Expression von IQGAP1 in Insektenzellen hatte sich als effiziente Methode zur Gewinnung des *full length* Proteins herausgestellt (Fukata *et al.* 1997). Das Insektenzellsystem bietet den Vorteil, dass fast alle posttranslationalen Modifikationen durchgeführt werden und die exprimierten Proteine damit den humanen sehr ähnlich sind. Vor allem große Proteine weisen daher eine bessere Löslichkeit auf als bei Expression in *E. coli* (O'Reilly, 1992). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte *full length* GST-IQGAP1 aus SF9-Zellen isoliert werden (Abb. 4.4). So trat zwar in geringem Maße Proteindegradation auf, jedoch vornehmlich am N-Terminus, so dass die Proteolysefragmente über keinen funktionellen GST-*tag* mehr verfügten und somit durch die Reinigung über die Glutathionsepharose Matrix entfernt werden konnten.

Alternativ zur Expression in Insektenzellen wurden *full length* IQGAP1 sowie einzelne IQGAP1 Domänen, welche für die Kartierung der S100P-Bindungsstellen benötigt wurden, auch *in vitro* synthetisiert (Abb. 4.18A). Bei diesem Verfahren unter Verwendung der für die Transkriptions- und Translationsprozesse benötigten Komponenten eines Kaninchen-Retikulozytenlysats wurde [³⁵S]Methionin in die Proteine eingebaut, um eine Detektion der nur in geringen Mengen synthetisierten Proteine zu ermöglichen. Die nur 60 Minuten dauernde Synthese gelang für alle IQGAP1 Derivate bzw. das *full length* IQGAP1 Protein, wie durch Autoradiographie nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt). Die *in-vitro*-Proteinsynthese stellt somit im Vergleich zur Expression in Insektenzellen eine sehr zeitsparende Alternative dar.

Die Expression verschiedener S100 Proteine und S100P Derivate als (His)₆-Fusionsproteine bzw. im Fall des S100Pwt Proteins auch als *tagless* Variante (Abb. 4.5) erfolgte in *E. coli* Kulturen. Die Analyse der Expression ergab, dass alle Proteine bzw. Proteinderivate als lösliche Proteine ohne detektierbare Proteindegradation exprimiert wurden. Im Falle des S100Pwt *tagless* Proteins erfolgte die Reinigung über eine Hydrophobe Interaktionschromatographie mittels Phenylsepharose, im Falle des His-S100Pwt Proteins und der C-terminal verkürzten S100P Derivate durch Hydrophobe Interaktionschromatographie mit nachgeschalteter Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Agarose. Hierdurch konnten die meisten bakteriellen Verunreinigungen entfernt werden und alle Proteine ließen sich

problemlos von den Matrices eluieren (Abb. 4.6 und Abb. 4.7). Die Reinigung der (His)₆-fusionierten S100P Mutanten mit Deletionen im Bereich der ersten EF-Hand sowie die Reinigung von His-S100A2 und His-S100A10 erfolgte lediglich über eine Ni-NTA-Agarose (Abb. 4.8). Im Fall des S100A10 Proteins war eine Reinigung über eine Phenylsepharose Matrix nicht möglich, da es sich hierbei um ein S100 Protein mit zwei inaktiven EF-Händen handelt, das sich aber dennoch permanent in einer der Ca²⁺-gebundenen Form der anderen S100 Proteine entsprechenden Konformation befindet. Daher exponiert dieses Protein auch unter Ca²⁺-freien Bedingungen hydrophobe Reste, wodurch keine Möglichkeit zur Elution des Proteins von der Matrix bestand. Die Reinigung durch Affinitätschromatographie ohne vorangestellte Hydrophobe Interaktionschromatographie hatte zur Folge, dass einige bakterielle Verunreinigungen in den Elutionsfraktionen vorhanden waren. Im Falle der S100P Deletionsmutanten und des S100A2 Proteins wäre ein zusätzlicher Reinigungsschritt über eine Phenylsepharose Matrix möglich gewesen, wodurch eventuell einige der in den Elutionsfraktionen vorhandenen höhermolekularen Proteine hätten beseitigt werden können. Nichtsdestotrotz war der Anteil der Verunreinigungen in den Eluaten im Vergleich zu den S100 Proteinen gering, so dass auch diese S100 Proteine für *in-vitro*-Bindungsstudien eingesetzt werden konnten.

Die Expression der (His)₆- bzw. GST-fusionierten Ezrin Derivate erfolgte ebenfalls in *E. coli* Kulturen. Die Analyse der Expression und Reinigung zeigte, dass sie alle als lösliche Proteine exprimiert wurden und affinitätschromatographisch über den (His)₆- bzw. GST-*tag* gereinigt werden konnten (Abb. 4.29). Bei der Expression von His-C-ERMAD konnten im Vergleich zu der Expression der anderen Ezrin Derivate nur eine geringe Ausbeute erzielt werden, jedoch war diese für die Durchführung der Bindungsstudien ausreichend. Bei der Expression von *full length* Ezrin und EzrinT567D zeigte sich ein gewisses Maß an Proteindegradation, die vermutlich am C-Terminus stattgefunden hat, da die Proteinfragmente auch über die Ni-NTA-Agarose angereichert wurden. Trotzdem war der Anteil an intaktem Protein in den Elutionsfraktionen ausreichend, um für Bindungsstudien eingesetzt werden zu können. Die Analyse der Präparation von His- und GST-N-ERMAD zeigte, dass hierbei nur wenig Proteindegradation auftrat (Abb. 4.15 und Abb. 4.29). Es handelt sich somit bei N-ERMAD im Vergleich zum *full length* Protein um eine unter diesen Pufferbedingungen stabilere Struktur.

5.2 Charakterisierung der S100P/IQGAP1-Interaktion

Die Analyse der S100P/IQGAP1-Interaktion beinhaltete zum einen die Untersuchung der S100P/IQGAP1-Komplexbildung in Zellen sowie die detaillierte biochemische Charakterisierung der Interaktion und zum anderen eine funktionelle Analyse, auf welche in Abschnitt 5.3 eingegangen wird.

5.2.1 Nachweis der direkten und Ca^{2+} -abhängigen S100P/IQGAP1-Interaktion

Die beobachtete Ca^{2+} -abhängige Assoziation zwischen IQGAP1 und dimerem S100P in der affinitätschromatographischen Untersuchung mit Plazentalysat musste zunächst als eine direkte Proteininteraktion verifiziert werden, da die Möglichkeit bestand, dass sie über weitere Proteine vermittelt worden war. So gab es zwar durch die zuvor von M. Pöter durchgeführten *in-vitro*-Bindungsstudien starke Hinweise auf eine direkte und Ca^{2+} -abhängige Interaktion (siehe Diplomarbeit M. Pöter, 2006), jedoch waren diese Experimente mit sehr stark degradiertem, bakteriell exprimiertem IQGAP1 Protein durchgeführt worden, wobei das *full length* Protein nur in sehr geringem Maße nachzuweisen war. Es bestand die Möglichkeit, dass durch die Proteindegradation Konformationsänderungen aufgetreten waren, die zu einer Freilegung von unspezifischen Bindungsstellen geführt haben könnten. Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Expression von GST-IQGAP1 in Insektenzellen konnten ausreichende Mengen an *full length* IQGAP1 Protein erzeugt werden, die wenig Spuren von Proteindegradation aufwiesen. Unter Verwendung dieses in Insektenzellen exprimierten *full length* IQGAP1 Proteins konnte durch *in-vitro*-Bindungsstudien die direkte und Ca^{2+} -abhängige Interaktion von IQGAP1 und S100P eindeutig verifiziert werden (Abb. 4.9).

Im Weiteren wurde nach Anhaltspunkten für die Annahme gesucht, dass diese Proteininteraktion auch in Zellen stattfindet und somit auch von physiologischer Bedeutung ist.

5.2.2 Die S100P/IQGAP1-Komplexbildung in Zellen

Hinweise auf eine intrazelluläre S100P/IQGAP1-Interaktion lieferten zum einen eine Co-Immunpräzipitation und zum anderen eine Immunfluoreszenz-Analyse der endogenen Proteine. Die Co-Immunpräzipitation wurde zwar mit GFP-S100P transfizierten HeLa-Zellen durchgeführt, dennoch zeigte dieses Experiment, dass die Komplexbildung in Zellen stattfinden kann und dass der GFP-*tag* die Interaktion nicht negativ beeinflusst (Abb. 4.3). Diese Information erlaubte, das GFP-Fusionsprotein für die späteren funktionellen Analysen einzusetzen.

Die Immunfluoreszenzanalyse der endogenen Proteine (Abb. 4.2A) zeigte, dass S100P in unstimulierten HeLa-Zellen in der gesamten Zelle gleichmäßig verteilt ist, wie es zuvor auch schon für das GFP-Fusionsprotein in A431-Zellen demonstriert worden war (Koltzsch *et al.* 2003). IQGAP1 lokalisiert in den nicht stimulierten HeLa-Zellen zytosolisch, ist aber im Vergleich zum S100P auch in Membranausstülpungen zu detektieren, bei denen es sich vermutlich um Aktin-*microspikes* handelt. Die Lokalisation von IQGAP1 in solchen aktinreichen Strukturen ist sowohl für HeLa- aber auch für verschiedene andere Zelllinien, wie z.B. Cos-7, Rat-1 oder HTB-58 gezeigt worden (Mateer *et al.* 2004). Eine EGF-Stimulierung der Zellen hat jedoch eine eindeutige Translokation beider Proteine in *membrane ruffles* zur Folge (Abb. 4.2B). Bei EGF handelt es sich um ein wichtiges Wachstumssignal, das durch Bindung an den EGF-Rezeptor eine Reihe zellulärer Prozesse in Gang setzt, die u.a. die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels sowie die Bildung von *membrane ruffles* induzieren (Ridley *et al.* 1992). Auch für HeLa-Zellen konnte zuvor schon die EGF-induzierte Bildung solcher *membrane ruffles* und die Lokalisation von IQGAP1 in diesen gezeigt werden (Beli *et al.* 2008, Brown *et al.* 2008). Die Co-Lokalisation von S100P mit IQGAP1 in diesen Strukturen deutet auf eine intrazelluläre Komplexbildung in Folge der EGF-induzierten Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration hin. Bislang wurde für das GFP-S100P Fusionsprotein in A431- und SKBR3-Zellen eine Ca^{2+} -abhängige Co-Lokalisation mit Ezrin in Mikrovilli-Strukturen gezeigt (Koltzsch *et al.* 2003, Austermann *et al.* 2008). IQGAP1 zeigt zwar nach EGF-Stimulierung eine Anreicherung in Strukturen, bei denen es sich um Mikrovilli handeln könnte, allerdings ist innerhalb dieser Strukturen kein endogenes S100P zu detektieren. Vermutlich ist im Vergleich zu den Experimenten mit ektopisch exprimiertem S100P die Menge an endogenem S100P in diesen Strukturen zu gering, um ein deutliches Antikörpersignal zu erzeugen. Nichtsdestotrotz können die beobachtete Co-Lokalisation in *membrane ruffles* sowie die Co-Immünpräzipitation des GFP-S100P Fusionsproteins mit IQGAP1 als deutliche Hinweise auf eine in Zellen vorkommende intrazelluläre Assoziation von IQGAP1 und S100P gesehen werden.

5.2.3 Kartierung der S100P/IQGAP1-Interaktionsmotive

Um die als direkt und Ca^{2+} -abhängig verifizierte und in Zellen beobachtete S100P/IQGAP1-Interaktion genauer zu charakterisieren, wurden die jeweiligen Bindungsstellen innerhalb der beiden Proteine kartiert.

Mittels *in-vitro*-Bindungsstudien und SPR-Analyse mit immobilisiertem S100P und isolierten IQGAP1-Domänen konnten innerhalb des IQGAP1 Proteins die IQ-Domäne als hoch affine ($K_D < 0,1 \mu\text{M}$) und die CHD als schwach affine Bindungsstellen für S100P identifiziert werden (Abb. 4.18 und Abb. 4.19). Diese beiden Domänen waren zuvor schon als Bindungsstellen anderer EF-Hand Ca^{2+} -bindender Proteine identifiziert worden. So interagiert IQGAP1 über seine IQ-Domäne mit Calmodulin, S100B

sowie Myosin ELC (Hart *et al.* 1996, Weissbach *et al.* 1998, Mbele *et al.* 2002) und weist in der CHD zusätzlich eine schwach affine Bindungsstelle für Calmodulin auf (Ho *et al.* 1999).

Innerhalb der IQ-Domäne stellen vier IQ-Motive die Erkennungssequenzen für die EF-Hand Ca^{2+} -bindenden Proteine dar. Es handelt sich bei dem IQ-Motiv allerdings nicht um ein prinzipielles Bindungsmotiv für S100 Proteine. So konnte zwar im Rahmen dieser Arbeit auch eine Interaktion zwischen IQGAP1 und S100A2 nachgewiesen werden, S100A10 sowie S100A6 und S100A11 binden jedoch nicht an IQGAP1 (vorliegende Arbeit, Mbele *et al.* 2002). Die Interaktionen zwischen der IQGAP1 IQ-Domäne und Calmodulin, Myosin ELC und S100B sind bereits etwas genauer analysiert worden, wodurch gewisse Unterschiede aufgedeckt werden konnten. So wurde gezeigt, dass Apo-Calmodulin an die IQ-Motive IQ3 und IQ4 binden kann, Ca^{2+} -Calmodulin zusätzlich auch noch an IQ1 und IQ2. In dieser Selektivität der IQ1 und IQ2 für Ca^{2+} /Calmodulin wird der Grund für die Ca^{2+} /Calmodulin induzierte Abrogation anderer IQGAP1 Interaktionen vermutet (Briggs *et al.* 2003b, Li *et al.* 2003). Myosin MLC bindet hingegen in Abwesenheit von Ca^{2+} an IQ1 und S100B in Gegenwart von Ca^{2+} an IQ1 und IQ2. An welches oder welche IQ-Motive S100P binden kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt, weshalb auch keine Aussage über eine mögliche Kompetition zwischen S100P und anderen IQGAP1-Bindungspartnern getroffen werden kann. Für S100B konnte allerdings gezeigt werden, dass es in Gegenwart von Ca^{2+} eine höhere Affinität zu IQGAP1 aufweist als Calmodulin (Mbele *et al.* 2002).

Bei der für S100P zusätzlich ermittelten Ca^{2+} -abhängigen Interaktion mit der Calponin Homologie Domäne (CHD) von IQGAP1 handelt es sich im Vergleich zur Interaktion mit der IQ-Domäne um eine schwach ausgeprägte Bindung. Dies steht im Einklang mit den für Calmodulin ermittelten Daten, wonach Calmodulin nur in Gegenwart von Ca^{2+} an die CHD bindet und dies mit einer 20fach geringeren Affinität im Vergleich zur Bindung an die IQ-Domäne (Ho *et al.* 1999).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es sich bei den hier identifizierten S100P-Bindungsstellen um bereits gut dokumentierte Bindungsstellen anderer EF-Hand Ca^{2+} -bindender Proteine im IQGAP1 Protein handelt.

Die Kartierung der IQGAP1-Bindungsstelle im S100P Protein erfolgte ebenfalls mittels *in-vitro*-Bindungsstudien, durchgeführt mit *full length* IQGAP1 und diversen S100P Mutanten (Abb. 4.5). Bei vielen S100 Proteinen wie z.B. S100A1, S100A10, S100A11 oder S100A12 ist einigen konservierten hydrophoben Aminosäureresten im C-terminalen Bereich eine wesentliche Rolle bei der Ligandenbindung zugewiesen worden (Osterloh *et al.* 1998, Kube *et al.* 1992, Rintala-Dempsey *et al.* 2006, Hatakeyama *et al.* 2004). Gleiches konnte bereits auch für S100P gezeigt werden. So sind die Aminosäuren 88-91 im S100P Protein essenziell für die Interaktion mit dem intrazellulären Zielprotein Ezrin (Austermann *et al.* 2008). Von den hier bezüglich der Interaktion mit IQGAP1 untersuchten

S100P Derivaten zeigt jedoch nur die S100P Δ 21-25 Mutante eine drastisch reduzierte Bindung an IQGAP1 (Abb. 4.14). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass diese fünf Aminosäuren, welche sich im Bereich des Ca²⁺-Bindungsloops der ersten EF-Hand befinden, wesentlich an der Interaktion mit IQGAP1 beteiligt sind. Da die Ca²⁺-Affinität der ersten EF-Hand sehr gering ist (Becker *et al.* 1992), bleibt diese EF-Hand in der Regel selbst bei einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration Ca²⁺-frei und steht zur Interaktion mit Zielproteinen zur Verfügung. Interessanterweise konnte auch für die Ca²⁺-abhängige Bindung von S100B an IQGAP1 gezeigt werden, dass der C-Terminus des S100B Proteins nicht involviert ist (Mbele *et al.* 2002). Somit besteht die Möglichkeit, dass auch an dieser Interaktion Aminosäuren im Bereich der ersten EF-Hand entscheidend beteiligt sind. Neben den identifizierten Aminosäuren 21-25 sind vermutlich noch weitere Reste im S100P Protein in die IQGAP1-Bindung involviert, da die Deletion dieser Aminosäuren nicht zu einer 100%igen Aufhebung der IQGAP1-Interaktion führt. Da C-terminale Reste nicht daran beteiligt zu sein scheinen, sind solche Reste in der Verbindungsregion zu vermuten. Diese sind zusätzlich zu den C-terminalen Resten bereits mehrfach als essenziell für die Interaktion von S100 Proteinen mit ihren jeweiligen Zielproteinen identifiziert worden (Zimmer *et al.* 2003). Von den bisher mittels Kristallstrukturanalyse untersuchten S100 Proteinen konnte einzig bei S100P die Struktur eines Teils der Verbindungsregion (Aminosäurereste 46-51) nicht ermittelt werden (Zhang *et al.* 2003). Dies deutet darauf hin, dass dieser Bereich im S100P Protein flexibler ist als bei anderen S100 Proteinen und lässt vermuten, dass diese Aminosäuren des S100P Proteins an der Interaktion mit einigen Zielproteinen beteiligt sind.

Die hier identifizierte Beteiligung der ersten EF-Hand des S100P Proteins bei der Bindung von IQGAP1 stellt einen völlig neuen Mechanismus der Interaktion von S100 Proteinen mit ihren Zielproteinen dar. Es gibt allerdings auch weitere Hinweise dafür, dass die S100 Proteine ihre Zielproteine nicht ausschließlich nach dem oben genannten Schema binden. So wurde beispielsweise gezeigt, dass S100A6 nach Deletion der C-terminalen Extension weiterhin Ca²⁺-abhängig mit seinem Zielprotein Annexin A6 interagiert (Garbuglia *et al.* 2000) und auch bei der Bindung von p53 an S100B wurden den C-terminalen aromatischen Aminosäureresten mittels NMR-spektroskopischer Analysen eine eher untergeordnete Rolle zugeschrieben (Rustandi *et al.* 2000). Diese Daten und die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse sprechen dafür, dass die Interaktionsmodi der S100 Proteine komplexer sind als zunächst vermutet. Hierüber können S100 Proteine vermutlich weitere Spezifität bezüglich der Wahl ihrer Interaktionspartner erlangen.

Durch die Identifizierung der an der S100P/IQGAP1-Interaktion beteiligten Reste bzw. Domänen wurde die Möglichkeit geschaffen, mit den bindungsdefizienten Mutanten eine Untersuchung zur funktionellen Bedeutung dieser Protein-Protein-Interaktion durchzuführen. Auf diese Weise konnte zuvor auch die Bedeutung der S100P/Ezrin-Interaktion bei der Transmigration von Tumorzellen

nachgewiesen werden (Austermann *et al.* 2008). Da abzusehen war, dass eine Verwendung der S100P-bindungsdefizienten IQGAP1 Mutante „IR-WW“ einen enormen Einfluss auf die Interaktionen von IQGAP1 mit vielen bisher identifizierten Bindungspartnern gehabt hätte, wurde die S100P Δ 21-25 Mutante für die funktionelle Analyse favorisiert und diese Mutante daher zunächst genauer charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die S100P Δ 21-25 Mutante im Vergleich zum S100Pwt Protein kein verändertes Bindungsverhalten gegenüber des gut charakterisierten intrazellulären Bindungspartners Ezrin aufweist (Abb. 4.15). Zudem zeigten immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, dass sich auch die intrazelluläre Lokalisation der ektopisch exprimierten Mutante nicht von der Lokalisation des Wildtyp-Proteins unterscheidet (Abb. 4.16 und Abb. 4.17), was vermutlich auf die unveränderte Bindung an Ezrin zurückzuführen ist. Da sich mit Ausnahme der IQGAP1-Bindung keine weiteren wesentlichen Unterschiede zwischen der S100P Δ 21-25 Mutante und dem S100Pwt Protein feststellen ließen, konnte diese Mutante für die Analysen zur Aufklärung der Bedeutung der S100P/IQGAP1-Interaktion auf zellulärer Ebene als ideale negative Kontrolle verwendet werden.

5.3 Einfluss der S100P/IQGAP1-Interaktion auf die MAPK-Kaskade

IQGAP1 dient intrazellulär als wichtiges Gerüstprotein zur Verknüpfung verschiedener Signalwege und Weiterleitung von Signalkaskaden, wobei dessen Rolle beim EGF-induzierten B-Raf-MEK1/2-ERK1/2 Signalweg besonders gut untersucht ist. Hier dient IQGAP1 anscheinend als Gerüstprotein, da die direkten Interaktionen von IQGAP1 mit den Proteinkinasen nachgewiesen und die entsprechenden Bindungsstellen im IQGAP1 Protein in der IQ-Domäne (B-Raf und MEK1/2) und der WW Domäne (ERK1/2) identifiziert wurden. Zudem konnte gezeigt werden, dass IQGAP1 essenziell für eine optimale EGF-induzierte Signalweiterleitung innerhalb dieser Kaskade ist. So führen sowohl Überexpression als auch Depletion von IQGAP1 in MCF-7- bzw. MEF-Zellen zu einer verminderten EGF-induzierten B-Raf-, MEK1/2- und ERK1/2-Aktivierung (Roy *et al.* 2004, Roy *et al.* 2005, Ren *et al.* 2007). Im Rahmen dieser Arbeit lieferte zunächst die Beobachtung einer signifikant verminderten EGF-induzierten IQGAP1-Tyrosinphosphorylierung in S100P überexprimierenden HeLa-Zellen (Abb. 4.21) einen Hinweis auf einen möglichen Einfluss der S100P/IQGAP1-Interaktion auf dessen Funktion als Gerüstprotein bei Signalkaskaden. Ein Zusammenhang zwischen einer verstärkten Tyrosinphosphorylierung von IQGAP1 und dessen Beteiligung an der Signalweiterleitung *downstream* aktivierter Rezeptor-Tyrosinkinasen ist bisher schon mehrfach beschrieben worden (Yamaoka-Tojo *et al.* 2004, Yamaoka-Tojo *et al.* 2006, Meyer *et al.* 2008). Diese Tyrosinphosphorylierung erfolgt u.a. durch den aktivierten Rezeptor selbst, aber wahrscheinlich auch durch zelluläre Tyrosinkinasen wie z.B. c-Src, für die in *in-vitro*-Studien gezeigt werden konnte, dass sie IQGAP1 phosphorylieren kann (Meyer *et al.* 2008). Die beobachtete Reduktion in der IQGAP1-Tyrosinphosphorylierung wurde als Anlass genommen, Komponenten der EGF-induzierten B-Raf-MEK-ERK-Kaskade bezüglich ihrer Aktivierung zu analysieren. Es zeigte sich, dass die S100P/IQGAP1-Interaktion einen inhibierenden Einfluss auf die Assoziation von B-Raf mit IQGAP1 hat (Abb. 4.22). Da bekannt ist, dass sich mit IQGAP1 assoziiertes B-Raf in seiner aktiven Form befindet (Ren *et al.* 2007), kann dieses Ergebnis entweder bedeuten, dass weniger aktiviertes B-Raf in der Zelle vorliegt oder dass B-Raf mit anderen Gerüstproteinen wie z.B. KSR1 interagiert (McKay *et al.* 2009). Da B-Raf als Aktivator von MEK1/2 fungiert (Papin *et al.* 1995), wurde im Rahmen dieser Arbeit auch analysiert, ob die Aktivierung von MEK1/2 durch die S100P/IQGAP1-Interaktion und eine verminderte B-Raf-Assoziation beeinflusst wird (Abb. 4.23). Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion der EGF-induzierten Aktivierung von MEK1/2 in S100Pwt überexprimierenden HeLa-Zellen im Vergleich zu S100P Δ 21-25 überexprimierenden Zellen. Der Unterschied ist allerdings schwächer ausgeprägt als der Unterschied bei der Tyrosinphosphorylierung des IQGAP1 Proteins oder der IQGAP1/B-Raf-Assoziation in Gegenwart erhöhter S100P Spiegel. Der Grund hierfür ist vermutlich, dass MEK1/2 auch an anderen Gerüstproteinen wie KSR1

durch B-Raf phosphoryliert und zusätzlich auch von anderen Kinasen wie z.B. Raf-1 reguliert wird (Kyriakis *et al.* 1992).

Die bisher ermittelten Daten liefern somit Hinweise, dass S100P als negativer Feedback-Regulator im EGF-induzierten MAPK-Signalweg am IQGAP1-Gerüstprotein dient. Die S100P/IQGAP1-Interaktion wird dabei durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst, welche in Folge der ebenfalls EGF-induzierten Stimulierung der Phospholipase C (PLC) und der dadurch ermöglichten IP_3 -induzierten Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER auftritt.

Analog zu den hier erhaltenen Daten wurde auch für Calmodulin gezeigt, dass eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach EGF-Stimulierung zu einer verstärkten Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin an IQGAP1 führt. Hieraus resultiert ebenfalls eine stark eingeschränkte Interaktion von IQGAP1 mit B-Raf (Ren *et al.* 2008). Neben dem inhibierenden Einfluss auf die IQGAP1/B-Raf-Interaktion verhindert die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin an IQGAP1 aber auch alle anderen bisher untersuchten Proteininteraktionen des IQGAP1 Proteins (White *et al.* 2009), darunter die Interaktionen mit Cdc42 und Rac1 (Ho *et al.* 1999, Briggs *et al.* 2003b). Dies hat, wie für MCF-7-Zellen gezeigt werden konnte, einen negativen Effekt auf die Modulation des Aktin-Netzwerks und dadurch auf die Zellmigration (Mataraza *et al.* 2007). Im Gegensatz zu Calmodulin wirkt S100P offensichtlich nicht inhibierend auf die Assoziation von IQGAP1 mit Cdc42 und Rac1 (Abb. 4.20A). Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass eine S100P Überexpression keinen signifikanten Effekt auf die spontane Zellmigration hat (Abb. 4.20B).

Der molekulare Mechanismus, der hinter dem im Rahmen dieser Arbeit dokumentierten Effekt von S100P auf die IQGAP1 vermittelte Aktivierung der MAPK-Kaskade steht, ist nicht bekannt. Eine Möglichkeit ist, dass die Bindung von S100P an IQGAP1 Ursache für die beobachtete Reduzierung der IQGAP1-Tyrosinphosphorylierung ist, eventuell indem es die Bindung zellulärer Tyrosinkinasen wie c-Src einschränkt. Die reduzierte Tyrosinphosphorylierung könnte dann der Grund für die eingeschränkte Assoziation von B-Raf mit IQGAP1 und die vermutlich verminderte B-Raf-Aktivität sein, die sich in der reduzierten MEK1/2-Aktivierung widerspiegelt.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Bindung von S100P an IQGAP1 kompetitiv zur Bindung von B-Raf und MEK1/2 erfolgt, da für alle drei Proteine die Bindungsstellen innerhalb der IQ-Domäne des IQGAP1 Proteins lokalisiert wurden (Roy *et al.* 2005, Ren *et al.* 2007). Ob die Proteine allerdings an dasselbe bzw. dieselben IQ-Motive binden ist nicht bekannt.

Denkbar ist weiterhin, dass die Bindung von S100P zu einem Konformationswechsel des IQGAP1 Proteins führt, der sich negativ auf die Interaktion mit B-Raf und eventuell auch auf die Interaktion mit MEK1/2 und ERK1/2 auswirkt. Dies ist im Moment die gängige Hypothese bezüglich der Calmodulin/IQGAP1-Interaktion. Dabei wird vermutet, dass durch die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin an die IQ-

Motive IQ1 und IQ2 eine Konformationsänderung im IQGAP1 Protein induziert wird, welche Interaktionen beispielsweise mit B-Raf verhindert (Ren *et al.* 2008, Li *et al.* 2003).

Wie bereits erwähnt, kann über die Assoziation von MEK1/2 und ERK1/2 mit S100P-gebundenem IQGAP1 keine Aussage getroffen werden, da dies nicht explizit analysiert wurde. Durch die Vielzahl der ERK-Substrate könnte eine veränderte ERK-Aktivität Einfluss auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse haben, darunter beispielsweise auf die Zellproliferation. Dies müsste in einem entsprechenden Proliferationsassay untersucht werden.

Die bezüglich der S100P/IQGAP1-Interaktion identifizierten Auswirkungen auf die IQGAP1-Aktivität werden in dem in Abb. 5.1 gezeigten Modell zusammengefasst und spekulativ erweitert.

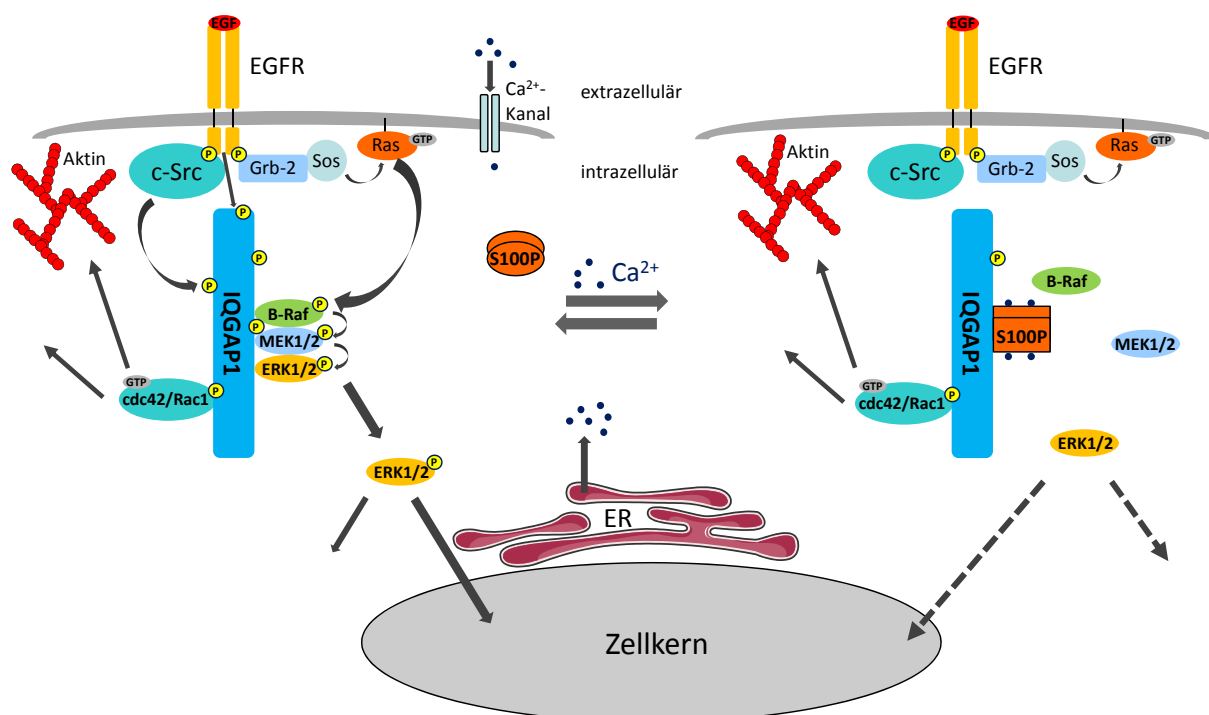


Abb. 5.1: Modell zum Einfluss der S100P/IQGAP1-Interaktion auf den MAPK-Signalweg

Eine EGF-Stimulierung bewirkt die Assemblierung eines Signalkomplexes am aktivierten EGF-Rezeptor. Diese hat die Aktivierung der B-Raf-MEK1/2-ERK1/2-Kaskade zur Folge. Hierbei dient das Tyrosin-phosphorylierte IQGAP1 als Gerüstprotein, welches eine effiziente Signalweiterleitung gewährleistet. Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration fördert die Bindung von S100P an IQGAP1. Es kommt zu einer reduzierten IQGAP1-Tyrosinphosphorylierung, einer eingeschränkten Assoziation von IQGAP1 mit B-Raf, einer verminderten MEK1/2-Aktivierung und vermutlich auch zu einer verminderten ERK1/2-Aktivität. Die Interaktion von IQGAP1 mit Cdc42 sowie Rac1 und die damit assoziierten Prozesse wie Veränderungen am Aktin-Zytoskelett bleiben unbeeinflusst. EGFR, EGF-Rezeptor; ER, Endoplasmatisches Retikulum. Abbildung angelehnt an Ren *et al.* 2008.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen und die bisher publizierten Daten lassen darauf schließen, dass ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach EGF-Stimulierung mindestens zwei verschiedene Antworten bezüglich der IQGAP1 Aktivität induzieren kann. Zum einen kann durch die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin an IQGAP1 ein komplett inhibierter Zustand bezüglich der Interaktion mit Komponenten des MAPKinase-Signalwegs und Regulatoren der Aktin- und Mikrotubuli-Dynamik induziert werden. Zum anderen kann es durch die Ca^{2+} -abhängige Bindung von S100P zu einem nur teilweise inhibierten Zustand des IQGAP1 Proteins kommen. Bei diesem teilweise inhibierten Zustand ist die Interaktion mit B-Raf beeinträchtigt, was in einer reduzierten MEK1/2-Aktivierung und möglicherweise in einer veränderten ERK1/2-Aktivität resultiert. Die Interaktion mit Cdc42 und Rac1, welche Aktin- und Mikrotubulidynamik steuern und welche ihrerseits ebenfalls durch die IQGAP1-Interaktion in ihrem aktiven Zustand gehalten werden, bleibt hingegen unbeeinflusst. Die Faktoren, die darüber entscheiden welcher Komplex aus IQGAP1 und einem Ca^{2+} -gebundenem EF-Hand Protein (Calmodulin vs. S100P) zu welchem Zeitpunkt und an welchem Ort gebildet wird, sind nicht bekannt. Möglicherweise spielen dabei die Gewebe- oder Zelltyp-spezifischen Expressionslevel von S100P und Calmodulin oder die Ca^{2+} -Konzentrationen, die benötigt werden um die jeweilige Komplexbildung zu initiieren, eine Rolle.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch diese Arbeit eine weitere Verknüpfung zwischen Ca^{2+} -*Signalling* und dem MAPK-Signalweg – vermittelt durch S100P und IQGAP1 – hergestellt werden konnte.

5.4 Analyse des IQGAP1/Ezrin-Komplexes

IQGAP1 und Ezrin sind wichtige Regulatoren im kortikalen Aktin-Zytoskelett und wurden darüber hinaus schon mehrfach gemeinsam als Komponenten größerer Proteinkomplexe identifiziert (Berryman *et al.* 2000, Paradela *et al.* 2005 und Abb. 4.1). Da zusätzlich eine direkte Interaktion von Ezrin mit S100P (Koltzsch *et al.* 2003) und im Rahmen dieser Arbeit auch eine direkte Interaktion von IQGAP1 mit S100P nachgewiesen werden konnte, wurde in dem zweiten Teil dieser Arbeit untersucht, ob möglicherweise auch eine direkte Interaktion von IQGAP1 und Ezrin vorliegt.

Die Ergebnisse der Bindungsstudien mit gereinigten Proteinen deuten sehr stark darauf hin, dass IQGAP1 Ca^{2+} -unabhängig mit der N-ERMAD von Ezrin interagiert. Da keine Interaktion von IQGAP1 mit *full length* Ezrin detektiert wurde, muss davon ausgegangen werden, dass die IQGAP1-Bindungsstelle innerhalb eines Bereichs der N-ERMAD liegt, welcher in der geschlossenen Konformation des Ezrin Proteins unzugänglich ist. Innerhalb dieser Studien konnte ebenfalls keine Interaktion zwischen der C-ERMAD von Ezrin und IQGAP1 detektiert werden. IQGAP1 wurde zwar zuvor durch die immobilisierte C-ERMAD von Ezrin im Rahmen einer Affinitätschromatographie aus einem Extrakt plazentaler Mikrovilli isoliert, allerdings wurde dabei nicht untersucht, ob es sich um eine direkte Interaktion handelt (Berryman *et al.* 2000). Zudem wurden bei diesem Experiment zusammen mit IQGAP1 noch weitere Proteine isoliert, so dass eine Bindung beispielsweise auch über das in Plazenta stark exprimierte S100P vermittelt worden sein könnte.

Der durch die Ergebnisse der *in-vitro*-Bindungsstudien erhaltene Hinweis auf eine direkte und Ca^{2+} -unabhängige Interaktion zwischen IQGAP1 und der N-ERMAD von Ezrin wird durch die Ergebnisse der Co-Immunpräzipitationsexperimente gestützt (Abb. 4.26 und Abb. 4.27). So konnte Ezrin sowohl in Ca^{2+} - als auch in EGTA-haltigen Puffern zusammen mit IQGAP1 aus HeLa-Zelllysaten präzipitiert werden und die Menge an co-präzipitiertem Ezrin änderte sich nicht in S100P-überexprimierenden Zellen. Da S100P ein Ca^{2+} -abhängiger Bindungspartner sowohl von IQGAP1 als auch von Ezrin ist und die Mengen an endogenem S100P in HeLa-Zellen im Vergleich zu den IQGAP1- und Ezrin-Mengen relativ gering sind (Daten nicht gezeigt), kann somit eine S100P-vermittelte Co-Immunpräzipitation von Ezrin mit IQGAP1 ausgeschlossen werden. Allerdings können diese Experimente nur als Hinweise auf eine direkte Interaktion von Ezrin und IQGAP1 auf zellulärer Ebene betrachtet werden, da die Proteinkomplexbildung auch über andere Proteine als S100P vermittelt werden kann. So ist beispielsweise für beide Proteine eine direkte Interaktion mit Aktin nachgewiesen worden (Bashour *et al.* 1997, Algrain *et al.* 1993). Nichtsdestotrotz zeigen die Co-Immunpräzipitationen einmal mehr, dass Ezrin und IQGAP1 zumindest innerhalb eines größeren Proteinkomplexes gemeinsam vorliegen und dass die Bildung dieses Komplexes Ca^{2+} -unabhängig stattfindet.

Diese Beobachtung wird auch von den durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen unterstützt. Bereits in unstimulierten HeLa-Zellen kann eine gewisse Co-Lokalisation der beiden Proteine in Nähe der Plasmamembran und in Zellfortsätzen beobachtet werden (Abb. 4.25A). Hierbei könnte es sich um IQGAP1 handeln, das an die N-ERMAD von Ezrin bindet, welches seinerseits durch Bindung an PI(4,5)P₂ und Phosphorylierung bereits aktiviert und zur Plasmamembran rekrutiert worden sein könnte (Niggli *et al.* 1995, Barret *et al.* 2000). Eine deutlichere Co-Lokalisation von IQGAP1 und Ezrin ist allerdings nach EGF-Stimulierung der Zellen zu beobachten (Abb. 4.25). Diese führt zu einer Translokation beider Proteine in *membrane ruffles*, was sowohl für Ezrin als auch für IQGAP1 bereits in diversen Zelllinien in Folge einer EGF-Rezeptor-Stimulierung gezeigt werden konnte (Smith *et al.* 2010, Bretscher 1989). Beiden Proteinen konnten innerhalb dieser aktivierten und mit Zellmigrationsprozessen assoziierten Membranstrukturen wichtige Funktionen bei der Organisation des kortikalen Zytoskeletts nachgewiesen werden (Borm *et al.* 2005, Johnson *et al.* 2009). Unklar bleibt aber weiterhin, ob die beiden Proteine gemeinsam – möglicherweise auch innerhalb eines größeren Proteinkomplexes – oder unabhängig voneinander dort hin rekrutiert werden.

Über die Funktion des hier dokumentierten IQGAP1/Ezrin-Komplexes kann zurzeit nur spekuliert werden. Da keine Interaktion von IQGAP1 mit *full length* Ezrin beobachtet werden konnte, ist ein aktivierender Einfluss von IQGAP1 auf das ruhende Ezrin, wie für die S100P-Bindung an Ezrin beobachtet (Koltzsch *et al.* 2003), wohl auszuschließen. Den Immunfluoreszenz-Analysen und Co-Immunpräzipitationen nach zu urteilen, scheint die Interaktion sowohl in unstimulierten wie auch in stimulierten Zellen stattzufinden. Allerdings bewirkt die EGF-Stimulierung eine zelluläre Umverteilung beider Proteine, weshalb eine regulatorische Funktion der Interaktion in Bezug auf die Wirkungsweisen von Ezrin, IQGAP1 oder auch beider Proteine im Bereich des kortikalen Zytoskeletts in Folge der Stimulierung mit Wachstumsfaktoren denkbar ist. Eine mögliche Funktion der IQGAP1/Ezrin-Interaktion könnte in der Verknüpfung von Cholesterol- und PI(4,5)P₂-reichen Mikrodomänen der Plasmamembran (*lipid rafts*) mit den wachsenden Enden von Mikrotubuli im Bereich des Leitsaums sich polarisierender und migrierender Zellen liegen. So konnte gezeigt werden, dass die PI(4,5)P₂-haltigen *lipid rafts* über das IQGAP1 Protein und die mit ihm assoziierten Proteine CLIP-170 und APC die wachsenden Enden von Mikrotubuli rekrutieren. Hier sind die Mikrotubuli ihrerseits für eine räumliche Fokussierung und zeitliche Stabilisierung der *rafts* notwendig, die migrationsrelevant ist (Golub *et al.* 2005). In diesem Zusammenhang kann spekuliert werden, dass die Verbindung zwischen den *lipid rafts* und dem IQGAP1 Protein eventuell über Ezrin vermittelt wird, welches zuvor durch die Bindung an PI(4,5)P₂ aktiviert und zu den *rafts* rekrutiert wurde. Die Tatsache, dass IQGAP1 und Ezrin gemeinsam aus *lipid raft*-haltigen Mikrovillistrukturen von Syncytiotrophoblastenzellen isoliert werden konnten (Paradela *et al.* 2005), stützt diese Hypothese. Co-Lokalisationsstudien mit

typischen *lipid raft* Markerproteinen, wie beispielsweise Flotillin-1 und -2, könnten weitere Hinweise auf eine derartige Funktion der direkten IQGAP1/Ezrin-Interaktion liefern.

Zusätzliche Komplexität bei jeglicher Spekulation über eine mögliche Funktion der IQGAP1/Ezrin-Interaktion wird allerdings aufgrund der für beide Proteine bekannten Ca^{2+} -abhängigen Interaktion mit S100P erzeugt. Das mögliche Zusammenspiel von S100P, IQGAP1 und Ezrin wird im nun folgenden Abschnitt diskutiert.

5.5 Die Interaktionen von S100P, IQGAP1 und Ezrin im kortikalen Zytoskelett

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Ca^{2+} -abhängige Interaktion von S100P und IQGAP1 sowie eine Ca^{2+} -unabhängige Interaktion von IQGAP1 mit Ezrin demonstriert werden. Zusätzlich ist die Ca^{2+} -abhängige Interaktion von S100P mit Ezrin bekannt (Koltzsch *et al.* 2003). Im Falle der S100P/IQGAP1- und der S100P/Ezrin-Interaktion handelt es sich um Komplexbildungen, die lediglich als Folge einer Zellstimulierung und der damit einhergehenden Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration stattfinden. Darüber hinaus zeigen die Lokalisationsstudien, dass diese Interaktionen auf spezielle Zellbereiche in Nähe der Plasmamembran wie Mikrovilli oder *membrane ruffles* begrenzt sind (Koltzsch *et al.* 2003, Austermann *et al.* 2008). Der S100P-Bindung an Ezrin konnte dabei eine aktivierende Funktion auf das Ezrin Protein und hierüber eine zellmigrationsfördernde Wirkung zugewiesen werden. Die S100P-Bindung an IQGAP1 wurde hingegen in Zusammenhang mit einem inhibierenden Einfluss auf die am IQGAP1 Protein organisierte MAPK-Kaskade gebracht. Bei der beobachteten IQGAP1/Ezrin-Komplexbildung handelt es sich im Gegenteil zu den zuvor beschriebenen Interaktionen um eine Ca^{2+} -unabhängige Wechselwirkung noch unbekannter Funktion.

Unklar ist, ob nach Zellstimulierung voneinander unabhängige S100P/Ezrin- und S100P/IQGAP1-Komplexe gebildet werden und bereits zuvor gebildete IQGAP1/Ezrin-Komplexe bestehen bleiben oder ob möglicherweise trimere Komplexe vorliegen. Für das letztere spricht die stets beobachtete sehr genaue Übereinstimmung der Lokalisation aller drei Proteine nach Stimulierung (Vgl. Abb. 4.2 und Abb. 4.25, bzw. Diplomarbeit Michaela Pöter, 2006). In solch einem trimeren Komplex könnte ein S100P-Dimer sowohl Ezrin als auch IQGAP1 binden und ein zusätzlicher Kontaktpunkt zwischen der N-ERMAD von Ezrin und IQGAP1 ausgebildet werden. Dass S100 Proteine verschiedene Zielproteine gleichzeitig binden ist, aufgrund ihrer Eigenschaft antiparallele Dimere zu bilden, eine weit verbreitete These (Donato 1999, Eckert *et al.* 2004). Da im Rahmen dieser Arbeit keine Interaktion zwischen *full length* Ezrin und IQGAP1 detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass die IQGAP1-Bindungsstelle innerhalb der N-ERMAD im ruhenden Ezrin nicht zugänglich ist. Somit unterscheiden sich die Bindungsstellen von S100P und IQGAP1 innerhalb der N-ERMAD. Das Interaktionsmotiv für S100P wurde in einem frei zugänglichen Bereich in Nähe der $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -Bindungsstellen kartiert (Austermann *et al.* 2008, Barret *et al.* 2000). Die These der unterschiedlichen Bindungsmotive wird auch durch das Co-Immunpräzipitationsexperiment gestützt, da die Überexpression von S100P keinen negativen Einfluss auf die Co-IP von Ezrin mit IQGAP1 hatte. Daher scheint eine Konkurrenz von IQGAP1 und S100P um dieselbe Bindungsstelle innerhalb des Ezrin Proteins unwahrscheinlich und ein trimerer Komplex ist denkbar.

Auch über die Funktion eines solchen trimeren Komplexes kann nur spekuliert werden. Eine Aktivierung von Zellen mit Wachstumsfaktoren führt zum einen zu einer Stimulierung von Zellmigration und beeinflusst zum anderen Zellproliferation und -differenzierung. Die migratorischen Prozesse könnten insofern positiv reguliert werden, als in Folge der ebenfalls durch EGF-stimulierten Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Bindung von S100P an Ezrin zu einer Aktivierung des Ezrin Proteins führt, wodurch eine stabile Verbindung zwischen der Plasmamembran und dem darunterliegenden Aktin-Zytoskelett hergestellt werden kann. Gleichzeitig würde die ebenfalls Ca^{2+} -abhängige Bindung von S100P an IQGAP1 in einem trimeren Komplex mit Ezrin auch die IQGAP1-assoziierten Proteine Cdc42 oder Rac1 zu aktinreichen kortikalen Regionen rekrutieren (siehe unbeeinflusste Bindung dieser beiden Proteine trotz S100P-Interaktion, Abb. 4.20). Dies würde zu einer für Zellmigration notwendigen Aktin-Polymerisierung unterhalb der Plasmamembran führen. Desweiteren würde S100P durch die Bindung an IQGAP1 die zuvor durch den EGF-Stimulus aktivierte MAPK-Signaltransduktion als negativer Feedback-Regulator einschränken und hierüber Einfluss auf die zellulären Folgen der MAPK-Aktivierung ausüben. So wurde gezeigt, dass eine anhaltend starke ERK-Aktivierung zu Seneszenz, Apoptose oder Zelldifferenzierung führt, wohingegen eine transiente Aktivierung gefolgt von einer anhaltenden schwächeren ERK-Aktivierung zu Zellproliferation führt (Qui *et al.* 1992, Marshall 1995, Pumiglia *et al.* 1997, Agell *et al.* 2002). Die direkte IQGAP1/Ezrin-Interaktion in solch einem trimeren Komplex könnte eventuell eine zusätzliche stabilisierende Wirkung auf die geöffnete Konformation des Ezrin Proteins ausüben. Denkbar wäre auch, dass durch die Rekrutierung von IQGAP1 und die dadurch an diesen Stellen geförderte Aktin-Polymerisierung zusätzliche Aktinfilamente erzeugt werden, an welche das Ezrin Protein binden kann.

Ob tatsächlich trimere Komplexe vorliegen oder aber separate Ca^{2+} -abhängig gebildete S100P/Ezrin und S100P/IQGAP1-Komplexe gleichzeitig mit möglicherweise schon vor der Zellstimulation gebildeten Ezrin/IQGAP1-Komplexen, ist nicht bekannt. Eventuell liegt auch eine Mischung aus trimeren und separaten Komplexen vor, deren Bildung von anderen Proteinen, der Stärke oder Dauer des Ca^{2+} -Signals oder vom Zelltyp abhängig sein könnte.

Trotz dieser noch zu klärenden Fragen, geben die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten Anlass zu der Annahme, dass S100P, IQGAP1 und Ezrin gemeinsam an der koordinierten Regulation des kortikalen Zytoskeletts und der MAPK-Signaltransduktion nach Aktivierung der Zelle mit Wachstumsfaktoren beteiligt sind.

6 Literaturverzeichnis

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. & Kemler, R. 1997, "Beta-Catenin is a Target for the Ubiquitin-Proteasome Pathway", *The EMBO journal*, vol. 16, no. 13, pp. 3797-3804.

Agell, N., Bachs, O., Rocamora, N. & Villalonga, P. 2002, "Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca²⁺, and calmodulin", *Cellular signalling*, vol. 14, no. 8, pp. 649-654.

Algrain, M., Turunen, O., Vaheri, A., Louvard, D. & Arpin, M. 1993, "Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker", *The Journal of cell biology*, vol. 120, no. 1, pp. 129-139.

Allouche, D., Parello, J. & Sanejouand, Y.H. 1999, "Ca²⁺/Mg²⁺ exchange in parvalbumin and other EF-hand proteins. A theoretical study", *Journal of Molecular Biology*, vol. 285, no. 2, pp. 857-873.

Amieva, M.R., Wilgenbus, K.K. & Furthmayr, H. 1994, "Radixin is a component of hepatocyte microvilli in situ", *Experimental cell research*, vol. 210, no. 1, pp. 140-144.

Arumugam, T., Simeone, D.M., Schmidt, A.M. & Logsdon, C.D. 2004, "S100P stimulates cell proliferation and survival via receptor for activated glycation end products (RAGE)", *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 7, pp. 5059-5065.

Arumugam, T., Simeone, D.M., Van Golen, K. & Logsdon, C.D. 2005, "S100P promotes pancreatic cancer growth, survival, and invasion", *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 11, no. 15, pp. 5356-5364.

Austermann, J., Nazmi, A.R., Muller-Tidow, C. & Gerke, V. 2008, "Characterization of the Ca²⁺-regulated ezrin-S100P interaction and its role in tumor cell migration", *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 43, pp. 29331-29340.

Barret, C., Roy, C., Montcourrier, P., Mangeat, P. & Niggli, V. 2000, "Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) binding site in the NH(2)-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution", *The Journal of cell biology*, vol. 151, no. 5, pp. 1067-1080.

Bashour, A.M., Fullerton, A.T., Hart, M.J. & Bloom, G.S. 1997, "IQGAP1, a Rac- and Cdc42-binding protein, directly binds and cross-links microfilaments", *The Journal of cell biology*, vol. 137, no. 7, pp. 1555-1566.

Batchelor, C.L., Woodward, A.M. & Crouch, D.H. 2004, "Nuclear ERM (ezrin, radixin, moesin) proteins: regulation by cell density and nuclear import", *Experimental cell research*, vol. 296, no. 2, pp. 208-222.

Becker, T., Gerke, V., Kube, E. & Weber, K. 1992, "S100P, a novel Ca²⁺-binding protein from human placenta. cDNA cloning, recombinant protein expression and Ca²⁺ binding properties", *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 207, no. 2, pp. 541-547.

Beli, P., Mascheroni, D., Xu, D. & Innocenti, M. 2008, "WAVE and Arp2/3 jointly inhibit filopodium formation by entering into a complex with mDia2", *Nature cell biology*, vol. 10, no. 7, pp. 849-857.

Bensenor, L.B., Kan, H.M., Wang, N., Wallrabe, H., Davidson, L.A., Cai, Y., Schafer, D.A. & Bloom, G.S. 2007, "IQGAP1 regulates cell motility by linking growth factor signaling to actin assembly", *Journal of cell science*, vol. 120, no. Pt 4, pp. 658-669.

Berridge, M.J., Bootman, M.D. & Roderick, H.L. 2003, "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling", *Nature reviews.Molecular cell biology*, vol. 4, no. 7, pp. 517-529.

Berridge, M.J., Lipp, P. & Bootman, M.D. 2000, "The versatility and universality of calcium signalling", *Nature reviews.Molecular cell biology*, vol. 1, no. 1, pp. 11-21.

- Berryman, M. & Bretscher, A. 2000, "Identification of a novel member of the chloride intracellular channel gene family (CLIC5) that associates with the actin cytoskeleton of placental microvilli", *Molecular biology of the cell*, vol. 11, no. 5, pp. 1509-1521.
- Bertram, J., Palfner, K., Hiddemann, W. & Kneba, M. 1998, "Elevated expression of S100P, CAPL and MAGE 3 in doxorubicin-resistant cell lines: comparison of mRNA differential display reverse transcription-polymerase chain reaction and subtractive suppressive hybridization for the analysis of differential gene expression", *Anti-Cancer Drugs*, vol. 9, no. 4, pp. 311-317.
- Bhattacharya, S., Bunick, C.G. & Chazin, W.J. 2004, "Target selectivity in EF-hand calcium binding proteins", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1742, no. 1-3, pp. 69-79.
- Bhattacharya, S., Large, E., Heizmann, C.W., Hemmings, B. & Chazin, W.J. 2003, "Structure of the Ca²⁺/S100B/NDR kinase peptide complex: insights into S100 target specificity and activation of the kinase", *Biochemistry*, vol. 42, no. 49, pp. 14416-14426.
- Bierhaus, A., Humpert, P.M., Morcos, M., Wendt, T., Chavakis, T., Arnold, B., Stern, D.M. & Nawroth, P.P. 2005, "Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products", *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, vol. 83, no. 11, pp. 876-886.
- Blagoev, B., Ong, S.E., Kratchmarova, I. & Mann, M. 2004, "Temporal analysis of phosphotyrosine-dependent signaling networks by quantitative proteomics", *Nature biotechnology*, vol. 22, no. 9, pp. 1139-1145.
- Bonilha, V.L., Rayborn, M.E., Saotome, I., McClatchey, A.I. & Hollyfield, J.G. 2006, "Microvilli defects in retinas of ezrin knockout mice", *Experimental eye research*, vol. 82, no. 4, pp. 720-729.
- Borm, B., Requardt, R.P., Herzog, V. & Kirfel, G. 2005, "Membrane ruffles in cell migration: indicators of inefficient lamellipodia adhesion and compartments of actin filament reorganization", *Experimental cell research*, vol. 302, no. 1, pp. 83-95.
- Bos, J.L., Rehmann, H. & Wittinghofer, A. 2007, "GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins", *Cell*, vol. 129, no. 5, pp. 865-877.
- Bretscher, A. 1989, "Rapid phosphorylation and reorganization of ezrin and spectrin accompany morphological changes induced in A-431 cells by epidermal growth factor", *The Journal of cell biology*, vol. 108, no. 3, pp. 921-930.
- Bretscher, A. 1983, "Purification of an 80,000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells", *The Journal of cell biology*, vol. 97, no. 2, pp. 425-432.
- Bretscher, A., Edwards, K. & Fehon, R.G. 2002, "ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex", *Nature reviews.Molecular cell biology*, vol. 3, no. 8, pp. 586-599.
- Briggs, M.W., Li, Z. & Sacks, D.B. 2002, "IQGAP1-mediated stimulation of transcriptional co-activation by beta-catenin is modulated by calmodulin", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 9, pp. 7453-7465.
- Briggs, M.W. & Sacks, D.B. 2003a, "IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation", *EMBO reports*, vol. 4, no. 6, pp. 571-574.
- Briggs, M.W. & Sacks, D.B. 2003b, "IQGAP1 as signal integrator: Ca²⁺, calmodulin, Cdc42 and the cytoskeleton", *FEBS letters*, vol. 542, no. 1-3, pp. 7-11.
- Brill, S., Li, S., Lyman, C.W., Church, D.M., Wasmuth, J.J., Weissbach, L., Bernards, A. & Snijders, A.J. 1996, "The Ras GTPase-activating-protein-related human protein IQGAP2 harbors a potential actin binding domain and interacts with calmodulin and Rho family GTPases", *Molecular and cellular biology*, vol. 16, no. 9, pp. 4869-4878.
- Brodersen, D.E., Etzerodt, M., Madsen, P., Celis, J.E., Thogersen, H.C., Nyborg, J. & Kjeldgaard, M. 1998, "EF-hands at atomic resolution: the structure of human psoriasin (S100A7) solved by MAD phasing", *Structure (London, England : 1993)*, vol. 6, no. 4, pp. 477-489.
- Brown, M.D., Bry, L., Li, Z. & Sacks, D.B. 2008, "Actin pedestal formation by enteropathogenic Escherichia coli is regulated by IQGAP1, calcium, and calmodulin", *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 50, pp. 35212-35222.

- Brown, M.D. & Sacks, D.B. 2006, "IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP", *Trends in cell biology*, vol. 16, no. 5, pp. 242-249.
- Bullions, L.C. & Levine, A.J. 1998, "The role of beta-catenin in cell adhesion, signal transduction, and cancer", *Current opinion in oncology*, vol. 10, no. 1, pp. 81-87.
- Burridge, K. & Doughman, R. 2006, "Front and back by Rho and Rac", *Nature cell biology*, vol. 8, no. 8, pp. 781-782.
- Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J. & Der, C.J. 1998, "Increasing complexity of Ras signaling", *Oncogene*, vol. 17, no. 11 Reviews, pp. 1395-1413.
- Chambers, D.N. & Bretscher, A. 2005, "Ezrin mutants affecting dimerization and activation", *Biochemistry*, vol. 44, no. 10, pp. 3926-3932.
- Chao, A., Wang, T.H. & Lai, C.H. 2007, "Overview of microarray analysis of gene expression and its applications to cervical cancer investigation", *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, vol. 46, no. 4, pp. 363-373.
- Davey, G.E., Murmann, P. & Heizmann, C.W. 2001, "Intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells", *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 33, pp. 30819-30826.
- Denker, S.P., Huang, D.C., Orlowski, J., Furthmayr, H. & Barber, D.L. 2000, "Direct binding of the Na⁺-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H(+) translocation", *Molecular cell*, vol. 6, no. 6, pp. 1425-1436.
- Diederichs, S., Bulk, E., Steffen, B., Ji, P., Tickenbrock, L., Lang, K., Zanker, K.S., Metzger, R., Schneider, P.M., Gerke, V., Thomas, M., Berdel, W.E., Serve, H. & Muller-Tidow, C. 2004, "S100 family members and trypsinogens are predictors of distant metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer", *Cancer research*, vol. 64, no. 16, pp. 5564-5569.
- Doi, Y., Itoh, M., Yonemura, S., Ishihara, S., Takano, H., Noda, T. & Tsukita, S. 1999, "Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout", *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 4, pp. 2315-2321.
- Donato, R. 1999, "Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1450, no. 3, pp. 191-231.
- Downen, S.E., Crnogorac-Jurcevic, T., Gangeswaran, R., Hansen, M., Eloranta, J.J., Bhakta, V., Brentnall, T.A., Luttgies, J., Kloppel, G. & Lemoine, N.R. 2005, "Expression of S100P and its novel binding partner S100PBPR in early pancreatic cancer", *The American journal of pathology*, vol. 166, no. 1, pp. 81-92.
- Eckert, R.L., Broome, A.M., Ruse, M., Robinson, N., Ryan, D. & Lee, K. 2004, "S100 proteins in the epidermis", *The Journal of investigative dermatology*, vol. 123, no. 1, pp. 23-33.
- Erickson, J.W., Cerione, R.A. & Hart, M.J. 1997, "Identification of an actin cytoskeletal complex that includes IQGAP and the Cdc42 GTPase", *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 39, pp. 24443-24447.
- Fievet, B.T., Gautreau, A., Roy, C., Del Maestro, L., Mangeat, P., Louvard, D. & Arpin, M. 2004, "Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin", *The Journal of cell biology*, vol. 164, no. 5, pp. 653-659.
- Filipek, A., Jastrzebska, B., Nowotny, M. & Kuznicki, J. 2002, "CacyBP/SIP, a calcyclin and Siah-1-interacting protein, binds EF-hand proteins of the S100 family", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 32, pp. 28848-28852.
- Foell, D. & Roth, J. 2004, "Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease", *Arthritis and Rheumatism*, vol. 50, no. 12, pp. 3762-3771.
- Fritz, G., Heizmann, C.W. & Kroneck, P.M. 1998, "Probing the structure of the human Ca²⁺- and Zn²⁺-binding protein S100A3: spectroscopic investigations of its transition metal ion complexes, and three-dimensional structural model", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1448, no. 2, pp. 264-276.

- Fukata, M., Kuroda, S., Fujii, K., Nakamura, T., Shoji, I., Matsuura, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kikuchi, A. & Kaibuchi, K. 1997, "Regulation of cross-linking of actin filament by IQGAP1, a target for Cdc42", *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 47, pp. 29579-29583.
- Fukata, M., Kuroda, S., Nakagawa, M., Kawajiri, A., Itoh, N., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S., Fujisawa, H., Kikuchi, A. & Kaibuchi, K. 1999, "Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin", *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 37, pp. 26044-26050.
- Fukata, M., Nakagawa, M. & Kaibuchi, K. 2003, "Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration", *Current opinion in cell biology*, vol. 15, no. 5, pp. 590-597.
- Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F. & Kaibuchi, K. 2002, "Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170", *Cell*, vol. 109, no. 7, pp. 873-885.
- Ganitkevich, V.Y. 2003, "The role of mitochondria in cytoplasmic Ca²⁺ cycling", *Experimental physiology*, vol. 88, no. 1, pp. 91-97.
- Gao, J.H., He, Z.J., Wang, Q., Li, X., Li, Y.X., Liu, M., Zheng, J.H. & Tang, H. 2008, "Low expression of S100P associated with paclitaxel resistance in ovarian cancer cell line", *Chinese medical journal*, vol. 121, no. 16, pp. 1563-1568.
- Garbuglia, M., Verzini, M., Hofmann, A., Huber, R. & Donato, R. 2000, "S100A1 and S100B interactions with annexins", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1498, no. 2-3, pp. 192-206.
- Gary, R. & Bretscher, A. 1995, "Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site", *Molecular biology of the cell*, vol. 6, no. 8, pp. 1061-1075.
- Gerlach, R., Demel, G., Konig, H.G., Gross, U., Prehn, J.H., Raabe, A., Seifert, V. & Kogel, D. 2006, "Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress", *Neuroscience*, vol. 141, no. 4, pp. 1697-1701.
- Golub, T. & Caroni, P. 2005, "PI(4,5)P2-dependent microdomain assemblies capture microtubules to promote and control leading edge motility", *The Journal of cell biology*, vol. 169, no. 1, pp. 151-165.
- Gould, K.L., Bretscher, A., Esch, F.S. & Hunter, T. 1989, "cDNA cloning and sequencing of the protein-tyrosine kinase substrate, ezrin, reveals homology to band 4.1", *The EMBO journal*, vol. 8, no. 13, pp. 4133-4142.
- Gribenko, A.V., Hopper, J.E. & Makhatadze, G.I. 2001, "Molecular characterization and tissue distribution of a novel member of the S100 family of EF-hand proteins", *Biochemistry*, vol. 40, no. 51, pp. 15538-15548.
- Grohmanova, K., Schlaepfer, D., Hess, D., Gutierrez, P., Beck, M. & Kroschewski, R. 2004, "Phosphorylation of IQGAP1 modulates its binding to Cdc42, revealing a new type of rho-GTPase regulator", *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 47, pp. 48495-48504.
- Hammacher, A., Thompson, E.W. & Williams, E.D. 2005, "Interleukin-6 is a potent inducer of S100P, which is up-regulated in androgen-refractory and metastatic prostate cancer", *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 37, no. 2, pp. 442-450.
- Hart, M.J., Callow, M.G., Souza, B. & Polakis, P. 1996, "IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs", *The EMBO journal*, vol. 15, no. 12, pp. 2997-3005.
- Hatakeyama, T., Okada, M., Shimamoto, S., Kubota, Y. & Kobayashi, R. 2004, "Identification of intracellular target proteins of the calcium-signaling protein S100A12", *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 271, no. 18, pp. 3765-3775.
- He, Z., Gao, J., Wang, Q., Liu, M., Li, Y., Li, X., Tang, H. & Zheng, J. 2008, "S100P contributes to chemosensitivity of human ovarian cancer cell line OVCAR3", *Oncology reports*, vol. 20, no. 2, pp. 325-332.
- Heiska, L., Alfthan, K., Gronholm, M., Vilja, P., Vaheri, A. & Carpen, O. 1998, "Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate", *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 34, pp. 21893-21900.

- Heizmann, C.W., Ackermann, G.E. & Galichet, A. 2007, "Pathologies involving the S100 proteins and RAGE", *Sub-cellular biochemistry*, vol. 45, pp. 93-138.
- Heizmann, C.W. & Cox, J.A. 1998, "New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca²⁺-, Zn²⁺- and Cu²⁺-binding protein family", *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, vol. 11, no. 4, pp. 383-397.
- Ho, Y.D., Joyal, J.L., Li, Z. & Sacks, D.B. 1999, "IQGAP1 integrates Ca²⁺/calmodulin and Cdc42 signaling", *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 1, pp. 464-470.
- Hsu, S.C., Galceran, J. & Grosschedl, R. 1998, "Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin", *Molecular and cellular biology*, vol. 18, no. 8, pp. 4807-4818.
- Hughes, S.C. & Fehon, R.G. 2007, "Understanding ERM proteins--the awesome power of genetics finally brought to bear", *Current opinion in cell biology*, vol. 19, no. 1, pp. 51-56.
- Inman, K.G., Yang, R., Rustandi, R.R., Miller, K.E., Baldissieri, D.M. & Weber, D.J. 2002, "Solution NMR structure of S100B bound to the high-affinity target peptide TRTK-12", *Journal of Molecular Biology*, vol. 324, no. 5, pp. 1003-1014.
- Ishikawa, H., Tamura, A., Matsui, T., Sasaki, H., Hakoshima, T., Tsukita, S. & Tsukita, S. 2001, "Structural conversion between open and closed forms of radixin: low-angle shadowing electron microscopy", *Journal of Molecular Biology*, vol. 310, no. 5, pp. 973-978.
- Janke, M., Herrig, A., Austermann, J., Gerke, V., Steinem, C. & Janshoff, A. 2008, "Actin binding of ezrin is activated by specific recognition of PIP2-functionalized lipid bilayers", *Biochemistry*, vol. 47, no. 12, pp. 3762-3769.
- Jin, G., Wang, S., Hu, X., Jing, Z., Chen, J., Ying, K., Xie, Y. & Mao, Y. 2003, "Characterization of the tissue-specific expression of the s100P gene which encodes an EF-hand Ca²⁺-binding protein", *Molecular biology reports*, vol. 30, no. 4, pp. 243-248.
- Johnson, M., Sharma, M. & Henderson, B.R. 2009, "IQGAP1 regulation and roles in cancer", *Cellular signalling*, vol. 21, no. 10, pp. 1471-1478.
- Joyal, J.L., Annan, R.S., Ho, Y.D., Huddleston, M.E., Carr, S.A., Hart, M.J. & Sacks, D.B. 1997, "Calmodulin modulates the interaction between IQGAP1 and Cdc42. Identification of IQGAP1 by nanoelectrospray tandem mass spectrometry", *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 24, pp. 15419-15425.
- Kikuchi, S., Hata, M., Fukumoto, K., Yamane, Y., Matsui, T., Tamura, A., Yonemura, S., Yamagishi, H., Keppler, D., Tsukita, S. & Tsukita, S. 2002, "Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes", *Nature genetics*, vol. 31, no. 3, pp. 320-325.
- Kita, H., Hikichi, Y., Hikami, K., Tsuneyama, K., Cui, Z.G., Osawa, H., Ohnishi, H., Mutoh, H., Hoshino, H., Bowlus, C.L., Yamamoto, H. & Sugano, K. 2006, "Differential gene expression between flat adenoma and normal mucosa in the colon in a microarray analysis", *Journal of gastroenterology*, vol. 41, no. 11, pp. 1053-1063.
- Kolch, W. 2005, "Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors", *Nature reviews.Molecular cell biology*, vol. 6, no. 11, pp. 827-837.
- Koltzsch, M. & Gerke, V. 2000, "Identification of hydrophobic amino acid residues involved in the formation of S100P homodimers in vivo", *Biochemistry*, vol. 39, no. 31, pp. 9533-9539.
- Koltzsch, M., Neumann, C., Konig, S. & Gerke, V. 2003, "Ca²⁺-dependent binding and activation of dormant ezrin by dimeric S100P", *Molecular biology of the cell*, vol. 14, no. 6, pp. 2372-2384.
- Kratchmarova, I., Blagoev, B., Haack-Sorensen, M., Kasseem, M. & Mann, M. 2005, "Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 308, no. 5727, pp. 1472-1477.
- Kretsinger, R.H. & Nockolds, C.E. 1973, "Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description", *The Journal of biological chemistry*, vol. 248, no. 9, pp. 3313-3326.

- Kube, E., Becker, T., Weber, K. & Gerke, V. 1992, "Protein-protein interaction studied by site-directed mutagenesis. Characterization of the annexin II-binding site on p11, a member of the S100 protein family", *The Journal of biological chemistry*, vol. 267, no. 20, pp. 14175-14182.
- Kuroda, S., Fukata, M., Kobayashi, K., Nakafuku, M., Nomura, N., Iwamatsu, A. & Kaibuchi, K. 1996, "Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1", *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 38, pp. 23363-23367.
- Kuroda, S., Fukata, M., Nakagawa, M., Fujii, K., Nakamura, T., Ookubo, T., Izawa, I., Nagase, T., Nomura, N., Tani, H., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S. & Kaibuchi, K. 1998, "Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 281, no. 5378, pp. 832-835.
- Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, X.F., Banerjee, P., Brautigan, D.L., Rapp, U.R. & Avruch, J. 1992, "Raf-1 activates MAP kinase", *Nature*, vol. 358, no. 6385, pp. 417-421.
- Le Clainche, C., Schlaepfer, D., Ferrari, A., Klingauf, M., Grohmanova, K., Veligodskiy, A., Didry, D., Le, D., Egile, C., Carlier, M.F. & Kroschewski, R. 2007, "IQGAP1 stimulates actin assembly through the N-WASP-Arp2/3 pathway", *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 1, pp. 426-435.
- Leclerc, E., Fritz, G., Vetter, S.W. & Heizmann, C.W. 2009, "Binding of S100 proteins to RAGE: an update", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1793, no. 6, pp. 993-1007.
- Lewit-Bentley, A. & Rety, S. 2000, "EF-hand calcium-binding proteins", *Current opinion in structural biology*, vol. 10, no. 6, pp. 637-643.
- Li, Z., Kim, S.H., Higgins, J.M., Brenner, M.B. & Sacks, D.B. 1999, "IQGAP1 and calmodulin modulate E-cadherin function", *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 53, pp. 37885-37892.
- Li, Z., McNulty, D.E., Marler, K.J., Lim, L., Hall, C., Annan, R.S. & Sacks, D.B. 2005, "IQGAP1 promotes neurite outgrowth in a phosphorylation-dependent manner", *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, no. 14, pp. 13871-13878.
- Li, Z. & Sacks, D.B. 2003, "Elucidation of the interaction of calmodulin with the IQ motifs of IQGAP1", *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 6, pp. 4347-4352.
- Lustig, B. & Behrens, J. 2003, "The Wnt signaling pathway and its role in tumor development", *Journal of cancer research and clinical oncology*, vol. 129, no. 4, pp. 199-221.
- Mackay, A., Jones, C., Dexter, T., Silva, R.L., Bulmer, K., Jones, A., Simpson, P., Harris, R.A., Jat, P.S., Neville, A.M., Reis, L.F., Lakhani, S.R. & O'Hare, M.J. 2003, "cDNA microarray analysis of genes associated with ERBB2 (HER2/neu) overexpression in human mammary luminal epithelial cells", *Oncogene*, vol. 22, no. 17, pp. 2680-2688.
- Marenholz, I., Heizmann, C.W. & Fritz, G. 2004, "S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature)", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 322, no. 4, pp. 1111-1122.
- Marshall, C.J. 1995, "Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation", *Cell*, vol. 80, no. 2, pp. 179-185.
- Mataraza, J.M., Briggs, M.W., Li, Z., Frank, R. & Sacks, D.B. 2003, "Identification and characterization of the Cdc42-binding site of IQGAP1", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 305, no. 2, pp. 315-321.
- Mataraza, J.M., Li, Z., Jeong, H.W., Brown, M.D. & Sacks, D.B. 2007, "Multiple proteins mediate IQGAP1-stimulated cell migration", *Cellular signalling*, vol. 19, no. 9, pp. 1857-1865.
- Mateer, S.C., McDaniel, A.E., Nicolas, V., Habermacher, G.M., Lin, M.J., Cromer, D.A., King, M.E. & Bloom, G.S. 2002, "The mechanism for regulation of the F-actin binding activity of IQGAP1 by calcium/calmodulin", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 14, pp. 12324-12333.
- Mateer, S.C., Morris, L.E., Cromer, D.A., Bensenor, L.B. & Bloom, G.S. 2004, "Actin filament binding by a monomeric IQGAP1 fragment with a single calponin homology domain", *Cell motility and the cytoskeleton*, vol. 58, no. 4, pp. 231-241.

- Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., Tsukita, S. & Tsukita, S. 1998, "Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association", *The Journal of cell biology*, vol. 140, no. 3, pp. 647-657.
- Matsui, T., Yonemura, S., Tsukita, S. & Tsukita, S. 1999, "Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases", *Current biology : CB*, vol. 9, no. 21, pp. 1259-1262.
- Matsumoto, T. & Claesson-Welsh, L. 2001, "VEGF receptor signal transduction", *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, vol. 2001, no. 112, pp. re21.
- Maudsley, S., Zamah, A.M., Rahman, N., Blitzer, J.T., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. & Hall, R.A. 2000, "Platelet-derived growth factor receptor association with Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor potentiates receptor activity", *Molecular and cellular biology*, vol. 20, no. 22, pp. 8352-8363.
- Mbele, G.O., Deloulme, J.C., Gentil, B.J., Delphin, C., Ferro, M., Garin, J., Takahashi, M. & Baudier, J. 2002, "The zinc- and calcium-binding S100B interacts and co-localizes with IQGAP1 during dynamic rearrangement of cell membranes", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 51, pp. 49998-50007.
- McCormick, F. 1993, "Signal transduction. How receptors turn Ras on", *Nature*, vol. 363, no. 6424, pp. 15-16.
- McKay, M.M., Ritt, D.A. & Morrison, D.K. 2009, "Signaling dynamics of the KSR1 scaffold complex", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 27, pp. 11022-11027.
- Meyer, R.D., Sacks, D.B. & Rahimi, N. 2008, "IQGAP1-dependent signaling pathway regulates endothelial cell proliferation and angiogenesis", *PLoS one*, vol. 3, no. 12, pp. e3848.
- Moore, B.W. 1965, "A soluble protein characteristic of the nervous system", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 19, no. 6, pp. 739-744.
- Moroz, O.V., Antson, A.A., Dodson, E.J., Burrell, H.J., Grist, S.J., Lloyd, R.M., Maitland, N.J., Dodson, G.G., Wilson, K.S., Lukanidin, E. & Bronstein, I.B. 2002, "The structure of S100A12 in a hexameric form and its proposed role in receptor signalling", *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 58, no. Pt 3, pp. 407-413.
- Morrison, D.K. & Cutler, R.E. 1997, "The complexity of Raf-1 regulation", *Current opinion in cell biology*, vol. 9, no. 2, pp. 174-179.
- Nakamura, F., Amieva, M.R. & Furthmayr, H. 1995, "Phosphorylation of threonine 558 in the carboxyl-terminal actin-binding domain of moesin by thrombin activation of human platelets", *The Journal of biological chemistry*, vol. 270, no. 52, pp. 31377-31385.
- Namba, T., Homan, T., Nishimura, T., Mima, S., Hoshino, T. & Mizushima, T. 2009, "Up-regulation of S100P expression by non-steroidal anti-inflammatory drugs and its role in anti-tumorigenic effects", *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 7, pp. 4158-4167.
- Ng, T., Parsons, M., Hughes, W.E., Monypenny, J., Zicha, D., Gautreau, A., Arpin, M., Gschmeissner, S., Verveer, P.J., Bastiaens, P.I. & Parker, P.J. 2001, "Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility", *The EMBO journal*, vol. 20, no. 11, pp. 2723-2741.
- Niggli, V., Andreoli, C., Roy, C. & Mangeat, P. 1995, "Identification of a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-binding domain in the N-terminal region of ezrin", *FEBS letters*, vol. 376, no. 3, pp. 172-176.
- Nishikawa, T., Lee, I.S., Shiraishi, N., Ishikawa, T., Ohta, Y. & Nishikimi, M. 1997, "Identification of S100b protein as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage", *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 37, pp. 23037-23041.
- Noritake, J., Fukata, M., Sato, K., Nakagawa, M., Watanabe, T., Izumi, N., Wang, S., Fukata, Y. & Kaibuchi, K. 2004, "Positive role of IQGAP1, an effector of Rac1, in actin-meshwork formation at sites of cell-cell contact", *Molecular biology of the cell*, vol. 15, no. 3, pp. 1065-1076.

- Noritake, J., Watanabe, T., Sato, K., Wang, S. & Kaibuchi, K. 2005, "IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration", *Journal of cell science*, vol. 118, no. Pt 10, pp. 2085-2092.
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K., and Luckow, V. A. 1992, "Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual", New York, N. Y.: W. H. Freeman and Company.
- Ostendorp, T., Leclerc, E., Galichet, A., Koch, M., Demling, N., Weigle, B., Heizmann, C.W., Kroneck, P.M. & Fritz, G. 2007, "Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100B", *The EMBO journal*, vol. 26, no. 16, pp. 3868-3878.
- Osterloh, D., Ivanenkov, V.V. & Gerke, V. 1998, "Hydrophobic residues in the C-terminal region of S100A1 are essential for target protein binding but not for dimerization", *Cell calcium*, vol. 24, no. 2, pp. 137-151.
- Papin, C., Eychene, A., Brunet, A., Pages, G., Pouyssegur, J., Calothy, G. & Barnier, J.V. 1995, "B-Raf protein isoforms interact with and phosphorylate Mek-1 on serine residues 218 and 222", *Oncogene*, vol. 10, no. 8, pp. 1647-1651.
- Paradela, A., Bravo, S.B., Henriquez, M., Riquelme, G., Gavilanes, F., Gonzalez-Ros, J.M. & Albar, J.P. 2005, "Proteomic analysis of apical microvillous membranes of syncytiotrophoblast cells reveals a high degree of similarity with lipid rafts", *Journal of proteome research*, vol. 4, no. 6, pp. 2435-2441.
- Pearson, M.A., Reczek, D., Bretscher, A. & Karplus, P.A. 2000, "Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain", *Cell*, vol. 101, no. 3, pp. 259-270.
- Perrin, D.D. & Watt, A.E. 1971, "Complex formation of zinc and cadmium with glutathione", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 230, no. 1, pp. 96-104.
- Peskind, E.R., Griffin, W.S., Akama, K.T., Raskind, M.A. & Van Eldik, L.J. 2001, "Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease", *Neurochemistry international*, vol. 39, no. 5-6, pp. 409-413.
- Phillips-Mason, P.J., Gates, T.J., Major, D.L., Sacks, D.B. & Brady-Kalnay, S.M. 2006, "The receptor protein-tyrosine phosphatase PTPmu interacts with IQGAP1", *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, no. 8, pp. 4903-4910.
- Pietromonaco, S.F., Simons, P.C., Altman, A. & Elias, L. 1998, "Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence", *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 13, pp. 7594-7603.
- Polakis, P. 2000, "Wnt signaling and cancer", *Genes & development*, vol. 14, no. 15, pp. 1837-1851.
- Polakis, P. 1999, "The oncogenic activation of beta-catenin", *Current opinion in genetics & development*, vol. 9, no. 1, pp. 15-21.
- Pollitt, A.Y. & Insall, R.H. 2009, "WASP and SCAR/WAVE proteins: the drivers of actin assembly", *Journal of cell science*, vol. 122, no. Pt 15, pp. 2575-2578.
- Pumiglia, K.M. & Decker, S.J. 1997, "Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 2, pp. 448-452.
- Qui, M.S. & Green, S.H. 1992, "PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity", *Neuron*, vol. 9, no. 4, pp. 705-717.
- Remppis, A., Greten, T., Schafer, B.W., Hunziker, P., Erne, P., Katus, H.A. & Heizmann, C.W. 1996, "Altered expression of the Ca(2+)-binding protein S100A1 in human cardiomyopathy", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1313, no. 3, pp. 253-257.
- Ren, J.G., Li, Z. & Sacks, D.B. 2008, "IQGAP1 integrates Ca²⁺/calmodulin and B-Raf signaling", *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 34, pp. 22972-22982.
- Ren, J.G., Li, Z. & Sacks, D.B. 2007, "IQGAP1 modulates activation of B-Raf", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 25, pp. 10465-10469.

- Rety, S., Sopkova, J., Renouard, M., Osterloh, D., Gerke, V., Tabaries, S., Russo-Marie, F. & Lewit-Bentley, A. 1999, "The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide", *Nature structural biology*, vol. 6, no. 1, pp. 89-95.
- Ridley, A.J. & Hall, A. 1992, "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors", *Cell*, vol. 70, no. 3, pp. 389-399.
- Rintala-Dempsey, A.C., Santamaria-Kisiel, L., Liao, Y., Lajoie, G. & Shaw, G.S. 2006, "Insights into S100 target specificity examined by a new interaction between S100A11 and annexin A2", *Biochemistry*, vol. 45, no. 49, pp. 14695-14705.
- Roy, M., Li, Z. & Sacks, D.B. 2005, "IQGAP1 is a scaffold for mitogen-activated protein kinase signaling", *Molecular and cellular biology*, vol. 25, no. 18, pp. 7940-7952.
- Roy, M., Li, Z. & Sacks, D.B. 2004, "IQGAP1 binds ERK2 and modulates its activity", *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 17, pp. 17329-17337.
- Rustandi, R.R., Baldisseri, D.M. & Weber, D.J. 2000, "Structure of the negative regulatory domain of p53 bound to S100B(beta-beta)", *Nature structural biology*, vol. 7, no. 7, pp. 570-574.
- Salama, I., Malone, P.S., Mihaimeed, F. & Jones, J.L. 2008, "A review of the S100 proteins in cancer", *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, vol. 34, no. 4, pp. 357-364.
- Saleh, H.S., Merkel, U., Geissler, K.J., Sperka, T., Sechi, A., Breithaupt, C. & Morrison, H. 2009, "Properties of an ezrin mutant defective in F-actin binding", *Journal of Molecular Biology*, vol. 385, no. 4, pp. 1015-1031.
- Santamaria-Kisiel, L., Rintala-Dempsey, A.C. & Shaw, G.S. 2006, "Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family", *The Biochemical journal*, vol. 396, no. 2, pp. 201-214.
- Sato, N., Fukushima, N., Matsubayashi, H. & Goggins, M. 2004, "Identification of maspin and S100P as novel hypomethylation targets in pancreatic cancer using global gene expression profiling", *Oncogene*, vol. 23, no. 8, pp. 1531-1538.
- Schafer, B.W., Fritschy, J.M., Murmann, P., Troxler, H., Durussel, I., Heizmann, C.W. & Cox, J.A. 2000, "Brain S100A5 is a novel calcium-, zinc-, and copper ion-binding protein of the EF-hand superfamily", *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 39, pp. 30623-30630.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R. & Wittinghofer, A. 1998, "GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site", *Trends in biochemical sciences*, vol. 23, no. 7, pp. 257-262.
- Schlessinger, J. 2000, "Cell signaling by receptor tyrosine kinases", *Cell*, vol. 103, no. 2, pp. 211-225.
- Schmidt, V.A., Scudder, L., Devoe, C.E., Bernards, A., Cupit, L.D. & Bahou, W.F. 2003, "IQGAP2 functions as a GTP-dependent effector protein in thrombin-induced platelet cytoskeletal reorganization", *Blood*, vol. 101, no. 8, pp. 3021-3028.
- Schrack, C., Fischer, A., Srivastava, D.P., Tronson, N.C., Penzes, P. & Radulovic, J. 2007, "N-cadherin regulates cytoskeletally associated IQGAP1/ERK signaling and memory formation", *Neuron*, vol. 55, no. 5, pp. 786-798.
- Schwaller, B. 2009, "The continuing disappearance of "pure" Ca²⁺ buffers", *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, vol. 66, no. 2, pp. 275-300.
- Serrador, J.M., Alonso-Lebrero, J.L., del Pozo, M.A., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Calvo, J., Lozano, F. & Sanchez-Madrid, F. 1997, "Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization", *The Journal of cell biology*, vol. 138, no. 6, pp. 1409-1423.
- Short, D.B., Trotter, K.W., Reczek, D., Kreda, S.M., Bretscher, A., Boucher, R.C., Stutts, M.J. & Milgram, S.L. 1998, "An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton", *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 31, pp. 19797-19801.

- Smith, M.J., Hardy, W.R., Li, G.Y., Goudreault, M., Hersch, S., Metalnikov, P., Starostine, A., Pawson, T. & Ikura, M. 2010, "The PTB domain of ShcA couples receptor activation to the cytoskeletal regulator IQGAP1", *The EMBO journal*, vol. 29, no. 5, pp. 884-896.
- Speck, O., Hughes, S.C., Noren, N.K., Kulikauskas, R.M. & Fehon, R.G. 2003, "Moesin functions antagonistically to the Rho pathway to maintain epithelial integrity", *Nature*, vol. 421, no. 6918, pp. 83-87.
- Strehler, E.E. & Treiman, M. 2004, "Calcium pumps of plasma membrane and cell interior", *Current Molecular Medicine*, vol. 4, no. 3, pp. 323-335.
- Swart-Mataraza, J.M., Li, Z. & Sacks, D.B. 2002, "IQGAP1 is a component of Cdc42 signaling to the cytoskeleton", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 27, pp. 24753-24763.
- Takahashi, K., Sasaki, T., Mammoto, A., Takaishi, K., Kameyama, T., Tsukita, S. & Takai, Y. 1997, "Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein", *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 37, pp. 23371-23375.
- Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J., Kawai, A. & Tsukita, S. 1994, "ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons", *The Journal of cell biology*, vol. 126, no. 2, pp. 391-401.
- Usatyuk, P.V., Gorshkova, I.A., He, D., Zhao, Y., Kalari, S.K., Garcia, J.G. & Natarajan, V. 2009, "Phospholipase D-mediated activation of IQGAP1 through Rac1 regulates hyperoxia-induced p47phox translocation and reactive oxygen species generation in lung endothelial cells", *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 22, pp. 15339-15352.
- Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M. & Cooper, J.A. 1993, "Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf", *Cell*, vol. 74, no. 1, pp. 205-214.
- Wang, G., Zhang, S., Fernig, D.G., Spiller, D., Martin-Fernandez, M., Zhang, H., Ding, Y., Rao, Z., Rudland, P.S. & Barraclough, R. 2004, "Heterodimeric interaction and interfaces of S100A1 and S100P", *The Biochemical journal*, vol. 382, no. Pt 1, pp. 375-383.
- Wang, Q., Williamson, M., Bott, S., Brookman-Amisshah, N., Freeman, A., Nariculam, J., Hubank, M.J., Ahmed, A. & Masters, J.R. 2007a, "Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer", *Oncogene*, vol. 26, no. 45, pp. 6560-6565.
- Wang, S., Watanabe, T., Noritake, J., Fukata, M., Yoshimura, T., Itoh, N., Harada, T., Nakagawa, M., Matsuura, Y., Arimura, N. & Kaibuchi, K. 2007b, "IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth", *Journal of cell science*, vol. 120, no. Pt 4, pp. 567-577.
- Watanabe, T., Wang, S., Noritake, J., Sato, K., Fukata, M., Takefuji, M., Nakagawa, M., Izumi, N., Akiyama, T. & Kaibuchi, K. 2004, "Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration", *Developmental cell*, vol. 7, no. 6, pp. 871-883.
- Weissbach, L., Bernards, A. & Herion, D.W. 1998, "Binding of myosin essential light chain to the cytoskeleton-associated protein IQGAP1", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 251, no. 1, pp. 269-276.
- White, C.D., Brown, M.D. & Sacks, D.B. 2009, "IQGAPs in cancer: a family of scaffold proteins underlying tumorigenesis", *FEBS letters*, vol. 583, no. 12, pp. 1817-1824.
- Whiteman, H.J., Weeks, M.E., Downen, S.E., Barry, S., Timms, J.F., Lemoine, N.R. & Crnogorac-Jurcevic, T. 2007, "The role of S100P in the invasion of pancreatic cancer cells is mediated through cytoskeletal changes and regulation of cathepsin D", *Cancer research*, vol. 67, no. 18, pp. 8633-8642.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B. & Johnson, G.L. 1999, "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human", *Physiological Reviews*, vol. 79, no. 1, pp. 143-180.
- Winder, S.J. & Walsh, M.P. 1990, "Smooth muscle calponin. Inhibition of actomyosin MgATPase and regulation by phosphorylation", *The Journal of biological chemistry*, vol. 265, no. 17, pp. 10148-10155.

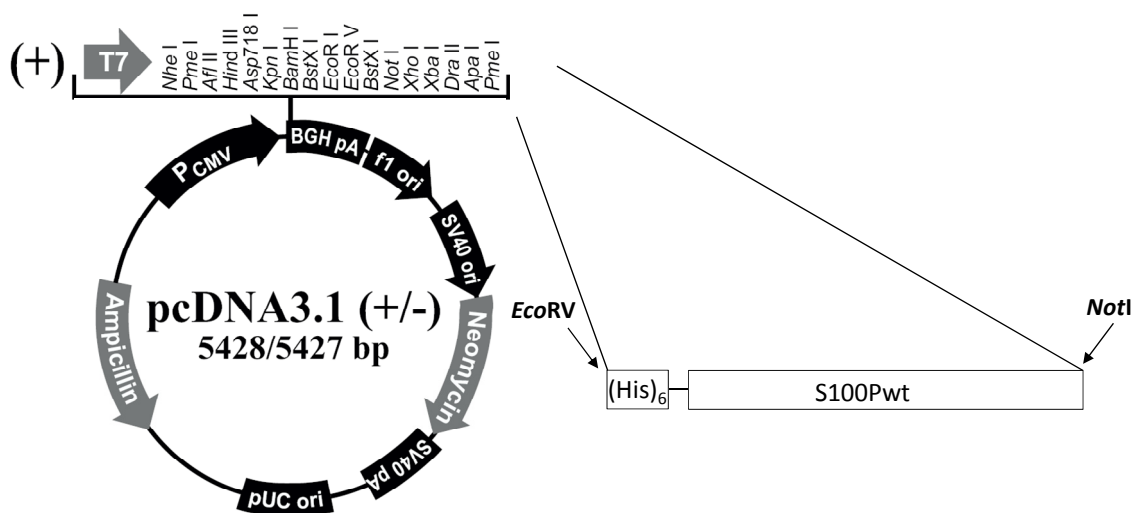
- Xie, J., Reverdatto, S., Frolov, A., Hoffmann, R., Burz, D.S. & Shekhtman, A. 2008, "Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE)", *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 40, pp. 27255-27269.
- Yamaoka-Tojo, M., Tojo, T., Kim, H.W., Hilenski, L., Patrushev, N.A., Zhang, L., Fukai, T. & Ushio-Fukai, M. 2006, "IQGAP1 mediates VE-cadherin-based cell-cell contacts and VEGF signaling at adherence junctions linked to angiogenesis", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 26, no. 9, pp. 1991-1997.
- Yamaoka-Tojo, M., Ushio-Fukai, M., Hilenski, L., Dikalov, S.I., Chen, Y.E., Tojo, T., Fukai, T., Fujimoto, M., Patrushev, N.A., Wang, N., Kontos, C.D., Bloom, G.S. & Alexander, R.W. 2004, "IQGAP1, a novel vascular endothelial growth factor receptor binding protein, is involved in reactive oxygen species--dependent endothelial migration and proliferation", *Circulation research*, vol. 95, no. 3, pp. 276-283.
- Yap, A.S., Brieher, W.M. & Gumbiner, B.M. 1997, "Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions", *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 13, pp. 119-146.
- Yap, K.L., Ames, J.B., Swindells, M.B. & Ikura, M. 1999, "Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily", *Proteins*, vol. 37, no. 3, pp. 499-507.
- Young, C.S., Kitamura, M., Hardy, S. & Kitajewski, J. 1998, "Wnt-1 induces growth, cytosolic beta-catenin, and Tcf/Lef transcriptional activation in Rat-1 fibroblasts", *Molecular and cellular biology*, vol. 18, no. 5, pp. 2474-2485.
- Zhang, H., Wang, G., Ding, Y., Wang, Z., Barraclough, R., Rudland, P.S., Fernig, D.G. & Rao, Z. 2003, "The crystal structure at 2Å resolution of the Ca²⁺-binding protein S100P", *Journal of Molecular Biology*, vol. 325, no. 4, pp. 785-794.
- Zimmer, D.B., Cornwall, E.H., Landar, A. & Song, W. 1995, "The S100 protein family: history, function, and expression", *Brain research bulletin*, vol. 37, no. 4, pp. 417-429.
- Zimmer, D.B., Wright Sadosky, P. & Weber, D.J. 2003, "Molecular mechanisms of S100-target protein interactions", *Microscopy research and technique*, vol. 60, no. 6, pp. 552-559.

7 Anhang

7.1 Plasmidkarten

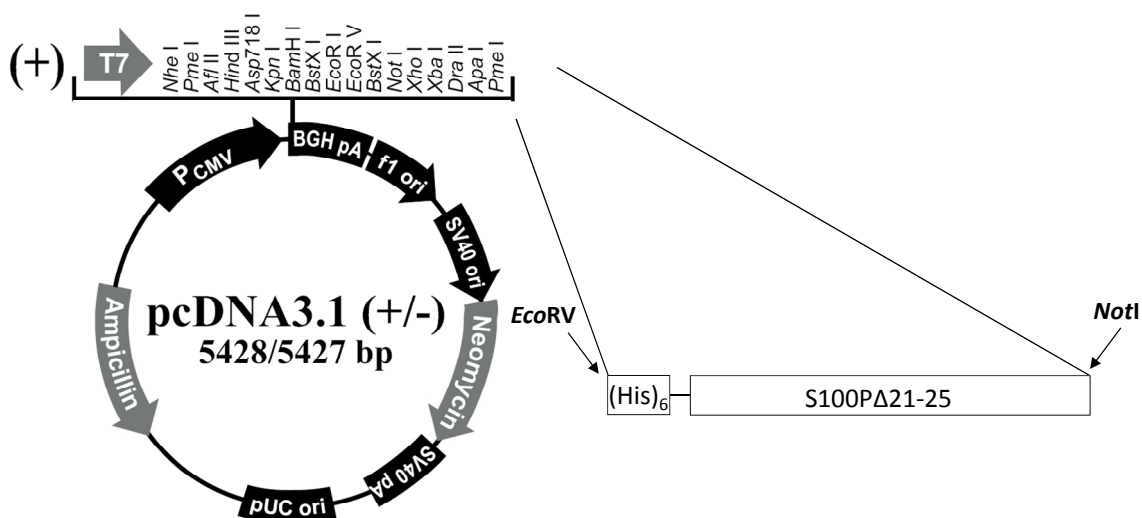
pcDNA-His-S100Pwt:

Insert: S100P cDNA
+ (His)₆-tag cDNA
Sequenzlänge: 396 bp
clone ID: NM_005980



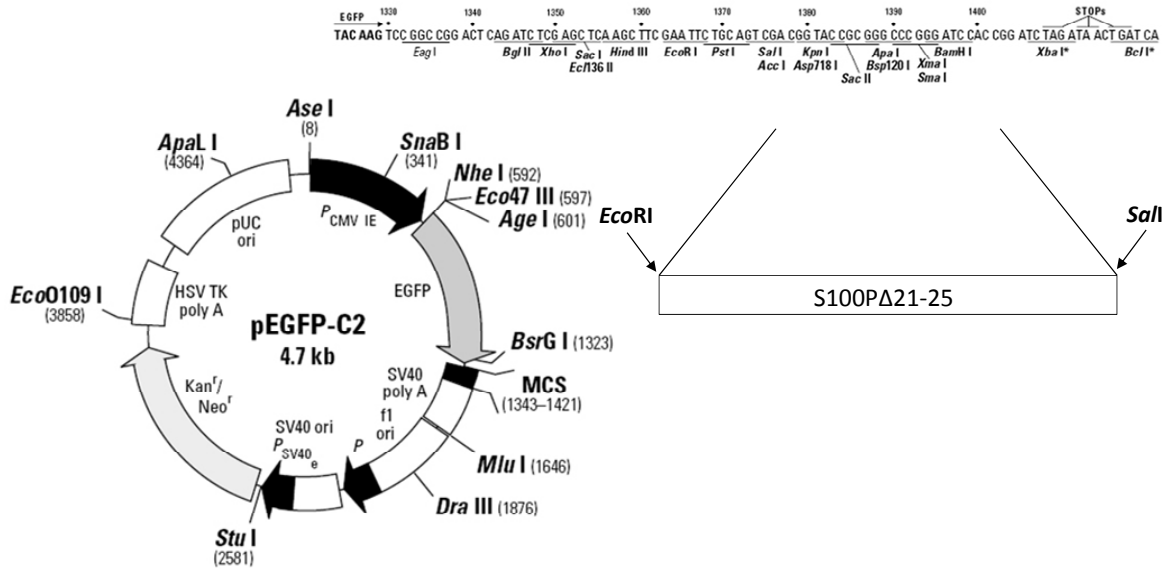
pcDNA-His-S100PΔ21-25:

Insert: S100P cDNA mit Deletion der bp 61-75 kodierend für AS 21-25
+ (His)₆-tag cDNA
Sequenzlänge: 381 bp
clone ID: NM_005980



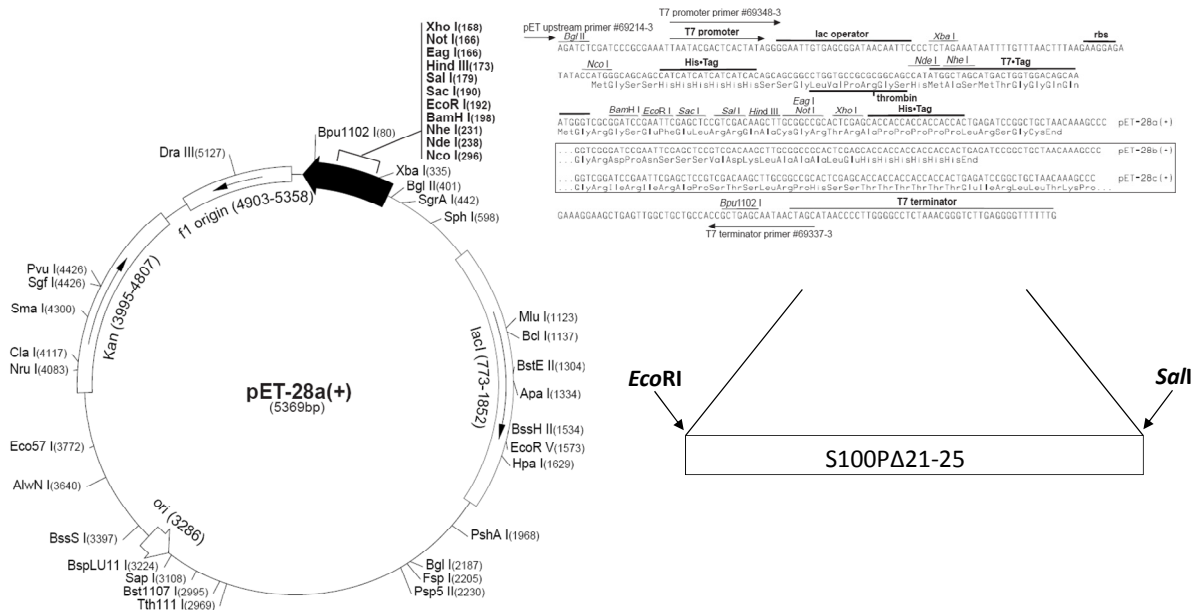
pEGFP-S100PΔ21-25:

Insert: S100P cDNA mit Deletion der bp 61-75 kodierend für AS 21-25
 Sequenzlänge: 273 bp
 clone ID: NM_005980



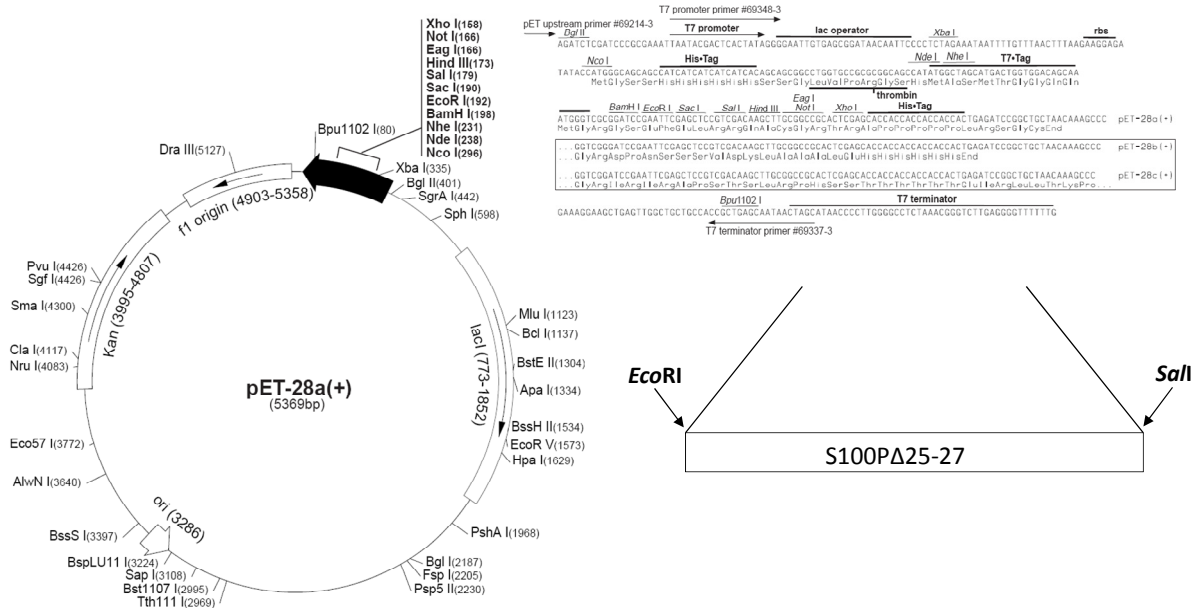
pet28a-S100PΔ21-25:

Insert: S100P cDNA mit Deletion der bp 61-75 kodierend für AS 21-25
 Sequenzlänge: 273 bp
 clone ID: NM_005980



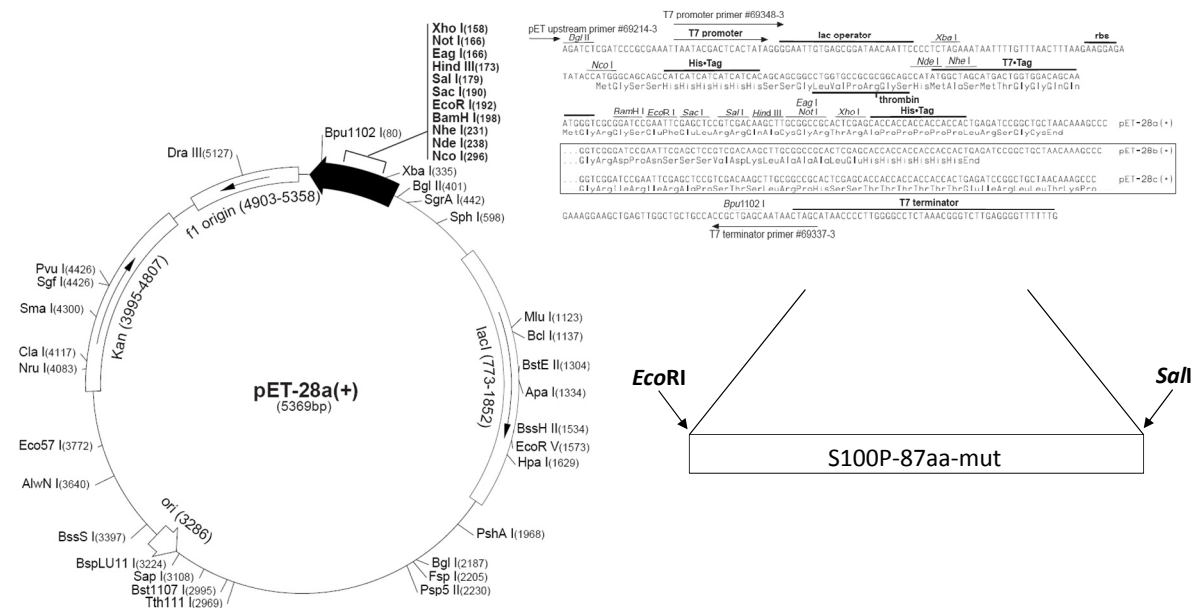
pet28a-S100PΔ25-27:

Insert: S100P cDNA mit Deletion der bp 73-81 kodierend für AS 25-27
 Sequenzlänge: 279 bp
 clone ID: NM_005980

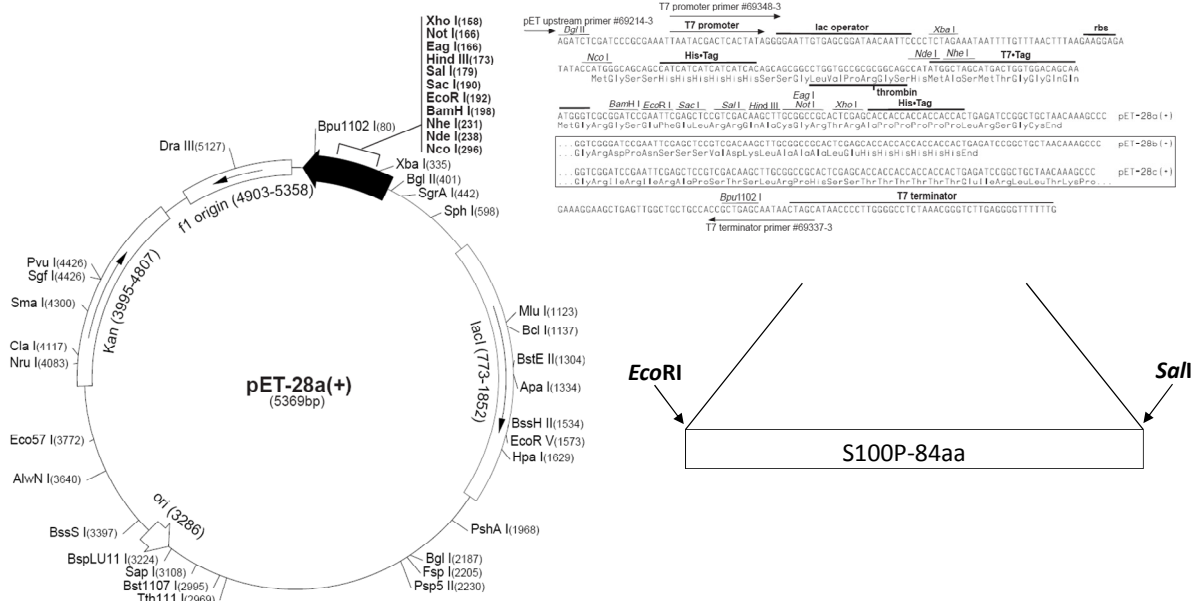


pet28a-S100P87aa-mut:

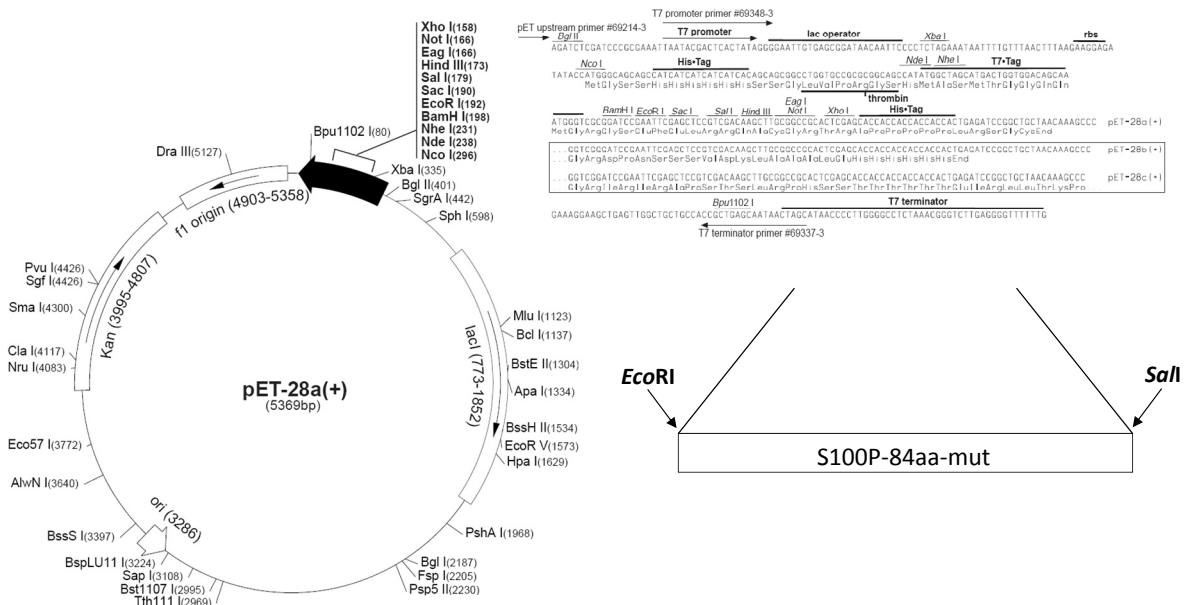
Insert: S100P cDNA mit Deletion der bp 262-285 kodierend für AS 88-95
 AS 82 Thr (ACG) → Ala (GCG)
 AS 83 Ser (TCT) → Leu (TTG)
 AS 86 His (CAC) → Asn (AAC)
 Sequenzlänge: 264 bp
 clone ID: NM_005980



pet28a-S100P-84aa: Insert: S100P cDNA mit Deletion der bp 253-285 kodierend für AS 85-95
 Sequenzlänge: 255 bp
 clone ID: NM_005980



pet28a-S100P84aa-mut: Insert: S100P cDNA mit Deletion der bp 253-285 kodierend für AS 85-95
 AS 82 Thr (ACG) → Ala (GCG)
 AS 83 Ser (TCT) → Leu (TTG)
 Sequenzlänge: 255 bp
 clone ID: NM_005980



7.2 Abkürzungsverzeichnis

AcNPV	<i>Autographa californica</i> Nucleopolyhedroviren
Amp	Ampicillin
APC	Adenomatous polyposis coli Protein
APS.....	Ammoniumperoxodisulfat
Arp2/3	<i>Actin related proteins 2 and 3</i>
AS.....	Aminosäure
BSA.....	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Cdc42.....	Cell division cycle 42
C-ERMAD	C-terminale ERM <i>Association Domain</i>
CFTR.....	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CHD.....	Calponin-Homologiedomäne
CLIC5	<i>Chloride Intracellular Channel 5</i>
CLIP-170.....	<i>Cytoplasmic linker protein-170</i>
DAG.....	Diacylglycerin
DMEM.....	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E3KARP	NHE3 Kinase A regulatorisches Protein
EBP50.....	ERM bindendes Protein 50
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF.....	<i>Epithelial Growth Factor</i>
ER.....	Endoplasmatisches Retikulum
ERK.....	<i>Extracellular-Signal Regulated Kinase</i>
FCS	fetales Kälberserum
FERM	<i>Four-point one, Ezrin, Radixin, Moesin</i>
FGF.....	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GEF.....	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GDI.....	<i>Guanosine nucleotide dissociation inhibitor</i>
Grb-2.....	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GRD.....	<i>RasGAP Related Domain</i>

GSH	Glutathion
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase-3 β
GST.....	Glutathion S-Transferase
HEPES.....	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IP	Immunpräzipitation
IP ₃	Inositoltriphosphat
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
IR.....	<i>Internal Repeats</i>
Kan.....	Kanamycin
KSR1.....	<i>Kinase Suppressor of Ras 1</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
LEF	<i>Lymphoid Enhancer Factor</i>
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation</i>
MEK	MAP-ERK Kinase
MW	<i>Molecular Weight</i>
N-ERMAD.....	N-terminale ERM Association Domain
NF κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NHE-1.....	Na ⁺ /H ⁺ exchanger Isoform 1
Ni-NTA	<i>Ni-Nitrilotriacetic acid</i>
N-WASP	<i>Neural Wiskott-Aldrich Syndrom Protein</i>
OD.....	Optische Dichte
PAGE.....	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS.....	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PFA.....	Paraformaldehyd
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC.....	Proteinkinase C
PLC.....	Phospholipase C
PMSF.....	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	<i>post nuclear supernatant</i>
PTB.....	phosphotyrosinbindend
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>

RAGE.....	<i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>
RGCT.....	RasGAP C-Terminus
rpm.....	<i>rounds per minute</i>
RTKs.....	Rezeptor-Tyrosinkinasen
SDS.....	Sodiumdodecylsulfat
SH2.....	Src-Homologie 2
Sos.....	<i>Son of sevenless</i>
SPR.....	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
TBS.....	<i>Tris Buffered Saline</i>
TCF.....	<i>T-Cell Factor</i>
TEMED.....	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOF.....	<i>Time Of Flight</i>
Tris.....	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF.....	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

7.3 Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Publikationen und Posterpräsentationen

Publikationen:

Austermann J., Nazmi AR., **Heil A.**, Fritz G., Kolinski M., Filipek S., Gerke V.

“Generation and characterization of a novel permanently active S100P mutant”

Biochim Biophys Acta. 2009 Jun; 1793(6): 1078-85

Heil A., Nazmi AR., Koltzsch M., Poeter M., Austermann J., Assard N., Baudier J., Kaibuchi K., Gerke V.

“S100P is a novel interaction partner and regulator of IQGAP1”

(Manuskript zur Publikation eingereicht)

Posterpräsentationen:

“Direct and Ca²⁺-dependent interaction of S100P with IQGAP1”

ECS Workshop,

Seix (Ariège, Frankreich), Juni 2007

“Direct and Ca²⁺-dependent interaction of S100P with IQGAP1”

10th Symposium on Calcium-Binding Proteins in Normal and Transformed Cells,

Leuven (Belgien), September 2008

“Characteristics of the S100P-IQGAP1 interaction”

ECS Workshop,

Smolenice (Slowakei), Juni 2009

Lebenslauf

Ein großes **Dankeschön** an

Prof. Dr. Volker Gerke für die hervorragende Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit,

Prof. Dr. Alexander Schmidt für die Zweitbegutachtung der Arbeit,

Judith für die schönen ersten zwei Jahre im Labor, die tolle Zusammenarbeit, das Korrekturlesen und die schönen Fahrten nach Konstanz und Seix,

Ali for holding my hand on the plane and for a time, that was “legen – wait for it – dary”,

Inés für die kleinen Besuche im Labor und das gemeinsame Durchleben des Zusammenschreibens, für's gemeinsame Leiden, Hoffen und Motivieren,

Johannes für das Korrekturlesen der Arbeit und für die kleinen Verschönerungen meines Arbeitsplatzes,

allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des IMBs für die Hilfsbereitschaft und dafür, dass man sich am kältesten Tag des Jahres Münsters schönste Gebäude von außen anschaut und am heißesten Tag des Jahres mit Polyfahrrädern durch die Rieselfelder „düst“,

Susanne für das stete Interesse am Stand der Dinge und an Zukunftsplänen,

meinen Eltern für die Unterstützung und den Rückhalt während der gesamten Zeit,

Tom für die motivierenden Worte wenn Zweifel aufkamen, die beruhigenden Worte wenn die Computerprogramme nicht so wollten wie man selbst und für vieles, vieles mehr!