

**Funktion und Regulation des
RhoGAP mit BAR-Domäne Nadrin bei
Zytoskelettveränderungen in Thrombozyten**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Sandra Beck
aus Neu-Ulm

Tübingen
2014

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

15.06.2015

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thilo Stehle

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Meinrad Gawaz

3. Berichterstatterin:

Prof. Dr. Ingrid Fleming

FÜR MEINE FAMILIE

„Land in Sicht, singt der Wind in mein Herz.

Die lange Reise ist vorbei.

Morgenlicht weckt meine Seele auf.

Ich lebe wieder und bin frei.“

(Rio Reiser)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2. 1. Hämostase – physiologische und pathophysiologische Betrachtung	3
2. 1. 1. Blutstillung.....	3
2. 1. 2. Thrombozyten in der Entstehung von arterieller Thrombose	5
2. 2. Signaltransduktion der Thrombozytenaktivierung	6
2. 2. 1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) in Thrombozyten	6
2. 2. 2. RhoGTPasen regulieren Zytoskelettveränderungen in Thrombozyten	7
2. 2. 3. Regulation der RhoGTPasen durch RhoGAPs	13
2. 2. 4. Autoinhibitorische BAR-Domäne	14
2. 2. 5. Regulation von GAPs durch Phosphorylierung	15
2. 3. „Neuron-associated developmentally regulated protein“ (Nadrin)	16
2. 3. 1. Nadrin – bisherige Untersuchungen	16
2. 3. 2. Nadrin existiert in verschiedenen Isoformen	17
2. 4. Zielsetzung	18
3. Material und Methoden.....	20
3. 1. Behandlung von Lösungen und Geräten	20

3. 2. Chemikalien, Reagenzien und Gerätschaften	20
3. 1. 1. Chemikalien	20
3. 1. 2. DNA-Längenstandards und Laufpuffer für Desoxyribonukleinsäuren	22
3. 1. 3. Enzyme	22
3. 1. 4. Molekularbiologische Hilfsmittel	23
3. 1. 5. Geräte	24
3. 1. 6. Verwendete Zelllinien	27
3. 1. 7. Verwendete Bakterienstämme und Vektoren	28
3. 1. 8. Verwendete Oligodesoxyribonukleotide (PCR-Primer)	29
3. 2. Zellbiologische Arbeiten	30
3. 2. 1. Kultivierung von Zelllinien	30
3. 2. 1. 1. A5-CHO	30
3. 2. 1. 2. HEK-293	31
3. 2. 2. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	31
3. 2. 3. Transfektion	32
3. 2. 4. Transformation	32
3. 2. 5. Isolierung muriner Thrombozyten	33
3. 2. 6. Isolierung humaner Thrombozyten	35
3. 2. 7. Aktivierung humaner und muriner Thrombozyten	35
3. 2. 8. Inhibition von Src-Familie Tyrosinkinase	36
3. 3. Molekularbiologische Arbeiten	36
3. 3. 1. Isolierung von Plasmid-DNA	36
3. 3. 2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	37
3. 3. 3. Agarosegelelektrophorese	37
3. 3. 4. Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	38
3. 3. 4. 1. Restriktionsendonukleaseverdau	38
3. 3. 4. 2. Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren	39
3. 3. 4. 3. Dephosphorylierung von Vektoren	40
3. 3. 5. <i>In vitro</i> -Synthese von Nukleinsäuren durch Polymerasekettenreaktion	40
3. 3. 5. 1. PCR mit Phusion TM High Fidelity DNA-Polymerase	41
3. 3. 5. 2. PCR mit QuikChange II Site Directed Mutagenesis Kit	41
3. 3. 6. Reinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	42

3. 3. 7. Isolierung von mRNA aus murinen Thrombozyten	42
3. 3. 8. cDNA-Synthese	43
3. 4. Proteinbiochemische Arbeiten	43
3. 4. 1. Herstellung von Zelllysaten	43
3. 4. 2. SDS-Gelelektrophorese	45
3. 4. 3. Western Blot	47
3. 4. 4. Immundetektion	48
3. 4. 5. Immunpräzipitation	49
3. 4. 6. Immunfluoreszenzfärbung	50
3. 5. Funktionelle Assays	51
3. 5. 1. „ <i>Spreading</i> “ von Thrombozyten	51
3. 5. 2. „ <i>Spreading</i> “ von A5-CHO Zellen und Adhäsionsassay	51
3. 5. 3. G-LISA®	52
3. 6. Statistik	52
4. Ergebnisse.....	53
4. 1. Nachweis von Nadrin in Thrombozyten und Megakaryozyten	53
4. 1. 1. Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von Nadrin in murinen Megakaryozyten	53
4. 1. 2. Lokalisierung von Nadrin in humanen Thrombozyten und Kolo- kalisierung mit Aktin.....	54
4. 1. 3. Nachweis von Nadrin in murinen und humanen Thrombozyten mittels Western Blot.....	55
4. 2. Isolierung, Mutation und Klonierung von muriner Nadrin cDNA	55
4. 2. 1. Isolierung muriner Nadrin cDNA aus Thrombozyten	55
4. 2. 2. Herstellung der Nadrin Δ BAR-Mutanten	57
4. 2. 3. Herstellung der Nadrin Phosphomutanten	58

4. 2. 4. Klonierung der murinen Nadrin Isoformen und Mutanten und Expression der erstellten Konstrukte in Säugetierzellen	59
4. 3. Untersuchung der GAP-Aktivität von murinen Nadrin Isoformen im Zellkultursystem	61
4. 3. 1. Nadrin reguliert Cdc42 Isoform-spezifisch	61
4. 3. 2. Nadrin reguliert Rac1	62
4. 3. 3. Nadrin reguliert RhoA	64
4. 4. Im Zellkultursystem reguliert Nadrin Stressfaserbildung, die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe und die Zelladhäsion	65
4. 4. 1. Nadrin reguliert die Stressfaserbildung	65
4. 4. 2. Nadrin reguliert die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe	67
4. 4. 3. Nadrin reguliert die Zelladhäsion	69
4. 5. Regulation von Nadrin	70
4. 5. 1. Nadrin wird durch die BAR-Domäne reguliert	70
4. 5. 1. 1. Die Nadrin BAR-Domäne reguliert den Einfluss von Nadrin auf die Stressfaserbildung	70
4. 5. 1. 2. Die Nadrin BAR-Domäne reguliert die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe	71
4. 5. 1. 3. Die Nadrin BAR-Domäne reguliert den Einfluss von Nadrin auf die Zelladhäsion	73
4. 5. 2. Src-Familie Tyrosinkinase-abhängige Phosphorylierung von Nadrin	74
4. 5. 2. 1. Nadrin wird in Thrombozyten aktivierungsabhängig tyrosinphosphoryliert	74
4. 5. 2. 2. Nadrin interagiert mit Src-Familie Tyrosinkinasen in Thrombozyten	77
4. 5. 2. 3. Nadrin wird in Thrombozyten durch Src-Familie Tyrosinkinasen phosphoryliert	79
4. 5. 2. 4. Nadrin wird durch Src Tyrosinkinase tyrosinphosphoryliert	80
4. 5. 3. Charakterisierung der Nadrin Phosphomutanten im Zellkultursystem	81
4. 5. 3. 1. Einfluss der Tyrosinphosphorylierung auf Nadrin2	82
4. 5. 3. 2. Einfluss der Tyrosinphosphorylierung auf Nadrin5	89
5. Diskussion	96

5. 1. Erstbeschreibung von Nadrin in Thrombozyten	96
5. 2. Regulation von Nadrin durch die BAR-Domäne	98
5. 3. Nadrin wird durch Tyrosinphosphorylierung reguliert	100
5. 4. Isoform-Spezifität der Nadrin „full length“ Varianten	102
5. 5. Fazit und Zukunftsperspektiven	104
6. Summary.....	106
7. Anhang	108
7. 1. Sequenzen	108
7. 1. 1. AS-Sequenzvergleich ncbi Reference Sequence NP_001116112.1 und thrombozytäres Nadrin2 WT	108
7. 1. 2. AS-Sequenzvergleich ncbi Reference Sequence NP_001116115.1 und thrombozytäres Nadrin5 WT	109
7. 1. 3. AS-Sequenzvergleich Nadrin2 WT und Nadrin5 WT	110
7. 1. 4. Primerbindestelle zur Klonierung von Nadrin2 in den Vektor ptdTomato-N1 ..	111
7. 1. 5. Primerbindestelle zur Klonierung von Nadrin5 in den Vektor ptdTomato-N1 ..	112
7. 1. 6. Primerbindestelle zur Herstellung der Nadrin Δ BAR-Mutanten	112
7. 1. 7. Punktmutation Y124A Primeranlagerungsstelle	113
7. 1. 8. Punktmutation Y314A Primeranlagerungsstelle	113
7. 1. 9. Punktmutationen Y124A und Y314A auf AS- und DNA-Ebene	114
7. 1. 10. Abigramme der ptdTomato-N1-Nadrin-Konstrukte	115
7. 2. Einbuchstabencode der Aminosäuren.....	124
7. 3. Software	124
7. 4. Literaturverzeichnis	125
8. Anlagen.....	137

8. 1. Aus dieser Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen	137
8. 2. Kongressbeiträge	137
9. Lebenslauf	139
Danksagung	140

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 2.1: Die Thrombozytenaktivierung an einer Gefäßverletzung.</i>	4
<i>Abbildung 2.2: Entstehung von Thrombose als Folge einer Plaqueruptur.</i>	5
<i>Abbildung 2.3: Aktivierung von G-Proteinen an GPCRs.</i>	6
<i>Abbildung 2.4: Cdc42-vermittelte Filopodienbildung.</i>	8
<i>Abbildung 2.5: Rac1 vermittelt Lamellipodienbildung.</i>	10
<i>Abbildung 2.6: Wirkung von RhoA auf das Zytoskelett.</i>	12
<i>Abbildung 2.7: Kleine RhoGTPasen als „molekulare Schalter“.</i>	13
<i>Abbildung 2.8: Mechanismen der Autoinhibition durch die BAR-Domäne.</i>	14
<i>Abbildung 2.9: Modell der Regulation von p190 RhoGAP durch Tyrosinphosphorylierung.</i>	15
<i>Abbildung 2.10: Nadrin Spleißisoformen der Maus.</i>	17
<i>Abbildung 2.11: Zusammenfassung der Hypothese: Nadrin spielt eine wichtige Rolle bei RhoGTPase-vermittelten Zytoskelettveränderungen in Thrombozyten.</i>	19
<i>Abbildung 3.1: In dieser Arbeit für Klonierungen verwendete Plasmidvektoren.</i>	28
<i>Abbildung 3.2: Aufbau eines „semi-dry“ Western Blot.</i>	47
<i>Abbildung 4.1: Immundetektion von Nadrin in murinen Megakaryozyten.</i>	53
<i>Abbildung 4.2: Humane Thrombozyten auf Fibrinogen „gespreaded“.</i>	54
<i>Abbildung 4.3: Nadrin Expression in humanen und murinen Thrombozyten.</i>	55
<i>Abbildung 4.4: Nadrin Isoform-spezifische PCR aus muriner Thrombozyten cDNA.</i>	56
<i>Abbildung 4.5: Schematische Übersicht der klonierten Nadrin „full length“ Varianten.</i>	56
<i>Abbildung 4.6: Schematische Darstellung der generierten Nadrin ΔBAR-Mutanten mit deletierter BAR-Domäne.</i>	57
<i>Abbildung 4.7: Deletion der Nadrin BAR-Domäne auf Nukleotidebene mittels PCR.</i>	57
<i>Abbildung 4.8: Schematische Darstellung der generierten Nadrin Phosphomutanten.</i>	58
<i>Abbildung 4.9: Western Blot-Analyse der in Säugetierzellen überexprimierten „full length“ Isoformen Nadrin2 WT und Nadrin5 WT.</i>	59
<i>Abbildung 4.10: Western Blot-Analyse der in Säugetierzellen überexprimierten Nadrin ΔBAR-Mutanten.</i>	60
<i>Abbildung 4.11: Western Blot-Analyse der in Säugetierzellen überexprimierten Nadrin Phosphomutanten.</i>	60
<i>Abbildung 4.12: Nadrin reguliert Cdc42 Isoform-spezifisch.</i>	62
<i>Abbildung 4.13: Nadrin reguliert Rac1.</i>	63

Abbildung 4.14: Nadrin reguliert RhoA.....	64
Abbildung 4.15: Repräsentative Aufnahmen von transfizierten A5-CHO Zellen nach F-Aktin-Färbung.....	65
Abbildung 4.16: Quantifizierung der Stressfaserbildung Nadrin „full length“-transfizierter Säugetierzellen.....	66
Abbildung 4.17: Repräsentative Aufnahmen von transfizierten A5-CHO Zellen nach Vinculin-Färbung.....	67
Abbildung 4.18: Quantifizierung der Bildung fokaler Adhäsionskomplexe in Nadrin-transfizierten Säugetierzellen.....	68
Abbildung 4.19: Nadrin beeinflusst die Adhäsion von Säugetierzellen.....	69
Abbildung 4.20: Quantifizierung der Stressfaserbildung Nadrin Δ BAR-transfizierter Säugetierzellen.....	71
Abbildung 4.21: Quantifizierung der Bildung fokaler Adhäsionskomplexe von Nadrin Δ BAR-transfizierten Säugetierzellen.....	72
Abbildung 4.22: Die Nadrin BAR-Domäne reguliert die Zelladhäsion.....	73
Abbildung 4.23: Immunpräzipitation zur Untersuchung der aktivierungsabhängigen Tyrosinphosphorylierung von Nadrin in murinen Thrombozyten.....	75
Abbildung 4.24: Immunpräzipitation zur Untersuchung der aktivierungsabhängigen Tyrosinphosphorylierung von Nadrin in humanen Thrombozyten.....	76
Abbildung 4.25: Immunpräzipitation zur Untersuchung der aktivierungsabhängigen Interaktion von Nadrin mit Src-Familie Tyrosinkinase in humanen Thrombozyten..	78
Abbildung 4.26: Immunpräzipitation zum Nachweis Src-Familie Tyrosinkinase-vermittelter Nadrin Tyrosinphosphorylierung in humanen Thrombozyten.....	79
Abbildung 4.27: Überexpression der Nadrin Isoformen Nadrin2 WT und Nadrin5 WT in Säugetierzellen zusammen mit Src Tyrosinkinase.....	81
Abbildung 4.28: Phosphorylierung der Nadrin Phosphomutanten.....	82
Abbildung 4.29: Nadrin2 GAP-Aktivität auf Cdc42 wird nicht durch Tyrosinphosphorylierung reguliert.....	83
Abbildung 4.30: Nadrin2 GAP-Aktivität auf Rac1 wird durch Tyrosinphosphorylierung reguliert.....	85
Abbildung 4.31: Nadrin2 GAP-Aktivität auf RhoA wird durch Tyrosinphosphorylierung reguliert.....	86
Abbildung 4.32: Einfluss der Tyrosinphosphorylierung von Nadrin2 auf Stressfaser- und fokale Adhäsionskomplexbildung.....	87

Abbildung 4.33: Tyrosinphosphorylierung von Nadrin2 beeinflusst die Zelladhäsion.....	89
Abbildung 4.34: Tyrosinphosphorylierung reguliert die Nadrin5 GAP-Aktivität auf Cdc42.	90
Abbildung 4.35: Nadrin5 GAP-Aktivität auf Rac1 wird nicht durch Tyrosinphosphorylierung reguliert.	92
Abbildung 4.36: Nadrin5 GAP-Aktivität auf RhoA wird nicht durch Tyrosinphosphorylierung reguliert.	93
Abbildung 4.37: Einfluss der Tyrosinphosphorylierung von Nadrin5 auf Stressfaser- und fokale Adhäsionskomplexbildung.	94
Abbildung 4.38: Tyrosinphosphorylierung von Nadrin5 hat keinen Einfluss auf die Zelladhäsion.	95
Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Inhibition durch die BAR-Domäne.	98
Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der zur Mutation ausgewählten Tyrosinphosphorylierungsstellen.	101
Abbildung 7.1: Abigramm zum Nachweis der Mutation in ptdTomato-Nadrin2.	115
Abbildung 7.2: Abigramm zum Nachweis der Mutation in ptdTomato-Nadrin5.	115
Abbildung 7.3: Abigramm zum Nachweis der Mutation der Phosphorylierungsstelle Y124 (Bp 370) in pcDNA TM 3.1-Nadrin2 Y124A.	116
Abbildung 7.4: Abigramm zum Nachweis der Mutation der Phosphorylierungsstelle Y314 (Bp 940) in pcDNA TM 3.1-Nadrin2 Y314A.	117
Abbildung 7.5: Abigramme zum Nachweis der Mutationen der Phosphorylierungsstellen Y124 (Bp 370) und Y314 (Bp 940) in pcDNA TM 3.1-Nadrin2 Y124/314A.	117
Abbildung 7.6: Abigramm zum Nachweis der Mutation der Phosphorylierungsstelle Y124 (Bp 370) in pcDNA TM 3.1-Nadrin5 Y124A.	118
Abbildung 7.7: Abigramm zum Nachweis der Mutation der Phosphorylierungsstelle Y314 (Bp 940) in pcDNA TM 3.1-Nadrin5 Y314A.	118
Abbildung 7.8: Abigramme zum Nachweis der Mutationen der Phosphorylierungsstellen Y124 (Bp 370) und Y314 (Bp 940) in pcDNA TM 3.1-Nadrin5 Y124/314A.	119
Abbildung 7.9: Abigramm zum Nachweis der Mutation der Phosphorylierungsstelle Y124 (Bp 370) in ptdTomato-Nadrin2 Y124A.	120
Abbildung 7.10: Abigramm zum Nachweis der Mutation der Phosphorylierungsstelle Y314 (Bp 940) in ptdTomato-Nadrin2 Y314A.	121
Abbildung 7.11: Abigramme zum Nachweis der Mutationen der Phosphorylierungsstellen Y124 (Bp 370) und Y314 (Bp 940) in ptdTomato-Nadrin2 Y124/314A.....	121

<i>Abbildung 7.12: Abigramm zum Nachweis der Mutation der Phosphorylierungsstelle Y124 (Bp 370) in ptdTomato-Nadrin5 Y124A.</i>	122
<i>Abbildung 7.13: Abigramm zum Nachweis der Mutation der Phosphorylierungsstelle Y314 (Bp 940) in ptdTomato-Nadrin5 Y314A.</i>	122
<i>Abbildung 7.14: Abigramme zum Nachweis der Mutationen der Phosphorylierungsstellen Y124 (Bp 370) und Y314 (Bp 940) in ptdTomato-Nadrin5 Y124/314A.</i>	123

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien, zugehörige CAS-Nummer und Bezugsquelle</i>	20
<i>Tabelle 3.2: Verwendete DNA-Längenstandards</i>	22
<i>Tabelle 3.3: Verwendete Enzyme mit zugehöriger EC-Nummer und Hersteller</i>	23
<i>Tabelle 3.4: Verwendete molekularbiologische Hilfsmittel und Reagenziensätze</i>	23
<i>Tabelle 3.5: Verwendete Oligodesoxyribonukleotide und PCR-Primer</i>	30
<i>Tabelle 3.6: Zusammensetzung des ACD-Puffers zur Antikoagulation</i>	33
<i>Tabelle 3.7: Zusammensetzung der 20-fach konzentrierten Stocklösung des Tyrode's Puffers für murine Thrombozyten</i>	34
<i>Tabelle 3.8: Zusammensetzung der 10-fach konzentrierten Stocklösung des Tyrode's Puffers für humane Thrombozyten</i>	35
<i>Tabelle 3.9: Zusammensetzung der 50-fach Stocklösung des TAE-Puffers</i>	38
<i>Tabelle 3.10: Beispielhafter Ansatz für Restriktionendonuklease-Verdaue</i>	39
<i>Tabelle 3.11: Beispielhafter Ansatz für die Ligation von Nukleinsäuren in Plasmidvektoren</i>	40
<i>Tabelle 3.12: Beispielhafter Ansatz zur Dephosphorylierung von Plasmidvektoren</i>	40
<i>Tabelle 3.13: Zusammensetzung des RIPA-Lysepuffers</i>	44
<i>Tabelle 3.14: Zusammensetzung des IP-Puffers</i>	45
<i>Tabelle 3.15: Zusammensetzung des Probenauftragepuffers (5x Lämmli-Puffer)</i>	46
<i>Tabelle 3.16: Zusammensetzung der 8,5 %-igen Polyacrylamidgele</i>	46
<i>Tabelle 3.17: Zusammensetzung der Polyacrylamidsammelgele</i>	46
<i>Tabelle 3.18: Zusammensetzung der 10-fach Stocklösung des SDS-Laufpuffers</i>	46
<i>Tabelle 3.19: Zusammensetzung der 10-fach Stocklösung des Blotpuffers</i>	47
<i>Tabelle 3.20: Verdünnungen der Primärantikörper und Bezugsfirma</i>	48
<i>Tabelle 3.21: Verdünnungen der Sekundärantikörper und Bezugsfirma</i>	49

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
A	Absorption
A	Ampere
ACD	„ <i>acid citrate dextrose</i> “
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Aktiengesellschaft
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARHGAP17	„ <i>RhoGTPase activating protein 17</i> “
ARP2/3	„ <i>actin-related protein 2/3 complex</i> “
AS	Aminosäure(n)
ASS	Acetylsalicylsäure
AT1R	Angiotensin II Typ 1 Rezeptor
BAR	Bin/Amphiphysin/Rvs
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CAS	Chemical Abstract Service
Cdc42	„ <i>cell division control protein 42 homolog</i> “
cDNA	copy DNA, komplementäre DNA
CHO	„ <i>chinese hamster ovary</i> “
CIP	„ <i>calf intestinal phosphatase</i> “
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Co. KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
CRP	„ <i>collagen-related peptide</i> “
C-Terminus	Carboxyterminus
C-terminat	carboxyterminal
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„ <i>deoxyribonucleic acid</i> “, Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	„ <i>epidermal growth factor</i> “
EGFP	„ <i>enhanced green fluorescent protein</i> “, verstärktes GFP
<i>et al.</i>	<i>et alii/et aliae/et alia</i> , und andere
FAK	fokale Adhäsionskomplexe
FCS	„ <i>fetal calf serum</i> “, fötales Kälberserum
g	„ <i>g-force</i> “, relative Zentrifugalbeschleunigung
g	Gramm
GAP	GTPase aktivierendes protein
GDI	„ <i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i> “, Guaninnukleotiddissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	„ <i>guanine nucleotide exchange factor</i> “, Guaninnukleotidaustauschfaktor
GFP	„ <i>green fluorescent protein</i> “, grün-fluoreszierendes Protein
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GP	Glykoprotein
GPCR	„ <i>G protein-coupled receptor</i> “, G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRAF	„ <i>GTPase regulator associated with focal adhesion kinase</i> “
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde(n)
HEK-293	„ <i>human embryonic kidney</i> “
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
Inc.	„ <i>incorporated</i> “
IP	Immunpräzipitation
k	„Kilo-“ (10^3)

l	Liter
LB	„lysogeny broth“
LIMK	„LIM domain kinase“
M	molar
MBS	„myosin-binding subunit“
MCS	„multiple cloning site“, multiple Klonierungsstelle
mDia	„mammalian diaphanous“
μ	„Mikro-“ (10^{-6})
m	Meter
m	„Milli-“ (10^{-3})
min	Minuten
MLC	„myosin light chain“
MLCP	„myosin light chain phosphatase“
MRD	„modified-release dipyrimadole“
mRNA	„messenger“ („Boten-“)Ribonukleinsäure
n	„Nano-“ (10^{-9})
Nadrin	„neuron-associated developmentally regulated protein“
NGF	„nerve growth factor“
NS	nicht signifikant
N-Terminus	Aminoterminus
N-terminal	aminoterminal
P	P-Wert für statistische Signifikanz
p. a.	<i>pro analysi</i> , zur Analyse
PAK	„p21-activated kinase“
PAR	„protease-activated receptor“, Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	„phosphate-buffered saline“, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration
PH	„pleckstrin homology“
PI3K	„Phosphatidylinositide 3-kinase“
PP2	„4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(dimethylethyl)pyrazolo [3,4-d]pyrimidine“, Src-Familie Tyrosinkinase Inhibitor
PRP	„platelet rich plasma“
Pty. Ltd.	„Proprietary Limited“

PVDF	Polyvinylidenfluorid
®	„ <i>registered</i> “, eingetragenes Warenzeichen
Rac1	„ <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i> “
RhoA	„ <i>Transforming protein RhoA</i> “
Rich-1	„ <i>RhoGAP interacting with CIP4 homologs protein 1</i> “
Rif	„ <i>Rho in filopodia</i> “
RIPA	„ <i>radioimmunoprecipitation assay</i> “
RNA	„ <i>ribonucleic acid</i> “, Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-assoziierte Kinase
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	„ <i>standard error of mean</i> “, Standardfehler
SF	Stressfaser(n)
Sra	„ <i>specifically Rac1-associated protein-1</i> “
Src	„ <i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i> “
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin
Thr	Thrombin
TM	„ <i>trademark</i> “
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TxA2	Thromboxan A2
U	Units
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett(-licht)
V	Volt
v/v	„ <i>volume over volume</i> “, Volumen pro Volumen
vWF	von Willebrandt Faktor
w/v	„ <i>weight over volume</i> “, Gewicht pro Volumen
WASP	„ <i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i> “
WAVE	„ <i>Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin homolog</i> “
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung

Im Jahr 2012 verstarben laut statistischem Bundesamt 349.217 Menschen in Deutschland an Krankheiten des Herz- und Kreislaufsystems. Mit 40,2 % der Todesfälle stellen also ischämische Herzkrankheiten zusammen mit zerebrovaskulären Erkrankungen in Deutschland die Haupttodesursache dar. Allein die chronisch ischämische Herzkrankheit (stabile *Angina pectoris*) bedingt 8,2 % aller Todesfälle in Deutschland und belegt damit den ersten Platz in der Statistik der Todesursachen, dicht gefolgt vom akuten Myokardinfarkt mit 6,0 % auf dem zweiten Platz. Außerdem befindet sich noch der gefürchtete Schlaganfall mit 2,3 % unter den zehn häufigsten Todesursachen. Hoffnung machen die seit 2003 stabil – wenn auch nur leicht – rückläufigen Zahlen der Todesfälle durch Erkrankungen des Herz-/Kreislaufsystems. Erreicht wird diese erfreuliche Tatsache unter anderem durch potente und sichere antithrombotische Therapien. Für die Entwicklung neuer antithrombotisch wirksamer Medikamente werden ständig neue so genannte „*targets*“ gesucht, die als Angriffspunkte für diese Antikoagulation dienen könnten.

Bei der Thrombozytenaktivierung regulieren RhoGTPasen die nötigen Zytoskelettveränderungen [Tomar und Schlaepfer, 2009]. Die Aktivität von RhoGTPasen wird von RhoGAPs („*RhoGTPase activating proteins*“) negativ beeinflusst. Nadrin ist ein RhoGAP, das eine zentrale Rolle bei der Exozytose in Neuronen spielt [Harada *et al.*, 2000]. Außerdem ist Nadrin bekanntermaßen bei der morphologischen Differenzierung von Astrozyten beteiligt, ein Prozess, bei dem die genaue Regulierung von RhoA wichtig ist [Kobayashi *et al.*, 2013]. In dieser Arbeit stellte ich daher die Hypothese auf, dass Nadrin in Thrombozyten bei der Regulierung RhoGTPase-vermittelter Zytoskelettveränderungen eine essentielle Rolle spielt und daher für die Entwicklung neuer antithrombozytärer Medikamente ein interessantes „*target*“ sein könnte.

Der erste Teil dieser Arbeit befasste sich mit dem Nachweis von Nadrin in Thrombozyten und der Isolierung zweier Nadrin Isoformen aus mRNA muriner Thrombozyten. Diese Nadrin WT cDNA wurde anschließend mutiert. Es wurde die BAR-Domäne der beiden Nadrin Varianten Nadrin2 und Nadrin5 deletiert. Weiterhin wurden zwei vielversprechende Tyrosinphosphorylierungsstellen mutiert. Der zweite Teil meiner Arbeit befasste sich mit der Charakterisierung der im ersten Teil gewonnenen nativen Nadrin WT Isoformen im Hinblick auf die RhoGTPasen und Zytoskelettveränderungen. Hier konnten klar Isoform-spezifische Funktionen der Nadrin Varianten gezeigt werden. Ferner konnte bei der Untersuchung der Nadrin Δ BAR-Mutanten eine eindeutige,

regulatorische Funktion der BAR-Domäne gezeigt werden. Im letzten Kapitel meiner Arbeit wurde eine aktivierungsabhängige Tyrosinphosphorylierung Nadrins in Thrombozyten demonstriert. Konsistent mit diesem Befund konnte die aktivierungsabhängige Interaktion von Nadrin mit Src-Familie Tyrosinkinasen gezeigt werden. Zuletzt zeigte die Analyse der Nadrin Phosphomutanten, dass die Regulation von Nadrin durch Tyrosinphosphorylierung klar Isoform-abhängig ist. Zusammengenommen trägt meine Arbeit also einen großen Schritt zum besseren Verständnis des interessanten, streng regulierten RhoGAPs Nadrin bei.

.

2. Einleitung

2. 1. Hämostase – physiologische und pathophysiologische Betrachtung

2. 1. 1. Blutstillung

Thrombozyten sind für die lebenswichtige Hämostase verantwortlich. Nur durch diesen Vorgang kann ein tödlicher Blutverlust bei einer Gefäßverletzung verhindert werden, aber gleichzeitig normaler Blutfluss im restlichen Kreislauf gewährleistet werden. Bereits Mitte des neunzehnten Jahrhunderts befasste sich Rudolf Virchow mit den ersten Details der physiologischen Blutstillung [Virchow, 1856], für die unzählige, geschickt verzahnte und genau kontrollierte Abläufe notwendig sind.

Die Hämostase kann in mehrere Schritte eingeteilt werden. Im ersten Schritt wird nach einer Gefäßverletzung zunächst das Strukturprotein Kollagen exponiert, das sich im intakten Gefäß im Extrazellularraum – also abseits des fließenden Bluts – befindet. Sobald allerdings Blut mit dem durch eine Gefäßverletzung freigelegten Kollagen in Berührung kommt, wird die Hämostase eingeleitet [Gale *et al.*, 2011]. Zunächst kommt unter hohen Scherraten, wie sie in Arterien und Arteriolen vorkommen, im Rahmen der primären Hämostase die initiale Bindung über den Thrombozytenoberflächenrezeptor GPIb-IX-V an immobilisierten von Willebrand Faktor (vWF) zustande [Li *et al.*, 2010; Ruggeri *et al.*, 2007]. Diese erste Bindung der Thrombozyten wird „*tethering*“ (engl., Anheften) genannt und reicht für eine feste Anlagerung nicht aus [Nieswandt *et al.*, 2003]. Vermutlich werden dadurch die Thrombozyten nur verlangsamt, was zu „rollenden“ Thrombozyten führt.

Den zweiten Schritt der Hämostase bildet die Thrombozyten- und Integrinaktivierung. Die Bindung der Thrombozyten über den Thrombozytenoberflächenrezeptor GPVI (Glykoprotein VI) an Kollagen [Nieswandt *et al.*, 2001] dient nicht der Adhäsion, sondern der Thrombozytenaktivierung. Die resultierende Integrinaktivierung und die Sekretion von „*second wave*“ (engl., zweite Welle) Mediatoren veranlassen nun eine stabile Anhaftung der Thrombozyten (**Abbildung 2.1**). Die Integrinaktivierung beinhaltet, dass diese heterodimeren integralen Membranproteine durch eine Konformationsänderung von einem inaktiven Zustand mit geringer Affinität in den aktiven Zustand mit sehr hoher Affinität für das Substrat

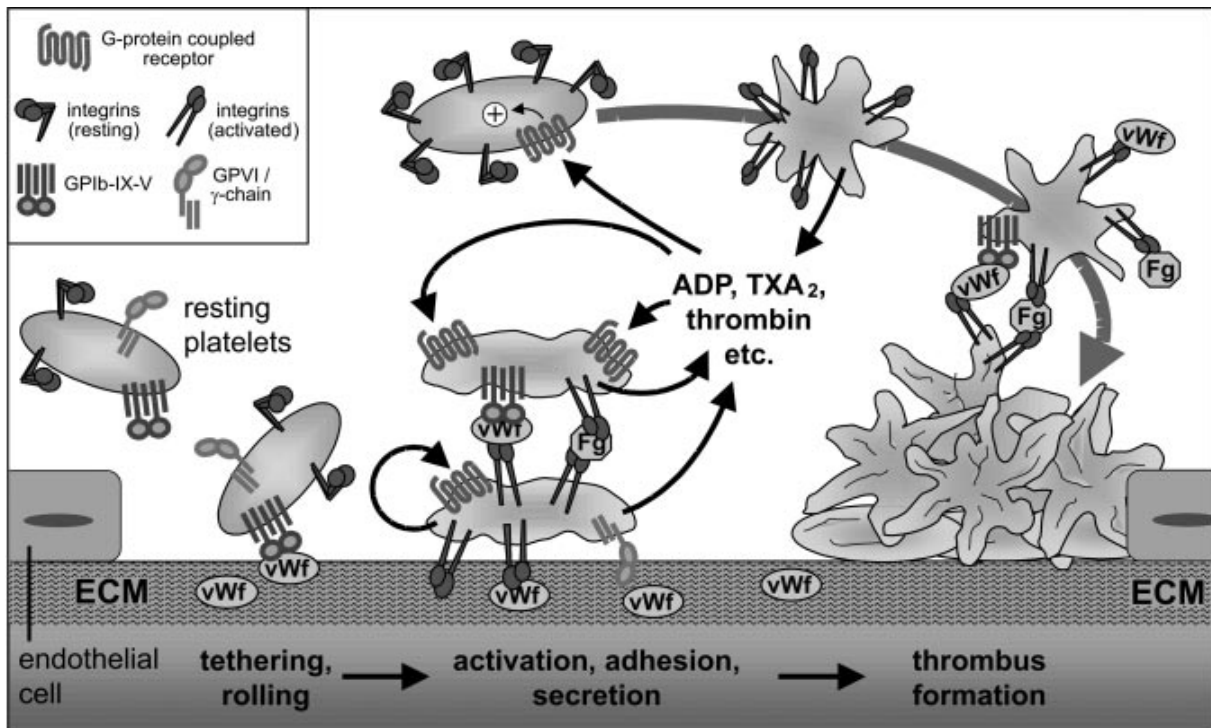


Abbildung 2.1: Die Thrombozytenaktivierung an einer Gefäßverletzung. Initiale Thrombozytenbindung an immobilisierten vWF („tethering“). Integrinaktivierung und autokrine Sekretion von „second wave“ Mediatoren (TxA₂, ADP, etc.). Rekrutierung weiterer Thrombozyten aus dem Blutstrom. GP Glykoprotein, ECM extrazelluläre Matrix, vWF von Willebrand Faktor, TxA₂ Thromboxan A₂, Fg Fibrinogen [Offermanns, *Circulation Research* 2006]

überführt werden. Hierbei handelt es sich um so genanntes „inside-out signaling“ und als Resultat bindet nun das aktivierte Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Fibronectin und immobilisierten vWF [Varga-Szabo *et al.*, 2008], Kollagen bindet mit hoher Affinität an Integrin $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ [Nieswandt *et al.*, 2003] und weitere Integrine binden an Fibronectin und Laminin. Als Verstärkungsmechanismus werden die „second wave“ Mediatoren wie Thromboxan A₂ (TxA₂) und ADP (Adenosindiphosphat) sezerniert und Thrombin wird an der Thrombozytenoberfläche gebildet. All diese Mediatoren wirken über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs, engl. „G protein-coupled receptors“) und verstärken ihre eigene Bildung in einem positiven Rückkopplungsmechanismus [Offermanns, 2006]. Nun werden neue Thrombozyten aus dem Blut gebunden und mittels TxA₂ und ADP aktiviert. Schließlich werden die Thrombozyten untereinander durch Bindung von Fibrinogen und vWF an das aktivierte Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ vernetzt und der Thrombus wächst [Offermanns, 2006; Varga-Szabo *et al.*, 2008; Nieswandt *et al.*, 2003].

2. 1. 2. Thrombozyten in der Entstehung von arterieller Thrombose

Neben der überlebenswichtigen physiologischen Hämostase spielen Thrombozyten allerdings auch die Hauptrolle bei der Entstehung lebensbedrohlicher Erkrankungen wie Schlaganfall und Herzinfarkt. Auch wenn keine Gefäßverletzung an sich vorliegt, sondern die Gefäßwand einen rupturierten atherosklerotischen Plaque aufweist [Ylä-Herttuala *et al.*, 2011], werden Thrombozyten aktiviert und die Folge kann Thrombusbildung bis hin zur Okklusion des betroffenen Gefäßes sein [Penz *et al.*, 2005; Reininger *et al.*, 2010] (siehe **Abbildung 2.2**). Die dadurch bedingte Unterversorgung mit Blut und folglich mit Sauerstoff führt zur Ischämie, bzw. je nach Grad der Unterversorgung sogar zum Infarkt.

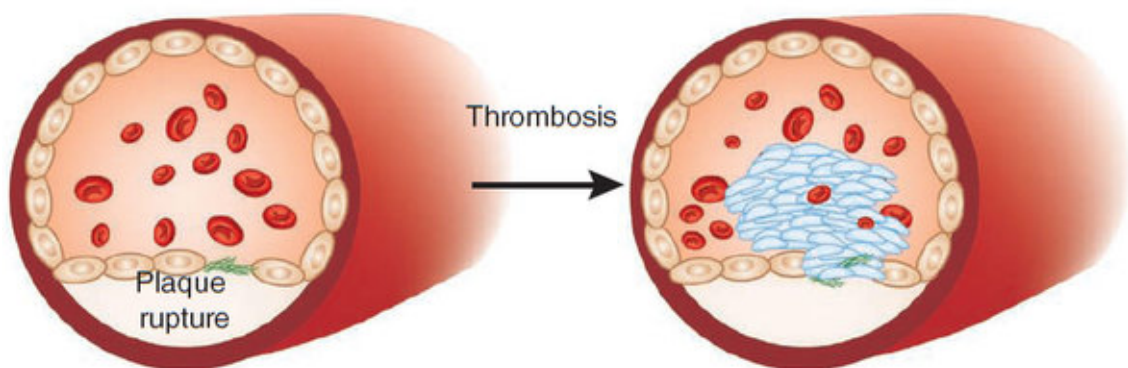


Abbildung 2.2: Entstehung von Thrombose als Folge einer Plaqueruptur. Erst bildet sich der so genannte „weiße Thrombus“, der hauptsächlich aus Thrombozyten besteht. Anschließend folgt der „rote Thrombus“, der reich an Fibrin und Blutzellen ist. (verändert nach Jackson *et al.*, Nature Medicine 2011)

Neben einer gesunden Lebensweise, die unter anderem körperliche Betätigung, ausgewogene Ernährung und Verzicht auf Zigaretten und Alkohol beinhaltet, kann eine Sekundärprävention durch antithrombozytäre Therapie stattfinden. Gängige Empfehlungen sind hier MRDs (engl. „*modified-release dipyrimadole*“), ASS (Acetylsalicylsäure) und Clopidogrel – allein oder in Kombination. Nachteil dieser etablierten antithrombozytären Therapien ist jedoch das steigende Blutungsrisiko [Greenhalgh *et al.*, 2011]. Aus diesem Grund ist es wichtig an neuen Angriffspunkten für sichere antithrombozytäre Therapien zu forschen.

2. 2. Signaltransduktion der Thrombozytenaktivierung

2. 2. 1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) in Thrombozyten

Etwa ein Drittel aller Medikamente auf dem Weltmarkt greift an den G-Protein (Guaninnukleotid-bindendes Protein)-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) an [Overington *et al.*, 2006], denn GPCRs sind an den verschiedensten Signalwegen beteiligt [Cabrera-Vera *et al.*, 2003]. So gehören auch einige der wichtigsten Thrombozytenoberflächenrezeptoren zur Klasse der GPCRs: PAR1 und PAR4 (engl. „*protease-activated receptor*“, Protease-aktivierter Rezeptor), sowie die purinergen Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂. Bei Agonistenbindung an den GPCR wird eine Signalkaskade gestartet, die im ersten Schritt auf der Aktivierung der namensgebenden G-Proteine beruht (**Abbildung 2.3**).

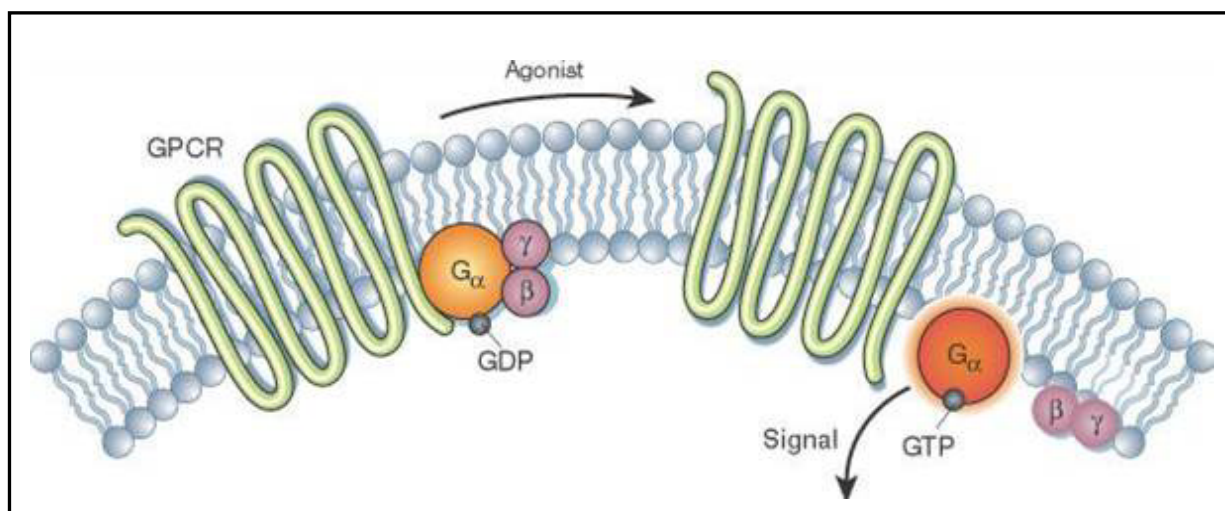


Abbildung 2.3: Aktivierung von G-Proteinen an GPCRs. Nach Agonistenbindung an den GPCR, wird $G\alpha$ als Heterotrimer zusammen mit den katalytisch inaktiven Untereinheiten $G\beta\gamma$ mit GTP beladen. $G\beta\gamma$ dissoziiert anschließend vom G-Protein-Komplex und $G\alpha$ -GTP übernimmt die Signalweiterleitung an die jeweiligen Effektorproteine. [Li *et al.*, Nature 2002]

Nach bisherigem Verständnis der G-Proteine ist im inaktiven Zustand GDP an deren α -Untereinheit gebunden. Nach Agonistenbindung an den GPCR wird nun der Austausch von GDP zu GTP unterstützt. Diese Katalyse benötigt die Anwesenheit der β - und γ -Untereinheiten [Smrcka *et al.*, 2008]. GTP-gebundenes $G\alpha$ kann nun verschiedenste Effektorproteine aktivieren [Offermanns, 2006]. GTP-gebundenes $G\alpha_{13}$ wird z. B. durch Thromboxan A₂-Bindung an die Protease-aktivierten Rezeptoren gebildet und führt zur Aktivierung von p115RhoGEF („*guanine nucleotide exchange factor*“, engl.,

Guaninnukleotidaustauschfaktor). Dies resultiert schließlich in der Aktivierung der RhoGTPase RhoA, die nun in ihrem GTP-gebundenen Zustand Effektorproteine wie ROCK (Rho-assoziierte Kinase) stimulieren kann [Aslan *et al.*, 2013]. ROCK vermittelt ihrerseits über Phosphorylierung von LIMK („*LIM domain kinase*“) [Ohashi *et al.*, 2000] die Inaktivierung des Aktin-bindenden und -depolymerisierenden Faktors Cofilin durch Phosphorylierung [Maekawa *et al.*, 1999]. So wird der Abbau filamentösen Aktins verhindert und das bestehende F-Aktin-Zytoskelett stabilisiert.

2. 2. 2. RhoGTPasen regulieren Zytoskelettveränderungen in Thrombozyten

RhoGTPasen unterscheiden sich nur gering von den G α -Proteinen: RhoGTPasen können wie G-Proteine auch GTP binden, allerdings fehlt den kleinen GTPasen der Rho Familie die katalytische Domäne um die Umsetzung von GTP zu GDP effizient zu vollziehen. Diese Tatsache erklärt auch deren geringe Größe von nur etwa 21 kDa [Aslan *et al.*, 2013] (im Vergleich G α_q = 42 kDa, G α_{13} = 44 kDa). Es existieren etwa 20 Mitglieder der Rho Familie GTPasen [Roy *et al.*, 2011]. RhoGTPasen kommen in jeder eukaryotischen Zelle vor [Jaffe *et al.*, 2005] und sind bekanntermaßen bei der Regulation von Zytoskelettveränderungen beteiligt. Die drei wichtigsten RhoGTPasen, die in dieser Arbeit behandelt wurden, sind Cdc42 („*cell division control protein 42 homolog*“), Rac1 („*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*“) und RhoA („*Transforming protein RhoA*“).

Cdc42

Cdc42 wurde in *Saccharomyces cerevisiae* als ein Protein entdeckt, das für die Zellpolarität verantwortlich ist [Johnson *et al.*, 1990]. Als bald wurde gezeigt, dass Cdc42 auch die Filopodienbildung in Fibroblasten reguliert [Nobes *et al.*, 1995]. **Abbildung 2.4** zeigt einen Überblick über die Cdc42-vermittelten Signalkaskaden, die zur Aktinpolymerisierung und zum Aktinumbau und somit zur Filopodienbildung führen. Cdc42 ist also in verschiedenen Zellarten ein wichtiger Vermittler der Filopodienbildung,

Neuere Untersuchungen mit Thrombozyten konditionaler Cdc42-„*knockout*“-Mäuse zeigten jedoch, dass Cdc42 in Thrombozyten nicht für die korrekte Filopodienbildung essentiell ist [Pleines *et al.*, 2010]. Filopodienbildung kann auch durch eine andere RhoGTPase - Rif („*Rho in filopodia*“) - vermittelt werden [Pellegrin *et al.*, 2005].

Neben der für Cdc42 typischen Filopodienbildung ist Cdc42 auch bei der Exozytose von Vesikeln beteiligt [Malacombe *et al.*, 2006; Harada *et al.*, 2000]. In Thrombozyten ist Cdc42 („*G25K GTP-binding protein*“) seit 1989 bekannt [Polakis *et al.*, 1989] und auch dessen Regulation durch GAPs (GTPase-aktivierende Proteine) wurde für Thrombozyten gezeigt [Hart *et al.*, 1991].

Rac1

Auch wenn Cdc42 und Rac1 die Bildung recht unterschiedlicher Zellprotrusionen vermitteln, so beeinflussen beide die Aktinpolymerisierung durch die Aktivierung von ARP2/3. Die wichtigsten Rac1-induzierten Signalwege, die zur Lamellipodienbildung führen, sind in **Abbildung 2.5** dargestellt. Im Fall von Rac1 wird durch aktives, GTP-gebundenes Rac1 jedoch ein Proteinkomplex namens WAVE-Komplex gebunden und hierbei bindet Rac1 nicht direkt an das im Komplex beteiligte, namensgebende WAVE („*Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin homolog*“) [Stradal *et al.*, 2004; Miki *et al.*, 2003]. Im WAVE-Komplex ist ein Rac1-Effektorprotein beteiligt, Sra-1 („*specifically Rac1-associated protein-1*“), über das nach heutigem Wissensstand die Signaltransduktion $\text{Rac1} \rightarrow \text{Sra-1 / WAVE-Komplex} \rightarrow \text{ARP2/3}$ stattfindet [Steffen *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2012]. Neben ARP2/3 wird auch mDia2 durch Rac1 aktiviert [Lammers *et al.*, 2008] und führt zur verstärkten peripheren Aktinpolymerisierung.

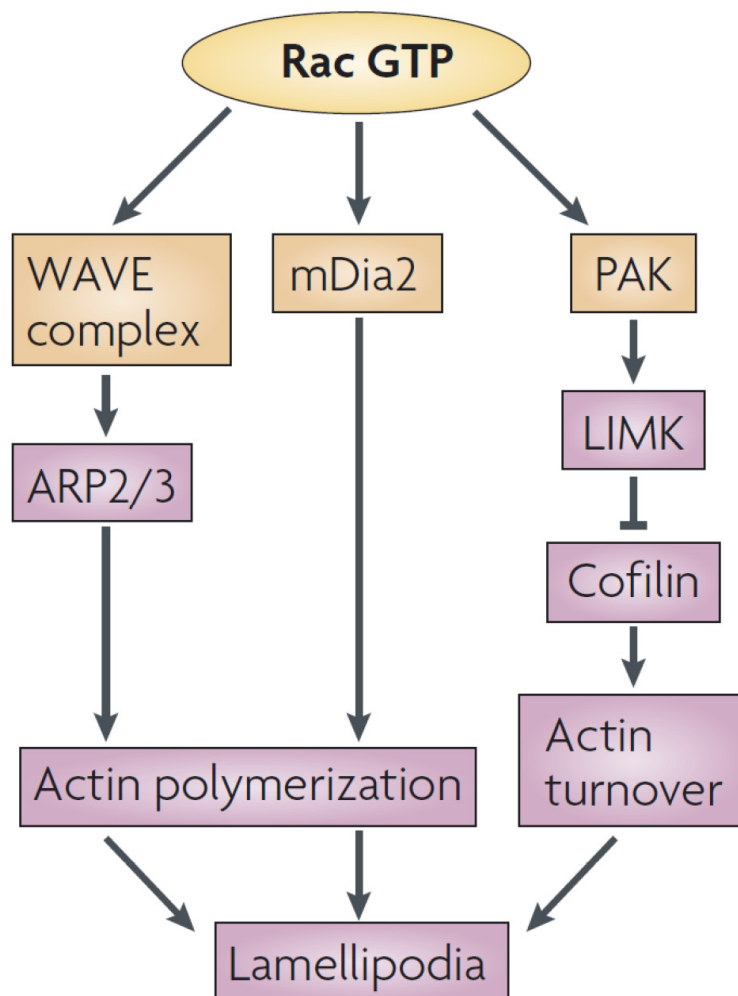


Abbildung 2.5: *Rac1* vermittelt Lamellipodienbildung. Aktives (GTP-gebundenes) *Rac1* kann an den WAVE-Komplex („Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin homolog“) binden und aktiviert so indirekt ARP2/3 („actin-related protein 2/3 complex“). Aktinpolymerisierung kann durch *Rac1* auch über *mDia2* („mammalian diaphanous-2“) stimuliert werden (Mitte). Beide Interaktionen führen zur Nukleation und schließlich Verzweigung bestehender Aktinstressfasern. Im rechten Zweig ist dargestellt, wie *Rac1* die Serin/Threonin-Kinase PAK („p21-activated kinase“) aktiviert und so LIMK („LIM domain kinase“) das Protein Cofilin deaktiviert, was zur Verminderung der Aktindepolymerisierung führt. [Verändert nach Heasman und Ridley, *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 2008]

Wie auch Cdc42 aktiviert *Rac1* neben der verstärkten Aktinpolymerisierung auch die Inhibierung der Aktindepolymerisierung. Über PAK und LIMK wird Cofilin gehemmt und der F-Aktin-Abbau vermindert [Heasman *et al.*, 2008].

Die Unterfamilie der RacGTPasen besteht aus drei Vertretern: *Rac1*, *Rac2* und *Rac3*, wobei nur *Rac1* in Thrombozyten exprimiert ist [McCarty *et al.*, 2005; Aslan *et al.*, 2013]. *Rac1* kann im Thrombozyten durch verschiedene Stimuli wie Kollagen, Thrombin oder Fibrinogen aktiviert werden [Soulet *et al.*, 2001; Suzuki-Inoue *et al.*, 2001] und

interagiert daraufhin mit dem Thrombozytenzytoskelett [Azim *et al.*, 2000]. Auch bei der Sekretion von Thrombozyten spielt Rac1 eine zentrale Rolle [Dwivedi *et al.*, 2010].

RhoA

RhoA ist vor allem für seine zentrale Rolle bei kontraktiven Prozessen [Wheeler *et al.*, 2004], der Bildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionskomplexen bekannt [Hall *et al.*, 1992]. Den ersten Hinweis darauf, dass RhoA die Aktinpolymerisierung reguliert, lieferten Experimente mit dem *Clostridium botulinum* Toxin C3 Transferase [Paterson *et al.*, 1990].

Eine Übersicht über die zentralen Signalwege von RhoA bezüglich Zytoskelettveränderungen ist in **Abbildung 2.6** dargestellt. Das vermutlich wichtigste Effektorprotein von RhoA ist ROCK („*RhoA-associated protein kinase 1 und 2*“) [Matsui *et al.*, 1996]. ROCK aktiviert einerseits LIMK, welches dann Cofilin durch Phosphorylierung inhibiert und damit den F-Aktin-Abbau vermindert [Maekawa *et al.*, 1999]. Weiterhin wird durch ROCK noch die Kontraktilität der entstehenden Aktomyosinfilamente beeinflusst. Aktiviertes, GTP-gebundenes RhoA führt zu aktivem ROCK, das MLC („*myosin light chain*“, engl., leichte Myosinkette) und MLCP („*myosin light chain phosphatase*“), bzw. die Untereinheit MBS („*myosin-binding subunit*“) der

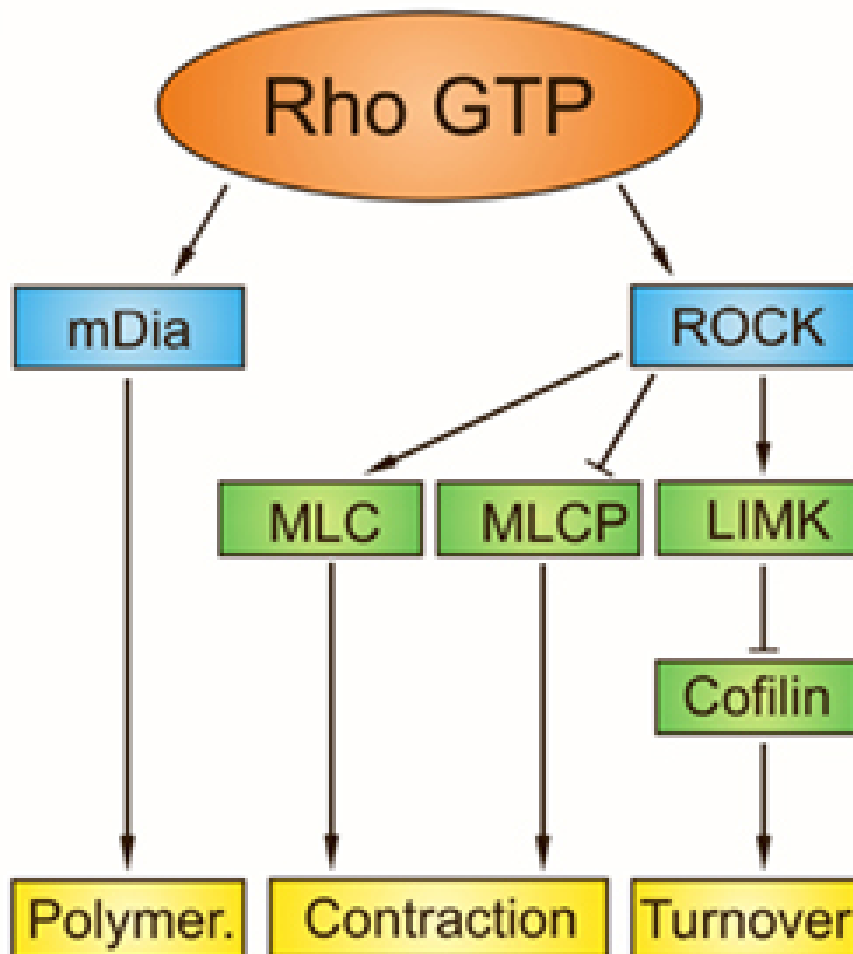


Abbildung 2.6: Wirkung von RhoA auf das Zytoskelett. Aktives, GTP-gebundenes RhoA interagiert mit mDia (links) und führt zur F-Aktin-Polymerisierung. Um die gebildeten Stressfasern zu stabilisieren und vor Abbau zu schützen, aktiviert RhoA sein Effektorprotein ROCK, welches LIMK aktiviert (ganz rechts). LIMK seinerseits inhibiert durch Phosphorylierung Cofilin und verhindert die Aktindepolymerisierung. Mitte: ROCK wirkt auf zwei Proteine ein, die sich mit gegensätzlicher Wirkung im Gleichgewicht befinden. Wird MLC phosphoryliert, führt dies zur Kontraktion der Aktomyosinfilamente, was den „shape change“ zur Folge hat. MLCP hingegen wird durch Phosphorylierung durch ROCK inhibiert, was eine Dephosphorylierung von MLC und damit eine Relaxierung des Zytoskeletts verhindert. [Dráber *et al.*, *Frontiers in Immunology* 2012]

Myosinphosphatase MLCP phosphoryliert [Kimura *et al.*, 1996; Wraith *et al.*, 2013; Amano *et al.*, 1996]. Wird die leichte Kette von Myosin phosphoryliert führt dies zur Kontraktion der Aktomyosinfilamente von beispielsweise glatten Muskelzellen wie bei der Vasokonstriktion [Riddick *et al.*, 2008]. In Thrombozyten wird durch die ROCK-vermittelte MLC-Phosphorylierung der „shape change“ und auch die „clot retraction“ (Retraktion des Blutgerinnsels) durch kontraktile Prozesse unterstützt, wohingegen die Phosphorylierung der MBS von MLCP dessen katalytische Aktivität inhibiert. Folglich erhöht sich der Gehalt an phosphoryliertem MLC [Suzuki *et al.*, 1999; Nakai *et al.*, 1997;

Egot *et al.*, 2013]. Schließlich kann nach Aktivierung GTP-gebundenes RhoA noch mit mDia1 interagieren, was zur Bildung dünner Aktinstressfasern führt, die durch die Wirkung von ROCK auf LIMK/Cofilin stabilisiert und vor dem Abbau geschützt werden [Watanabe *et al.*, 1999].

2. 2. 3. Regulation der RhoGTPasen durch RhoGAPs

Die kleinen GTPasen der Rho-Familie fungieren als „molekulare Schalter“. Sie können an- und abgeschaltet werden. Hierbei sind drei weitere Molekülgruppen von Bedeutung: GEFs („*guanine nucleotide exchange factor*“, engl., Guaninnukleotid austauschfaktor), GDIs („*guanine nucleotide dissociation inhibitor*“, engl., Guaninnukleotiddissoziationsinhibitor) und GAPs („*GTPase-activating protein*“, engl., GTPase-aktivierendes Protein). Die „molekulare Schalter“-Funktion ist in **Abbildung 2.7** dargestellt.

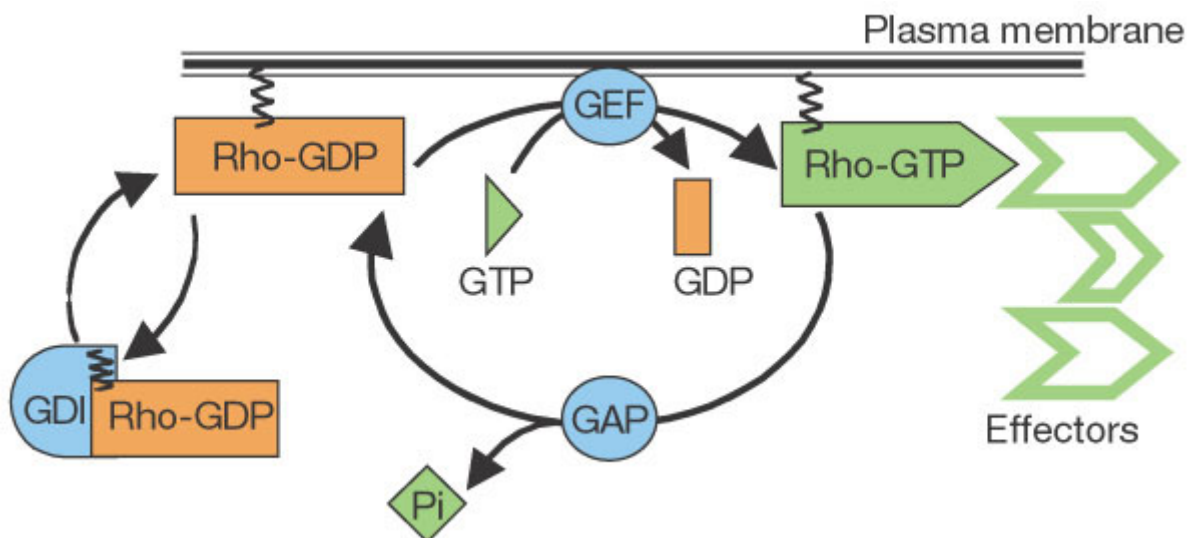


Abbildung 2.7: Kleine RhoGTPasen als „molekulare Schalter“. Die kleinen GTP-bindenden Proteine der Rho-Familie translozieren bei bestimmten Stimuli zur Zellperipherie. Dort aktivieren GEFs die RhoGTPase durch den Austausch von GDP zu GTP. Die GTP-gebundene GTPase kann nun mit seinen Effektorproteinen interagieren. Terminiert wird das Signal der kleinen RhoGTPasen durch die GAPs, welche die Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP katalysieren. GDIs können die kleine RhoGTPase in ihrem inaktiven Zustand halten. [Etienne-Manneville *et al.*, Nature 2002]

RhoGTPase aktivierende Proteine (RhoGAPs) regulieren die kleinen GTPasen der Rho Familie [Moon *et al.*, 2003]. RhoGTPasen besitzen generell nur eine geringe intrinsische GTPase-Aktivität [Rittinger *et al.*, 1997; Jelen *et al.*, 2009]. Hier kommen die

RhoGAPs ins Spiel, die mit ihrem Argininfingermotiv sehr effizient GTP zu GDP umsetzen [Scheffzek *et al.*, 1998; Ahmadian *et al.*, 1997]. Das Motiv des „Argininfingers“ beruht auf der Tatsache, dass die geladene Seitenkette eines definierten und durch eine Helix-Arginin-Helix-Abfolge exponiert liegenden Argininmoleküls mit dem aktiven Zentrum einer RhoGTPase interagiert und so den sonst instabilen Übergangszustand (engl. „*transition state*“) der GTP-gebundenen RhoGTPase stabilisiert [Rittinger *et al.*, 1997; Fidyk *et al.*, 2002]. GAPs regulieren also die kleinen RhoGTPasen. Doch wie wird die Aktivität der GAPs beeinflusst?

2. 2. 4. Autoinhibitorische BAR-Domäne

Bereits 2003 beschreiben Fauchereau und Kollegen einen Regulationsmechanismus für GTPase-aktivierende Proteine. Die GAP-Aktivität von Oligophrenin-1 wird durch dessen N-terminal gelegene BAR-Domäne inhibiert [Fauchereau *et al.*, 2003]. Die Inhibition beruht auf einer direkten Interaktion der BAR- und GAP-Domäne. Eberth und Kollegen schlagen hierfür mehrere Mechanismen vor (siehe **Abbildung 2.9**). Die GAPs, die der **Abbildung 2.8** zu Grunde liegen, stellen schematisch die beiden verwandten GAPs

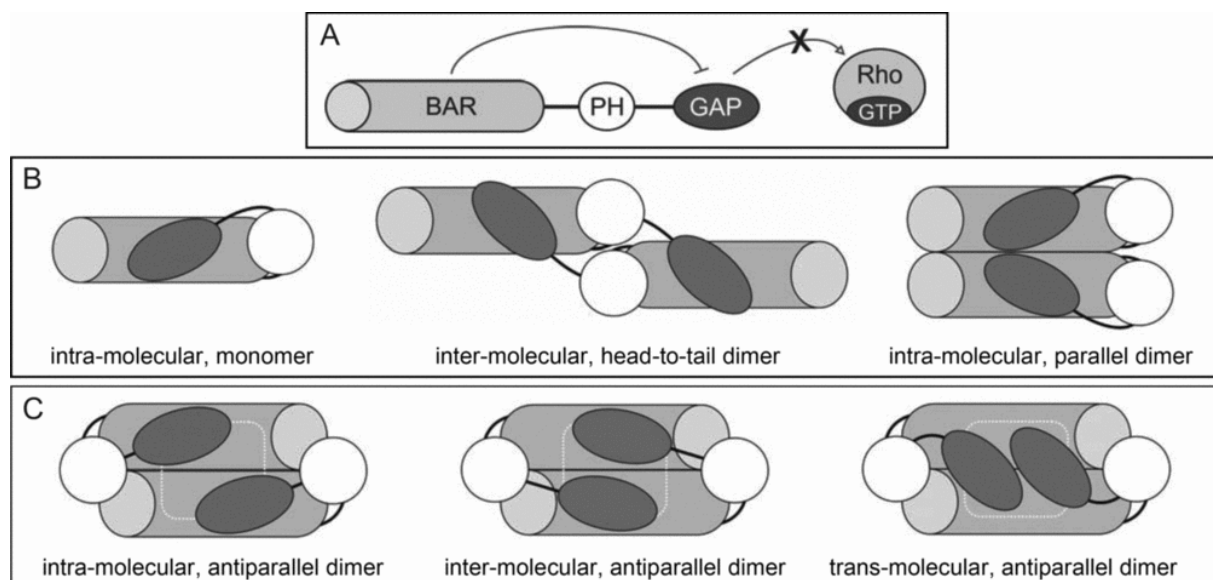


Abbildung 2.8: Mechanismen der Autoinhibition durch die BAR-Domäne. (A) Schematische Darstellung zur Inhibition der GAP-Aktivität durch die BAR-Domäne. (B) und (C) Die Inhibition kann sowohl intramolekular, als auch intermolekular stattfinden. Bei den wahrscheinlichen Möglichkeiten spielt auch die Dimerisierung der GTPase-aktivierenden Proteine eine entscheidende Rolle. [Eberth *et al.*, *Biochemical Journal* 2009]

Oligophrenin-1 und GRAF1 („*GTPase regulator associated with focal adhesion kinase*“) dar. Von den beschriebenen Mechanismen werden die intramolekularen monomeren und dimeren Interaktionen als unwahrscheinlich angesehen, können aber nicht ausgeschlossen werden. Außerdem wird die in diesen Proteinen vorhandene PH („*pleckstrin homology*“)-Domäne als notwendig für die autoinhibitorische Funktion der BAR-Domäne beschrieben [Eberth *et al.*, 2009].

2. 2. 5. Regulation von GAPs durch Phosphorylierung

Die Regulation von GAPs durch Phosphorylierung ist nicht unbekannt. So wird beispielsweise p190 RhoGAP an Tyrosin 1105 *in vitro* und *in vivo* durch Src („*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*“) phosphoryliert. Diese Tyrosinphosphorylierung ist notwendig um p190 RhoGAP zu aktivieren und so den p190 RhoGAP-vermittelten F-Aktin-Abbau zu erreichen. Das zu Grunde liegende Modell der Regulation von p190 RhoGAP ist in **Abbildung 2.9** dargestellt. In unstimulierten Zellen ist p190 RhoGAP an ein negativ regulierendes Protein gebunden. EGF („*epidermal growth factor*“)-Stimulation

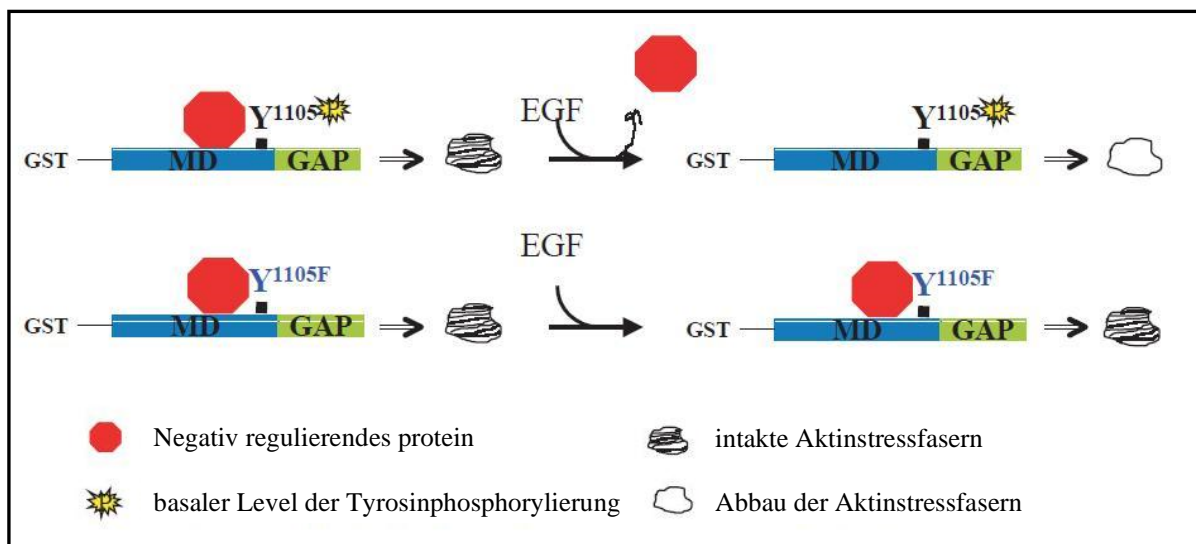


Abbildung 2.9: Modell der Regulation von p190 RhoGAP durch Tyrosinphosphorylierung. An Stelle Y1105 tyrosinphosphoryliertes p190 RhoGAP bindet an ein negativ regulierendes Protein. EGF-Stimulation führt zur Freisetzung des negativ regulierenden Proteins (rot) und p190 RhoGAP wird aktiv. Ist die Tyrosinphosphorylierungsstelle mutiert, kann auf EGF-Stimulation das negativ regulierende Protein nicht freigegeben werden und p190 RhoGAP bleibt inaktiv. Die Folge ist das Ausbleiben der Zytoskelettumorganisation. [Haskell *et al.*, *Journal of Cell Science* 2001]

führt zur Freisetzung des negativ regulierenden Proteins vom tyrosinphosphorylierten p190 RhoGAP und folglich kann p190 RhoGAP RhoA inaktivieren, was zum Aktinstressfaserabbau führt. Das mutierte p190 RhoGAP-Y1105F kann nicht an Stelle Y1105 tyrosinphosphoryliert werden. Nach EGF-Stimulation kann das negativ regulierende Protein daher nicht vom p190 RhoGAP freigesetzt werden. Die Folge ist, dass RhoA nicht durch p190 RhoGAP reguliert werden kann und daher keine Aktinzytoskelettumorganisation stattfindet [Haskell *et al.*, 2001]. Die Tyrosinphosphorylierung von p190 RhoGAP stellt eine Möglichkeit der engmaschigen und zeitlichen Regulation von RhoA und folglich von Stressfaser-, bzw. Aktinzytoskelettumorganisation dar [Yang *et al.*, 2001]. Dies wurde auch im Zusammenhang des Angiotensin II / AT1R (Angiotensin II Typ 1 Rezeptor) Signalweges in vaskulären glatten Muskelzellen gezeigt. Auch hier dient die Tyrosinphosphorylierung von p190 RhoGAP der zeitlichen Regulation der RhoA-Aktivität [Bregeon *et al.*, 2009].

2. 3. „*Neuron-associated developmentally regulated protein*“ (Nadrin)

2. 3. 1. Nadrin – bisherige Untersuchungen

Das „*neuron-associated developmentally regulated protein*“ (Nadrin), auch ARHGAP17 oder RICH-1 genannt, ist ein RhoGAP, das die kleinen GTPasen der Rho Familie regulieren kann. Bisher wurde Nadrin hauptsächlich in neuronalen Zellen untersucht. 2000 zeigen Harada und Kollegen, dass die Überexpression von Nadrin in PC12 Zellen (Zellen eines Nebennierenphäochromozytoms der Ratte) die Calcium-abhängige Exozytose verstärkt [Harada *et al.*, 2000]. PC12 Zellen dienen als Modellsystem um NGF („*nerve growth factor*“, engl., Nervenwachstumsfaktor)-vermittelte neuronale Differenzierung und Neuritenwachstum zu untersuchen [Katoh *et al.*, 2000].

Nadrin spielt weiterhin eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung von „*tight junctions*“ (engl., dichte Verbindung) bei der Bildung von Zell-Zell-Kontakten. Hierbei hat die RhoGTPase Cdc42 eine stark konservierte Aufgabe bei der Erhaltung der Zellpolarität von Epithelzellen und wird von Nadrin reguliert [Wells *et al.*, 2006].

Neueste Untersuchungen belegen eine essentielle Rolle von Nadrin bei der morphologischen Differenzierung von Astrozyten zu „Sternzellen“ (engl. „*stellate cells*“). Bei dieser Differenzierung ist es notwendig, dass RhoA inaktiviert wird und so das

Aktinzytoskelett umorganisiert werden kann. Die Nadrin-GAP-Aktivität ist für die erfolgreiche morphologische Differenzierung von Astrozyten zu „Sternzellen“ notwendig [Kobayashi *et al.*, 2013].

2. 3. 2. Nadrin existiert in verschiedenen Isoformen

Viele RhoGAPs besitzen Spezifität gegenüber einer bestimmten RhoGTPase, andere wiederum zeigen katalytische Aktivität gegenüber mehreren RhoGTPasen [Jelen *et al.*, 2009]. Bis heute sind die Mechanismen, die die Spezifität der GAPs gegenüber bestimmten Substraten bewirken, nicht genau erforscht. Die GAP-Domäne von Nadrin ist in der Lage dazu, *in vitro* alle drei in dieser Arbeit untersuchten RhoGTPasen zu inaktivieren [Harada *et al.*, 2000]. Ziel dieser Arbeit war es unter anderem zu untersuchen, ob die einzelnen Nadrin Isoformen Spezifität gegenüber einer oder mehreren RhoGTPasen aufweisen.

Nadrin existiert in der Maus als 5 Isoformen, die durch alternatives Spleißen gebildet werden. Ein Schema der 5 murinen Nadrin Isoformen ist in **Abbildung 2.10** dargestellt.

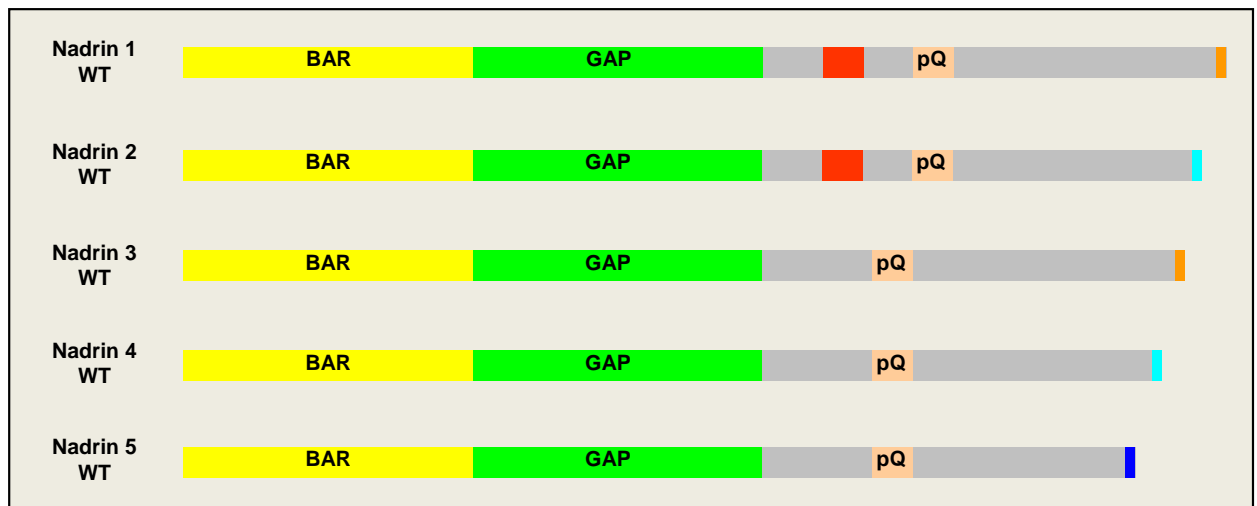


Abbildung 2.10: Nadrin Spleißisoformen der Maus. Die BAR-Domäne (gelb) und die katalytisch aktive GAP-Domäne (grün) sind in allen 5 murinen Nadrin Isoformen identisch. Der C-Terminus (grau) unterscheidet die 5 Isoformen voneinander. Die Isoformen 1 und 3 teilen sich durch alternatives Spleißen ein Ende (orange) wie auch die Isoformen 2 und 4 (hellblau). Isoform 5 ist die kürzeste Isoform und hat als Ende nur ein einziges Valin (dunkelblau). Die Isoformen 1 und 3, sowie 2 und 4, unterscheiden sich durch das Vorhandensein einer Abfolge von 78 Aminosäuren voneinander (rot). pQ = Abfolge von 17 Glutaminen.

Furuta und Kollegen zeigten 2002, dass die vier Nadrin Spleißvarianten der Ratte unterschiedliche Funktionen übernehmen. So schlagen sie für Nadrin-126 eine wichtige Funktion bei der embryonalen Gehirnentwicklung vor, und für die anderen drei Varianten einen mehr oder weniger starken Einfluss auf das NGF-induzierte Neuritenwachstum [Furuta *et al.*, 2002].

2. 4. Zielsetzung

Ziel der aktuellen Herz-/Kreislaufforschung ist es, neue Angriffspunkte für effiziente antithrombotische Therapien zu finden. Diese Therapien sollen atherosklerotischen Gefäßveränderungen vorbeugen, oder deren Beseitigung erleichtern. Eine der wichtigsten Anforderungen an diese „*anti-platelet-drugs*“ ist die Sicherheit im Hinblick auf die Blutungsneigung.

In dieser Arbeit wurde das Protein Nadrin eingehend untersucht. Bekanntermaßen spielt Nadrin eine wichtige Rolle bei Zytoskelettveränderungen von neuronalen Zellen. Für die Thrombozytenfunktion sind Zytoskelettveränderungen essentiell. Ziel dieser Doktorarbeit war es also Nadrin im Hinblick auf die für die Thrombozytenfunktion wichtigen Zytoskelettveränderungen zu charakterisieren (siehe **Abbildung 2.11**). Da von Nadrin in der Maus 5 verschiedene Spleißvarianten bekannt sind, war es außerdem notwendig, die einzelnen Isoformen getrennt voneinander zu analysieren, um deren Substratspezifität bezüglich der RhoGTPasen und schließlich deren individuelle Funktion zu ergründen. Weiterhin sollte in dieser Arbeit detailliert untersucht werden, wie die einzelnen Nadrin Isoformen reguliert werden.

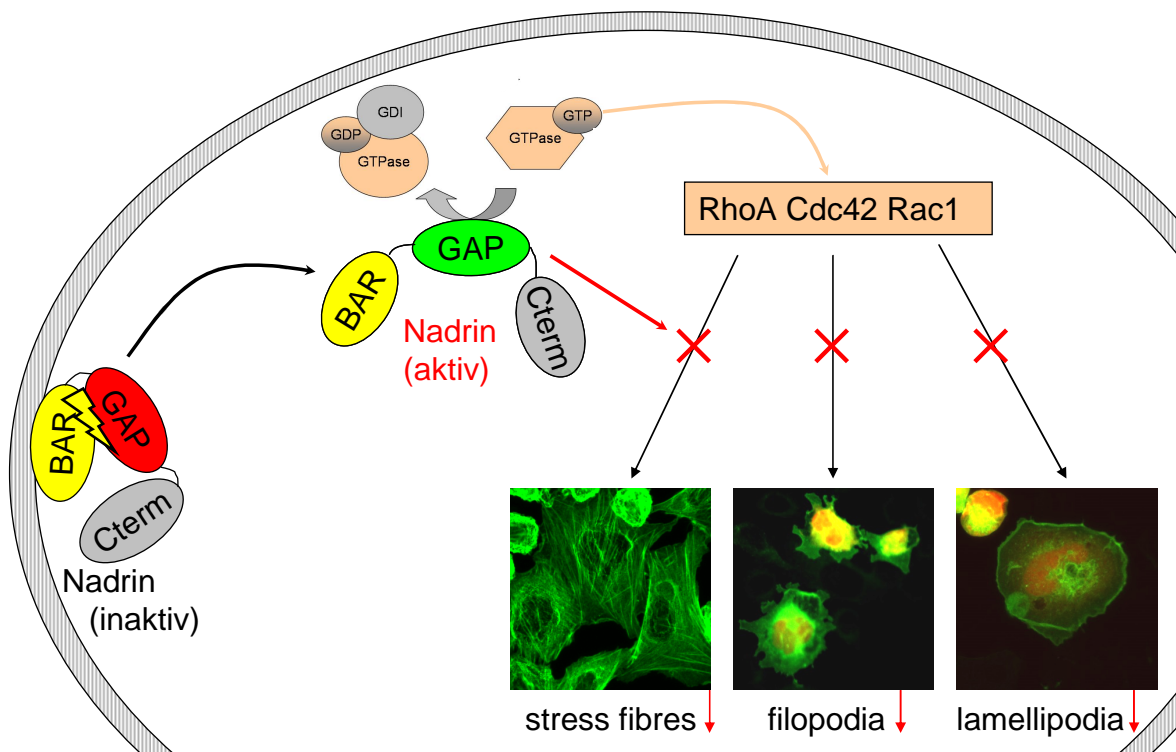


Abbildung 2.11: Zusammenfassung der Hypothese: Nadrin spielt eine wichtige Rolle bei RhoGTPase-vermittelten Zytoskelettveränderungen in Thrombozyten. Nadrin inaktiviert die RhoGTPasen und vermindert so die RhoA-vermittelte Stressfaserbildung, sowie die Cdc42/Rac1-vermittelte Pseudopodienbildung.

Es ergab sich folglich nachstehendes Arbeitsprogramm:

- Isolierung und Klonierung zweier Nadrin Isoformen (Nadrin2 WT und Nadrin5 WT) aus Gesamt-mRNA muriner Thrombozyten und Herstellung verschiedener Nadrin Mutanten
- Charakterisierung der Nadrin „full length“ Isoformen Nadrin2 WT und Nadrin5 WT bezüglich ihrer GAP-Aktivität und Spezifität gegenüber der RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42
- Untersuchung der autoinhibitorischen BAR-Domäne, auch im Hinblick auf die einzelnen Isoformen Nadrin2 Δ BAR und Nadrin5 Δ BAR.
- Nachweis der aktivierungsabhängigen Tyrosinphosphorylierung von Nadrin in Thrombozyten und Analyse des Einflusses der Tyrosinphosphorylierung auf die GAP-Aktivität von Nadrin2 und Nadrin5.

3. Material und Methoden

3. 1. Behandlung von Lösungen und Geräten

Um Sterilität zu gewährleisten, wurden hitzestabile Lösungen und Gefäße 20 min bei 121 °C und 1 bar Wasserdampfüberdruck autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden mit einem 0,22 µm-Sterilfilter (Millex-GP, 0,22 µm PES, 33 mm, Merck KGaA, Darmstadt) mit Polyethersulfonmembran sterilfiltriert. Alle hitzelabilen Geräte wurden mit 70 % (v/v) unvergälltem Ethanol gewaschen. Steriles Wasser entstammte ausschließlich der Reinstwasseranlage (TKA GenPure, TKA, Thermo Electron LED GmbH, Niederelbert) und wurde zusätzlich autoklaviert.

3. 2. Chemikalien, Reagenzien und Gerätschaften

3. 1. 1. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in **Tabelle 3.1** aufgeführt.

Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien, zugehörige CAS-Nummer und Bezugsquelle

Chemikaliename	Bezugsquelle ¹⁾	CAS-Nummer ²⁾
Acrylamid/Bis-Lösung 30 %	RO	-
Agarose SeaKem® LE Agarose	LO	9012-36-6
Ammoniumperoxodisulfat	RO	7727-54-0
Ampicillin Natriumsalz	RO	69-52-3
β-Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol)	SI	60-24-2
Bromphenolblau Natriumsalz	ME	34725-61-6
Calciumchlorid	FL	10043-52-4
Dimethylsulfoxid	AP	67-68-5
di-Natriumphosphat	ME	7558-79-4
Essigsäure	ME	64-19-7
Ethanol 100 % unvergällt	VW	64-17-5

Ethanol 100 % vergällt	VW	64-17-6
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	SI	60-00-4
Formaldehydlösung 4 %	OF	50-00-0
Glukose	SI	50-99-7
Glyzerin	FL	56-81-5
Glycin	AP	56-40-6
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	RO	7365-45-9
Isopropanol	VW	67-63-0
Kaliumchlorid	ME	7447-40-7
Kanamycin	SI	25389-94-0
Luria Bertani Nährmedium	SI	-
Luria Bertani Nährmedium mit Agar	SI	-
Magermilchpulver	AP	-
Magnesiumchlorid	ME	7786-30-3
Methanol	VW	67-56-1
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	RO	110-18-9
Natriumacetat	ME	127-09-3
Natriumchlorid	AP	7647-14-5
Natriumcitrat	AP	6132-04-3
Natriumdesoxycholat	AP	302-95-4
Natriumdodecylsulfat (SDS)	RO	151-21-3
Natriumhydrogenphosphat	ME	7601-54-9
Natriumhydroxid	RO	1310-73-2
Nonidet TM P40 Substitute (NP40)	FL	9016-45-9
Rinderserumalbumin, Fraktion V	AP	9048-46-8
Salzsäure	AP	7647-01-0
Schwefelsäure	RO	7664-93-9
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS-base)	AP	77-86-1
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid (TRIS-HCl)	RO	1185-53-1
Triton TM X-100	SI	9002-93-1
Tween® 20	ME	9005-64-5

¹⁾ Bezugsquellen der Chemikalien: AP = AppliChem GmbH, Darmstadt; FL = Fluka Chemie AG, Taufkirchen; LO = Lonza Cologne GmbH, Köln; ME = Merck Eurolab GmbH, Darmstadt; OF = Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken; RO = Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe; SI = Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; VW = VWR International GmbH, Darmstadt

²⁾ CAS-Nummer: internationaler Bezeichnungsstandard für Chemikalien (CAS = Chemical Abstract Service)

Soweit im Text nicht anders vermerkt, wurden Laborchemikalien mindestens in p. a. (*pro analysi*)-Qualität von folgenden Firmen bezogen:

- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- AppliChem, AppliChem GmbH, Darmstadt
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

3. 1. 2. DNA-Längenstandards und Laufpuffer für Desoxyribonukleinsäuren

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Längenstandards sind in **Tabelle 3.2** aufgeführt.

Tabelle 3.2: *Verwendete DNA-Längenstandards*

Hersteller	Bezeichnung des Längenstandards
Promega GmbH, Mannheim	1kb DNA Ladder G5711
Promega GmbH, Mannheim	100bp DNA Ladder G2101

Als Laufpuffer für Desoxyribonukleinsäuren wurde das folgende Produkt verwendet:

Blue/Orange Loading Dye, 6x, Promega GmbH, Mannheim

3. 1. 3. Enzyme

Zur Durchführung dieser Arbeit wurden folgende, in **Tabelle 3.3** dargestellten, Enzyme verwendet.

Tabelle 3.3: Verwendete Enzyme mit zugehöriger EC-Nummer und Hersteller

Enzymname		EC-Nummer ¹⁾	Hersteller ²⁾
Desoxyribonuklease I		3.1.21.1	FE
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase		2.7.7.7	FI
„calf intestinal phosphatase“		3.1.3.1	NE
Apyrase		3.6.1.5	SI
Thrombin		3.4.21.5	RD
Restriktions- endonukleasen (Schnittstelle)	<i>AgeI</i> (5' A↓CCGGT 3')	3.1.21.4	NE
	<i>BamHI</i> (5' G↓GATCC 3')	3.1.21.4	NE
	<i>XbaI</i> (5' T↓CTAGA 3')	3.1.21.4	NE
T4 DNA Ligase		6.5.1.1	FE

¹⁾ EC-Nummer: Die „Enzyme Commission Nummer“ stellt ein Klassifikationssystem für Enzyme dar

²⁾ Bemerkung zu den Herstellern: FE = Fermentas Molecular Biology Products, Fisher Scientific – Germany GmbH, Schwerte; FI = Finnzymes Molecular Biology Products, Fisher Scientific – Germany GmbH, Schwerte; NE = NEB New England Biolabs GmbH, Frankfurt; RD = Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim; SI = Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

3. 1. 4. Molekularbiologische Hilfsmittel

Für die Durchführung dieser Arbeit wurden die folgenden, in **Tabelle 3.4** aufgeführten, Reagenziensätze und molekularbiologischen Hilfsmittel verwendet.

Tabelle 3.4: Verwendete molekularbiologische Hilfsmittel und Reagenziensätze

Reagenziensatz	Anwendung	Hersteller
RNeasy Mini Kit	RNA-Isolierung	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Plasmidisolierung	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Plasmidisolierung	QIAGEN GmbH, Hilden
ImProm-I™ Reverse Transcription System	cDNA-Synthese / RT-PCR	Promega GmbH, Mannheim
QuikChange II Site-	Mutagenese zirkulärer DNA-	Agilent Technologies

Directed Mutagenesis Kit	Plasmide	Deutschland GmbH, Böblingen
QIAquick Gel Extraction Kit	Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	QIAGEN GmbH, Hilden

3. 1. 5. Geräte

Im Folgenden sind die verwendeten Geräte aufgeführt, sofern nicht im laufenden Text erwähnt.

Autoklav	WESA AG, Eupen, Belgien
automatischer Hämatologie-Analysator	KX-21N, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt
Brutschrank	CO ₂ INCUBATOR, SANYO Electric Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan kelvitron® t Trockenschrank, Heraeus TM , Fisher Scientific – Germany GmbH, Schwerte
Drehrad	Rotator 2 x 6 mit Drehteller und Klammern, Helmut Saur Laborbedarf, Reutlingen
Eismaschine	Scotsman AF 100, Scotsman Ice Systems, Vernon Hills (IL), USA
Filter	Millex-GP, 0,22 µm PES, 33 mm, Merck KGaA, Darmstadt
Filterpapier	Whatman Grade GB005 580 x 580 mm 3MM Cellulose Chromatography Paper, Whatman GmbH, Dassel
Heizblöcke	Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg
Kanülen	BD Microlance TM 3, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Kühlschränke	4 °C Kühlzelle, Viessmann Kältetechnik GmbH, Hof/Saale

	4 °C, - 20 °C, - 80 °C Schränke: Standardgeräte -80 °C, -150°C, SANYO Electric Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan
Magnetrührer	Ikamag [®] RCT, IKA [®] -Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mehrkanalpipette	Eppendorf Research [®] , 8-Kanal-Pipette, 30-300 µl, Eppendorf AG, Hamburg
Mikrowelle	MW 7809, SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern
Mikroskope	OPTIPHOT-2, Nikon GmbH, Düsseldorf Axiovert200, Carl Zeiss AG, Oberkochen Nikon DIAPHOT, Nikon GmbH, Düsseldorf LSM 5 Exciter, Carl Zeiss AG, Oberkochen
Neubauer Zählkammer	C-Chip Einwegzählkammer, DigitalBio, NanoEnTek Inc. (HQ), Guro-gu, Seoul, Korea Neubauer improved 0,1 mm, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen
PCR-Maschinen	DNA Engine [®] , Bio-Rad Laboratories GmbH, München FlexCycler, Analytik Jena Aktiengesellschaft, Jena
pH-Messgerät	HI 9025 microcomputer pH meter, HANNA Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein
Photodokumentation	Quantum ST, VILBER LOURMAT Deutschland GmbH, Eberhardzell
Pipetten	Eppendorf Research [®] Plus (variabel), verschiedene Ausführungen, Eppendorf AG, Hamburg STARLAB ErgoOne [®] (variabel), verschiedene Ausführungen, STARLAB GmbH, Hamburg PEQLAB peqPETTE (variabel), verschiedene Ausführungen, PEQLAB Biotechnologie GmbH,

	Erlangen
Pipettierhilfe	accu-jet® pro, BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Reinstwasseranlage	TKA GenPure, TKA, Thermo Electron LED GmbH, Niederelbert
Rollenmischer	analoger Rollenmischer RS-TR05, Phoenix Instrument GmbH, Garbsen Rollenmischer RM5, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG – „Assistent“, Sondheim / Rhön
Rundschüttler	Innova® 44, New Brunswick™, Eppendorf AG, Hamburg CELLOSHAKER VARIOSPEED, RENNER GmbH, Dannstadt IKA® KS 260 basic, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Sicherheitswerkbank	HERAsafe HS 18, Heraeus®, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Spektralphotometer	SmartSpec™ 3000, Bio-Rad Laboratories GmbH, München NanoDrop 2000, NanoDrop products, Wilmington (DE), USA
Stoppuhr	Standardgeräte, digital
Stromquellen	PowerPac™ 300, Bio-Rad Laboratories GmbH, München PS 304 Electrophoresis Power Supply, Life Technologies, Fisher Scientific – Germany GmbH, Schwerte EPS 601 Power Supply, GE Healthcare GmbH, Solingen
Taumelschüttler	Taumelschüttler, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Vortexer	IKA® MS 3 digital, IKA®-Werke GmbH & Co. KG,

	Staufen IKA® MS 3 basic, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen Vortex Genie 2, Scientific Industries, Inc., Bohemia (NY), USA
Waagen	Sartorius GW 3202, Sartorius AG, Göttingen Denver Instrument TP-3002, Fisher Scientific – Germany GmbH, Schwerte
Wasserbadthermostat	Inkubationsbad, GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel MS/2 Umwälzthermostat, LAUDA-Brinkmann , LP., Delran (NJ), USA
Zentrifugen	Centrifuge 5417C, Eppendorf AG, Hamburg Centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg Centrifuge 5415C, Eppendorf AG, Hamburg Multifuge 1 s, Heraeus™, Fisher Scientific – Germany GmbH, Schwerte Megafuge 1.0R, Heraeus™, Fisher Scientific – Germany GmbH, Schwerte Multifuge 3S+, Heraeus™, Fisher Scientific – Germany GmbH, Schwerte

3. 1. 6. Verwendete Zelllinien

Es wurde mit den im Folgenden aufgeführten Zelllinien der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig gearbeitet. Die Stammkulturen wurden im normalen Kulturmedium supplementiert mit 10 % (v/v) DMSO und finalen 20 % FCS (v/v) bei -150 °C eingefroren aufbewahrt.

HEK 293 (DSMZ ACC 305)

A5-CHO [Frojmovic *et al.*, 1991]

3. 1. 7. Verwendete Bakterienstämme und Vektoren

In dieser Arbeit wurde mit den käuflich von Life Technologies GmbH, Darmstadt erworbenen One Shot® TOP10 chemisch kompetenten *Escherichia coli* gearbeitet. Als Vektoren wurden die in **Abbildung 3.1** dargestellten Plasmide pcDNATM3.1/hygro(+) (**Abbildung 3.1A**) von Life Technologies GmbH, Darmstadt und ptdTomato (**Abbildung 3.1B**) von Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich verwendet. Das Plasmid pcDNATM3.1/hygro(+) dient der Expression von Proteinen in Säugetierzellen. Hierzu wird das Gen von Interesse durch Restriktionsendonukleaseverdau (siehe 3. 3. 4. 1. „Restriktionsendonukleaseverdau“) in die multiple Klonierungsstelle eingebracht und durch T4 DNA-Ligase-vermittelte Ligation (siehe 3. 3. 4. 2. „Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren“) kovalent mit dem Plasmid verbunden.

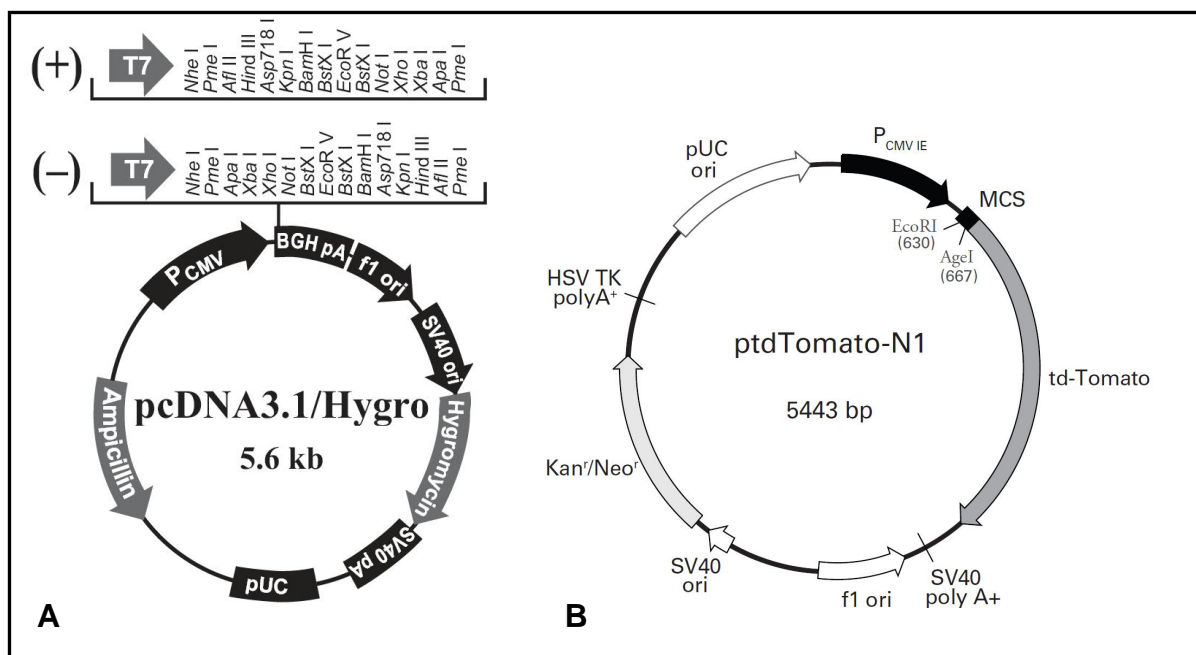


Abbildung 3.1: In dieser Arbeit für Klonierungen verwendete Plasmidvektoren. Dargestellt sind Genkarten der wichtigsten Sequenzen wie Antibiotikaresistenzen, Promotoren, der Replikationsursprung und die „multiple cloning site“ (engl., MCS, multiple Klonierungsstelle). (A) Das Plasmid pcDNATM3.1/Hygro(+) dient der effizienten transienten oder stabilen Proteinexpression in Säugetierzellen. (B) Das Plasmid ptdTomato-N1 erlaubt die Expression eines beliebigen Proteins in Säugetierzellen, das C-terminal an das rotfluoreszierende Protein „tandem“ Tomato fusioniert ist. P_{CMV} = Promotor des Cytomegalievirus; BGH pA = „bovine growth hormone“ Transkriptionsterminations- und Polyadenylierungssignal; SV40 ori = „Simian virus 40“ (engl., Affenvirus 40) Promotor erlaubt die effiziente Expression der Hygromycinresistenz; Hygromycin = die Hygromycinresistenz dient der Generierung stabil transfizierter Zelllinien; SV40 pA = Transkriptionsterminations- und Polyadenylierungssignal von SV40; pUC = erlaubt die effiziente („high-

copy“) Replikation des Plasmids in *E. coli*; Ampicillin = β -Lactamase Gen zur Selektion positiver Transformanden; MCS = multiple Klonierungsstelle; td-Tomato = Gen zur Expression von „tandem“ Tomato; Kan^r = Resistenz gegen Kanamycin zur Selektion positiver Transformanden; Neo^r = das Neomycinphosphotransferasegen verleiht Resistenz gegen G418 (Geneticin) zur Generierung stabil transfizierter Zelllinien; HSV TK polyA⁺ = Herpes simplex virus Thymidinkinase Polyadenylierungssignal zur Transkriptionstermination.

Das Plasmid ptdTomato-N1 dient der Expression eines Fusionsproteins. Dazu wird das Gen von Interesse vor dem „tandem“ Tomato-Gen in die MCS kloniert. Hierbei war zu beachten, den Leserahmen beim Übergang der Nadrinsequenz in die „tandem“ Tomato-Sequenz aufrecht zu erhalten und das Stop-Codon von Nadrin durch Mutation zu eliminieren. Die Sequenzen und Abigramme hierzu sind im Anhang aufgeführt.

Die Sequenzierung der Plasmide wurde von der Firma GATC (GATC Biotech AG, Konstanz) durchgeführt. Es wurden gemäß der Anforderungen der Sequenzierfirma 30 μ l Plasmid mit einer Konzentration von 50 ng/ μ l an die Firma gesendet. Die Sequenzierreaktion wurde mit Standardprimern (z. B. pCMV „forward“ Primer) und mit nach meinen Anweisungen von der Firma synthetisierten Oligonukleotidprimern, die in der Nadrinsequenz lagen, durchgeführt. Abigramme relevanter Sequenzierungen sind im Anhang einsehbar.

3. 1. 8. Verwendete Oligodesoxyribonukleotide (PCR-Primer)

Die verwendeten Oligodesoxyribonukleotide (PCR-Primer) sind in **Tabelle 3.5** zusammengefasst. Bezugsquelle der Oligodesoxyribonukleotide war die Firma Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg. Zur Konzipierung der Oligodesoxynukleotidsequenzen und der damit durchgeführten PCR wurden die folgenden webbasierten Programme verwendet:

„Primer3“ (<http://frodo.wi.mit.edu/>)

„OligoCalc“ (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)

„PrimerX“ (<http://www.bioinformatics.org/primerx/>)

Tabelle 3.5: Verwendete Oligodesoxyribonukleotide und PCR-Primer

Oligonukleotidname	Sequenz	RE-Schnittstelle
Nadrin_fw	5'- gagaggatccacccatgaagaagcaattcaaccgcatg -3'	BamHI
Nadrin_2_4_rev	5'- gagatctagattagtctggaaaccttcccac -3'	XbaI
Nadrin_5_rev	5'- gagatctagatcatacatcagtgacgattctgg -3'	XbaI
Nadrin_4_GAP_fw	5'- gagaggatccacccatggagaagccagccttcggcacacctc -3'	BamHI
Nadrin_4_FL_oS_rev	5'- gagaaacgggtgggtctggaaaaccttcccacctg -3'	AgeI
Nadrin_5_FL_oS_rev	5'- gagaaccgggtgtacatcagtgacgattctggaggc -3'	AgeI
Nadrin_Y124A_fw	5'- gagatcatggacctctcgtggcatagcagaggtggag -3'	-
Nadrin_Y124_rev	5'- ctccacctctgctatgccagcgagaggtccatgatctc -3'	-
Nadrin_Y314_fw	5'- catcgcatctggatgaattgcctctgatccccatgctgctg -3'	-
Nadrin_Y314_rev	5'- cgacagcatggggatcagagggcgaattcatccagatcgcatg -3'	-

3. 2. Zellbiologische Arbeiten

3. 2. 1. Kultivierung von Zelllinien

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter der Sterilbank durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Verwendung eines Antibiotikums (Penicillin/Streptomycin) im Nährmedium wurde zur Vermeidung von Seiteneffekten auf die Zellphysiologie abgelehnt. Zelllinien wurden unter physiologischen Bedingungen in feuchter, 5 %-iger CO₂-Atmosphäre bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

3. 2. 1. 1. A5-CHO

A5-CHO („*chinese hamster ovary*“) Zellen [Frojmovic *et al.*, 1991] sind adärent wachsende Zellen, die das humane Integrin α IIB β 3 auf ihrer Zelloberfläche stabil überexprimieren. A5-CHO Zellen wurden nie länger als 2 bis 3 Wochen passagiert, um den Verlust des stabil transfizierten Integrins zu verhindern.

Die Zellen wurden in 175 cm²-Gewebekulturflaschen kultiviert. Das Nährmedium besaß folgende Zusammensetzung: DMEM „*high glucose*“ (Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt) + 10 % FCS + 1 % NEAA (nicht essentielle Aminosäuren, Gibco®

MEM Non-Essential Amino Acids, Life Technologies GmbH, Darmstadt). Für die Subkultivierung wurde das Medium abgenommen und verworfen. Die adhärent wachsenden Zellen wurden mit adäquater Menge PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin (0,05 % Trypsin-EDTA, Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt) für 3 - 10 min im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde mit 10 % FCS-haltigem Medium abgestoppt und die Zellsuspension schließlich bei 311 g für 5 min bei RT abzentrifugiert. Die Einstellung der für den jeweiligen Versuch benötigten Zelldichte beruhte nun auf der während der Zentrifugation mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelten Zellzahl.

3. 2. 1. 2. HEK-293

HEK-293 („*human embryonic kidney*“, DSMZ-Nr. ACC 305) sind adhärent wachsende Zellen, die in 75 cm²-Gewebekulturflaschen kultiviert wurden. Das Nährmedium setzte sich wie folgt zusammen: DMEM „*high glucose*“ (Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt) + 10 % FCS + 1 % NEAA. Die Subkultivierung von HEK-293 Zellen fand, wie bei 3. 2. 1. 1. „A5-CHO“ beschrieben, statt.

3. 2. 2. Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Medien wurden vor der Verwendung 20 min lang bei 121 °C und 1 bar Wasserdampfüberdruck autoklaviert. Zur Selektion von transformierten Bakterien wurde antibiotikumhaltiges Medium verwendet. Die Zugabe von Ampicillin bzw. Kanamycin wurde nach dem Abkühlen der Medien auf ca. 50 °C vorgenommen. Die sterilfiltrierte Stammlösung des zugegebenen Ampicillin hatte eine Konzentration von 100 mg/ml, Kanamycin besaß eine Konzentration von 50 mg/ml. Im Medium betrug die Endkonzentration 100 µg Ampicillin, bzw. 50 µg Kanamycin pro Milliliter.

Für diese Arbeit wurden ausschließlich One Shot® TOP10 chemisch kompetente *Escherichia coli* (One Shot® TOP10 Chemically Competent *E.coli*, Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt) verwendet. Der Genotyp dieser kommerziell erwerblichen Bakterien entstammt laut Hersteller dem Bakterienstamm DH10B™ [Durfée *et al.*, 2008] und besitzt dieselben Merkmale.

3. 2. 3. Transfektion

Um zirkuläre DNA in Säugetierzellen einzuschleusen, wurde die Transfektion mittels Lipofectamine® 2000 (Life Technologies GmbH, Darmstadt) durchgeführt. Hierzu wurden am 1. Tag $0,2 \times 10^6$ A5-CHO, bzw. $0,225 \times 10^6$ HEK-293 pro ml Medium (DMEM „high glucose“ (Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt) + 10 % FCS + 1 % NEAA) in 6 „well“-Zellkulturschalen ausgesät und für 24 h bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die jeweilige Plasmid-DNA mit DMEM „high glucose“ (Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt) ohne Zusätze auf 3 µg pro Transfektion eingestellt (150 µl). Zeitgleich wurde 9 µl Lipofectamine® 2000 mit 91 µl DMEM „high glucose“ (Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt) ohne Zusätze verdünnt. Zur DNA-Lipofectamine® 2000-Komplexbildung wurden dann beide Komponenten zusammengemischt und bei RT etwa 45 bis 50 min inkubiert. Nach der Komplexbildung wurde pro „well“ 250 µl DNA/Lipofectamine® 2000-Gemisch den ca. 80 % konfluenten Zellen zugegeben und die Zellen ca. 6 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Transfektion wurde ein Medienwechsel gegen DMEM „high glucose“ (Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt) + 0,5 % FCS durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden dann ca. 16 bis 23 h nach Mediumwechsel für die jeweilige Versuchsdurchführung geerntet. Kotransfektionen von Zellen mit Nadrin cDNA zusammen mit RhoGTPasen-, bzw. Src-cDNA wurden im Verhältnis Nadrin:RhoGTPase 60:1 und Nadrin:Src 5:1 durchgeführt.

3. 2. 4. Transformation

Es gibt Bakterien, die natürlicherweise Nukleinsäuren aus der Umgebung aufnehmen können, ohne zuvor eine spezielle Behandlung durchlaufen zu haben. Hierzu zählen beispielsweise *Bacillus*-Arten. *Escherichia coli* hingegen muss durch ein bestimmtes Verfahren vor der Transformation kompetent, also „aufnahmefähig für DNA“ gemacht werden.

Als Transformationsstamm wurde *E. coli* TOP10 (Unterstamm DH10B™, Life Technologies GmbH, Darmstadt) verwendet. Es handelt sich um ein Derivat des Stammes *Escherichia coli* K12, welcher keine Pathogenität besitzt.

Die chemisch kompetenten *E. coli* TOP10-Zellen wurden mittels Hitzeschock transformiert. Hierzu wurden die bei - 80 °C gelagerten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10 – 50 ng Vektor vermischt. Zu 50 µl kompetenten *E. coli* TOP10-Zellen wurden 10 – 30 µl Ligationsansatz (3. 3. 4. 2. „Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren“) gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 20 bis 30 min auf Eis. Daran schloss sich der Hitzeschock bei 42 °C für 45 s auf dem Heizblock an. Zuletzt wurden die transformierten Zellen auf Eis ein bis drei Minuten lang abgekühlt und mit 500 µl auf RT vorgewärmtem LB („*lysogeny broth*“)-Medium versehen. Eine einstündige Inkubationszeit auf einem Rundschüttler mit 200 bis 220 Upm (Innova® 44, New Brunswick™, Eppendorf AG, Hamburg) und 37 °C folgte, um bei den Transformanden die Antibiotikumresistenz auszubilden. Nach dieser Inkubationszeit ohne Selektionsdruck folgte die Selektion durch Ausplattieren von einer adäquaten Menge der Kultur auf ampicillin- (100 µg/ml) bzw. kanamycinhaltigen (50 µg/ml) Agarplatten. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Einzelkolonien wurden schließlich verwendet, um 4 ml antibiotikahaltiges LB-Medium zu inokulieren. Die Transformanden wurden dann mittels Plasmidisolierung (siehe 3. 3. 1. „Isolierung von Plasmid-DNA“) und analytischem Restriktionsendonukleaseverdau (siehe 3. 3. 4. 1. „Restriktionsendonukleaseverdau“) analysiert.

3. 2. 5. Isolierung muriner Thrombozyten

Zur Gewinnung von murinen Thrombozyten wurde C57BL/6 Wildtyp-Mäusen unter Isoflurannarkose (Isofluran CP®, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf) aus dem retroorbitalen Venenplexus mittels heparinisierten Glaskapillaren Blut entnommen. Zur Koagulationshemmung wurde das Blut mit ACD („*acid citrate dextrose*“) versetzt. Die Zusammensetzung des ACD-Puffers ist der **Tabelle 3.6** zu entnehmen. Das Blut-ACD-Gemisch wurde anschließend 5 min bei RT und 1800 Upm

Tabelle 3.6: Zusammensetzung des ACD-Puffers zur Antikoagulation

Chemikalie	Endkonzentration	Einwaage [g]
Natriumcitrat	24 mM	12,5
Zitronensäure	18 mM	6,82
Glukose	28 mM	10,0

Natriumhydroxid	pH-Wert 4,69 einstellen
Wasser	ad 500 ml

(Eppendorf Centrifuge 5415C) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere Phase (das PRP („*platelet rich plasma*“)) grob abgenommen und in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 800 Upm (Eppendorf Centrifuge 5415C) bei RT für 6 min. Dieser Schritt diente der Klärung des PRP von Erythrozyten und Leukozyten. Das oben abgesetzte PRP wurde schließlich sauber abgenommen und in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Um eine unerwünschte Thrombozytenaggregation zu verhindern wurde der PRP optional Apyrase (finale Konzentration = 0,02 U/ml) und PGI₂ (finale Konzentration = 0,5 µM) zugegeben. Um das Antikoagulanzen wegzuwaschen wurden die Thrombozyten des PRP 5 min bei 2800 Upm (Eppendorf Centrifuge 5415C) und RT abzentrifugiert und mit 1 ml Tyrode's Puffer pH 7,4 (mit HEPES eingestellt) mit Apyrase und PGI₂ versetzt gewaschen. Die Zusammensetzung der 20-fach konzentrierten Stocklösung ist **Tabelle 3.7** zu entnehmen. Vor Verwendung wird der Puffer mit destilliertem Wasser verdünnt und frisch mit Glukose (Endkonzentration 0,1 % (v/v)) und BSA (Endkonzentration = 0,36 %) versetzt. Nun wurden die Thrombozyten für 20 bis 60 min bei 37 °C ruhen gelassen. Nach der Inkubation bei 37 °C wurde die Thrombozytenkonzentration im automatischen Hämatologieanalysator (Sysmex) gemessen (1:10 verdünnt mit Tyrode's Puffer). Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 2800 Upm (Eppendorf Centrifuge 5415C) und RT wurden die pelletierten Thrombozyten mit Tyrode's Puffer auf die für den jeweiligen Versuch benötigte Konzentration eingestellt.

Tabelle 3.7: Zusammensetzung der 20-fach konzentrierten Stocklösung des Tyrode's Puffers für murine Thrombozyten

Chemikalie	Endkonzentration	Einwaage [g]
Natriumchlorid (NaCl)	2,7 M	159,5
Kaliumchlorid	53,6 mM	3,99
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	238 mM	19,99
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	8 mM	1,1
Wasser (H ₂ O)	ad 1000 ml	

3. 2. 6. Isolierung humaner Thrombozyten

Von gesunden Spendern wurde venöses Blut gewonnen. Als Antikoagulant diente ACD (siehe **Tabelle 3.6**). Das Blut wurde aus den 20 ml-Spritzen vorsichtig in konische 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Gewinnung „Plättchen reichen Plasmas“ (PRP, „*platelet rich plasma*“) diente der erste Zentrifugationsschritt (20 min ohne Bremse bei 216 g und RT). Die obere Phase wurde mit einer sterilen Transferpipette in ein konisches 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt (maximal 10 ml pro Röhrchen). Das PRP wurde dann auf 35 ml mit Tyrode's Puffer pH 6,5 (Zusammensetzung siehe **Tabelle 3.8**) aufgefüllt und für 10 min bei 863 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Thrombozyten wurden in einer für die folgenden Versuche adäquaten Menge Tyrode's Puffer pH 7,4 resuspendiert und bei RT für 20 bis 45 min ruhen gelassen.

Tabelle 3.8: Zusammensetzung der 10-fach konzentrierten Stocklösung des Tyrode's Puffers für humane Thrombozyten

Chemikalie	Endkonzentration	Einwaage [g]
Natriumchlorid (NaCl)	1,37 M	80
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	121 mM	10,15
Kaliumchlorid (KCl)	26 mM	1,95
Wasser (H ₂ O)	ad 1000 ml	

3. 2. 7. Aktivierung humaner und muriner Thrombozyten

Die Aktivierung humaner und muriner Thrombozyten erfolgte nach der Herstellung von gewaschenen Thrombozyten, wie unter 3. 2. 5. „Isolierung muriner Thrombozyten“ und 3. 2. 6. „Isolierung humaner Thrombozyten“. Sollten murine Thrombozyten aktiviert werden, wurde dem Tyrode's Puffer vor der Aktivierung Calciumchlorid zugegeben (Endkonzentration CaCl₂ = 1 mM). Die Thrombozyten wurden in der Regel mit 0,2 U/ml Thrombin (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim), bzw. 10 µg/ml CRP („*collagen-related peptide*“, engl., Richard Farndale, University of Cambridge, UK)

aktiviert. Die Aktivierungszeiträume hingen vom jeweiligen Versuch ab und rangierten zwischen 30 s und 15 min.

3. 2. 8. Inhibition von Src-Familie Tyrosinkinasen

Zur Bestimmung ob Nadrin durch Src-Familie Tyrosinkinasen tyrosinphosphoryliert wird, wurde der Src-Familie Tyrosinkinase-spezifische Inhibitor PP2 (Merck KGaA, Darmstadt) eingesetzt. Vor der Aktivierung wurden Thrombozyten bei RT 15 min mit 20 μ M PP2 inkubiert. Anschließend wurde mit den Lysaten der Thrombozyten eine Immunpräzipitation mit Phosphotyrosin-spezifischem Antikörper (4G10®, millipore, Merck KGaA, Darmstadt) durchgeführt. Die Durchführung der IP ist dem Punkt 3. 4. 5. „Immunpräzipitation“ zu entnehmen.

PP2-Behandlung bei Überexpression von Nadrin WT zusammen mit Src Tyrosinkinase fand über Nacht (ca. 20 bis 22 h) bei 37 °C und 5 % CO₂ statt. Die Transfektion wurde im Verhältnis Nadrin:Src 5:1 durchgeführt. PP2 wurde dem Kulturmedium der verwendeten Säugetierzellen nach dem Mediumwechsel im Anschluss an die Transfektion zugegeben. Die finale Konzentration im Kulturmedium betrug 50 μ M.

3. 3. Molekularbiologische Arbeiten

3. 3. 1. Isolierung von Plasmid-DNA

Mit den QIAGEN Plasmid Isolierungs Kits (QIAprep Spin Miniprep Kit und QIAfilter Plasmid Midi Kit, beide QIAGEN GmbH, Hilden) kann schnell mit hoher Ausbeute, reine Plasmid-DNA aus Bakterien isoliert werden. Dieser Reagenziensatz wendet eine modifizierte Methode der alkalischen Lyse [Birnboim und Doly, 1979] an. Die Bindung der Plasmide an die Kieselgelmatrix beruht auf einer hohen Salzkonzentration und der selektiven Entledigung von chromosomaler DNA. Es wurden 3 ml Bakteriensuspension (QIAprep Spin Miniprep Kit), bzw. 25 ml (QIAfilter Plasmid Midi Kit) einer Übernachtskultur zur Plasmidisolierung eingesetzt. Die Ernte der Bakterien fand bei 8.000 Upm (Eppendorf Centrifuge 5415C) bei Miniprep-Ansätzen und bei 3.452 g beim

Midiprep-Maßstab statt. Weiterhin wurde gemäß der Anleitung des Herstellers verfahren. Die Elution der Plasmide fand mit sterilem Wasser statt.

3. 3. 2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurde in dieser Arbeit ein Spektralphotometer (NanoDrop 2000, NanoDrop products, Wilmington (DE), USA) verwendet. Die Messung der Nukleinsäurekonzentration mit einem Spektralphotometer beruht auf der Eigenschaft von Nukleinsäurebasen, Licht einer Wellenlänge von 260 nm zu absorbieren. Hierbei genügte es, 1 µl der zu bestimmenden Nukleinsäurelösung nach vorheriger Leerwertmessung, auf die Messoberfläche zu pipettieren und das Gerät zu schließen. Die durch Oberflächenspannung entstehende Flüssigkeitsschicht hat nun eine exakt vom Gerät benötigte Schichtdicke. Die Reinheit konnte am Ratio $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ abgelesen werden. Werte zwischen 1,9 und 1,8 für DNA und zwischen 1,9 und 2,0 (RNA) wurden als rein akzeptiert.

3. 3. 3. Agarosegelelektrophorese

In eine Agarosegelkammer (PerfectBlue Gel System Mini L, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) mit Platinelektroden wurde aufgekochte Agarose gegossen, mit einem Kamm auf Seite der Kathode (Minuspol) versehen und erkalten gelassen. Die Gele bestanden üblicherweise aus 0,8 % (w/v) Agarose, die in einfach konzentriertem TAE-Puffer (TRIS-EDTA-Acetat-Puffer) gelöst ist. Die Zusammensetzung des TAE-Puffers ist der *Tabelle 3.9* zu entnehmen. Sollten DNA-Fragmente deutlich kleiner als 1 kbp aufgetrennt werden, wurde ein 2 %-iges (w/v) Agarosegel verwendet. Nach dem Aushärten des Gels (Schichtdicke 5-12 mm) wurde die Gelkammer mit 1x TAE-Puffer aufgefüllt und der Kamm entfernt.

Die zu untersuchende DNA wurde im angemessenen Verhältnis mit Blue/Orange Loading Dye, 6x (Promega GmbH, Mannheim) vermischt und in die Taschen des zuvor angefertigten Agarosegels pipettiert. Zusätzlich wurde ein DNA-Längenstandard 1kb DNA Ladder, bzw. 100bp DNA Ladder (beide von Promega GmbH, Mannheim) in eine der Geltaschen pipettiert, damit die Länge der Fragmente der zu analysierenden DNA-Probe

sicher bestimmt werden konnte. Es wurde nun eine Spannung von ca. 5 Volt pro Zentimeter Elektrodenabstand angelegt. Als Stromquelle dienten das EPS 601 Power Supply (GE Healthcare GmbH, Solingen). Die Laufzeit der DNA-Proben konnte anhand der in den Laufpuffern enthaltenen Farbstoffbanden (Xylencyanol FF, Bromphenolblau und Orange G) abgeschätzt werden.

Die Färbung der DNA wurde durch Ethidiumbromid bewerkstelligt. Diese Substanz interkaliert in doppelsträngige DNA und zeigt bei Anregung mit ultraviolettem Licht eine orange- bis rosafarbene Fluoreszenz. Ethidiumbromid besitzt die bemerkenswerte Eigenschaft, dass sich bei Interkalation in doppelsträngige DNA, seine Fluoreszenz um den 50- bis 100-fachen Wert verstärkt. Die lichtgeschützt aufbewahrte Färbelösung bestand aus 1 µg Ethidiumbromid pro Milliliter 1 x TAE Puffer (**Tabelle 3.9**). Agarosegele wurden etwa 10 bis 30 min im Färbebad inkubiert und anschließend in der Photodokumentation Quantum ST (VILBER LOURMAT Deutschland GmbH, Eberhardzell) während Bestrahlung mit einer Anregungswellenlänge von 254 nm fotografiert.

Tabelle 3.9: Zusammensetzung der 50-fach Stocklösung des TAE-Puffers

Chemikalie	Endkonzentration	Einwaage [g]
TRIS-base	2 M	242
EDTA 0,5 M pH 8,0	50 mM	100 ml
Essigsäure (100 %)	17,5 %	57,1 ml
Wasser (H ₂ O)	ad 1000 ml	

3. 3. 4. Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

3. 3. 4. 1. Restriktionsendonukleaseverdau

Zur vorhersagbaren Hydrolyse von Nukleinsäuren wurden Restriktionsendonukleasen der Klasse II (EC 3.1.21.4) eingesetzt. Diese Enzyme besitzen eine definierte Erkennungssequenz, innerhalb derer auch die DNA hydrolysiert wird. Die Restriktionsendonukleasen der Klasse II können weiterhin in zwei Gruppen eingeteilt werden. Es gibt Enzyme, die die DNA mit einem einzelsträngigen Überhang („sticky ends“,

klebrige Enden) hydrolysieren und eine zweite Gruppe, die glatte Enden verursachen („*blunt ends*“, glatte Enden).

Die Verdauung mit Restriktionsendonukleasen wurden in den in **Tabelle 3.10** dargestellten Ansätzen durchgeführt. Es wurden die in **Tabelle 3.3** aufgeführten Enzyme verwendet. Die Ansätze wurden gemäß den optimalen Bedingungen der jeweiligen Enzyme inkubiert. Üblicherweise fanden die Restriktionsendonukleaseverdauung zur Herstellung von DNA-Inserts bei 37 °C über Nacht statt. Die Hydrolyse von pcDNATM3.1/Hygro(+), bzw. ptdTomato-N1 (siehe 3. 1. 7. „Verwendete Bakterienstämme und Vektoren“) zur Analyse des Inserts wurden normalerweise mit *Xba*I, bzw. *Age*I und *Bam*HI ein bis drei Stunden bei 37 °C vorgenommen. Die Analyse der Restriktionsendonukleaseverdauung geschah mittels Agarosegelelektrophorese.

Tabelle 3.10: Beispielhafter Ansatz für Restriktionendonukleaseverdauung

Substanz	Volumen	finale Konzentration
Puffer (z. B. NEB2)	2 µl	1-fach
Restriktionsendonuklease (10 – 20 U/µl)	0,5 – 1 µl	10 U pro 1 – 3 µg DNA
DNA	xy µl	1 - 3 µg
H ₂ O	xy µl	ad 20 µl

3. 3. 4. 2. Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Wenn üblicherweise ein Insert in einen Plasmidvektor kloniert wird, wird dieser vor der Ligation mit den benötigten Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und anschließend dephosphoryliert. Diese Schritte sind unter 3. 3. 4. 1. „Restriktionsendonukleaseverdauung“ und 3. 3. 4. 3. „Dephosphorylierung von Vektoren“ beschrieben. Das zu klonierende DNA-Fragment musste mit denselben Restriktionsendonukleasen behandelt sein und passende Überhänge besitzen. Die Ligation wurde anschließend mit dem in **Tabelle 3.11** zusammengefassten Ligationsansatz durchgeführt.

Üblicherweise wurden 50 bis 100 ng des zu klonierenden DNA-Fragments eingesetzt. Die Ligation fand gemäß den Angaben des Herstellers für 60 min bei RT und folgenden 4 °C über Nacht statt. Anschließend wurde das Plasmid direkt zur Transformation von *Escherichia coli* eingesetzt (siehe 3. 2. 4. „Transformation“).

Tabelle 3.11: Beispielhafter Ansatz für die Ligation von Nukleinsäuren in Plasmidvektoren

Substanz	Volumen	finale Konzentration
10x Ligase Puffer	1 μ l	1-fach
T4 Ligase h.c.	0,5 – 1 μ l	10 U pro 1 – 3 μ g DNA
Plasmid-DNA	xy μ l	30 ng
Insert-DNA	xy μ l	äquimolar zum Plasmid
H ₂ O	xy μ l	ad 10 μ l

3.3.4.3. Dephosphorylierung von Vektoren

Um die Wahrscheinlichkeit einer Religation des leeren Vektors mit sich selbst zu verringern, wurden die mit Restriktionsendonukleasen hydrolysierten Plasmide mit dem Enzym CIP (engl. „*calf intestinal phosphatase*“) behandelt. Dieses Enzym dephosphoryliert die durch Restriktionsendonukleasen erzeugten Enden und stellt sicher, dass nur eine erfolgreiche Ligation mit einem Insert, dessen Enden noch Phosphatreste besitzen, stattfinden kann. Der übliche Ansatz einer Dephosphorylierung ist in **Tabelle 3.12** dargestellt. Die Reaktion wurde für 1 h bei 37 °C durchgeführt.

Tabelle 3.12: Beispielhafter Ansatz zur Dephosphorylierung von Plasmidvektoren

Substanz	Volumen	finale Konzentration
Restriktionsverdau	20 μ l	1 - 3 μ g
CIP (10 U/ μ l)	1 μ l	10 U pro 1 – 3 μ g DNA

3.3.5. In vitro-Synthese von Nukleinsäuren durch Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (engl. „*polymerase chain reaction*“, PCR) [Mullis, 1990] ist seit langem eine wichtige Methode der Molekularbiologie. Sie erlaubt es mit hoher Effizienz spezifische DNA-Fragmente *in vitro* zu synthetisieren. Die Matrizenmoleküle werden bei dieser Methode exponentiell vermehrt. Der erste Schritt der „Kettenreaktion“ besteht in der Denaturierung der Matrizenstränge durch Hitze. Anschließend binden bei einer berechneten Schmelztemperatur die dem PCR Ansatz

zugegebenen Primer spezifisch an den Matrizenstrang. Diese Primer bilden einen Startpunkt für die hitzebeständige DNA-Polymerase.

3. 3. 5. 1. PCR mit PhusionTM High Fidelity DNA-Polymerase

Für die Klonierung der Nadrin Varianten aus muriner Thrombozyten cDNA wurde die effiziente „*proof reading*“-Polymerase PhusionTM High Fidelity DNA-Polymerase verwendet. Da es Ziel dieser Arbeit war, die klonierten Nadrin Isoformen in Säugetierzellen zu überexprimieren, konnte nur eine DNA-Polymerase mit höchster Genauigkeit in Frage kommen. Der Ansatz für die PCR mit der PhusionTM High-Fidelity DNA-Polymerase erfolgte gemäß den Herstellerangaben, ausschließlich die Templatmenge wurde variiert (50 – 200 ng). Als Matrize diente cDNA aus murinen Thrombozyten (siehe 3. 3. 8. „cDNA-Synthese“), bzw. Plasmid-DNA bereits sequenzierter Klonierungen. Das PCR-Programm für die PhusionTM High Fidelity-PCR hatte das folgende Temperaturprofil:

1. initiale Denaturierung:	98 °C 3 min	} 35 Wiederholungen
2. Denaturierung:	98 °C 15 s	
3. Primer-Anlagerung:	68 °C 30 s	
4. Elongation:	72 °C 15 – 30 s pro 1 kBp	
5. finale Elongation:	72 °C 7 min	

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, auf Spezifität überprüft und die Bande der erwarteten Größe ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen DNA-Fragmente wurden schließlich gereinigt (siehe 3. 3. 6. „Reinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen“), mit den benötigten Restriktionsendonukleasen hydrolysiert (siehe 3. 3. 4. 1. „Restriktionsendonukleaseverdau“) und in den jeweiligen Vektor ligiert (siehe 3. 3. 4. 2. „Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren“).

3. 3. 5. 2. PCR mit QuikChange II Site Directed Mutagenesis Kit

Um die Tyrosinphosphorylierungsstellen von Nadrin zu mutieren, mussten Mutationen von einem bis drei Basenpaaren (Ziel: Einzelaminosäureaustausch) in die klonierte cDNA eingebracht werden. Hierzu fand der QuikChange II Site Directed

Mutagenesis Kit (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen) Anwendung. Die verwendeten Primer sind in der *Tabelle 3.5* aufgeführt. Relevante Abigramme der Sequenzierungen sind dem Anhang zu entnehmen.

3. 3. 6. Reinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

DNA wurde aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) extrahiert. Dabei wurden folgende Schritte durchgeführt: Die gewünschte DNA-Bande wurde aus einem Agarosegel auf einem schwachen (70 % Intensität) UV-Schirm mit 254 nm Anregungswellenlänge mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das Agarosestück wurde in einem Puffer mit hoher Salzkonzentration durch Hitzeeinwirkung (52 °C) gelöst. Die in Lösung befindliche DNA wurde anschließend an eine Kieselgelmatrix gebunden. Nach einem Waschschrift wurde die DNA in 20 µl bis 50 µl Reinstwasser (Reinstwasseranlage TKA GenPure, TKA, Thermo Electron LED GmbH, Niederelbert) eluiert.

3. 3. 7. Isolierung von mRNA aus murinen Thrombozyten

In dieser Arbeit wurde die RNA-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi angewendet [Chomczynski und Sacchi, 1987]. Es handelt sich um eine „Ein-Schritt“-Methode und es fand das Reagenz TRIzol® (Life Technologies GmbH, Darmstadt) Anwendung. Nach Chomczynski und Sacchi werden die gewaschenen Thrombozyten (siehe 3. 2. 5. „Isolierung muriner Thrombozyten“) mit dem Guanidiniumthiocyanathaltigen TRIzol® im selben Schritt lysiert und RNasen inaktiviert. In dieser Arbeit wurden die gewaschenen Thrombozyten jedoch vor TRIzol®-Zugabe bereits mit dem üblichen Lysepuffer lysiert (siehe 3. 4. 1. „Herstellung von Zellysaten – Zellysate für Immunpräzipitation“). Durch das ebenfalls im TRIzol® enthaltene Phenol, werden Proteine und DNA abgetrennt. Nach starkem Vortexen und einer 10-minütigen Inkubation bei RT wurde schließlich dem Gemisch noch Chloroform zugegeben und erneut gevortext. Einer weiteren 10-minütigen Inkubation bei RT schloss sich ein Zentrifugationsschritt an (10 min, 10.600 g, 4 °C). Nun wurde die obere, wässrige Phase unter vollständiger Vermeidung der Interphase (enthält DNA) abgenommen und in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß

überführt. Zur weiteren Reinigung der RNA wurde nochmals ein Phenol-Chloroform-Gemisch zugegeben und gevortext. Einer 2-minütigen Inkubation bei RT schloss sich eine weitere Zentrifugation an (10 min, 10.600 g, 4 °C). Die obere, wässrige Phase wurde wieder sauber abgenommen und in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Den letzten Schritt stellte eine Isopropanolfällung dar. Hierzu fügte man der RNA-Lösung Isopropanol (RT) im gleichen Verhältnis zu und mischte die Probe gut. Die Fällung fand für 30 min auf Eis statt. Das nach der Zentrifugation (10 min, 20.800 g, 4 °C) erhaltene Pellet wurde schließlich noch mit 70 %-igem unvergälltem Ethanol gewaschen. Nun folgte die letzte Zentrifugation für 10 min bei 20.800 g und 4 °C. Der Ethanol wurde möglichst restlos abpipettiert und das Pellet trocknen gelassen. Nach vollständiger Trocknung wurde die RNA in 20 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Zuletzt wurde die Konzentration bestimmt (siehe 3. 3. 2. „Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen“) und die RNA entweder bei -80 °C gelagert, oder sofort die cDNA-Synthese (siehe 3. 3. 8. „cDNA-Synthese“) durchgeführt.

3. 3. 8. cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA aus gewonnener mRNA aus Geweben wurde das ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) verwendet. Hierbei wurde maximal 1 µg, bzw. das laut Herstellerangaben maximal mögliche Volumen der mRNA als Template in die Reaktion eingesetzt und die Umschreibung mittels der im Kit enthaltenen Reversen Transkriptase durchgeführt. Die Reaktion läuft im Prinzip ab, wie eine normale PCR, allerdings mit einzelsträngiger mRNA als Template und mit dem poly A-Schwanz der mRNAs komplementären poly d(T)-Primern.

3. 4. Proteinbiochemische Arbeiten

3. 4. 1. Herstellung von Zelllysaten

Zelllysate für Western Blot Analyse

Um Lysate für Western Blot Analysen (3. 4. 2. „SDS-Gelelektrophorese“ und 3. 4. 3. „Western Blot“) zu gewinnen wurden Zellen mit so genanntem RIPA

(„*radioimmunoprecipitation assay*“) Puffer lysiert [Alcaraz *et al.*, 1990]. Die Bestandteile des RIPA Lysepuffers sind in **Tabelle 3.13** zusammengefasst. Dem RIPA-Puffer wurde direkt vor der Verwendung noch ein Proteinaseinhibitorcocktail zugegeben (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim) und die Lyse fand für maximal 5 min auf Eis statt. Anschließend konnten optional die Lysate durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 20.800 g und 4 °C geklärt werden.

Tabelle 3.13: Zusammensetzung des RIPA-Lysepuffers

Chemikalie	Endkonzentration
TRIS-Hydrochlorid	50 mM
Natriumchlorid (NaCl)	150 mM
Triton TM X-100	1 %
Natriumdesoxycholat	1 %
Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,1 %
EDTA	1 mM
Wasser (H ₂ O)	ad 1000 ml

Zellysate für Immunpräzipitation

Damit Lysate für eine anschließende Immunpräzipitation (IP, siehe 3. 4. 5. „Immunpräzipitation“) verwendet werden können, dürfen keine zu stringenten Lysebedingungen gewählt werden, um eine Denaturierung des für die IP verwendeten Antikörpers oder die Dissoziation labiler Protein-Protein-Wechselwirkungen zu verhindern. Gewählt wurde hierfür IP-Puffer (Immunpräzipitations-Puffer, siehe **Tabelle 3.14**), der mit 1 % Endkonzentration NP-40 (NonidetTM P40 Substitute) und 10 µM Natriumorthovanadat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) versetzt wurde. Die Lyse fand für 45 min bei 4 °C rotierend statt. Auch hier konnte ein optionaler Zentrifugationsschritt (20.800 g, 4 °C, 5 min) angeschlossen werden.

Tabelle 3.14: Zusammensetzung des IP-Puffers

Chemikalie	Endkonzentration	Einwaage [g]
TRIS-Hydrochlorid	15 mM	2,364
Natriumchlorid (NaCl)	155 mM	9,05
EDTA	1 mM	2 ml von 0,5 M
Natriumazid	0,005 %	0,2 ml von 25 %
Wasser (H ₂ O)	ad 1000 ml	

3. 4. 2. SDS-Gelelektrophorese

Prinzip der SDS-Gelelektrophorese ist es, Proteine rein nach deren Molekulargewicht aufzutrennen. Hierzu wurden Zelllysate (siehe 3. 4. 1. „Herstellung von Zelllysaten“) für 5 bis 10 min bei 95 °C hitzedenaturiert und mit dem Reagenz 2-Mercaptoethanol in der denaturierten Konformation fixiert, indem die Wiederausbildung von Disulfidbrücken verhindert wird. Die Zusammensetzung des Lämmli-Probenauftragepuffers ist der **Tabelle 3.15** zu entnehmen. Das im Überschuss vorhandene SDS („*sodium dodecyl sulfate*“, engl., Natriumdodecylsulfat) lagert sich überall an die Proteine an und hebt die eigentliche Ladung der Proteine durch seine negative Ladung auf. Nun wurden die Proteine auf einem Polyacrylamidgel bestimmter Prozentzahl (Zusammensetzung siehe **Tabelle 3.16** und **Tabelle 3.17**) im elektrischen Feld aufgetrennt. Zum Polymerisieren dienen die Komponenten APS (Ammoniumperoxodisulfat, Radikalstarter) und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, Katalysator). Beim Anfertigen der Gele wurde zuerst das Trenngel gemischt, in die Gelkassette (Novex®, Life Technologies GmbH, Darmstadt) gefüllt und mit Isopropanol überschichtet, um eine waagerechte und gerade Kante zu gewährleisten. Nach etwa 20 min wurde das Isopropanol abgegossen und restlos aus der Gelkassette entfernt. Nun wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und zur Formung der Probenauftrageaschen mit einem Kamm (Life Technologies GmbH, Darmstadt) versehen. Für die Gelelektrophorese wurden die Gele schließlich in die Gelkammern (XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System, Life Technologies GmbH, Darmstadt) eingesetzt und mit 1x Laufpuffer (Zusammensetzung siehe **Tabelle 18**) versehen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei RT und anliegenden 70 bis 140 V, sowie 400 mA für 2 bis 3 Stunden.

Tabelle 3.15: Zusammensetzung des Probenauftragepuffers (5x Lämmli)

Chemikalie	Volumen [ml]
TRIS 1 M pH 6,8	6
SDS 10 %	4
Glyzerin	10
Bromphenolblau	1 Spatelspitze

Tabelle 3.16: Zusammensetzung der 8,5 %-igen Polyacrylamidgele

Chemikalie	Volumen [ml]
Wasser (H ₂ O)	4,5
TRIS 1,5 M pH 8,8	2,5
Acrylamid/Bis-Lösung 30 %	2,8
SDS 10 %	0,1
APS	80 µl
TEMED	10 µl

Tabelle 3.17: Zusammensetzung der Polyacrylamidsammelgele

Chemikalie	Volumen [ml]
Wasser (H ₂ O)	3,4
TRIS 1 M pH 6,8	0,625
Acrylamid/Bis-Lösung 30 %	0,85
SDS 10 %	50 µl
APS	50 µl
TEMED	5 µl

Tabelle 3.18: Zusammensetzung der 10-fach Stocklösung des SDS-Laufpuffers

Chemikalie	Endkonzentration	Einwaage [g]
TRIS-base	25 mM	30
Glycin	192 mM	144
SDS	0,1 %	10
Wasser (H ₂ O)	ad 1000 ml	

3. 4. 3. Western Blot

Der Western Blot (WB) dient der Übertragung von Proteinen, die mittels SDS-Gelelektrophorese (siehe 3. 4. 2. „SDS-Gelelektrophorese“) aufgetrennt wurden, auf eine PVDF („polyvinylidene difluoride“) Membran. In dieser Arbeit wurden „semi-dry“ Elektrobloß-Systeme (Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München und PerfectBlue™ Semy-Dry Blotter Sedec™ M, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) verwendet, wobei sich die Proteine entlang einer anliegenden Spannung bewegen. Der Aufbau des WB (siehe auch **Abbildung 3.2**) sah wie folgt aus: auf die unten liegende Anode wird ein mit Blot Puffer (Zusammen-

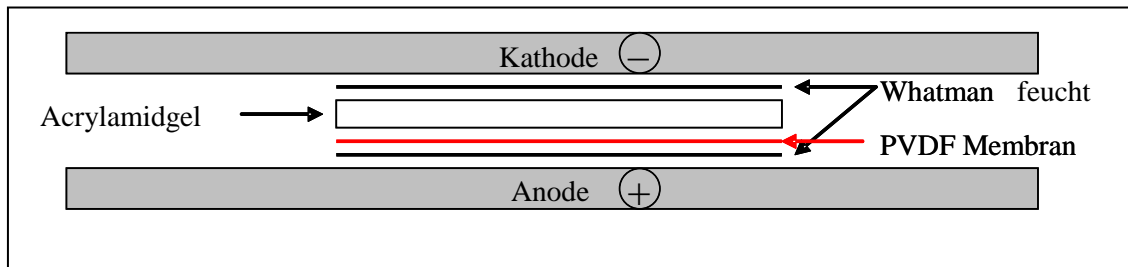


Abbildung 3.2: Aufbau eines „semi-dry“ Western Blot.

setzung siehe **Tabelle 3.19**) getränktes Filterpapier (Whatman 3MM) gelegt. Die PVDF Membran wurde 2 bis 10 min in Methanol äquilißriert und auf das feuchte Filterpapier plan aufgelegt. Als nächstes wurde nun das Polyacrylamidgel luftblasenfrei auf die PVDF Membran aufgelegt. Die letzte Schicht stellt ein weiteres mit Blot Puffer befeuchtetes Filterpapier dar. Nach auflegen der Kathode wurde eine Spannung von 10 V und 80 mA pro Gel angelegt und der WB für 1 bis 1,5 h bei RT durchgeführt. Nach dem Transfer können die Proteine auf der PVDF Membran direkt mittels Immundetektion (siehe 3. 4. 4. „Immundetektion“) analysiert werden.

Tabelle 3.19: Zusammensetzung der 10-fach Stocklösung des Blotpuffers

Chemikalie	Endkonzentration	Einwaage [g]
TRIS-base	20 mM	30
Glycin	150 mM	112,6
Wasser (H ₂ O)	ad 1000 ml	

3. 4. 4. Immundetektion

Um bei der Immundetektion spezifisch Proteine detektieren zu können, müssen zunächst unspezifische Bindungsstellen blockiert werden. Hierzu wurde die nach dem WB (siehe 3. 4. 3. „Western Blot“) mit Proteinen beladene Membran mindestens 1 h bei 4 °C mit 5 % Milchpulver in PBST („*phosphate buffered saline*“ mit 0,1 % Tween® 20) auf dem Rundschüttler inkubiert. Nach dem Blockieren wurde die Membran mit dem jeweils benötigten, primären Antikörper über Nacht auf einem Rollenmischer bei 4 °C inkubiert. Die Verdünnungen der verwendeten Primärantikörper für die Immundetektion nach Western Blot sind in **Tabelle 3.20** zusammengefasst. Am folgenden Tag wurde die Membran 3 mal etwa 10 min lang mit PBST bei RT gewaschen. Anschließend folgte die einstündige Inkubation bei RT und in Dunkelheit mit dem Sekundärantikörper. Diese Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper sind gegen Antikörper der Spezies, aus der der Primärantikörper gewonnen wurde, gerichtet und wurden in 5 % Milchpulver in PBST gelöst. Die Verdünnungen, sowie die Exzitations-/Emmisionsmaxima der Sekundärantikörper (LI-COR®, Lincoln (NE), USA) sind der **Tabelle 3.21** zu entnehmen. Anschließend wurde die Membran 3 mal mit PBST gewaschen und im Dunklen zwischen Filterpapier getrocknet. Die eigentliche Detektion fand mit dem Odyssey Infrared Imaging Scanner (LI-COR®, Lincoln (NE), USA) statt.

Tabelle 3.20: Verdünnungen der Primärantikörper und Bezugsfirma

Antikörper und Bestellnummer	Verdünnung	Bezugsfirma ¹⁾
Anti-ARHGAP17 antibody ab74454	1:300	AB
ARHGAP17 antibody (S-13) sc-160146	1:50	SC
ARHGAP17 antibody NBP-83870	1:300	NB
Anti-Phosphotyrosine clone 4G10® 05-321	1:1000	MI
Src (36D10) Rabbit mAb #2109	1:2000	CS
anti-pan actin: rabbit polyclonal #AAN01	1:1000	CY

¹⁾ Bezugsfirmen der Primärantikörper: AB = Abcam plc, Camebridge, UK; CS = Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (MA), USA; CY = Cytoskeleton, Inc., Denver (CO), USA; MI = millipore, Merck KGaA, Darmstadt; NB = Novus Biologicals, LLC, Littleton (CO), USA; SC = Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg

Tabelle 3.21: Verdünnungen der Sekundärantikörper und Emissionsmaximum

Antikörper und Bestellnummer	Verdünnung	Exzitation/Emission [nm]
IRDye® 800CW Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) 926-32213	1:15.000	778/795
IRDye® 800CW Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) 926-32212	1:15.000	778/795
IRDye® 680 Donkey Anti-Goat IgG (H+L) 926-32224	1:7.500	683/710

3. 4. 5. Immunpräzipitation

Mit der Immunpräzipitation können bestimmte Proteinmodifikationen, sowie -interaktionen gezeigt werden. Hierzu werden Zelllysate (siehe 3. 4. 1. „Herstellung von Zelllysaten“) mit einem Antikörper (5 µg) versehen und 1 bis 2 Stunden bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. IgG-Kontroll-Antikörper wurden von Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg käuflich erworben (normal mouse IgG, normal rabbit IgG und normal goat IgG). Nach der Antikörperinkubation wird den Proben nach Herstellerangaben gewaschene Protein G-Sepharose (Protein G Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) zugegeben. Protein G ist ein bakterielles Protein, welches mit sehr hoher Affinität Immunglobuline der Subklasse IgG bindet. Die Protein G-gekoppelte Sepharose dient also dazu, an einen Antikörper gegen ein spezifisches Protein zu binden und damit das Zielprotein selbst, oder dessen Bindungspartner anzureichern. Der Ablauf einer Immunpräzipitation ist in **Abbildung 3.3** schematisch dargestellt. Immunpräzipitierte Proteine wurden 1:1 mit 2xLämmli-Puffer versetzt und mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert.

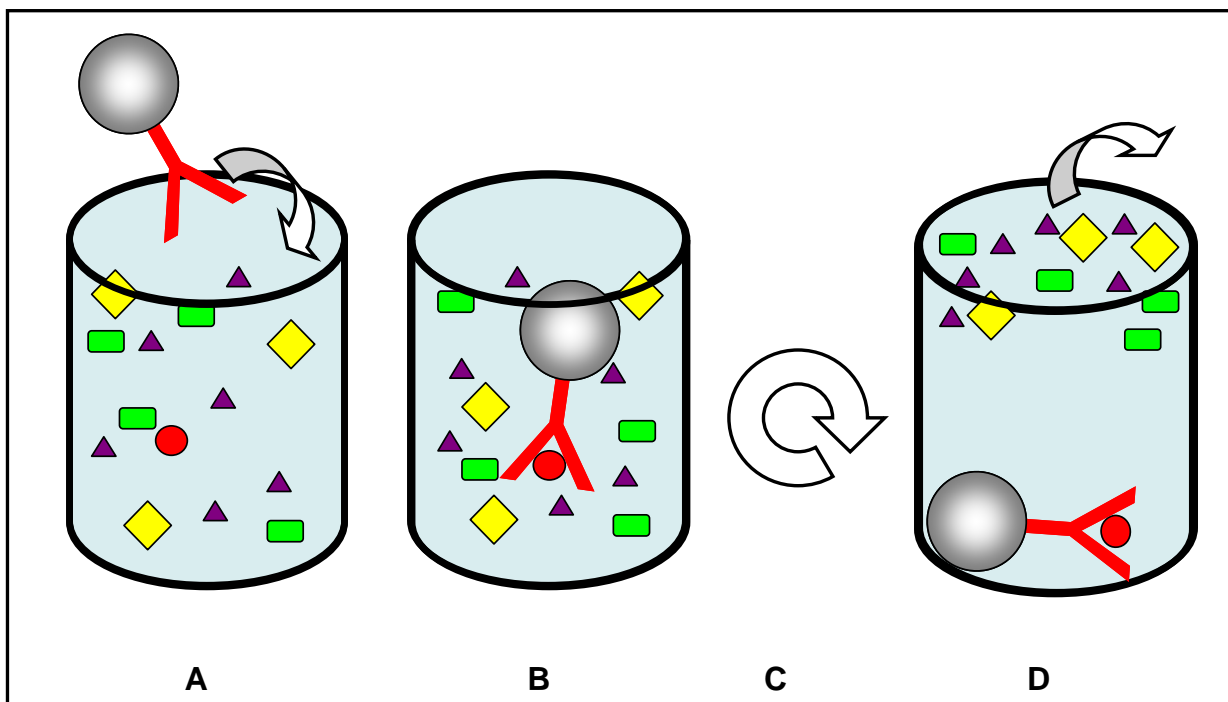


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung einer Immunpräzipitation. (A) Einem Proteingemisch (Zelllysat) wird ein an Sepharose gekoppelter Antikörper gegen das Protein von Interesse zugegeben. (B) Der Antikörper bindet an das Protein von Interesse. (C) Bei einer Zentrifugation wird der schwere Sepharose-Antikörper-Protein-Komplex von den restlichen Proteinen im Zelllysat abgetrennt. (D) Der Überstand wird verworfen und der abgetrennte Sepharose-Antikörper-Protein-Komplex kann gewaschen und weiter analysiert werden.

3. 4. 6. Immunfluoreszenzfärbung

Zellen, die immunzytochemisch gefärbt werden sollten, mussten zunächst fixiert werden. Hierzu wurde den Zellen 4 %-ige Formaldehydlösung zugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Da in dieser Arbeit ausschließlich intrazelluläre Proteine untersucht wurden, schloss an den Fixierungsschritt immer zwingend eine Permeabilisierung der Zellen an (10 min 0,1 % TritonTM X-100 bei RT). Die Färbung mit den jeweiligen Primäantikörpern erfolgte nach mindestens einstündiger Blockierung mit 5 % BSA in der Regel über Nacht bei 4 °C. Die Inkubation mit dem Sekundäantikörper, bzw. mit primär gelabeltem Alexa488-Phalloidin zur Färbung von filamentösen Aktinstressfasern erfolgte in der Regel für 60 min bei RT.

Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München). Es wurde in PBS eine 1:3000-Verdünnung der DAPI-Stocklösung (1 mg/ml, Endkonzentration = 0,33 µg/ml) hergestellt und die Zellen bei

Dunkelheit exakt 2 min mit dem Farbstoff inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. DAPI lagert sich in die AT-reichen Regionen der DNA ein und fluoresziert bei Anregung mit ultraviolettem Licht (Absorptionsmaximum 358 nm) blau (Emmissionsmaximum 461 nm).

3. 5. Funktionelle Assays

3. 5. 1. „*Spreading*“ von Thrombozyten

Für das „*spreading*“ von Thrombozyten ist es notwendig Deckgläser geeignet vorzubehandeln. Im Fall dieser Arbeit wurde als Adhäsionsmatrix humanes Fibrinogen gewählt. Es wurden Deckgläser (130 – 170 µm Stärke) geeigneter Größe ausgesucht und die zu beschichtende Fläche mit einem Fettstift markiert. Anschließend wurde die Fibrinogenlösung gleichmäßig auf der Beschichtungsfläche verteilt und über Nacht in einer feuchten Umgebung bei 4 °C inkubiert.

Am Folgetag wurde die Fibrinogenlösung abgeschüttet und mit 1 %-igem BSA für mindestens eine Stunde bei RT blockiert. Die Thrombozyten wurden nach dem Abschütten der Blockierlösung in einer Konzentration von 50.000 pro µl für 1 h bei RT „*spreaden*“ gelassen. Nach dieser Zeit wurden die Thrombozyten abgeschüttet und fixiert (mit 4 %-iger Formaldehydlösung). Je nach anschließender Färbung wurde ein Permeabilisierungsschritt mit 0,1 % TritonTM X-100 für 10 min bei RT durchgeführt.

3. 5. 2. „*Spreading*“ von A5-CHO Zellen und Adhäsionsassay

Um A5-CHO Zellen „*spreaden*“ zu lassen, wird die Beschichtung passender Deckgläser wie bereits unter 3. 5. 1. „*Spreading*“ von Thrombozyten“ mit humanem Fibrinogen über Nacht vorgenommen. Mit ptdTomato-Konstrukten transfizierte A5-CHO Zellen wurden schließlich unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und eine definierte Menge von 3.000 transfizierten Zellen pro µl für 60 min bei RT „*spreaden*“ gelassen. Anschließend wurden die Zellen abgeschüttet und nach 15-minütiger Fixierung mit 4 %-iger Formaldehydlösung mit DAKO Fluorescence Mounting Medium (Dako Deutschland

GmbH, Hamburg) eingedeckelt. Die Quantifizierung der adhärenierten Zellen fand anhand von mindestens 12 Übersichtsaufnahmen in 10-facher Vergrößerung statt.

3. 5. 3. G-LISA®

G-LISAs® (Cytoskeleton, Inc., Denver (CO), USA) sind ELISAs („*enzyme linked immuno absorbent assay*“, engl., enzymgekoppelter Immunabsorptionsversuch), die spezifisch den Gehalt an aktiven RhoGTPasen detektieren. Das Prinzip beruht darauf, dass die Effektorproteine der RhoGTPasen in 96 „*wells*“ immobilisiert sind. Diese Effektorproteine werden nur von aktiven, GTP-gebundenen RhoGTPasen gebunden, was sicherstellt, dass nur aktivierte RhoGTPasen nachgewiesen werden. Die G-LISAs® wurden exakt nach den Herstellerangaben durchgeführt.

3. 6. Statistik

Die Ergebnisse in dieser Arbeit sind als Mittelwert \pm SEM („*standard error of mean*“, engl., Standardfehler) dargestellt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software PRISM (GraphPad Software, La Jolla (CA), USA) und Signifikanzen wurden mit Hilfe des ungepaarten, zweiseitigen „*student's t-test*“ berechnet. Der Schwellenwert für statistische Signifikanz wurde bei 0,05 gewählt. (P < 0,05 *, P < 0,01 **, P < 0,001 ***)

4. Ergebnisse

Nadrin ist ein aus dem neuronalen System bekanntes RhoGAP. Wenn PC12 Zellen Neuritenauswüchse bilden, ist Nadrin an der Regulation der benötigten Zytoskelettveränderungen beteiligt, indem es GTPasen der Rho Familie reguliert [Furuta *et al.*, 2002]. Auch im Thrombozyten spielen RhoGTPasen eine essentielle Rolle. Ziel dieser Arbeit sollte es also sein, Nadrin in Thrombozyten nachzuweisen und seine Regulation und Funktion hinsichtlich Zytoskelettveränderungen zu charakterisieren.

4. 1. Nachweis von Nadrin in Thrombozyten und Megakaryozyten

Der erste Teil dieser Arbeit bestand darin, Nadrin in murinen und humanen Thrombozyten, sowie in murinen Megakaryozyten nachzuweisen. Der Nachweis fand auf Nukleotid- / Proteinebene, sowie *in situ* statt.

4. 1. 1. Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von Nadrin in murinen Megakaryozyten

Megakaryozyten sind die vielkernigen Vorläuferzellen, die Thrombozyten bilden. Dieser komplexe Prozess wird Megakaryopoese genannt. Da Thrombozyten bei der Megakaryopoese kein DNA-Material vom Megakaryozyten bekommen, sondern nur

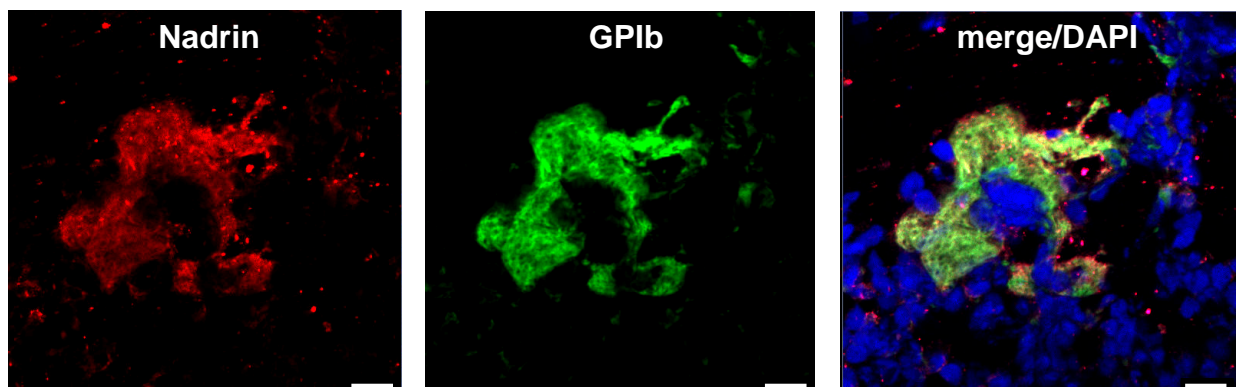


Abbildung 4.1: Immundetektion von Nadrin in murinen Megakaryozyten. Rot: Nadrin; Grün: GPIb; Blau: DAPI; Gelb: „merge“ von rot und grün. Maßstab = 20 μm

mRNA und Proteine, war es interessant Nadrin *in situ* im Megakaryozyten nachweisen zu können. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von murinen Megakaryozyten sind in **Abbildung 4.1** zu sehen. Es ist sowohl eine Kernfärbung, als auch eine Färbung mit dem Thrombozyten- und Megakaryozyten-spezifischen Antikörper GPIb zu sehen. Parallel dazu wurde Nadrin immunodetektiert. Nadrin konnte also in murinen Megakaryozyten nachgewiesen werden.

4. 1. 2. Lokalisierung von Nadrin in humanen Thrombozyten und Kollokalisierung mit Aktin

Die Lokalisierung von Nadrin wurde mittels Immundetektion in „gespreadeten“ Thrombozyten gezeigt. Hierzu werden Deckgläser mit Fibrinogen beschichtet und die Thrombozyten wurden hierauf eine Stunde „spreaden“ gelassen. Anschließend wurden die Thrombozyten fixiert und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt. Gezeigt sind hier humane Thrombozyten, da diese größer sind und schönere Bilder lieferten. Mit murinen Thrombozyten wurde der gleiche Versuch durchgeführt. In **Abbildung 4.2** ist eine klare Kollokalisierung mit

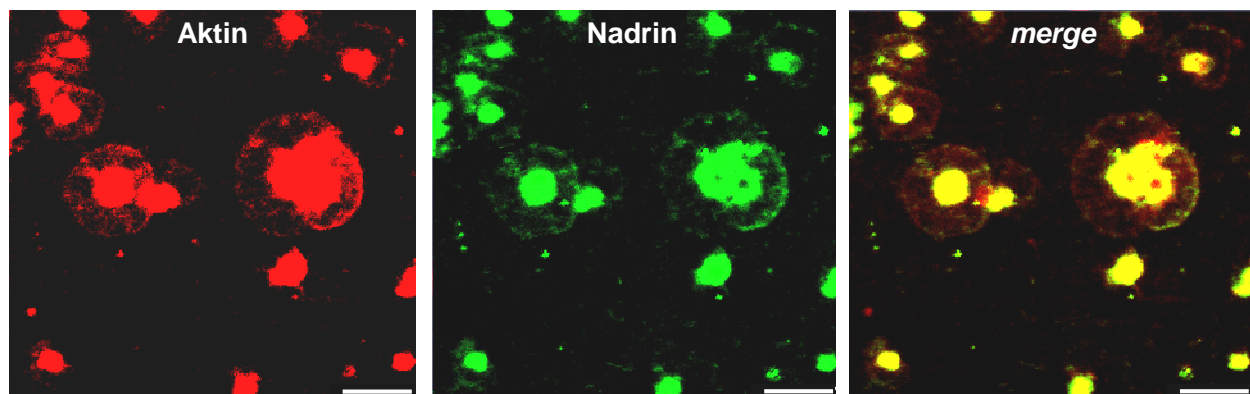


Abbildung 4.2: Humane Thrombozyten auf Fibrinogen „gespreadet“. Rot: Aktin; Grün: Nadrin; Gelb: „merge“ von rot und grün. Maßstab = 10 μm

Aktin gezeigt. Sowohl im zentralen Aktinring, als auch an den äußersten Enden der runden Lamellipodien war Nadrin mit filamentösem Aktin kollokalisiert.

4. 1. 3. Nachweis von Nadrin in murinen und humanen Thrombozyten mittels Western Blot

Auf Proteinebene wurde Nadrin mittels Western Blot nachgewiesen. Hierzu wurden Thrombozytenlysate (human und murin) im Vergleich zu Gewebelysaten (Kontrolllysate

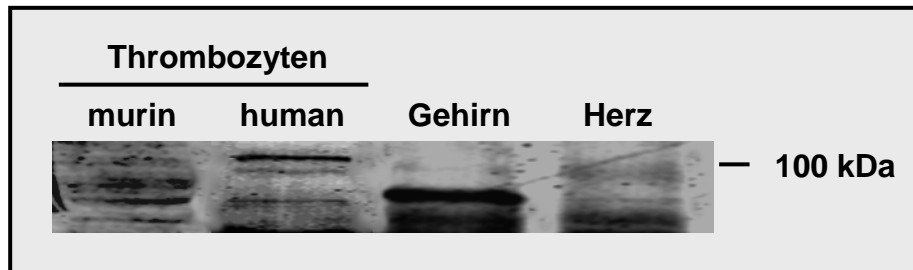


Abbildung 4.3: Nadrin Expression in humanen und murinen Thrombozyten. Kontrolllysate aus murinem Gehirn und Herz.

aus Herz und Gehirn) mittels Western Blot und anschließender Immundetektion hinsichtlich ihres Nadringehaltes analysiert. In **Abbildung 4.3** ist ein exemplarischer Western Blot gezeigt. Es fällt auf, dass in allen getesteten Lysaten mehrere Banden erscheinen und keine distinkte Einzelbande.

4. 2. Isolierung, Mutation und Klonierung von muriner Nadrin cDNA

4. 2. 1. Isolierung muriner Nadrin cDNA aus Thrombozyten

Nachdem wie unter 4. 1. 3. „Nachweis von Nadrin in murinen und humanen Thrombozyten mittels Western Blot“ beschrieben Nadrin an sich in Thrombozyten auf Proteinebene nachgewiesen wurde, wurde im Rahmen dieser Arbeit außerdem die Analyse der verschiedenen Nadrin Isoformen angestrebt. Es wurde hierzu die Gesamt-RNA aus Thrombozyten isoliert, diese RNA in cDNA umgeschrieben und eine Nadrin Isoform-spezifische PCR durchgeführt. Da sich die „full length“ Isoformen Nadrin2 WT und Nadrin4 WT dieselbe C-terminale Sequenz teilen, ergab die PCR ein Gemisch dieser beiden Isoformen. Die „full length“ Isoform Nadrin5 WT konnte hingegen mittels spezifischer PCR-Primer einzelnamplifiziert werden. Das Ergebnis dieser PCR ist in **Abbildung 4.4** gezeigt; es konnten nur sehr schwache Banden erhalten werden. Dennoch

wurden die schwachen Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert. Es folgte die Klonierung der „full length“ Isoformen (siehe 4. 2. 4. „Klonierung

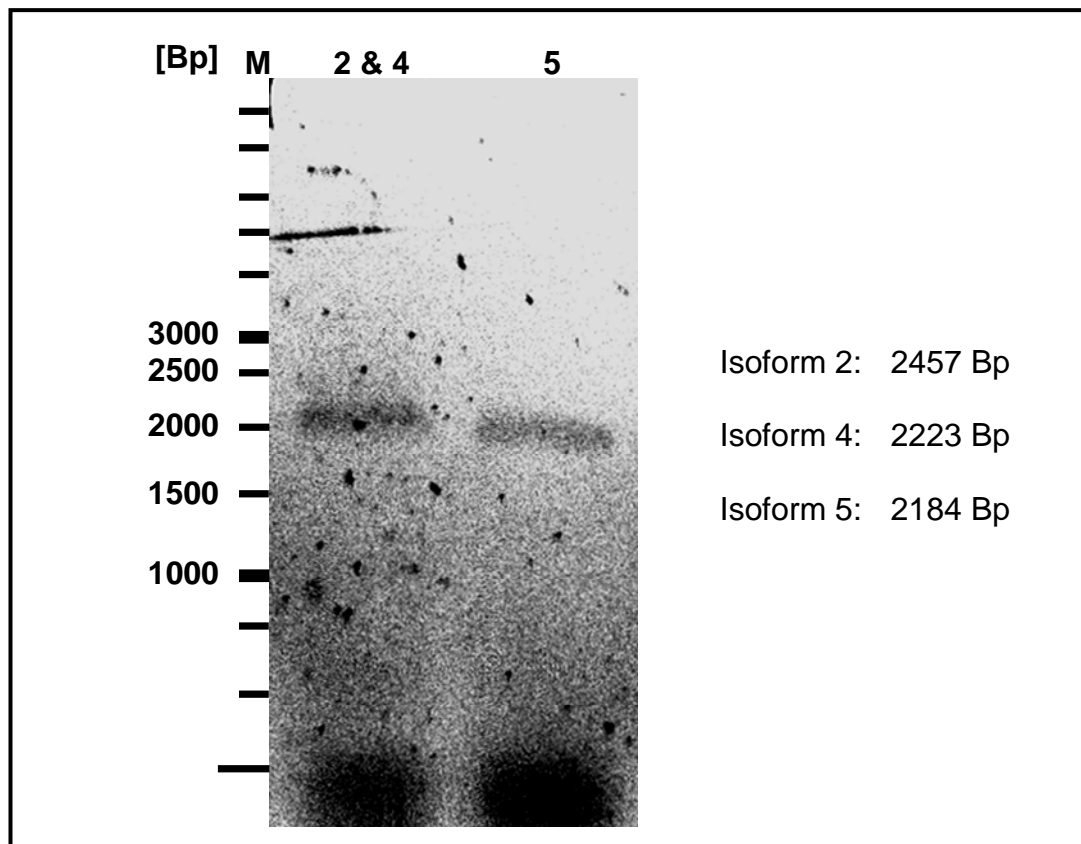


Abbildung 4.4: Nadrin Isoform-spezifische PCR aus muriner Thrombozyten cDNA. 2 & 4: Gemisch aus den beiden „full length“ Isoformen Nadrin2 WT und Nadrin4 WT. 5: „full length“ Isoform Nadrin5 WT.

der murinen Nadrin Isoformen und Mutanten und Expression der erstellten Konstrukte in Säugetierzellen“). Eine schematische Übersicht der klonierten Nadrin „full length“ Varianten ist in **Abbildung 4.5** dargestellt. Die Ergebnisse der Sequenzierungen sind im Anhang aufgeführt.

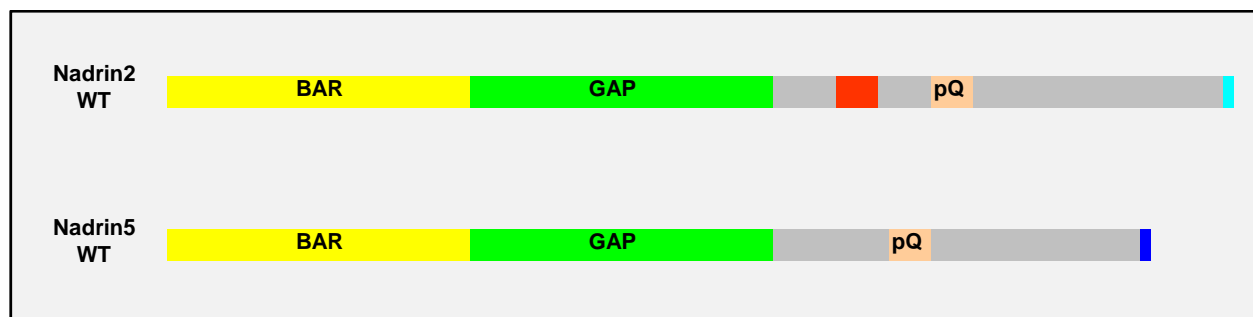


Abbildung 4.5: Schematische Übersicht der klonierten Nadrin „full length“ Varianten. Nadrin2 WT und Nadrin5 WT; WT = Wildtyp.

4. 2. 2. Herstellung der Nadrin Δ BAR-Mutanten

Basierend auf den klonierten und sequenzierten Nadrin „full length“ Isoformen (Nadrin2 WT und Nadrin5 WT), wurden die Δ BAR-Mutanten durch PCR hergestellt. Eine schematische Übersicht der generierten Nadrin Δ BAR-Mutanten ist in **Abbildung 4.6**

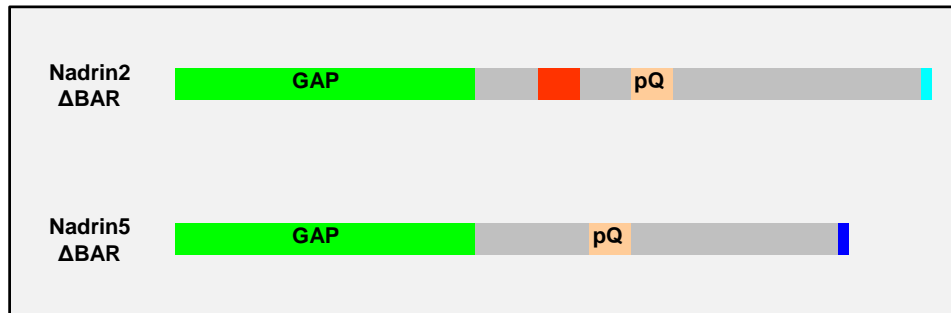


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung der generierten Nadrin Δ BAR-Mutanten mit deletierter BAR-Domäne.

dargestellt. Mit Hilfe eines „forward“ PCR-Primer, der in der GAP-Domäne mit einem Startcodon beginnt wurde die N-terminal gelegene BAR-Domäne deletiert. Die PCR-Produkte der Nadrin Δ BAR-Mutanten sind in **Abbildung 4.7** gezeigt. Auch diese PCR-Produkte wurden im Agarosegel auf ihre Reinheit überprüft und schließlich aus

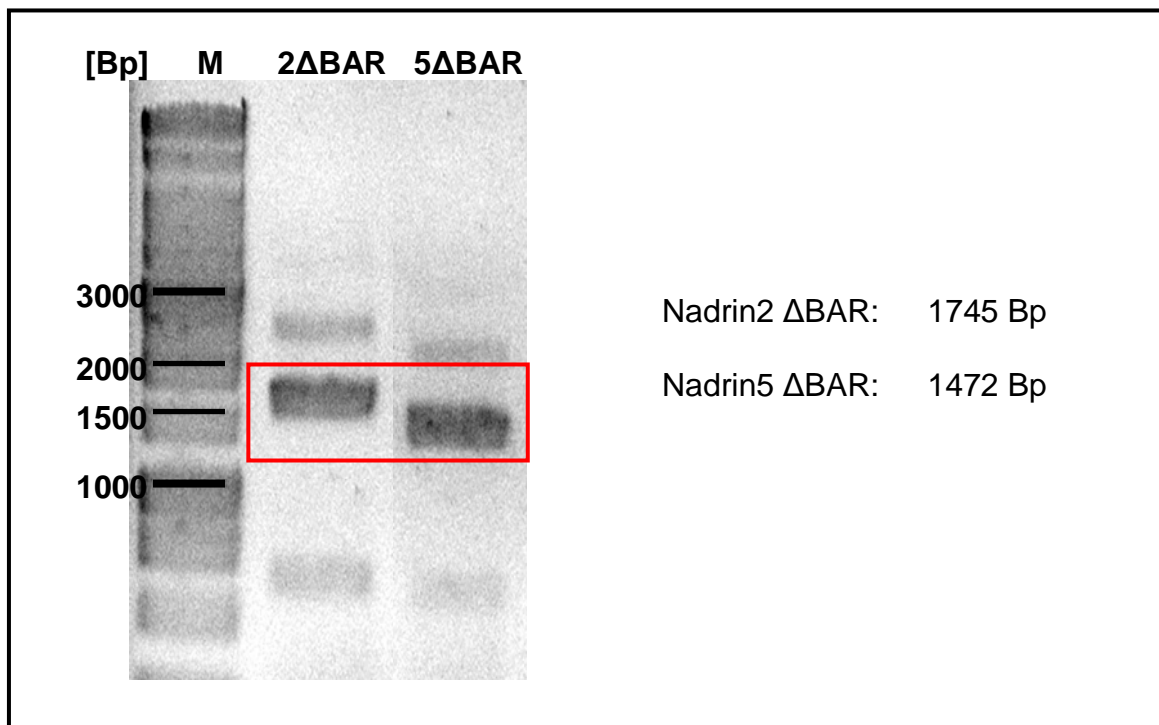


Abbildung 4.7: Deletion der Nadrin BAR-Domäne auf Nukleotidebene mittels PCR. Nadrin2 Δ BAR 1745 Bp; Nadrin5 Δ BAR 1472 Bp.

dem Gel extrahiert und in die beiden in dieser Arbeit verwendeten Vektoren kloniert (siehe 4. 2. 4. „Klonierung der murinen Nadrin Isoformen und Mutanten und Expression der erstellten Konstrukte in Säugetierzellen“). Sequenzen hierzu befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

4. 2. 3. Herstellung der Nadrin Phosphomutanten

Die Nadrin Phosphomutanten (Einzelmutanten) wurden auf der Grundlage der in pcDNATM3.1/Hygro(+) und ptdTomato-N1 klonierten Nadrin „full length“ Isoformen (Nadrin2 WT und Nadrin5 WT) hergestellt. Eine schematische Übersicht der generierten Nadrin Phosphomutanten ist in **Abbildung 4.8** zu sehen. Es wurde mittels „long range“ PCR eine drei Basen lange Mutation eingefügt. Die Nadrin-

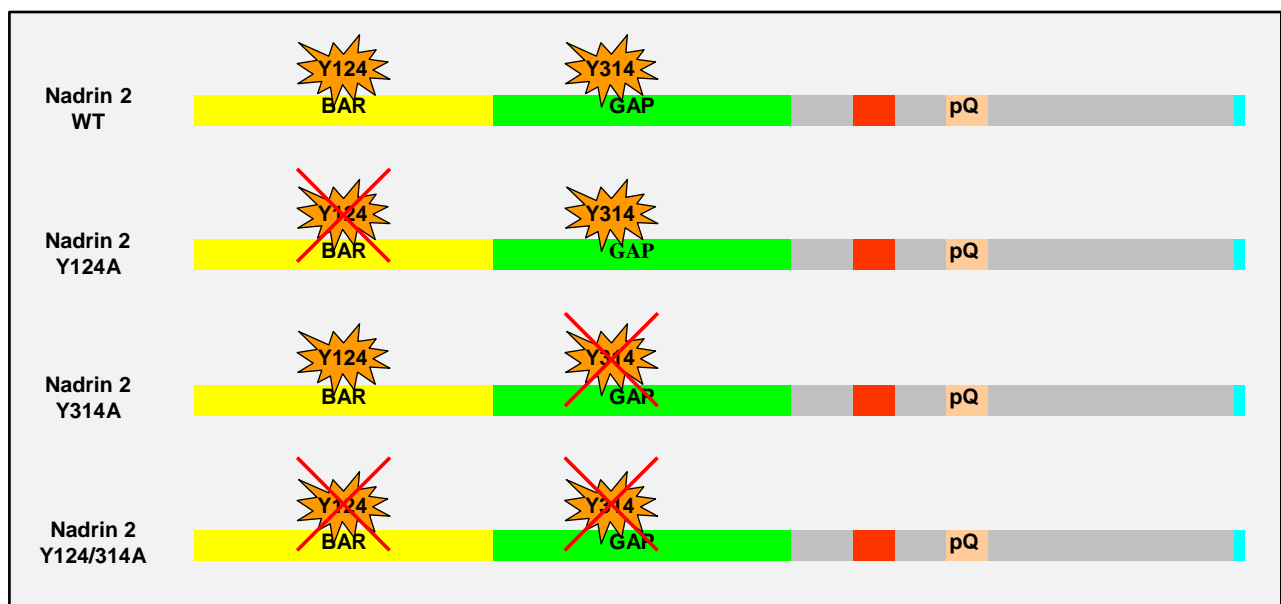


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung der generierten Nadrin Phosphomutanten. Dargestellt ist exemplarisch nur Nadrin2 und die darauf basierenden Phosphomutanten. Für Nadrin5 wurden identische Konstrukte hergestellt.

Phosphodoppelmutanten wurden basierend auf den sequenzierten Einzelmutanten Nadrin2 Y124A und Nadrin5 Y124A erzeugt, indem eine weitere Mutation mittels „long range“ PCR eingefügt wurde. Abigramme zum Nachweis der erfolgreichen Mutationen sind im Anhang aufgeführt.

4. 2. 4. Klonierung der murinen Nadrin Isoformen und Mutanten und Expression der erstellten Konstrukte in Säugetierzellen

Die in 4. 2. 1. und 4. 2. 2. gezeigten Nadrin WT Isoformen und Δ BAR-Mutanten wurden nach Gelextraktion mit *Bam*HI / *Xba*I (pcDNATM3.1/Hygro (+)), bzw. *Bam*HI / *Age*I (ptdTomato-N1) hydrolysiert und in die mit denselben Restriktionsendonukleasen vorbehandelten Vektoren ligiert. Es handelt sich um Expressionsvektoren für Säugetierzellen. Überprüft wurde die Funktionalität der hergestellten Konstrukte durch Transfektion von Säugetierzellen (A5-CHO und HEK-293) und anschließender Zelllyse, SDS-Gelelektrophorese und Westen Blot mit Immundetektion.

Ein Western Blot der Nadrin „full length“ Varianten ist in **Abbildung 4.9A** dargestellt. Die gezeigten Proteine wurden in Säugetierzellen unter Verwendung des Vektors pcDNATM3.1/Hygro(+) exprimiert. Die zu erwartende Größe der Konstrukte liegt bei ca. 80 kDa (Nadrin5 WT) und 90 kDa (Nadrin2 WT).

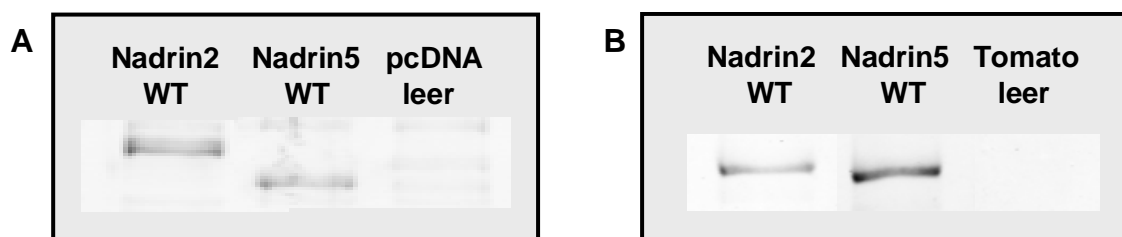


Abbildung 4.9: Western Blot-Analyse der in Säugetierzellen überexprimierten „full length“ Isoformen Nadrin2 WT und Nadrin5 WT. (A) Verwendeter Überexpressionsvektor: pcDNATM3.1/Hygro(+). (B) Der verwendete Vektor ptdTomato erlaubt die Expression eines Fusionsproteins „tandem“ Tomato-Nadrin2 WT und „tandem“ Tomato-Nadrin5 WT.

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Zellmorphologie wurde außerdem ein Vektor eingesetzt, der die Expression eines rot-fluoreszierenden Fusionsproteins erlaubt. Die „full length“ Isoformen Nadrin2 WT und Nadrin5 WT fusioniert mit dem Farbstoff „tandem“ Tomato (ca. 54 kDa) haben eine Größe zwischen ca. 134 und 144 kDa und sind auf dem Western Blot in **Abbildung 4.9B** zu sehen.

Um eine eventuelle Regulation durch die BAR-Domäne zeigen zu können, wurden die Nadrin „full length“ Isoformen (Nadrin2 WT und Nadrin5 WT) mutiert, indem die komplette BAR-Domäne deletiert wurde. Die Nadrin Δ BAR-Mutanten haben eine molekulare Masse von ca. 62 kDa (Nadrin2 Δ BAR), bzw. 53 kDa (Nadrin5 Δ BAR) und wurden sowohl mit pcDNATM3.1/Hygro(+) (**Abbildung 4.10A**) als auch als Fusionsprotein mit ptdTomato (**Abbildung 4.10B**) in Säugetierzellen überexprimiert. Mit dem rot-

fluoreszierenden Protein „tandem“ Tomato fusioniert besitzen die Nadrin Δ BAR-Mutanten berechnete, theoretische Massen von 116 kDa („tandem“ Tomato-Nadrin2 Δ BAR) und 107 kDa („tandem“ Tomato-Nadrin5 Δ BAR).

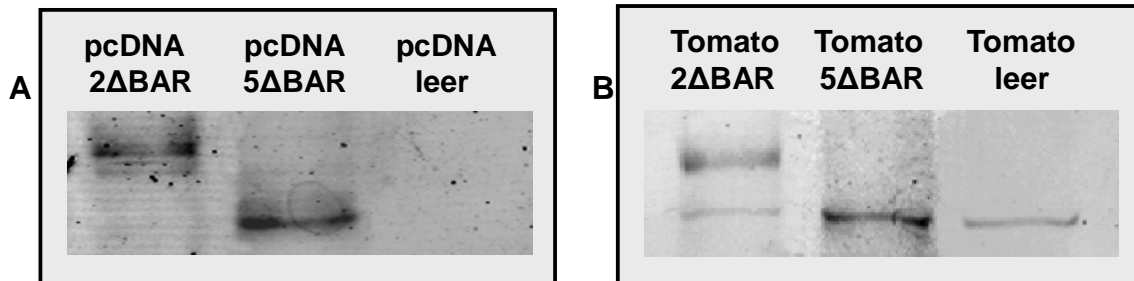


Abbildung 4.10: Western Blot-Analyse der in Säugetierzellen überexprimierten Nadrin Δ BAR-Mutanten. (A) Vektor: pcDNATM3.1/Hygro(+). (B) Der verwendete Vektor ptdTomato erlaubt die Expression eines Fusionsproteins („tandem“ Tomato ~ 54 kDa).

Neben der eventuellen Regulation der Nadrin GAP-Aktivität durch die BAR-Domäne, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch der Einfluss von Tyrosinphosphorylierung auf die Nadrin-Aktivität untersucht. Die unter 4. 2. 3. „Herstellung der Nadrin Phosphomutanten“ beschriebenen Konstrukte wurden in Säugetierzellen (HEK293) überexprimiert und zur Expressionskontrolle mittels Western Blot und anschließender

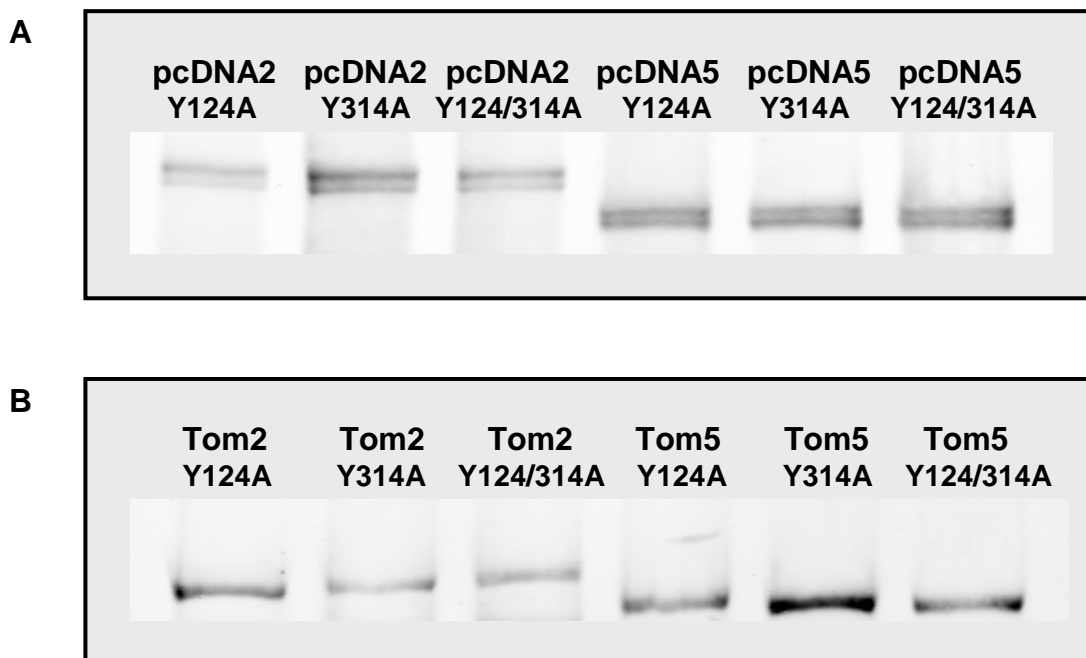


Abbildung 4.11: Western Blot-Analyse der in Säugetierzellen überexprimierten Nadrin Phosphomutanten. (A) Mit dem Vektor pcDNATM3.1/Hygro(+) überexprimierte Nadrin Phosphomutanten. (B) Der verwendete Vektor ptdTomato-N1 erlaubt die Expression eines Fusionsproteins („tandem“ Tomato ~ 54 kDa). Tom2 = „tandem“ Tomato-Nadrin2; Tom5 = „tandem“ Tomato-Nadrin5.

Immundetektion analysiert. Die überexprimierten Nadrin Phosphomutanten sind in **Abbildung 4.11** dargestellt, sowohl mit dem Vektor pcDNATM3.1/Hygro(+) (**Abbildung 4.11A**) überexprimiert, als auch mit ptdTomato als Fusionsprotein mit dem rot-fluoreszierenden „*tandem*“ Tomato (**Abbildung 4.11B**).

Die molekulare Masse der Nadrin Phosphomutanten gleicht der der jeweiligen Nadrin „*full length*“ Isoformen Nadrin2 WT und Nadrin5 WT, bzw. der „*tandem*“ Tomato-Nadrin-Fusionsproteine, die in **Abbildung 4.9** dargestellt sind.

4. 3. Untersuchung der GAP-Aktivität von murinen Nadrin Isoformen im Zellkultursystem

4. 3. 1. Nadrin reguliert Cdc42 Isoform-spezifisch

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Nadrin „*full length*“ Isoformen Nadrin2 WT und Nadrin 5 WT wurden nun getrennt voneinander auf ihr Vermögen Cdc42 zu regulieren untersucht. Hierzu konnte im Zellkultursystem gezielt die jeweilige Isoform überexprimiert werden.

Es wurde eine Kotransfektion von Säugerzellen mit den Nadrin „*full length*“ Isoformen und der konstitutiv aktivierten Mutante Cdc42-Q61L durchgeführt. Zuerst wurde im G-LISA®-Experiment die GAP-Aktivität der einzelnen Nadrin „*full length*“ Isoformen gegenüber Cdc42 gezeigt (**Abbildung 4.12A**). Es war deutlich zu erkennen, dass nur Nadrin5 WT den Gehalt an aktivem, GTP-gebundenem Cdc42 reduzieren konnte. Nadrin2 WT hatte keinen Einfluss auf den Cdc42-GTP-Level. Weiterhin wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von den kotransfizierten Säugetierzellen angefertigt, um den Einfluss der beiden Nadrin „*full length*“ Isoformen auf Cdc42-induzierte Zytoskelettveränderungen zu untersuchen. Repräsentative Aufnahmen sind in **Abbildung 4.12B** dargestellt. Konsistent mit den Ergebnissen der G-LISA®-Experimente konnte festgestellt werden, dass nur Nadrin5 WT in der Lage ist, die Cdc42-vermittelte Filopodienbildung zu verringern. Die Filopodienbildung in Zellen in denen Nadrin2 WT und Cdc42 überexprimiert wurde, entsprach der mitgeführten „*tandem*“ Tomato-Leervektorkontrolle.

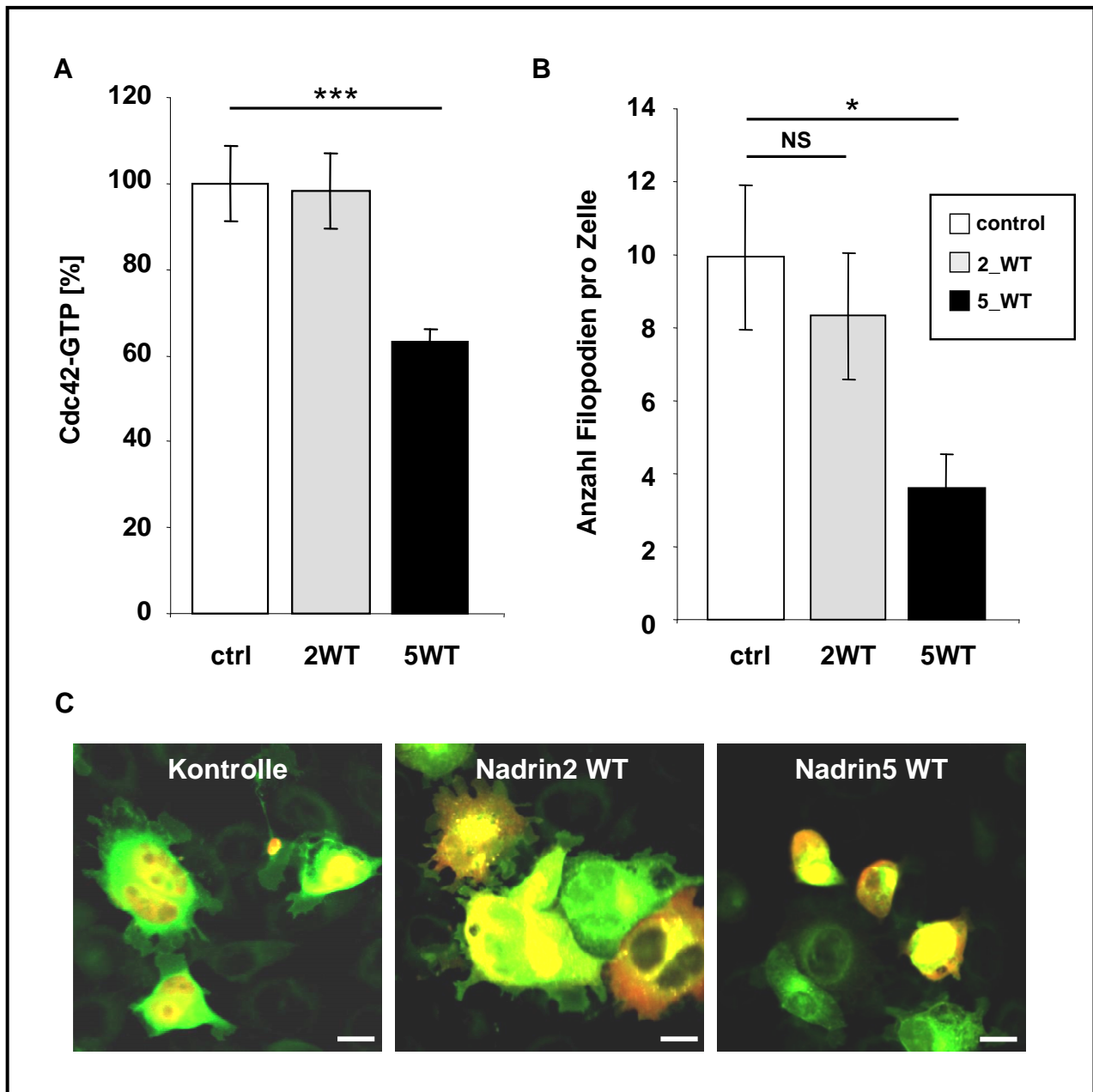


Abbildung 4.12: Nadrin reguliert Cdc42 Isoform-spezifisch. (A) Cdc42-G-LISA® mit konstitutiv aktiviertem Cdc42 und Nadrin „full length“ Isoformen (Nadrin2 WT und Nadrin5 WT) überexprimiert in Säugetierzellen. (B) Statistische Auswertung der Cdc42-Q61L-induzierten Filopodienbildung bei Nadrin2 WT- bzw. Nadrin5 WT-Überexpression. (C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Cdc42-Q61L cDNA und Nadrin cDNA kotransfizierten A5-CHO Zellen; Grün = EGFP-Cdc42-Q61L, Rot = Nadrin bzw. „tandem“ Tomato. Maßstab = 10 μ m. $P < 0,05$ *, $P < 0,001$ ***, nicht signifikant NS

4. 3. 2. Nadrin reguliert Rac1

Weiterhin wurden nun im Zellkulturmodell die beiden Nadrin „full length“ Isoformen Nadrin2 WT und Nadrin5 WT bezüglich ihrer Wirkung auf Rac1 miteinander

verglichen. Die Ergebnisse des G-LISA®, der wie unter 4. 3. 1. mit kotransfizierten Säugetierzellen durchgeführt wurde, sind dem Diagramm in **Abbildung 4.13A** zu entnehmen. Beide getesteten Nadrin „full length“ Isoformen (Nadrin2 WT und Nadrin5 WT) konnten den Gehalt an GTP-gebundenem Rac1 mindestens sehr signifikant

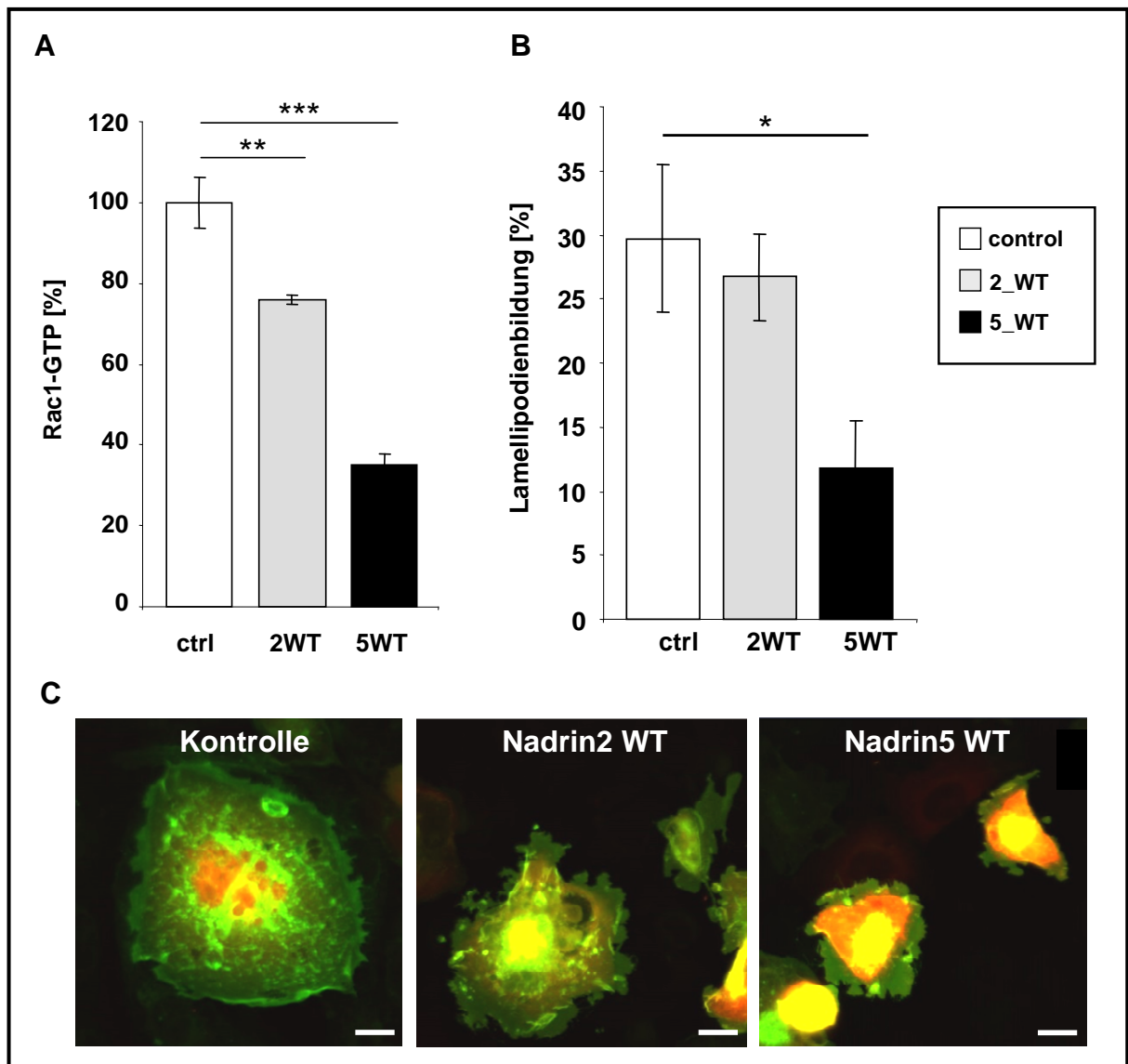


Abbildung 4.13: Nadrin reguliert Rac1. (A) Rac1-G-LISA® mit konstitutiv aktiviertem Rac1 und Nadrin „full length“ Isoformen (Nadrin2 WT und Nadrin5 WT) überexprimiert in Säugetierzellen. (B) Statistische Auswertung der Rac1-Q61L-induzierten Lamellipodienbildung bei Nadrin2 WT- bzw. Nadrin5 WT-Überexpression. $P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ *** (C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Rac1-Q61L cDNA und Nadrin cDNA kotransfizierten A5-CHO Zellen; EGFP-Rac1-Q61L = grün, Nadrin bzw. „tandem“ Tomato = rot. Maßstab = 10 μ m.

reduzieren. Auch in diesem Versuchsansatz wurden von den kotransfizierten Säugetierzellen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Wie in **Abbildung 4.13C** an repräsentativen Aufnahmen zu erkennen ist, haben – in Einklang mit den G-

LISA®-Ergebnissen – beide getesteten Nadrin „full length“ Isoformen (Nadrin2 WT und Nadrin5 WT) einen Einfluss auf die für Rac1 charakteristische Lamellipodienbildung. Hierbei ist die GAP-Aktivität von Nadrin5 WT mit einer Reduktion des GTP-gebundenen Rac1 auf $35,1 \pm 2,8$ % verglichen mit der Leervektorkontrolle deutlich potenter, als die GAP-Aktivität von Nadrin2 WT ($75,8 \pm 1,2$ %). Die Quantifizierung der Lamellipodienbildung ist dem Diagramm in **Abbildung 4.13B** zu entnehmen. Die flachen, runden Lamellipodien sind in Nadrin5 WT-transfizierten Zellen deutlich stärker verringert, als in Nadrin2 WT-transfizierten Zellen.

4. 3. 3. Nadrin reguliert RhoA

Auch für die dritte wichtige RhoGTPase RhoA wurde mittels Überexpression in Säugetierzellen der Einfluss der einzelnen Nadrin „full length“ Isoformen (Nadrin2 WT und Nadrin5 WT) untersucht (**Abbildung 4.14**). Beide Nadrin Isoformen waren in der Lage aktives RhoA mindestens signifikant zu reduzieren.

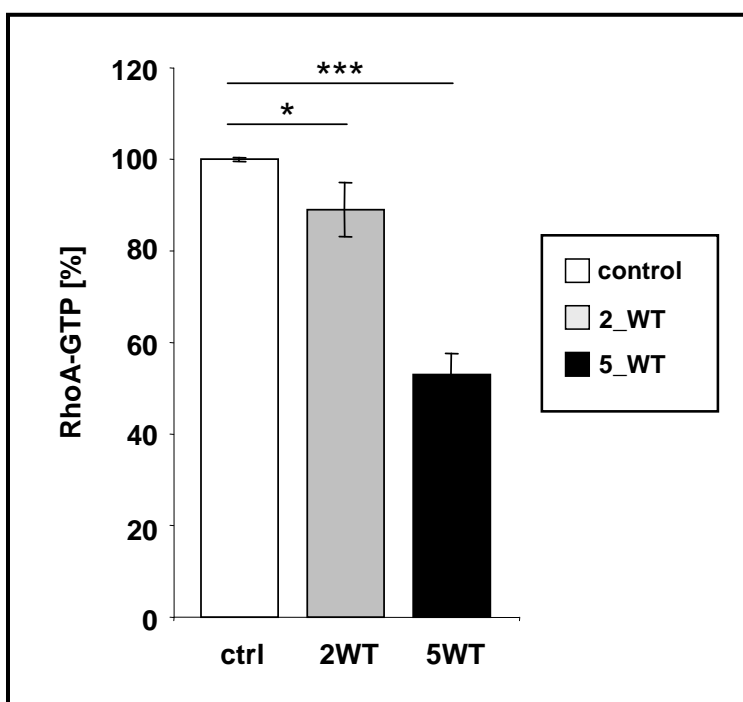


Abbildung 4.14: Nadrin reguliert RhoA. RhoA1-G-LISA® mit konstitutiv aktiviertem RhoA und Nadrin „full length“ Isoformen (Nadrin2 WT und Nadrin5 WT) überexprimiert in Säugetierzellen. $P < 0,05$ *, $P < 0,001$ ***

Leider ist der Einfluss von RhoA auf das Zytoskelett nicht so markant, wie die bereits gezeigte Pseudopodienbildung, die von Rac1 und Cdc42 vermittelt wird. Daher wurde

Stressfaserbildung und die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe fokussiert (siehe 4. 4. „Im Zellkultursystem reguliert Nadrin Stressfaserbildung, die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe und die Zelladhäsion“). RhoA spielt hierbei eine zentrale Rolle.

4. 4. Im Zellkultursystem reguliert Nadrin Stressfaserbildung, die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe und die Zelladhäsion

4. 4. 1. Nadrin reguliert die Stressfaserbildung

Stressfasern sind wichtig für Zellmotilität und kontraktile Prozesse. Einer der wichtigsten Regulatoren der Stressfaserbildung ist die GTPase RhoA. In A5-CHO Zellen wurden die einzelnen Nadrin „full length“ Isformen in ptdTomato überexprimiert und anschließend auf Stressfaserbildung untersucht. Die Färbung der Stressfasern erfolgte mit Alexa Fluor® 488 Phalloidin (*Abbildung 4.15*).

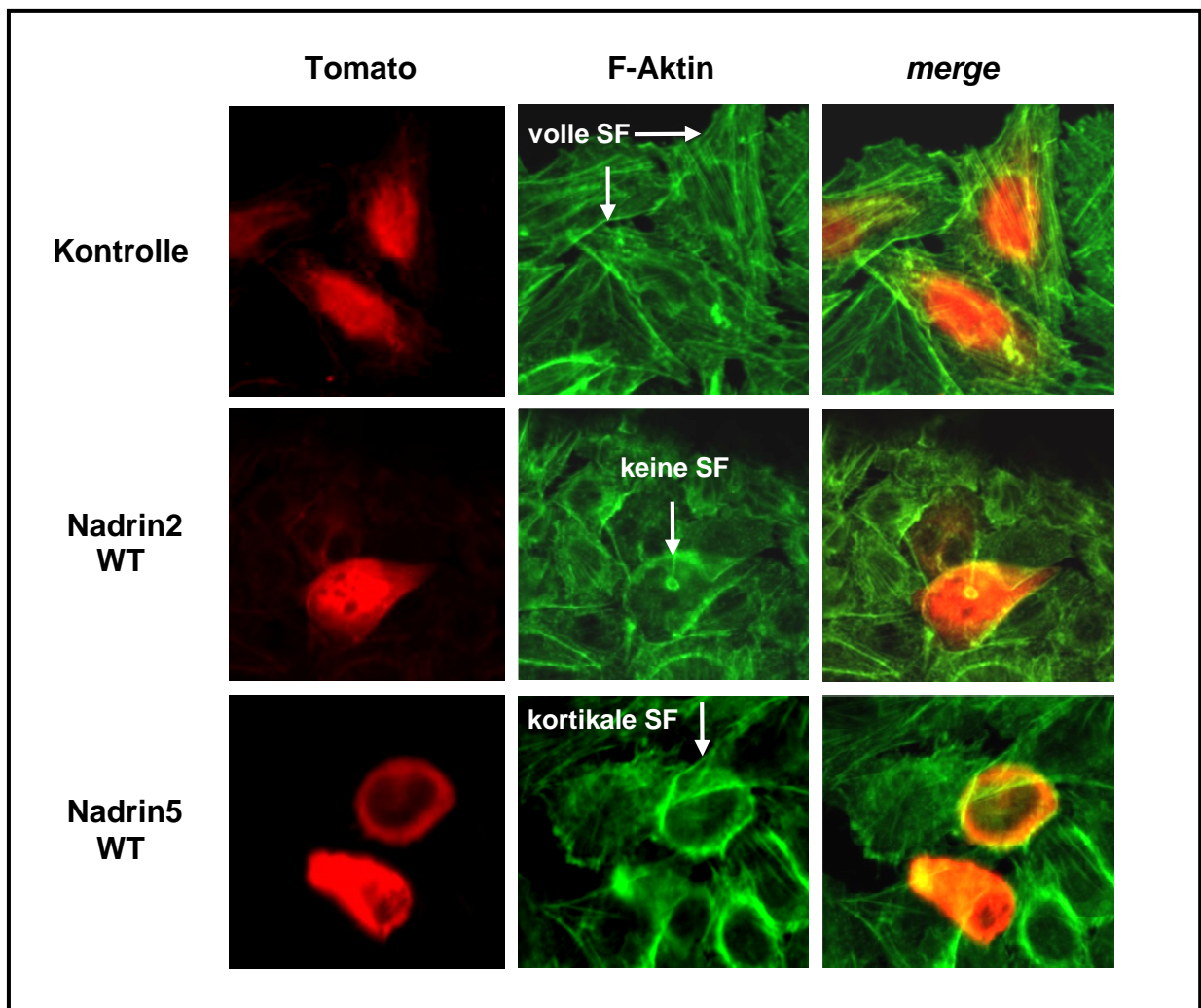


Abbildung 4.15: Repräsentative Aufnahmen von transfizierten A5-CHO Zellen nach F-Aktin-Färbung. Grün: Alexa Fluor® 488 Phalloidin (F-Aktin-Färbung); Rot: „tandem“ Tomato (Kontrolle), Fusionsprotein „tandem“ Tomato-Nadrin „full length“ (siehe Beschriftung: Nadrin2 WT und Nadrin5 WT); SF = Stressfasern.

Die Auswertung der Stressfaserbildung transfizierter A5-CHO Zellen erfolgte, indem die Zellen in drei Gruppen eingeteilt wurden:

1. Zellen mit normaler Stressfaserbildung
2. Zellen mit reduzierter oder kortikaler Stressfaserbildung
3. Zellen, die keine Stressfasern bildeten.

Das quantifizierte Ergebnis ist im Diagramm in **Abbildung 4.16** zusammengefasst.

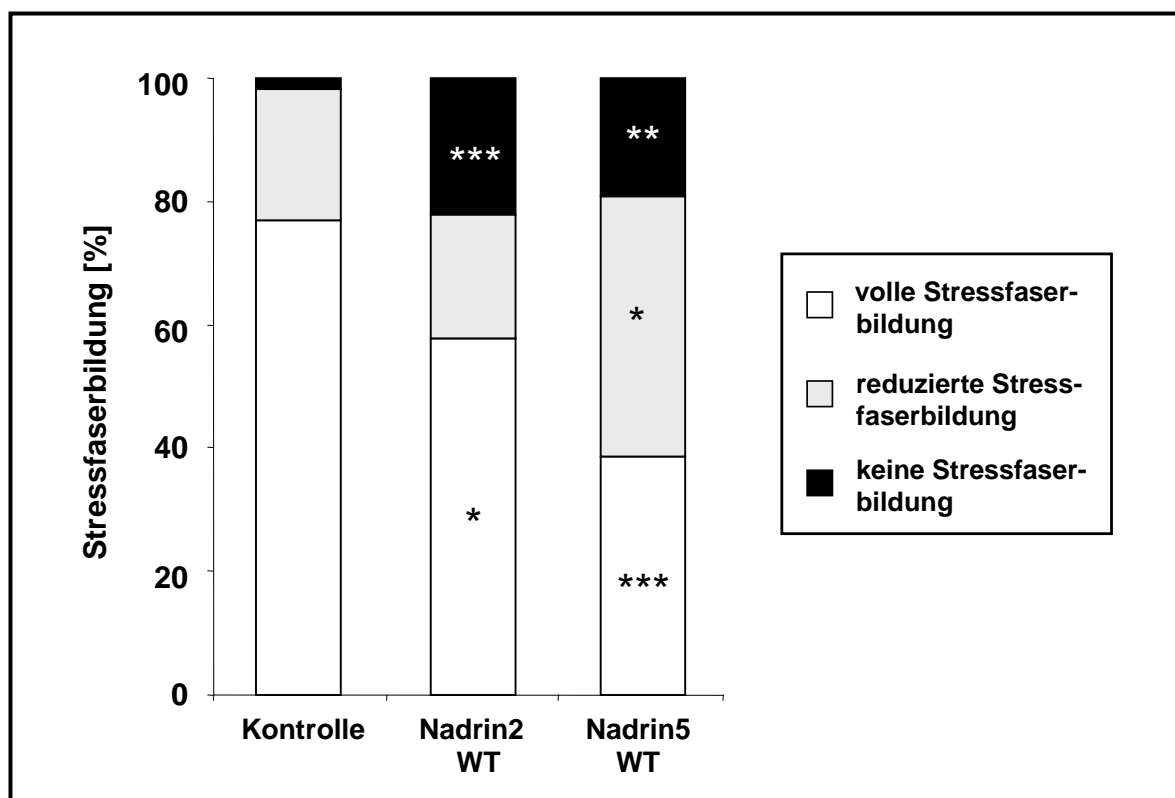


Abbildung 4.16: Quantifizierung der Stressfaserbildung Nadrin „full length“-transfizierter Säugetierzellen. Einfluss von Nadrin2 WT und Nadrin5 WT auf die Bildung von Stressfasern. $P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ ***

Sowohl Nadrin2 WT als auch Nadrin5 WT reduzierten die Anzahl der Zellen, die normale Stressfaserbildung zeigten verglichen mit der Kontrolle mindestens signifikant (Nadrin2 WT = 57,8 %, Nadrin5 WT = 38,7 % verglichen mit der Leervektorkontrolle = 77,0 %). Überexpression von Nadrin5 WT erhöhte die Zahl der Zellen mit reduzierter Stressfaserbildung signifikant (Nadrin5 WT = 42,0 % verglichen mit der Kontrolle = 21,3 %). Auch die Zahl der Zellen die gar keine Stressfasern mehr bildeten wurde von beiden getesteten Nadrin „full length“- Isoformen mindestens sehr signifikant erhöht (Nadrin5 WT = 19,3 % verglichen mit der Leervektorkontrolle = 1,7 %).

4. 4. 2. Nadrin reguliert die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe

Neben der Bildung von Stressfasern spielt auch die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe eine zentrale Rolle bei Zellmigration und Zelladhäsion. Die Färbung fokaler Adhäsionskomplexe beruht auf der Immundetektion von Vinculin, einem Protein, das in relativ großer Menge in fokalen Adhäsionskomplexen eingelagert wird [Katoh *et al.*, 1995]. Auch der Prozess der fokalen Adhäsionskomplex-Bildung wird zu einem Großteil von RhoA reguliert. Da Nadrin, wie in 4. 3. 3. „Nadrin reguliert RhoA“ gezeigt, die RhoA-Aktivität beeinflussen kann, wurde auch der Effekt der einzelnen Nadrin „full length“ Isoformen Nadrin2 WT und Nadrin5 WT auf die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe untersucht. Nach Überexpression von Nadrin2 WT und Nadrin5 WT, bzw. der Leervektorkontrolle in A5-CHO Zellen wurde Vinculin immundetektiert und anhand konfokaler fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen analysiert (**Abbildung 4.17**).

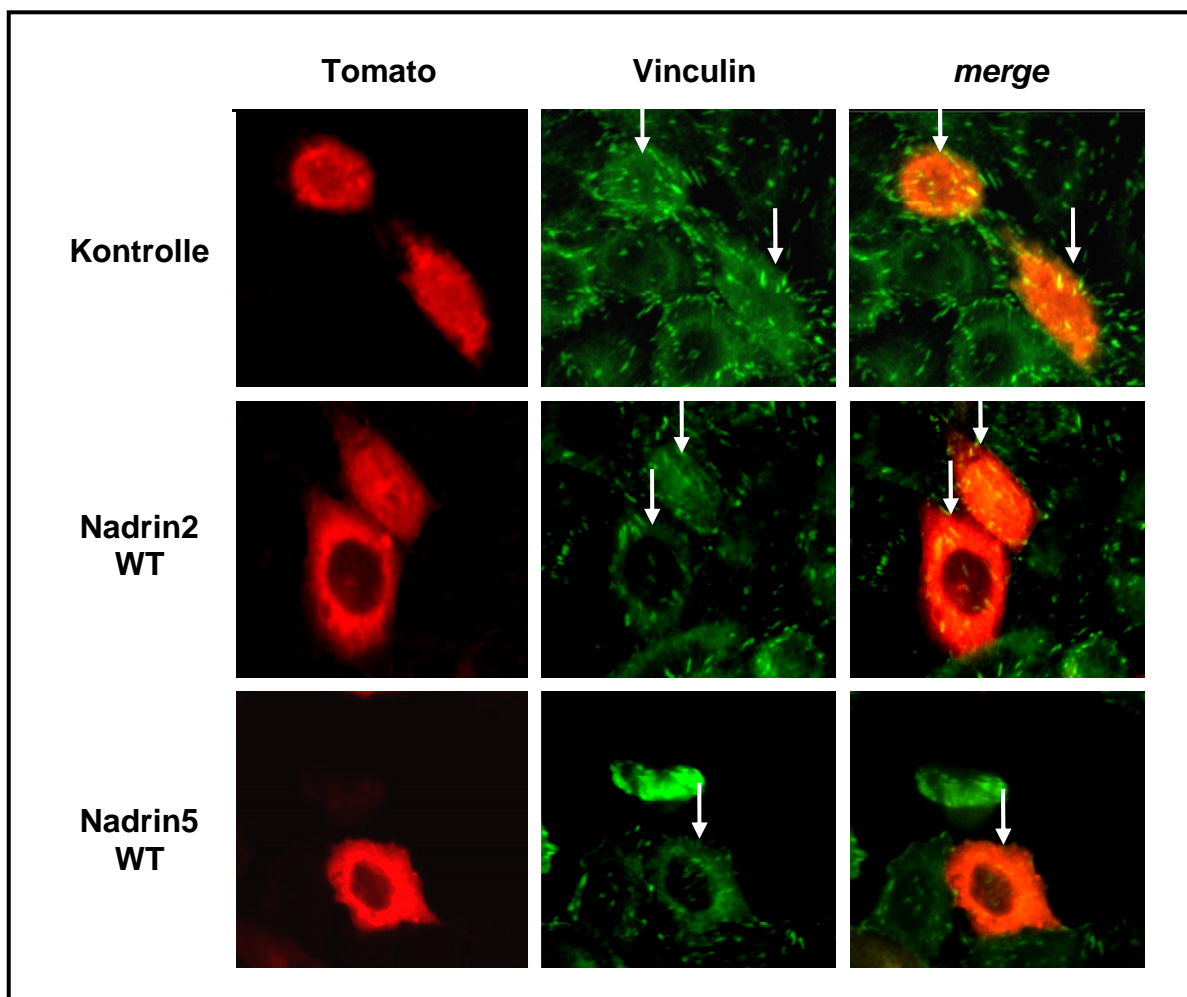


Abbildung 4.17: Repräsentative Aufnahmen von transfizierten A5-CHO Zellen nach Vinculin-Färbung. In Säugetierzellen überexprimierte Nadrin „full length“ Isoformen (Nadrin2 WT und Nadrin5 WT) beeinflussen die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe.

Die Quantifizierung der Bildung fokaler Adhäsionskomplexe erfolgte, indem die Nadrin-transfizierten A5-CHO in drei Gruppen eingeteilt wurden:

1. normale Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen
2. verminderte Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen
3. nur diffuse Färbung im Zytoplasma

Diese Auswertung ergab das folgende, in **Abbildung 4.18** dargestellte Ergebnis.

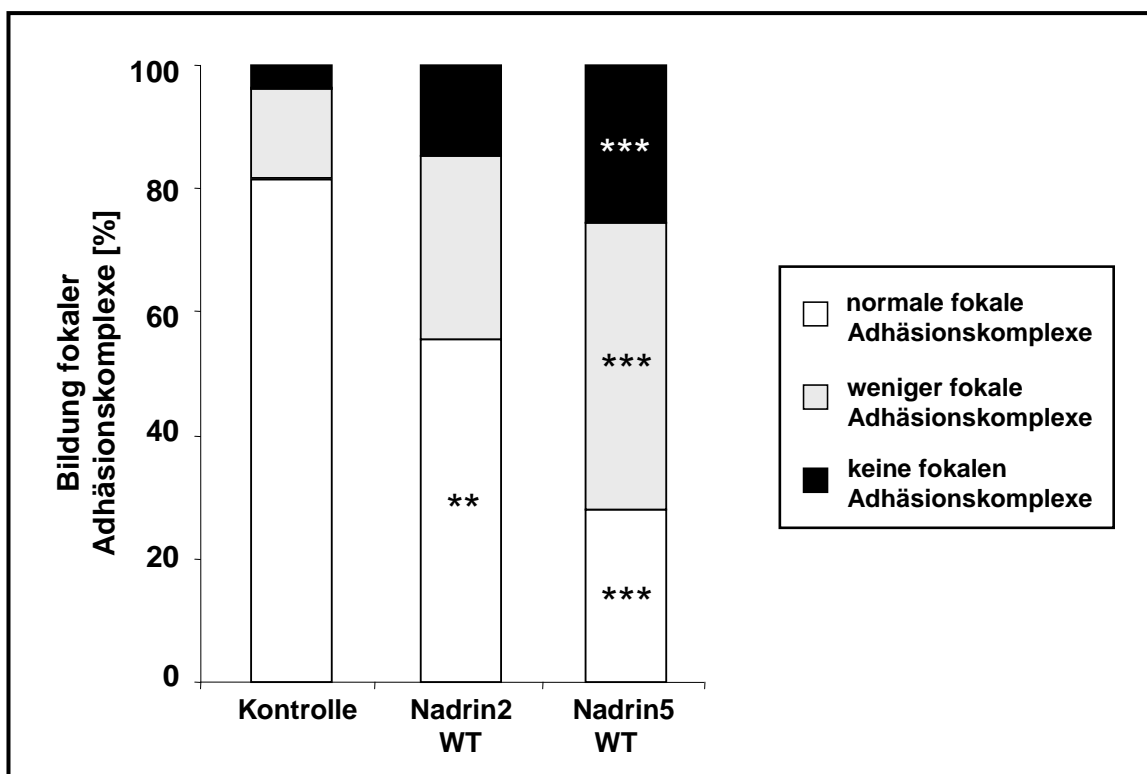


Abbildung 4.18: Quantifizierung der Bildung fokaler Adhäsionskomplexe in Nadrin-transfizierten Säugetierzellen. Einfluss von Nadrin2 WT und Nadrin5 WT auf die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe verglichen mit Leervektor-transfizierten Zellen. $P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ ***

Alle Zellen, in denen Nadrin überexprimiert wurde, zeigten eine gegenüber der Kontrolle deutlich veränderte Bildung fokaler Adhäsionskomplexe. Normale Adhäsionskomplexbildung war bei beiden getesteten Nadrin „full length“ Isoformen im Vergleich zu Leervektorkontrolle mindestens sehr signifikant verringert. Im Vergleich zur Leervektorkontrolle war die Bildung normaler fokaler Adhäsionskomplexe von 81,5 % in den Kontrollzellen auf 55,7 % (Nadrin2 WT), bzw. 28,1 % (Nadrin5 WT) reduziert.

4. 4. 3. Nadrin reguliert die Zelladhäsion

Da die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe durch beide getesteten Nadrin „full length“ Isoformen (Nadrin2 WT und Nadrin5 WT) beeinflusst wurde, folgte die Untersuchung der Zelladhäsion bei Nadrin-Überexpression. Hierzu wurden A5-CHO Zellen verwendet, die nach Transfektion auf einer Fibrinogen-Matrix adhären gelassen wurden. Repräsentative Bilder der transfizierten Zellen, sowie die Quantifizierung adhärerter Zellen pro Gesichtsfeld sind in **Abbildung 4.19** dargestellt.

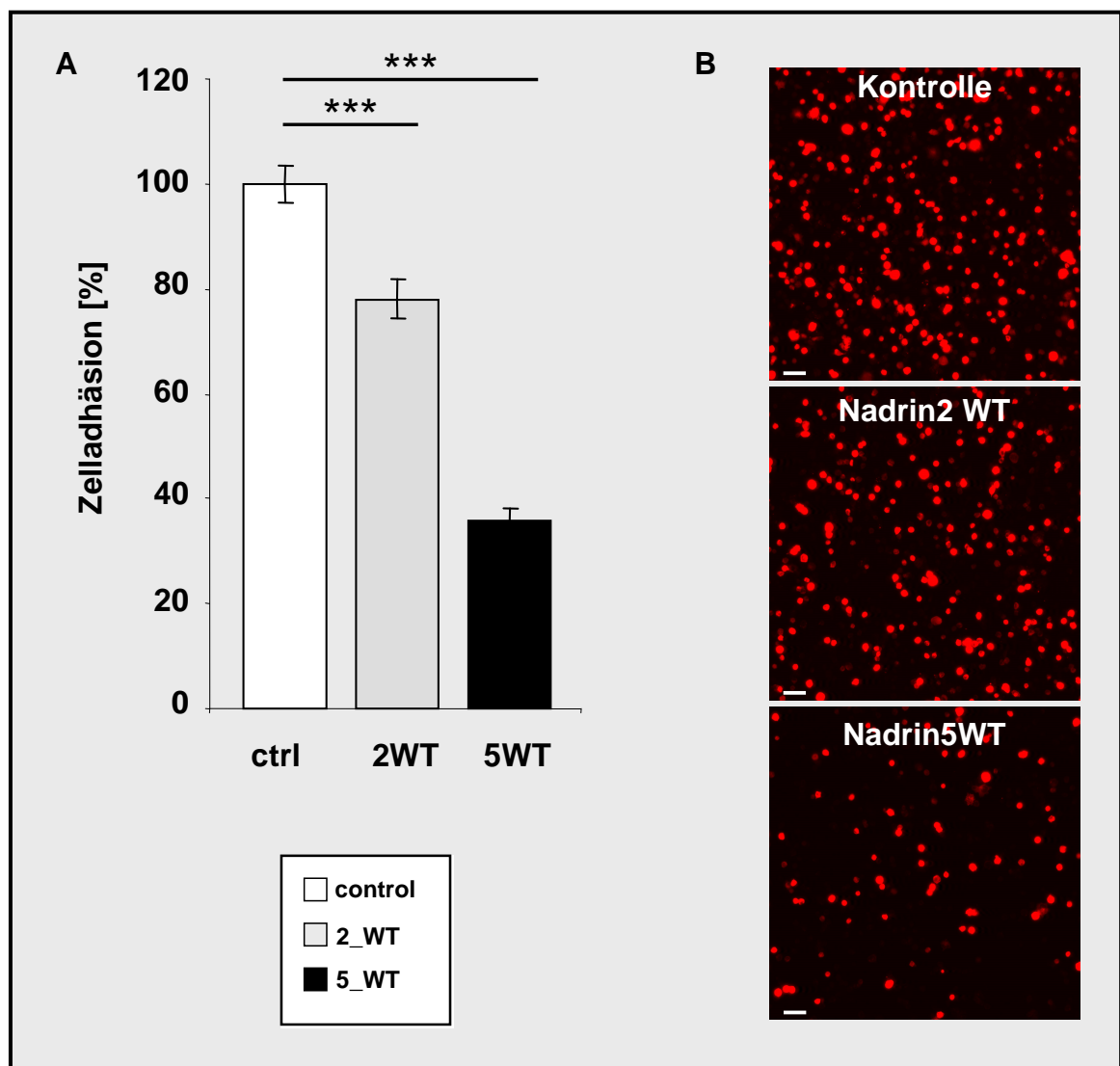


Abbildung 4.19: Nadrin beeinflusst die Adhäsion von Säugetierzellen. Nadrin2 WT und Nadrin5 WT wurde in A5-CHO Zellen überexprimiert und eine definierte Zahl transfizierter Zellen auf Fibrinogen adhären gelassen. (A) Quantifizierung adhärerter, transfizierter Zellen pro Gesichtsfeld. (B) Repräsentative Aufnahmen transfizierter Zellen. $P < 0,001$ ***

Beide getesteten Nadrin „full length“ Isoformen (Nadrin2 WT und Nadrin5 WT) hatten einen mehr oder weniger deutlichen Effekt auf die Zelladhäsion. Nadrin2 WT reduzierte die Zahl adhärierter Zellen auf $78,1 \pm 3,6$ % verglichen mit der Kontrolle, Nadrin5 WT hingegen reduzierte die Zahl adhärierter A5-CHO Zellen auf $35,8 \pm 2,5$ %.

4. 5. Regulation von Nadrin

Für GTPase aktivierende Proteine stehen der Zelle mehrere Regulationsmechanismen zur Verfügung. In dieser Arbeit wurden zwei bekannte und teils weit verbreitete Mechanismen untersucht: Die Regulation durch die BAR-Domäne und durch Tyrosinphosphorylierung.

4. 5. 1. Nadrin wird durch die BAR-Domäne reguliert

Da für das verwandte RhoGAP Oligophrenin-1 eine Regulation durch die BAR-Domäne bereits gezeigt wurde, lag es nahe diesen Mechanismus auch für Nadrin zu untersuchen. Bei Oligophrenin-1 spielt bei der Regulation durch die BAR-Domäne auch die „pleckstrin homology“ (PH)-Domäne eine entscheidende Rolle. Wenngleich Nadrin eine solche PH-Domäne nicht besitzt, wurde der regulatorische Effekt der BAR-Domäne auf die Nadrin-Aktivität untersucht.

4. 5. 1. 1. Die Nadrin BAR-Domäne reguliert den Einfluss von Nadrin auf die Stressfaserbildung

Um einen eventuellen regulatorischen Effekt der BAR-Domäne zeigen zu können, wurden die unter 4. 2. 2. „Herstellung der Nadrin Δ BAR-Mutanten“ gezeigten Nadrin Δ BAR-Mutanten in Säugetierzellen überexprimiert und deren Einfluss auf die Stressfaserbildung untersucht. Die Versuchsdurchführung glich der unter 4. 4. 1. „Nadrin reguliert die Stressfaserbildung“ beschriebenen und die Auswertung wurde anhand der Selben Kriterien durchgeführt. Die transfizierten und F-Aktin-gefärbten A5-CHO Zellen wurden in drei Gruppen eingeteilt:

1. Zellen mit normaler Stressfaserbildung
2. Zellen mit reduzierter oder kortikaler Stressfaserbildung
3. Zellen, die keine Stressfasern bildeten.

Das quantifizierte Ergebnis ist im Diagramm in **Abbildung 4.20** zusammengefasst.

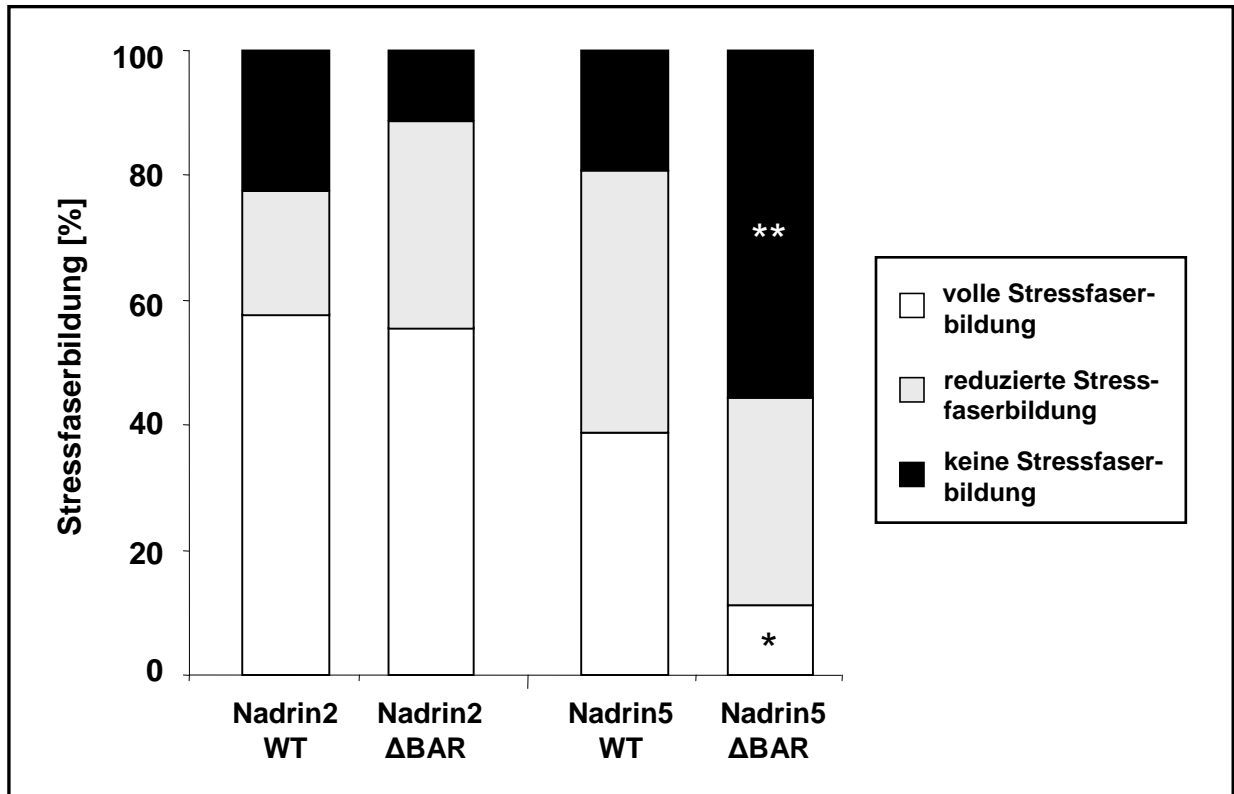


Abbildung 4.20: Quantifizierung der Stressfaserbildung Nadrin Δ BAR-transfizierter Säugetierzellen. Einfluss von Nadrin2 Δ BAR und Nadrin5 Δ BAR auf die Stressfaserbildung im Vergleich zur jeweiligen „full length“ Isoform Nadrin2 WT und Nadrin5 WT. $P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **

Im Vergleich mit der zugehörigen „full length“ Isoform, zeigt Nadrin5 Δ BAR einen deutlich größeren Effekt. Die volle Stressfaserbildung ist von ca. 40 % bei Nadrin5 WT auf nur noch etwa 10 % bei Nadrin5 Δ BAR reduziert. Nadrin2 hingegen zeigt bezüglich der Stressfaserbildung keine signifikante Veränderung bei deletierter BAR-Domäne.

4. 5. 1. 2. Die Nadrin BAR-Domäne reguliert die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe

Wie bereits in 4. 4. 2. „Nadrin reguliert die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe“ beschrieben, spielt auch die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe eine zentrale Rolle bei Zellmigration und Zelladhäsion. Die Färbung fokaler Adhäsionskomplexe beruht auf der Immundetektion von Vinculin, einem Protein, das in relativ großer Menge in fokalen

Adhäsionskomplexen eingelagert wird [Kato *et al.*, 1995]. Auch der Prozess der fokalen Adhäsionskomplex-Bildung wird zu einem Großteil von RhoA reguliert. Da Nadrin, wie in 4. 3. 3. „Nadrin reguliert RhoA“ gezeigt, die RhoA-Aktivität beeinflussen kann, wurde auch der Effekt der einzelnen Nadrin Δ BAR-Mutanten (Nadrin2 Δ BAR und Nadrin5 Δ BAR) auf die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe untersucht, indem besagte Nadrin Δ BAR-Mutanten als „*tandem*“ Tomato-Fusionsprotein und die zugehörige Kontrolle in A5-CHO Zellen überexprimiert wurden und nach der Immundetektion von Vinculin konfokale Aufnahmen angefertigt wurden.

Die Quantifizierung der Bildung fokaler Adhäsionskomplexe erfolgte, indem die Nadrin-transfizierten A5-CHO Zellen in drei Gruppen eingeteilt wurden:

1. normale Bildung fokaler Adhäsionskomplexe
2. verminderte Bildung fokaler Adhäsionskomplexe
3. nur diffuse Vinculinfärbung im Zytoplasma

Diese Auswertung ergab das folgende, in **Abbildung 4.21** dargestellte Ergebnis.

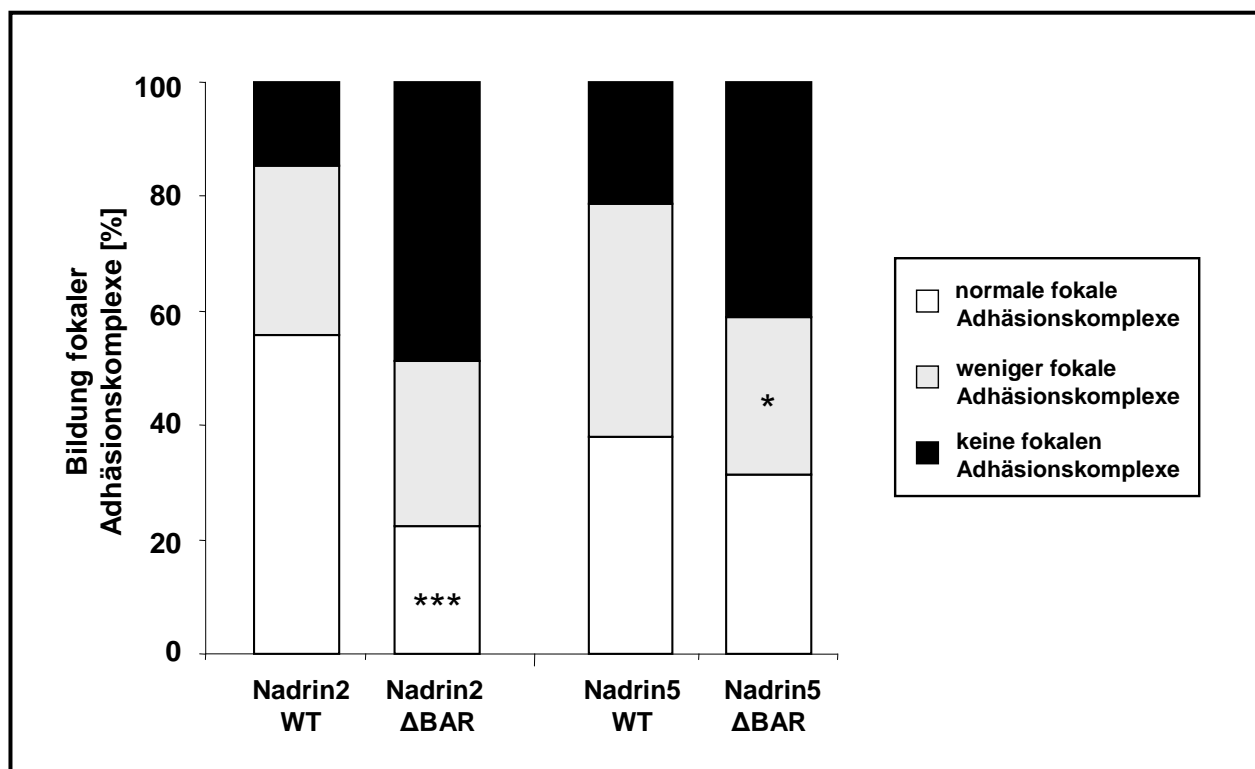


Abbildung 4.21: Quantifizierung der Bildung fokaler Adhäsionskomplexe von Nadrin Δ BAR-transfizierten Säugetierzellen. Einfluss von Nadrin2 bzw. Nadrin5 Δ BAR verglichen mit den jeweiligen WT Isoformen auf die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe. $P < 0,05$ *, $P < 0,001$ ***

Sowohl auf Nadrin2 als auch auf Nadrin5 hat die Deletion der BAR-Domäne einen mindestens signifikanten Einfluss bezüglich der Bildung fokaler Adhäsionskomplexe. Im

Vergleich zur Kontrolle Nadrin2 WT ($55,7 \pm 4,5 \%$) wird die fokale Adhäsionskomplexbildung durch Nadrin2 Δ BAR stärker vermindert auf $20,0 \pm 6,2 \%$. Nadrin5 Δ BAR erhöhte die Zahl der Zellen ohne Adhäsionskomplexe, wobei die Zellen mit reduzierten Adhäsionskomplexen auf $28,6 \pm 1,4 \%$ verglichen mit der WT-Kontrolle (Nadrin5 WT = $46,3 \pm 5,7 \%$) abnimmt. Diffuse Verteilung des Proteins Vinculin im Zytoplasma war tendenziell häufiger in den Nadrin Δ BAR-Mutanten zu beobachten.

4. 5. 1. 3. Die Nadrin BAR-Domäne reguliert den Einfluss von Nadrin auf die Zelladhäsion

Unter 4. 4. 3. „Nadrin reguliert die Zelladhäsion“ wurde bereits gezeigt, dass die beiden „full length“ Isoformen Nadrin2 WT und Nadrin5 WT die Zelladhäsion beeinflussen. Auch im Hinblick auf die Zelladhäsion wurde der Einfluss der Nadrin BAR-Domäne untersucht. Hierzu wurden A5-CHO Zellen mit Nadrin cDNA transfiziert und anschließend auf einer Fibrinogenmatrix adhären gelassen. Repräsentative Bilder der transfizierten Zellen, sowie die Quantifizierung adhärerter Zellen pro Gesichtsfeld sind in **Abbildung 4.22** dargestellt.

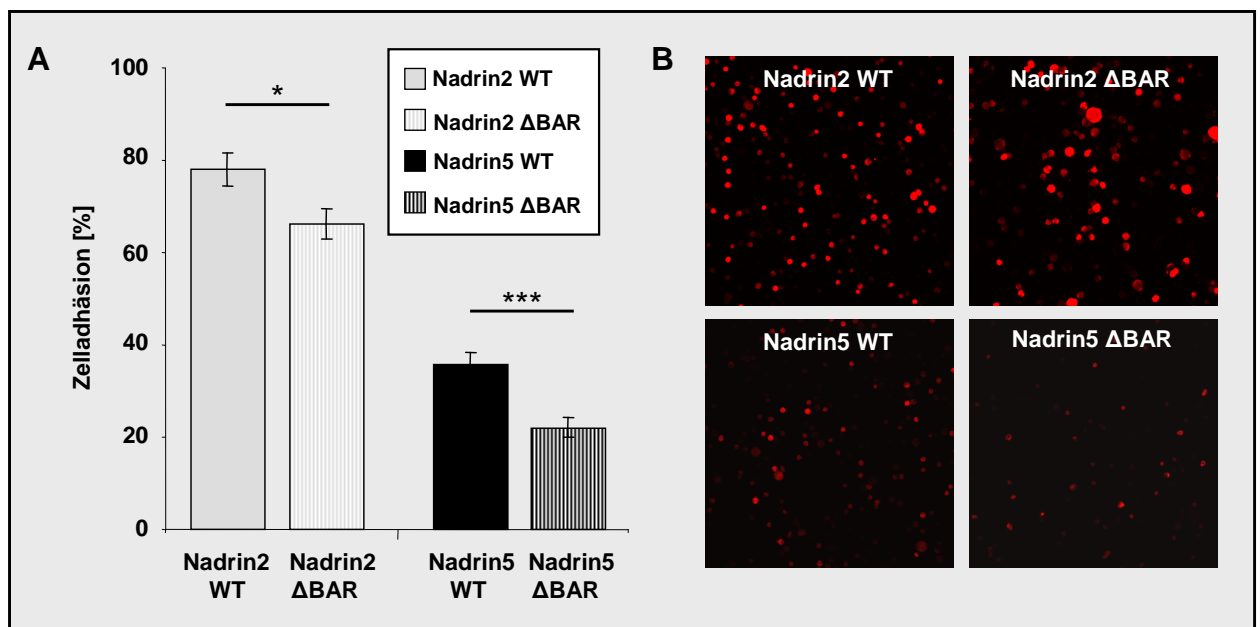


Abbildung 4.22: Die Nadrin BAR-Domäne reguliert die Zelladhäsion. (A) Quantifizierung adhärerter, transfizierter Zellen pro Gesichtsfeld. (B) Repräsentative Aufnahmen transfizierter A5-CHO Zellen. „tandem“ Tomato-Nadrin = rot. $P < 0,05$ *, $P < 0,001$ ***

Die BAR-Domäne beeinflusst sowohl Nadrin2 WT als auch Nadrin5 WT, denn die jeweiligen Nadrin Δ BAR-Mutanten reduzieren die Zelladhäsion nochmals deutlich. Nadrin2 Δ BAR reduzierte die Zelladhäsion auf ca. $66,2 \pm 3,1$ % (Nadrin2 WT = $78,1 \pm 3,6$ %) und Nadrin5 Δ BAR verringerte die Adhäsion transfizierter A5-CHO Zellen noch mal deutlich verglichen mit der Kontrolle Nadrin5 WT ($35,8 \pm 2,5$ %) auf nur noch $22,0 \pm 2,1$ %.

4. 5. 2. Src-Familie Tyrosinkinase-abhängige Phosphorylierung von Nadrin

Tyrosinphosphorylierung stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus verschiedenster Proteine dar. Eine sehr bekannte und in vielen Signaltransduktionswegen vorkommende Tyrosinkinase ist Src. Daher wurde in dieser Arbeit die Tyrosinphosphorylierung von Nadrin in Thrombozyten und im Zellkulturmodell untersucht.

4. 5. 2. 1. Nadrin wird in Thrombozyten aktivierungsabhängig tyrosinphosphoryliert

Regulationsprozesse, die auf die Thrombozytenaktivierung folgen, müssen schnell in die Signaltransduktion eingreifen können. Daher ist die Phosphorylierung von Proteinen in Thrombozyten ein weitverbreiteter Regulationsmechanismus [Zahedi et al., 2006]. Um die aktivierungsabhängige Tyrosinphosphorylierung von Nadrin zu zeigen, wurden Immunpräzipitationsstudien durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass sowohl durch Thrombin- als auch durch CRP-Aktivierung Nadrin tyrosinphosphoryliert wird. In *Abbildung 4.23* ist gezeigt, dass Nadrin in murinen Thrombozyten nach Thrombinaktivierung tyrosinphosphoryliert wird.

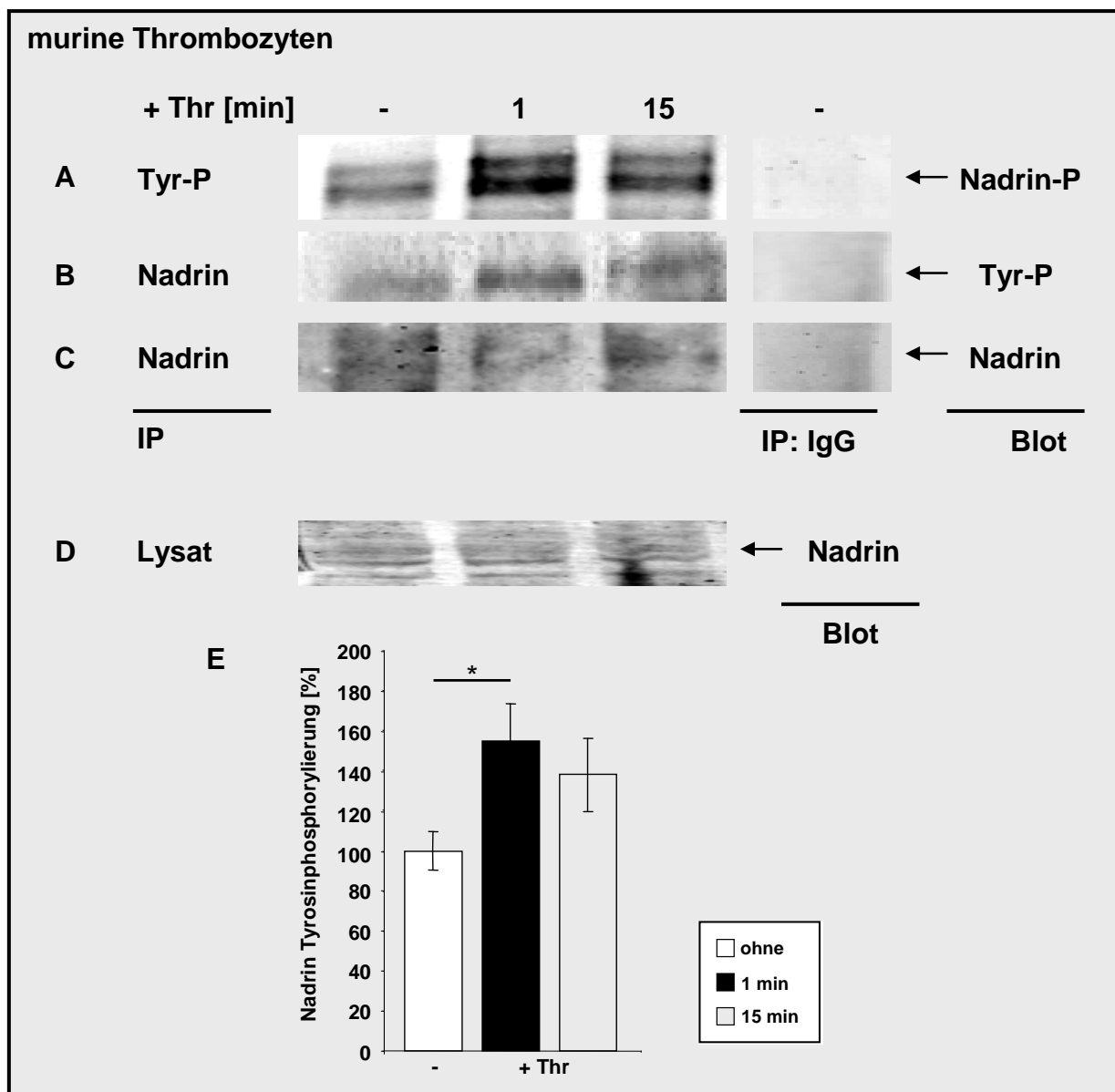


Abbildung 4.23: Immunpräzipitation zur Untersuchung der aktivierungsabhängigen Tyrosinphosphorylierung von Nadrin in murinen Thrombozyten. Die Aktivierung erfolgte mit Thrombin (1 und 15 min) (A) Immunpräzipitation mit Phosphotyrosin-Antikörper und Immundetektion von Nadrin. (B) Reziproke Immunpräzipitation mit Nadrin-Antikörper und Immundetektion von Phosphotyrosin. (C) Immunpräzipitation mit Nadrin-Antikörper und Immundetektion von Nadrin als Ladekontrolle. Jeweils rechts im Bild sind die zugehörigen IgG-Kontrollen abgebildet. (D) Lysate vor Immunpräzipitation zur Kontrolle des Eintrags. (E) Statistische Auswertung der Nadrin Tyrosinphosphorylierung nach Thrombinaktivierung muriner Thrombozyten. $P < 0,05^*$

Weiterhin wurden auch humane Thrombozyten untersucht. Auch hier wurden die Thrombozyten mit Thrombin aktiviert und anschließend Immunpräzipitationen durchgeführt. Die Ergebnisse der Fällungen mit anschließender Immundetektion sind in **Abbildung 4.24** gezeigt.

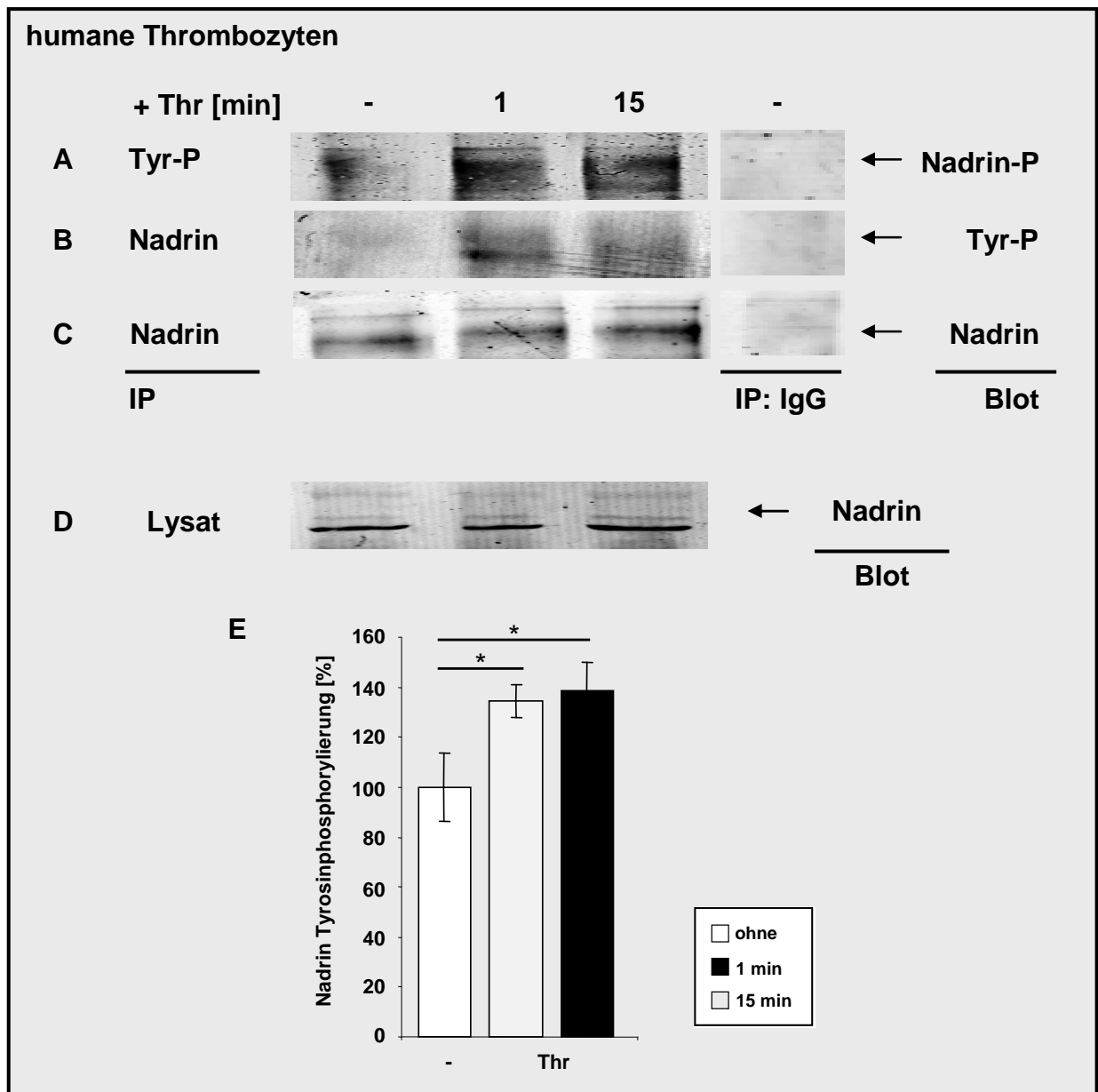


Abbildung 4.24: Immunpräzipitation zur Untersuchung der aktivierungsabhängigen Tyrosinphosphorylierung von Nadrin in humanen Thrombozyten. Die Aktivierung erfolgte mit Thrombin (1 und 15 min) (A) Immunpräzipitation mit Phosphotyrosin-Antikörper und Immundetektion von Nadrin. (B) Reziproke Immunpräzipitation mit Nadrin-Antikörper und Immundetektion von Phosphotyrosin. (C) Immunpräzipitation mit Nadrin-Antikörper und Immundetektion von Nadrin als Ladekontrolle. Jeweils rechts im Bild sind die zugehörigen IgG-Kontrollen zu sehen. (D) Lysate vor Immunpräzipitation zur Kontrolle des Eintrags. (E) Statistische Auswertung der Nadrin Tyrosinphosphorylierung nach Thrombinaktivierung humaner Thrombozyten. $P < 0,05$ *

Im Weiteren wurde nun unter Anwendung von CRP als Thrombozytenagonist auf die für die Nadrin Tyrosinphosphorylierung verantwortliche Tyrosinkinase fokussiert.

4. 5. 2. 2. Nadrin interagiert mit Src-Familie Tyrosinkinasen in Thrombozyten

In Thrombozyten spielt die Src-Familie der Tyrosinkinasen eine entscheidende Rolle bei Signaltransduktionsprozessen. Daher wurde eine Untersuchung der Interaktion von Nadrin und Tyrosinkinasen der Src-Familie durchgeführt.

Mit Lysaten von aktivierten Thrombozyten wurden Immunpräzipitationsstudien durchgeführt. Es ist dadurch möglich Proteine und deren Bindungspartner anzureichern und so eine Aussage über Protein-Protein-Interaktionen unter verschiedenen Bedingungen zu treffen. Humane Thrombozyten wurden hierzu aktiviert, lysiert und jeweils mit Src-Antikörper, bzw. reziprok mit Nadrin-Antikörper versetzt. Der Immunpräzipitation folgte die Immundetektion mit Nadrin-Antikörper, bzw. reziprok mit Src-Antikörper. Zur Kontrolle des Eintrags wurden außerdem die Lysate vor der IP analysiert um gleichmäßigen Eintrag in die IP zu gewährleisten. Die Ergebnisse der Immunpräzipitationen mit humanen Thrombozyten sind in **Abbildung 4.25** dargestellt.

Die Ergebnisse der Immunpräzipitationsstudien legen eine aktivierungsabhängige Interaktion von Nadrin und Src-Familie Tyrosinkinasen in murinen und humanen Thrombozyten nahe. Auf eine geringe Interaktion in ruhenden Thrombozyten folgt eine

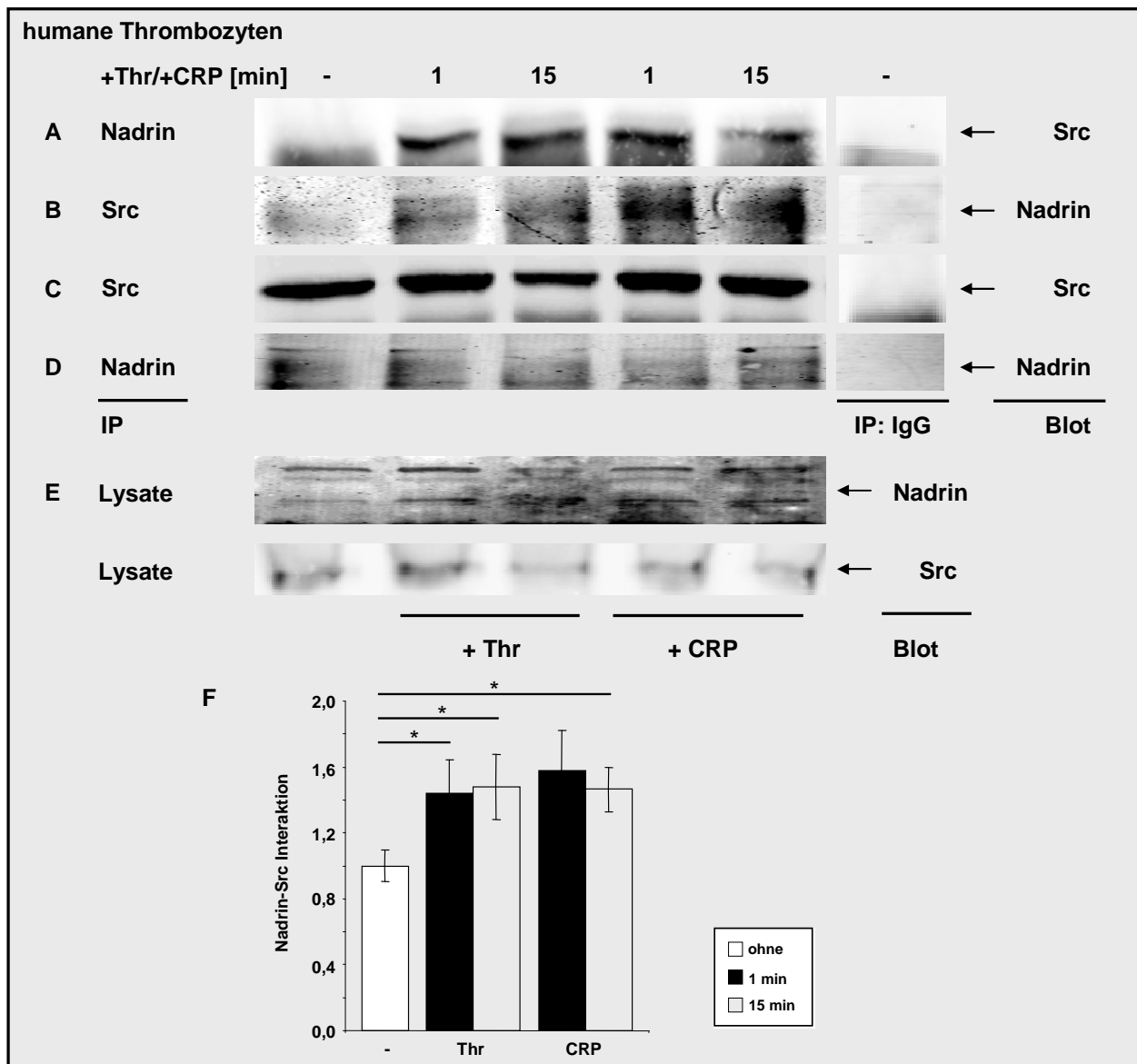


Abbildung 4.25: Immunpräzipitation zur Untersuchung der aktivierungsabhängigen Interaktion von Nadrin mit Src-Familie Tyrosinkinase in humanen Thrombozyten. Die Aktivierung erfolgte mit Thrombin und CRP (jeweils 1 und 15 min) (A) Immunpräzipitation mit Nadrin-Antikörper und Immundetektion von Src. (B) Reziproke Immunpräzipitation mit Src-Antikörper und Immundetektion von Nadrin. (C) Immunpräzipitation mit Src-Antikörper und Immundetektion von Src als Ladekontrolle. (D) Immunpräzipitation mit Nadrin-Antikörper und Immundetektion von Nadrin als Ladekontrolle. Jeweils rechts im Bild sind die zugehörigen IgG-Kontrollen zu sehen. (E) Lysate vor Immunpräzipitation zur Kontrolle des Eintrags. (F) Statistische Auswertung der Nadrin Tyrosinphosphorylierung nach Thrombinaktivierung humaner Thrombozyten. $P < 0,05$ *

deutlich verstärkte Nadrin-Src-Interaktion nach Aktivierung sowohl mit Thrombin als auch mit CRP. Ob diese Src-Familie Tyrosinkinase auch für die Tyrosinphosphorylierung verantwortlich ist, wurde im Weiteren untersucht.

4. 5. 2. 3. Nadrin wird in Thrombozyten durch Src-Familie Tyrosinkinasen phosphoryliert

Nachdem die Interaktion von Nadrin und Src-Familie Tyrosinkinasen gezeigt wurde (siehe 4. 5. 2. 2. „Nadrin interagiert mit Src-Familie Tyrosinkinasen in Thrombozyten“), und auch die aktivierungsabhängige Tyrosinphosphorylierung bereits gezeigt wurde, sollte nun untersucht werden, ob die Nadrin-Tyrosinphosphorylierung durch Src-Familie Tyrosinkinasen vermittelt wird.

Um zu belegen, dass Src-Familie Tyrosinkinasen neben der aktivierungsabhängigen Interaktion mit Nadrin auch an dessen Tyrosinphosphorylierung beteiligt sind, wurden Thrombozyten vor der Aktivierung mit CRP mit dem für Src-Familie Tyrosinkinasen spezifischen Tyrosinkinaseinhibitor PP2 behandelt. Die Thrombozyten wurden dann für 1 bzw. 15 min aktiviert und anschließend lysiert. Eine darauf folgende Immunpräzipitation mit Phosphotyrosin-spezifischem Antikörper und anschließender Immundetektion von Nadrin zeigt eine reduzierte Nadrin-Tyrosinphosphorylierung, die etwa im Bereich der basalen Tyrosinphosphorylierung ruhender Thrombozyten liegt. Thrombozyten ohne PP2-Behandlung zeigten eine deutlich stärkere Nadrin-Tyrosinphosphorylierung. Das Ergebnis einer Immunpräzipitation nach PP2-Behandlung humaner Thrombozyten ist in **Abbildung 4.26** gezeigt. Zur Kontrolle des Eintrags wurden die Lysate vor der IP auf ihren Gehalt an Nadrin analysiert.

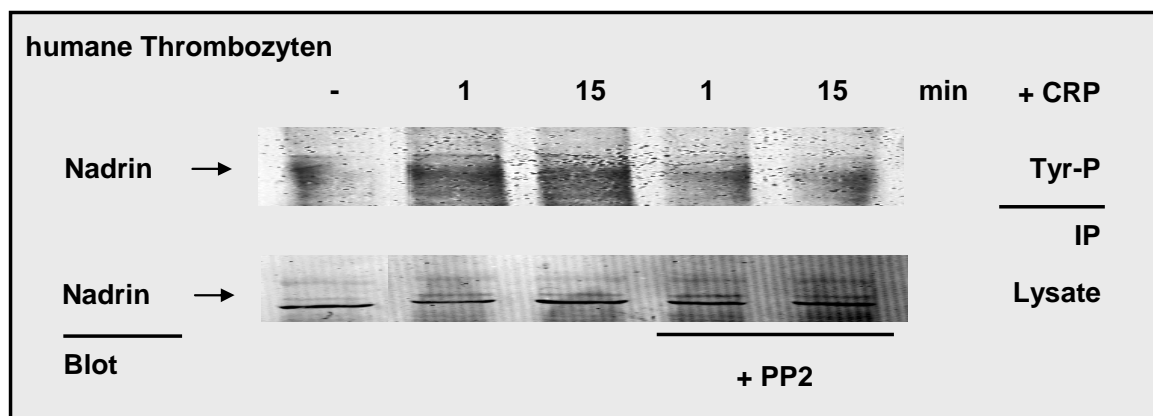


Abbildung 4.26: Immunpräzipitation zum Nachweis Src-Familie Tyrosinkinase-vermittelter Nadrin Tyrosinphosphorylierung in humanen Thrombozyten. Der Aktivierung mit CRP (jeweils 1 und 15 min) ging eine 15-minütige PP2-Behandlung voraus. Immunpräzipitation mit Phosphotyrosin-Antikörper und Immundetektion von Nadrin (oben). Lysate vor Immunpräzipitation zur Kontrolle des Eintrags (unten).

Nachdem gezeigt wurde, dass Nadrin in Thrombozyten von Src-Familie Tyrosinkinase aktivierungsabhängig phosphoryliert wird, folgte die Untersuchung der einzelnen Nadrin Isoformen im Zellkultursystem.

4. 5. 2. 4. Nadrin wird durch Src Tyrosinkinase tyrosinphosphoryliert

Um die Tyrosinphosphorylierung der Isoformen Nadrin2 WT und Nadrin5 WT einzeln betrachten zu können, wurden Überexpressionsstudien durchgeführt. Es wurden die Nadrin Isoformen Nadrin2 WT und Nadrin5 WT jeweils mit und ohne Src in HEK-293 Zellen überexprimiert. Zusätzlich wurde den mit Nadrin und Src kotransfizierten Zellen noch der Src-Familie Tyrosinkinase-Inhibitor PP2, bzw. als Kontrolle Wortmannin, zugegeben. Zur Kontrolle des Expressionslevels wurden die Lysate auch vor der IP untersucht.

Wie in *Abbildung 4.27* dargestellt, sind beide Nadrin Isoformen stärker tyrosinphosphoryliert, wenn sie zusammen mit Src exprimiert werden. Dies wurde mittels Immunpräzipitationsstudien mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper gezeigt. Zusätzlich wurden auch Zelllysate nach Behandlung mit PP2 (Src-Familie Tyrosinkinase Inhibitor) mittels Immunpräzipitation analysiert. Die Behandlung mit PP2 reduzierte eindeutig und hochsignifikant die Src-vermittelte Tyrosinphosphorylierung. Der zur Kontrolle eingesetzte, gegen eine andere Kinase gerichtete, Inhibitor Wortmannin (WM) zeigte keinen solchen Effekt.

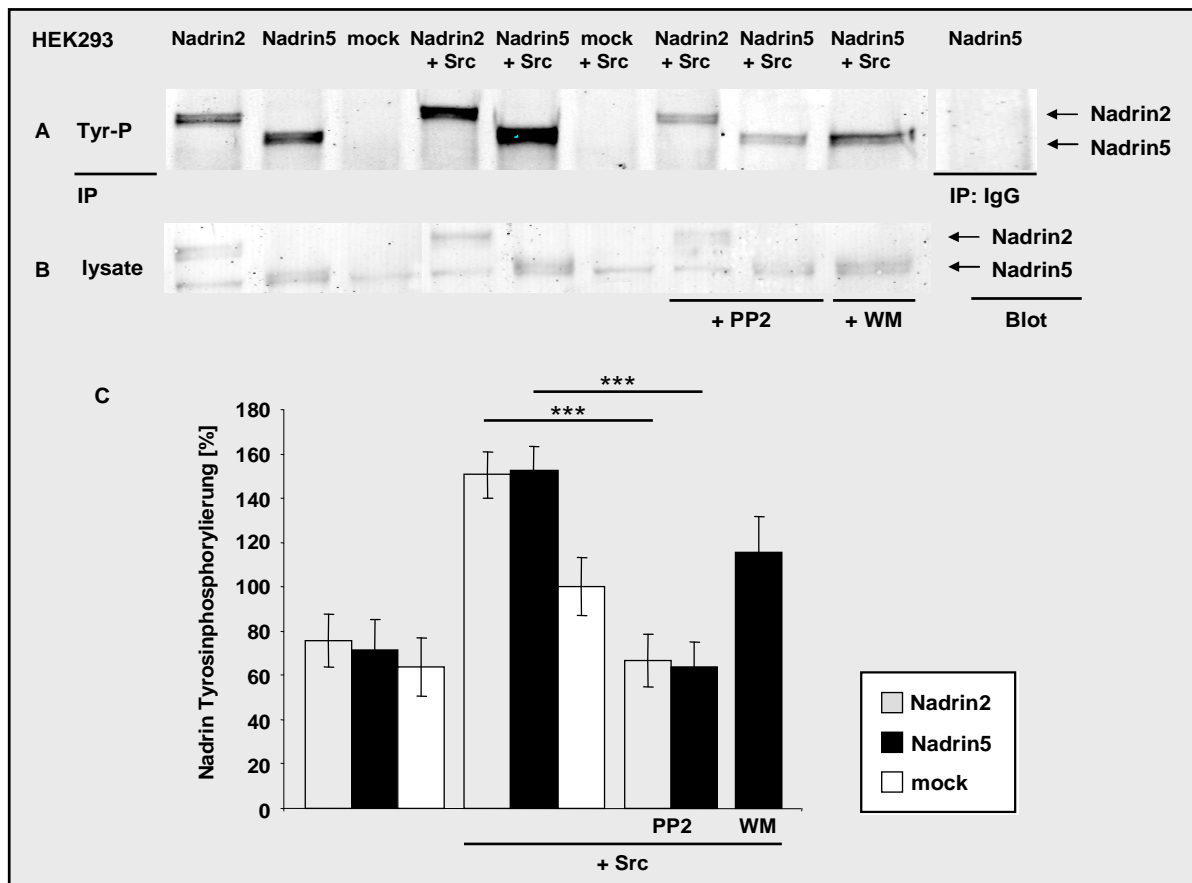


Abbildung 4.27: Überexpression der Nadrin Isoformen Nadrin2 WT und Nadrin5 WT in Säugetierzellen zusammen mit Src Tyrosinkinase. Immunnpräzipitation tyrosinphosphorylierter Proteine mit anschließender Immundetektion von Nadrin. „mock“ = Leervektorkontrolle, PP2 = Src-Familie Tyrosinkinase Inhibitor, WM = Wortmannin (PI3K („Phosphatidylinositide 3-kinase“) Inhibitor) (A) Immunpräzipitation mit Phosphotyrosin-Antikörper und Immundetektion von Nadrin. (B) Lysate vor Immunpräzipitation zur Kontrolle des Eintrags. (C) Statistische Auswertung der Src-vermittelten Tyrosinphosphorylierung von Nadrin2 WT und Nadrin5 WT bei Src Kotransfektion und nach Anwendung von PP2. $P < 0,001$ ***

4. 5. 3. Charakterisierung der Nadrin Phosphomutanten im Zellkultursystem

Um die Effekte der Tyrosinphosphorylierung auf die beiden Nadrin Isoformen Nadrin2 und Nadrin5 untersuchen zu können, wurden die unter 4. 2. 3. „Herstellung der Nadrin Phosphomutanten“ beschriebenen Nadrin Phosphomutanten für Überexpressionsstudien eingesetzt. Die Sequenzierungen der Nadrin Phosphomutanten sind im Anhang aufgeführt. Alle Mutationen sind wie beabsichtigt auf Nukleotidebene nachgewiesen worden (siehe Anhang). Weiterhin sollte nun gezeigt werden, dass die Nadrin Phosphomutanten im Vergleich zu den Wildtyp-Isoformen Nadrin2 WT und Nadrin5 WT weniger stark phosphoryliert werden. In **Abbildung 4.28** sind die Ergebnisse der Immunpräzipitation mit Phosphotyrosin-Antikörper und zusammen mit

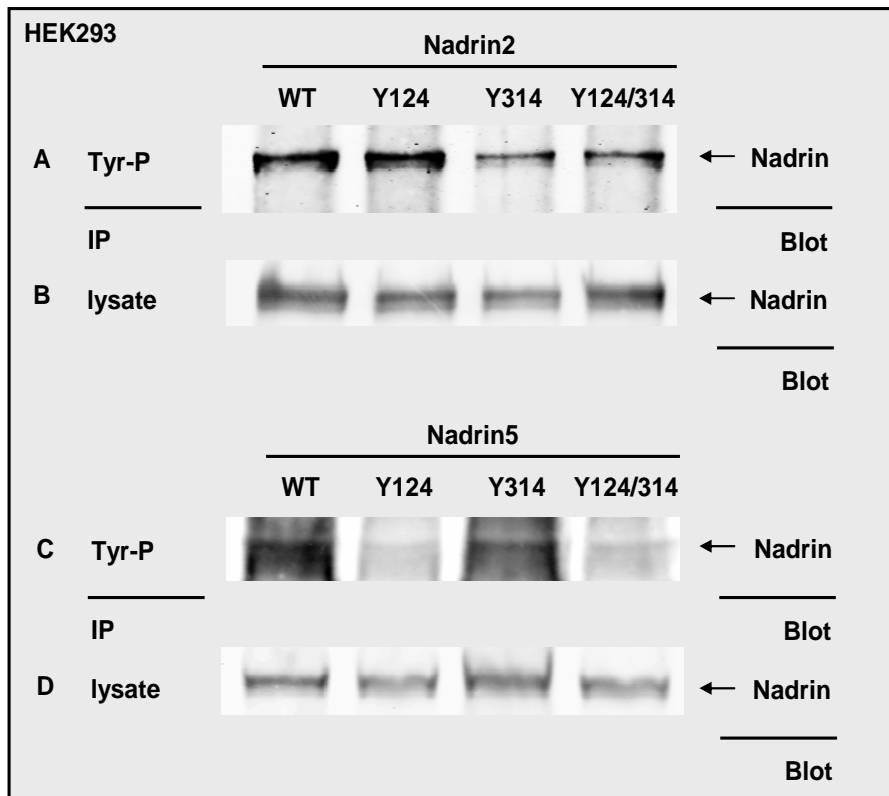


Abbildung 4.28: Phosphorylierung der Nadrin Phosphomutanten. Nachweis der erfolg-reichen Mutagenese der Tyrosinphosphorylierungsstellen mittels Immunpräzipitation mit Phosphotyrosin-spezifischem Antikörper. (A) IP der Nadrin2 Phosphomutanten mit Phosphotyrosin-Antikörper und Immundetektion von Nadrin. (B) Zelllysate von Nadrin2

Phosphomutanten-transfizierten Zellen. (C) Tyrosinphosphorylierung der Nadrin5 Phosphomutanten. (D) Kontrolle des Expressionslevels der Nadrin5 Phosphomutanten vor IP.

Src exprimierten Nadrin Phosphomutanten. Die Wildtyp-Isoformen der Nadrin Varianten sind jeweils am stärksten phosphoryliert. Die Nadrin2 Mutanten zeigen bei mutierter Tyrosinphosphorylierungsstelle Y314 (Nadrin2 Y314A und Nadrin2 Y124/314A) eine deutliche Reduktion der Tyrosinphosphorylierung. Die Nadrin5 Mutanten zeigen hingegen bei mutierter Tyrosinphosphorylierungsstelle Y124 (Nadrin5 Y124A und Nadrin5 Y124/314A) eine durch IP kaum nachweisbare Phosphorylierung. Die gezeigte reduzierte Phosphorylierung der Nadrin Phosphomutanten sollte nun auf ihre Auswirkung auf die Nadrin GAP-Aktivität untersucht werden.

4. 5. 3. 1. Einfluss der Tyrosinphosphorylierung auf Nadrin2

Nadrin2 GAP-Aktivität auf Cdc42 wird nicht durch Tyrosinphosphorylierung reguliert

Im Zellkulturmodell wurde bisher gezeigt, dass die „full length“ Variante Nadrin2 WT aktives GTP-gebundenes Cdc42 nicht reduzieren konnte (siehe 4. 3. 1. „Nadrin reguliert Cdc42 Isoform-spezifisch“). Um nun einen eventuellen Einfluss der

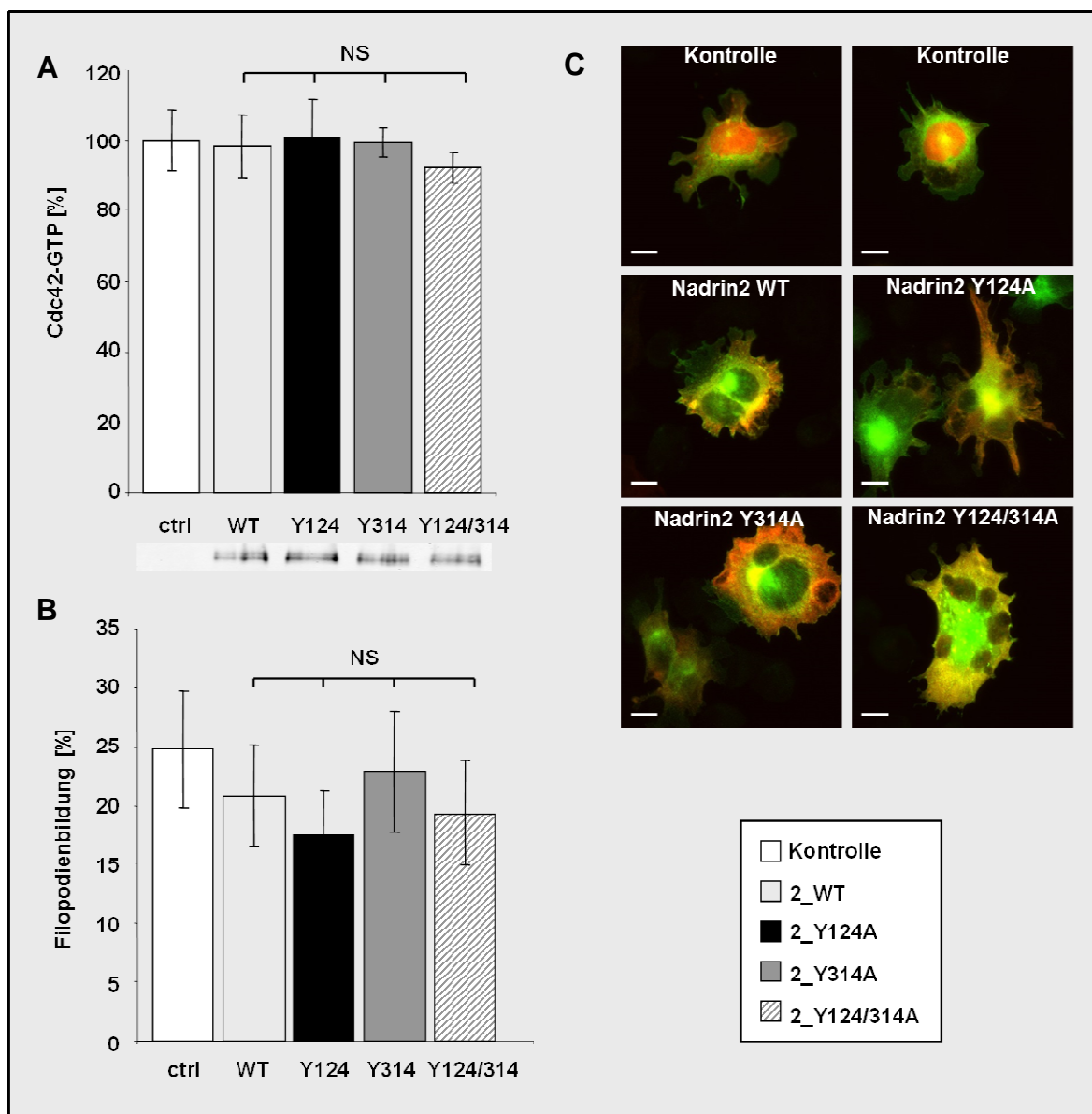


Abbildung 4.29: Nadrin2 GAP-Aktivität auf Cdc42 wird nicht durch Tyrosinphosphorylierung reguliert. (A) Cdc42-G-LISA® mit konstitutiv aktiviertem Cdc42 und den Nadrin2 Phosphomutanten überexprimiert in Säugetierzellen. Unten: Western Blot zur Expressionskontrolle. (B) Statistische Auswertung der Cdc42-induzierten Filopodienbildung bei Nadrin2 Phosphomutanten-Überexpression. (C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Cdc42-Q61L cDNA und Nadrin cDNA kotransfizierten A5-CHO Zellen; EGFP-Cdc42-Q61L = grün, Nadrin bzw. „tandem“-Tomato = rot. nicht signifikant NS

Tyrosinphosphorylierung von Nadrin2 zeigen zu können, wurden die Nadrin2 Phosphomutanten einzeln überexprimiert und analysiert. Die Ergebnisse des G-LISA®, der mit kotransfizierten Säugetierzellen durchgeführt wurde, sind dem Diagramm in **Abbildung 4.29A** zu entnehmen. Alle getesteten Nadrin2 Phosphomutanten hatten – wie die Kontrolle Nadrin2 WT – keinen Einfluss auf aktives, GTP-gebundenes Cdc42. Weiterhin wurde die Zellmorphologie Nadrin- und Cdc42-kotransfizierter A5-CHO Zellen untersucht, indem die

Cdc42-induzierte Filopodienbildung quantifiziert wurde. Die Auswertung der Filopodienbildung, sowie repräsentative Aufnahmen sind in **Abbildung 4.29B** und **4.29C** zu sehen. Für alle getesteten Nadrin2 Phosphomutanten konnte im Vergleich zu Nadrin2 WT weder ein signifikant erhöhter noch ein signifikant verringerter Einfluss auf die Bildung von Filopodien gezeigt werden. Konsistent mit der Quantifizierung der Filopodienbildung präsentierten sich die Aufnahmen der kotransfizierten Zellen. Die mit Nadrin2 WT, bzw. Nadrin2 Phosphomutanten transfizierten Zellen zeigten eine der Kontrolle vergleichbare Filopodienbildung.

Nadrin2 GAP-Aktivität auf Rac1 wird durch Tyrosinphosphorylierung reguliert

Unter 4. 3. 2. „Nadrin reguliert Rac1“ wurde bereits gezeigt, dass die „full length“ Isoform Nadrin2 WT Rac1 regulieren kann. Um einen eventuellen Einfluss der Tyrosinphosphorylierung auf die Nadrin2-Aktivität zeigen zu können, wurden die Nadrin2 Phosphomutanten einzeln überexprimiert und analysiert. Die Ergebnisse des G-LISA®, der mit kotransfizierten Säugetierzellen durchgeführt wurde, sind dem Diagramm in **Abbildung 4.29A** zu entnehmen.

Die Einzelmutante Nadrin2 Y314A reduzierte sehr signifikant, die Doppelmutante Nadrin2 Y124/314A reduzierte hoch signifikant GTP-gebundenes, aktives Rac1 verglichen mit Nadrin2 WT. Der Effekt der Nadrin2 Tyrosinphosphorylierung auf die Lamellipodienbildung ist in **Abbildung 4.30B** und **4.30C** dargestellt. Konsistent mit den

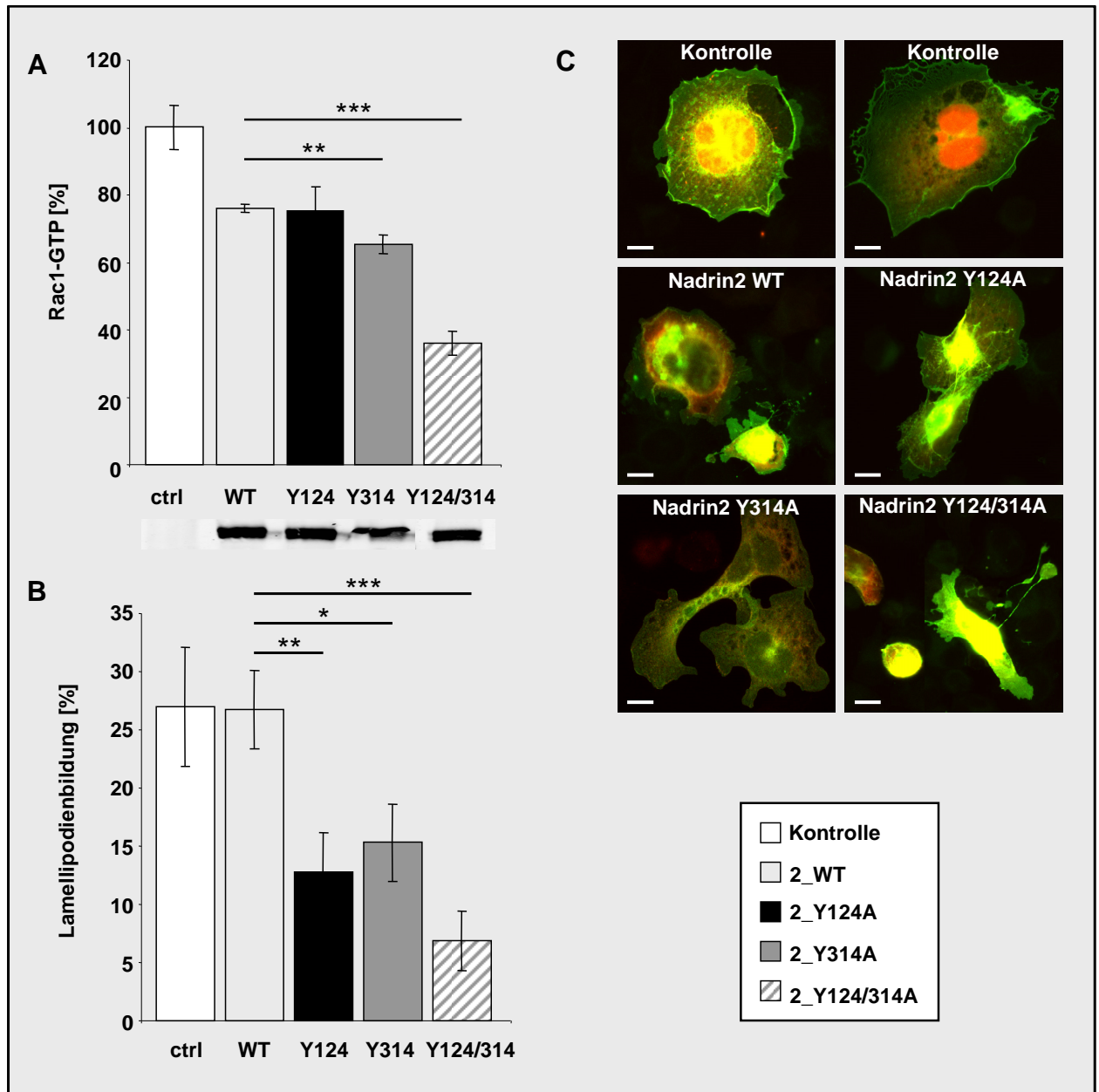


Abbildung 4.30: Nadrin2 GAP-Aktivität auf Rac1 wird durch Tyrosinphosphorylierung reguliert. (A) Rac1-G-LISA® mit konstitutiv aktiviertem Rac1 und den Nadrin2 Phosphomutanten überexprimiert in Säugetierzellen. Unten: Western Blot zur Expressionskontrolle. (B) Statistische Auswertung der Rac1-induzierten Lamellipodienbildung bei Nadrin2 Phosphomutanten-Überexpression. (C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Rac1-Q61L cDNA und Nadrin cDNA kotransfizierten A5-CHO Zellen; EGFP-Rac1-Q61L = grün, Nadrin bzw. „tandem“-Tomato = rot. $P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ ***

Ergebnissen des G-LISA®, konnte auch in Bezug auf Lamellipodienbildung ein klarer Effekt der Tyrosinphosphorylierung auf die Nadrin2-Aktivität gezeigt werden. Auch hier war die Nadrin2 Y124/314A Doppelmutante am aktivsten im Vergleich zu den Einzelmutanten, bzw. Nadrin2 WT.

Nadrin2 GAP-Aktivität auf RhoA wird durch Tyrosinphosphorylierung reguliert

Wie unter 4. 3. 3. „Nadrin reguliert RhoA“ bereits gezeigt, reguliert Nadrin2 WT RhoA im Zellkulturmodell. Auch für diese dritte, wichtige RhoGTPase sollte nun ein potentieller Einfluss der Tyrosinphosphorylierung von Nadrin2 untersucht werden. Die Ergebnisse des G-LISA®, der mit kotransfizierten Säugetierzellen durchgeführt wurde, sind dem Diagramm in **Abbildung 4.31** zu entnehmen.

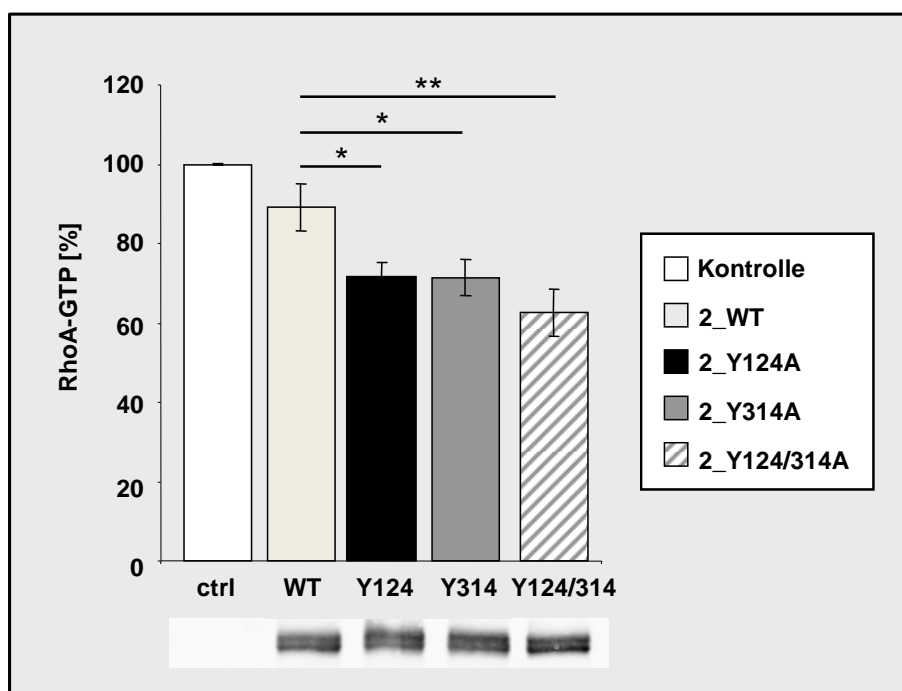


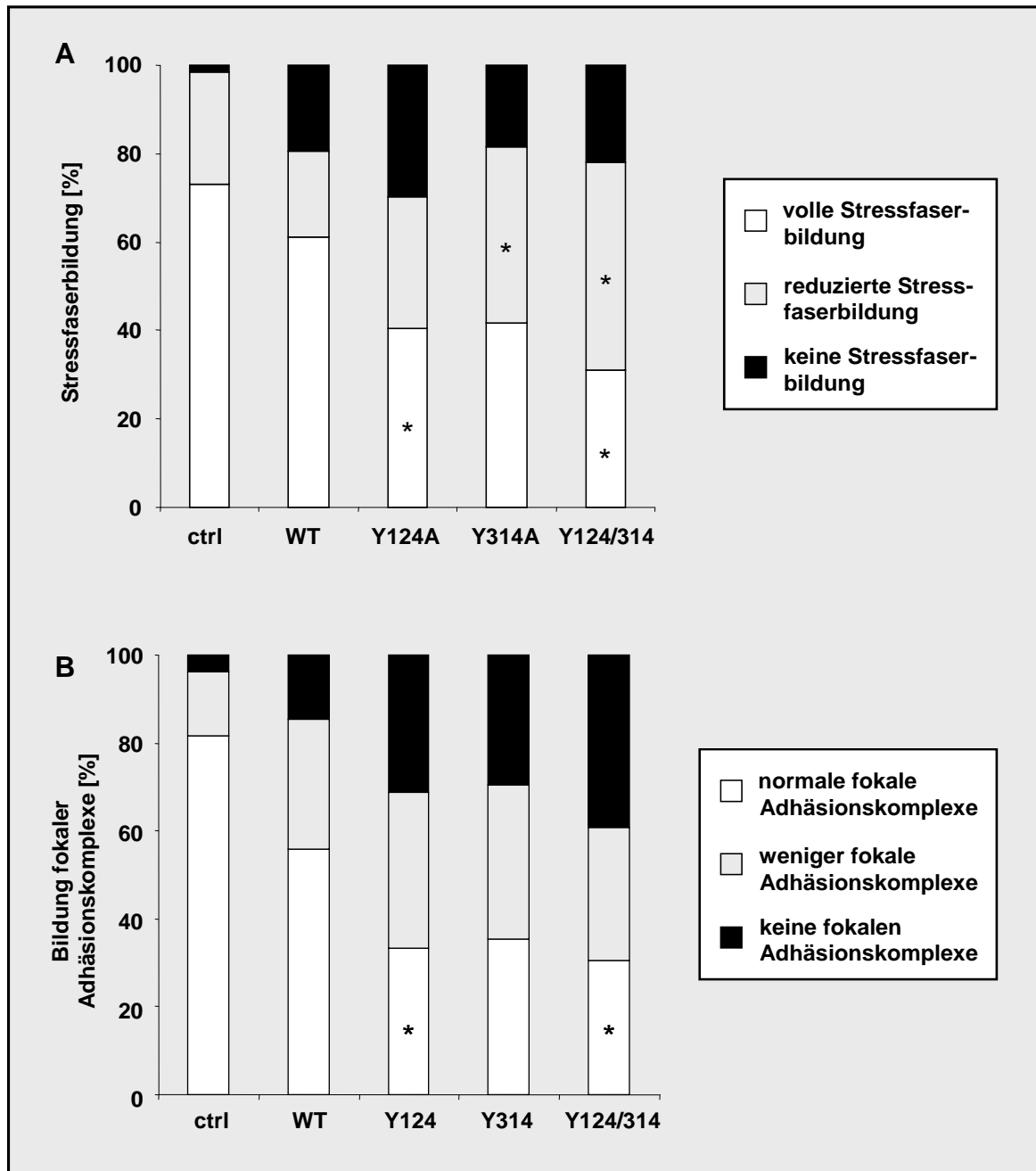
Abbildung 4.31: Nadrin2 GAP-Aktivität auf RhoA wird durch Tyrosinphosphorylierung reguliert. RhoA-G-LISA® mit konstitutiv aktiviertem RhoA und den Nadrin2 Phosphomutanten überexprimiert in Säugetierzellen. Unten: Western Blot zur Expressionskontrolle. $P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **

Tyrosinphosphorylierung hat einen eindeutigen Effekt auf die Nadrin2 GAP-Aktivität gegenüber RhoA. Erneut zeigt sich die Nadrin2 Doppelmutante Y124/314A als aktivste Phosphomutante bei der Regulation von RhoA im G-LISA® Experiment. Da der Einfluss von RhoA auf die Zellmorphologie nicht so eindeutig ist, wie die bereits betrachtete Pseudopodienbildung, wurde im Weiteren noch die Stressfaser- und fokale Adhäsionskomplexbildung analysiert.

Einfluss der Tyrosinphosphorylierung von Nadrin2 auf Stressfaser- und fokale Adhäsionskomplexbildung

RhoA spielt bei der Bildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionskomplexen eine zentrale Rolle. Daher wurden diese beiden Parameter bei der Charakterisierung der Nadrin2 Phosphomutanten auch betrachtet. Die Nadrin2 Phosphomutanten wurden in A5-CHO

Zellen überexprimiert und nach Färbung des filamentösen Aktinzytoskeletts, bzw. Vinculins wurden Stressfasern (siehe *Abbildung 4.32A*) und fokale Adhäsionskomplexe (siehe *Abbildung 4.32B*) quantifiziert.



*Abbildung 4.32: Einfluss der Tyrosinphosphorylierung von Nadrin2 auf Stressfaser- und fokale Adhäsionskomplexbildung. (A) Quantifizierung der Stressfaserbildung nach Überexpression der Nadrin2 Phosphomutanten. (B) Quantifizierung der fokalen Adhäsionskomplexe nach Überexpression der Nadrin2 Phosphomutanten. $P < 0,05$ **

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Tyrosinphosphorylierung von Nadrin2 auch die den Einfluss von Nadrin2 auf die Stressfaserbildung beeinflusst. Wie zuvor bereits für die Regulation von RhoA gezeigt, sind alle getesteten Nadrin2 Phosphomutanten

aktiver als die Kontrolle Nadrin2 WT. Die volle Stressfaserbildung ist in den Nadrin2 Y124A-transfizierten Zellen auf $40,4 \pm 5,1$ %, in Nadrin2 Y314A-transfizierten Zellen auf $41,8 \pm 7,5$ % reduziert (Nadrin2 WT = $61,1 \pm 8,4$ %). Nadrin2 Y124/314A reduziert die volle Stressfaserbildung am stärksten auf nur noch $31,0 \pm 8,1$ %.

Wie bereits für die Stressfaserbildung gezeigt, wird auch die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe durch die Tyrosinphosphorylierung von Nadrin2 beeinflusst. Die Nadrin2 Phosphomutanten reduzierten die normale fokale Adhäsionskomplexbildung auf $32,8 \pm 8,6$ % (Nadrin2 Y124A), $35,3 \pm 11,0$ % (Nadrin2 Y314A) und $30,4 \pm 8,7$ % (Nadrin2 Y124/314A). Auch im Hinblick auf die Verminderung, bzw. Inhibition der Adhäsionskomplexe konnte eine ähnliche Tendenz gezeigt werden, wobei die Nadrin2 Phosphomutanten allesamt aktiver als Nadrin2 WT erschienen. Allerdings konnte nur für zwei der drei Nadrin2 Phosphomutanten ein signifikanter Unterschied zur Nadrin2 WT Isoform gezeigt werden. Nadrin2 Y124A reduzierte die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe auf $32,8 \pm 8,6$ %, Nadrin2 Y124/314A auf $30,4 \pm 8,7$ %. Nadrin2 Y314A zeigte eine ähnliche Tendenz ($35,3 \pm 11,0$ %, $P = 0,055$).

Tyrosinphosphorylierung von Nadrin2 reguliert die Zelladhäsion

RhoGTPasen spielen für Adhäsionsprozesse eine zentrale Rolle. Daher wurden die Nadrin2 Phosphomutanten auch bezüglich ihres Einflusses auf die Zelladhäsion untersucht. Wie in 4. 4. 3. „Nadrin beeinflusst die Zelladhäsion“ bereits für die Nadrin WT Isoformen beschrieben, wurden A5-CHO Zellen nach Nadrin Überexpression auf Fibrinogen adhären gelassen und anschließend quantifiziert. **Abbildung 4.33** zeigt sowohl die Quantifizierung (**Abbildung 4.33A**) als auch repräsentative Übersichtsaufnahmen (**Abbildung 4.33B**).

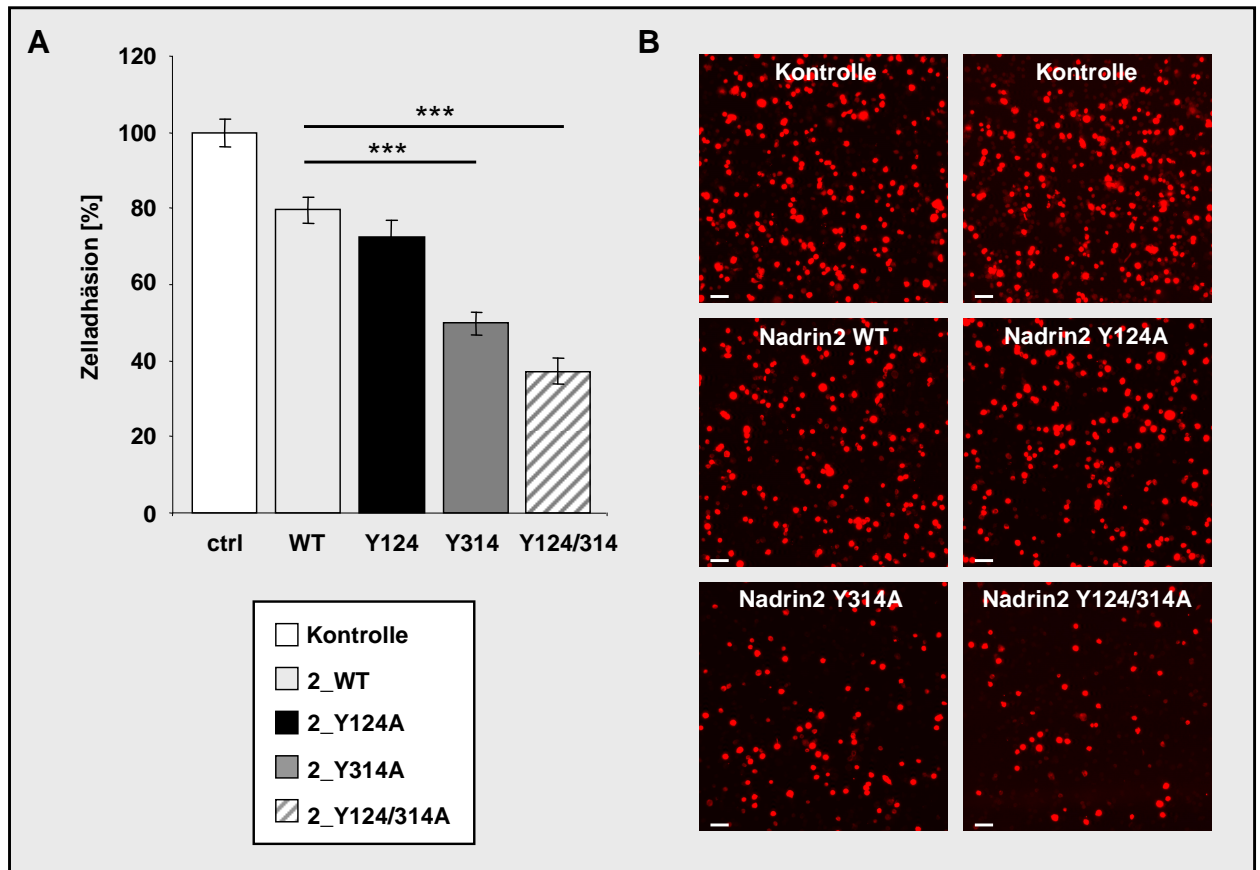


Abbildung 4.33: Tyrosinphosphorylierung von Nadrin2 beeinflusst die Zelladhäsion. (A) Quantifizierung adhärrierter transfizierter A5-CHO Zellen. (B) Repräsentative Übersichtsaufnahmen der Zelladhäsionsversuche. $P < 0,001$ ***

Konsistent mit den bisherigen Ergebnissen zeigen die Phosphomutanten Nadrin2 Y314A und Nadrin2 Y124/314A einen gegenüber der Nadrin2 WT Variante signifikant größeren Effekt auf die Zelladhäsion. Während Nadrin2 WT verglichen mit der Leervektorkontrolle die Zelladhäsion auf knapp 80 % reduzierte ($79,6 \pm 3,3$ %), konnten die Einzelmutante Nadrin2 Y314A die Adhäsion auf ca. 50 % (Nadrin2 Y314A $49,8 \pm 3,0$ %) verringern. Erneut zeigte auch hier die Doppelmutante Nadrin2 Y124/314A den stärksten Effekt und reduzierte die Zelladhäsion auf nur noch $37,1 \pm 3,4$ %).

4. 5. 3. 2. Einfluss der Tyrosinphosphorylierung auf Nadrin5

Nadrin5 GAP-Aktivität auf Cdc42 wird durch Tyrosinphosphorylierung reguliert

In Abschnitt 4. 3. „Untersuchung der GAP-Aktivität von murinen Nadrin Isoformen im Zellkultursystem“ wurde eine klare Regulation von Cdc42 durch Nadrin5 WT gezeigt. Nun sollte ein eventueller Einfluss der Tyrosinphosphorylierung auf die Aktivität von Nadrin5

analysiert werden. Hierzu wurden zunächst die Nadrin5 Phosphomutanten zusammen mit Cdc42 in Säugetierzellen überexprimiert und mittels G-LISA® analysiert. Die Resultate des Cdc42-G-LISA® sowie repräsentative Aufnahmen von kotransfizierten A5-CHO Zellen und die Quantifizierung der Cdc42-induzierten Filopodienbildung sind **Abbildung 4.34** zu entnehmen.

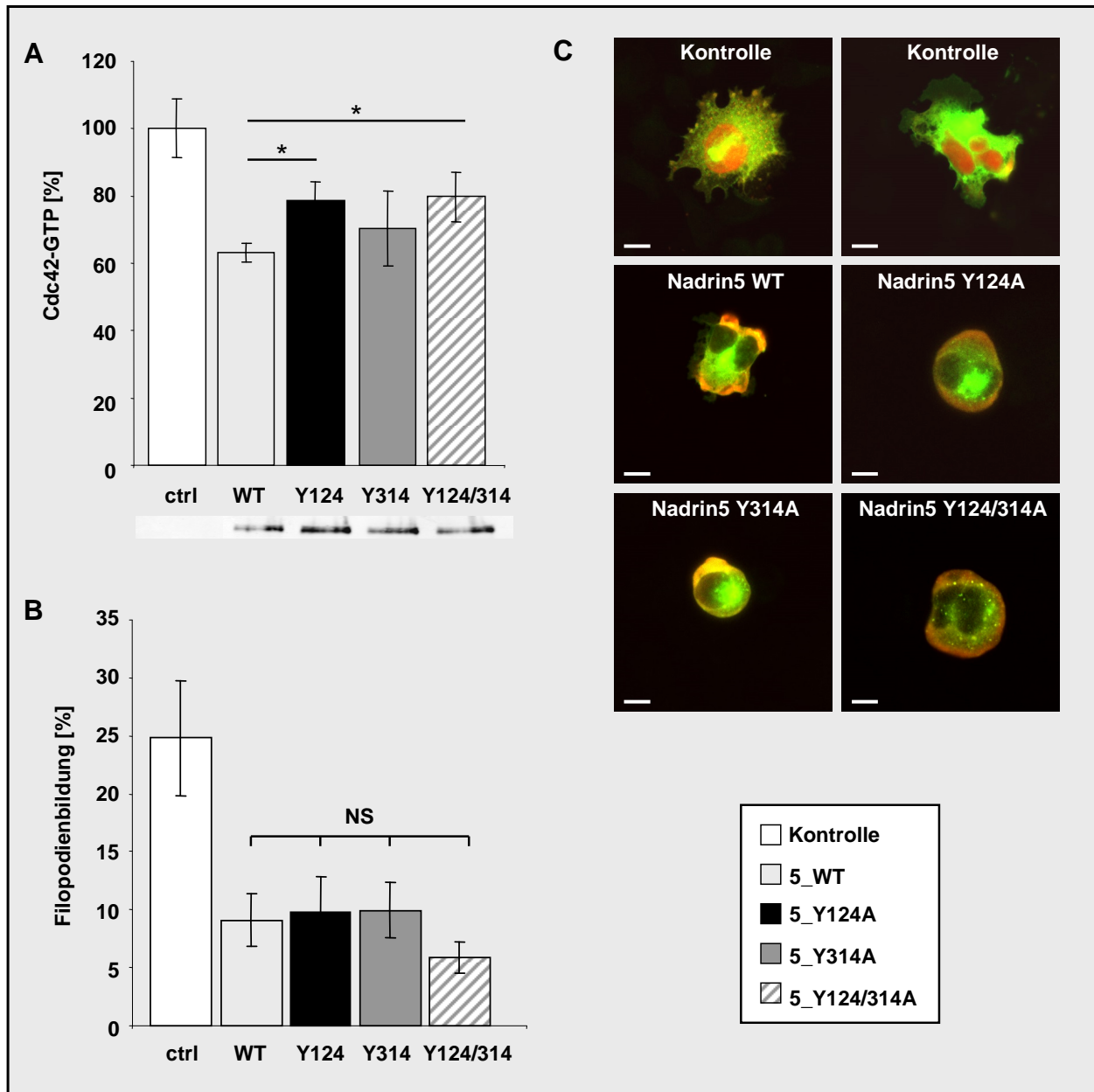


Abbildung 4.34: Tyrosinphosphorylierung reguliert die Nadrin5 GAP-Aktivität auf Cdc42. (A) Cdc42-G-LISA® mit konstitutiv aktiviertem Cdc42 und den Nadrin5 Phosphomutanten überexprimiert in Säugetierzellen. Unten: Western Blot zur Expressionskontrolle. (B) Statistische Auswertung der Cdc42-induzierten Filopodienbildung bei Nadrin5 Phosphomutanten-Überexpression. (C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Cdc42-Q61L cDNA und Nadrin cDNA kotransfizierten A5-CHO Zellen; EGFP-Cdc42-Q61L = grün, Nadrin bzw. „tandem“ Tomato = rot. $P < 0,05$ *, nicht signifikant NS

Für zwei der drei untersuchten Nadrin5 Phosphomutanten wurde ein im Vergleich zur Nadrin5 WT Kontrolle leicht veränderter Einfluss auf Cdc42 beobachtet. Nadrin5 Y124A und Nadrin5 Y124/314A zeigen tendenziell leicht verringerte Cdc42-Inaktivierung. Die Quantifizierung der Filopodienbildung ergab hingegen keinen Unterschied der Nadrin5 Phosphomutanten verglichen mit der Nadrin5 WT Kontrolle. Dies spiegelte sich in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der kotransfizierten Zellen wieder: Nadrin5 WT-, bzw. Nadrin5 Phosphomutanten-transfizierte Zellen zeigten kaum Filopodienbildung verglichen mit der Leervektorkontrolle.

Nadrin5 GAP-Aktivität auf Rac1 wird nicht durch Tyrosinphosphorylierung reguliert

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Rac1 von Nadrin5 WT reguliert wird (siehe 4. 3. 2. „Nadrin reguliert Rac1“). Um einen potentiellen Effekt der Tyrosinphosphorylierung auf die Nadrin5 GAP-Aktivität gegenüber Rac1 zeigen zu können, wurden die Nadrin5 Phosphomutanten in Säugetierzellen überexprimiert und mittels G-LISA® (**Abbildung 4.35A**) analysiert. Außerdem wurde die Zellmorphologie von kotransfizierten A5-CHO Zellen untersucht (**Abbildung 4.35C**) und die Rac1-vermittelte Lamellipodienbildung quantifiziert (**Abbildung 4.35B**).

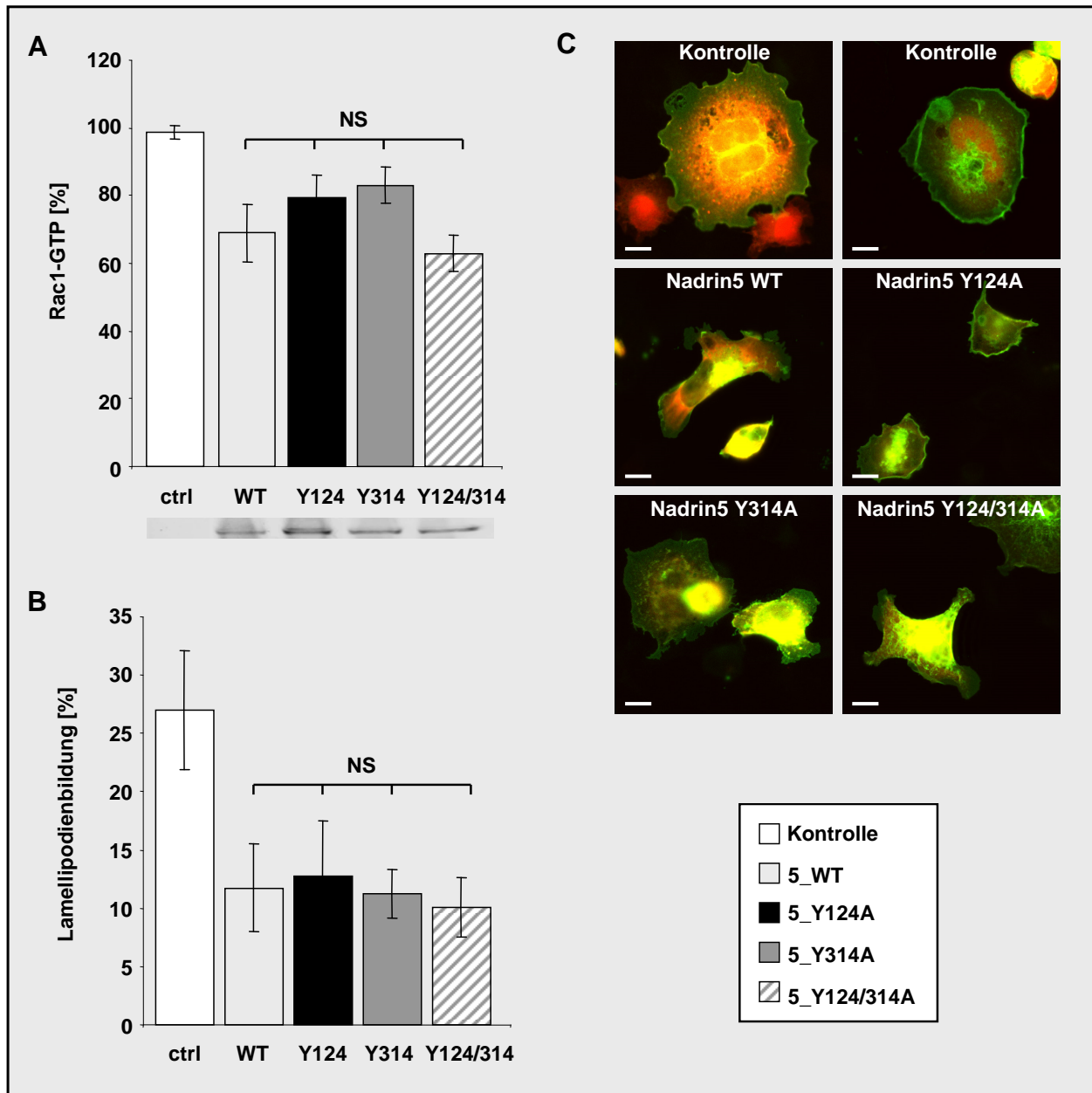


Abbildung 4.35: Nadrin5 GAP-Aktivität auf Rac1 wird nicht durch Tyrosinphosphorylierung reguliert. (A) Rac1-G-LISA® mit konstitutiv aktiviertem Rac1 und den Nadrin5 Phosphomutanten überexprimiert in Säugetierzellen. Unten: Western Blot zur Expressionskontrolle. (B) Statistische Auswertung der Rac1-induzierten Lamellipodienbildung bei Nadrin5 Phosphomutanten-Überexpression. (C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Rac1-Q61L cDNA und Nadrin cDNA kotransfizierten A5-CHO Zellen; EGFP-Rac1-Q61L = grün, Nadrin bzw. „tandem“ Tomato = rot. nicht signifikant NS

Im Gegensatz zu dem eindeutigen Effekt auf Nadrin2 bezüglich der Inaktivierung von GTP-gebundenem Rac1, konnte für Nadrin5 kein signifikanter Einfluss der Tyrosinphosphorylierung auf dessen GAP-Aktivität gegenüber Rac1 erhalten werden. Weiterhin wurde passend hierzu mit allen Nadrin5 Phosphomutanten kein signifikant veränderter Einfluss auf die Lamellipodienbildung verglichen mit Nadrin5 WT beobachtet.

Nadrin5 GAP-Aktivität auf RhoA wird nicht durch Tyrosinphosphorylierung reguliert

Für die dritte RhoGTPase RhoA konnte, – wie bereits für Rac1 – kein Einfluss der Nadrin5 Tyrosinphosphorylierung auf dessen Aktivität gegenüber RhoA gezeigt werden. Es wurden G-LISA®-Experimente wie unter 4. 3. 3. „Nadrin reguliert RhoA“ beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind dem Diagramm in **Abbildung 4.36** zu entnehmen.

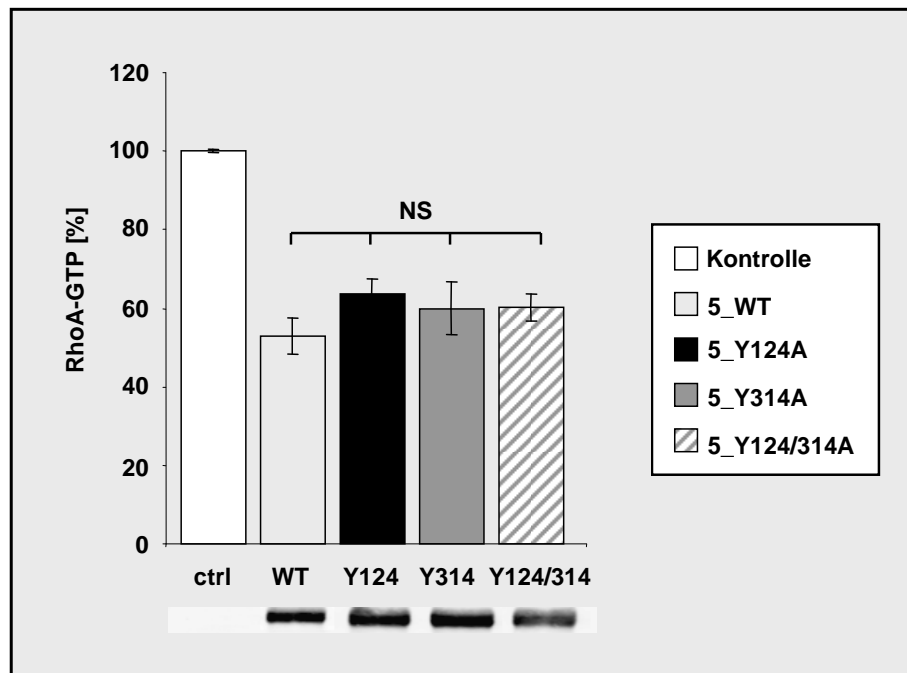


Abbildung 4.36: Nadrin5 GAP-Aktivität auf RhoA wird nicht durch Tyrosinphosphorylierung reguliert. RhoA-G-LISA® mit konstitutiv aktiviertem RhoA und den Nadrin5 Phosphomutanten überexprimiert in Säugerzellen. Unten: Western Blot zur Expressionskontrolle. nicht signifikant NS

Alle getesteten Nadrin5 Phosphomutanten reduzierten den Gehalt an aktivem, GTP-gebundenem RhoA etwa in demselben Maß wie die native Isoform Nadrin5 WT. Da die von RhoA hervorgerufene Zellmorphologie nicht so eindeutig anhand einfacher Aufnahmen quantifizierbar ist, wurde weiterhin auf Stressfaser- und fokale Adhäsionskomplexbildung fokussiert.

Einfluss der Tyrosinphosphorylierung von Nadrin5 auf Stressfaser- und fokale Adhäsionskomplexbildung

Nach Überexpression der Nadrin5 Phosphomutanten in A5-CHO Zellen wurde das filamentöse Aktinzytoskelett, bzw. Vinculin gefärbt und anschließend die Stressfasern (siehe **Abbildung 4.37A**) und die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe (siehe **Abbildung 4.37B**) quantifiziert.

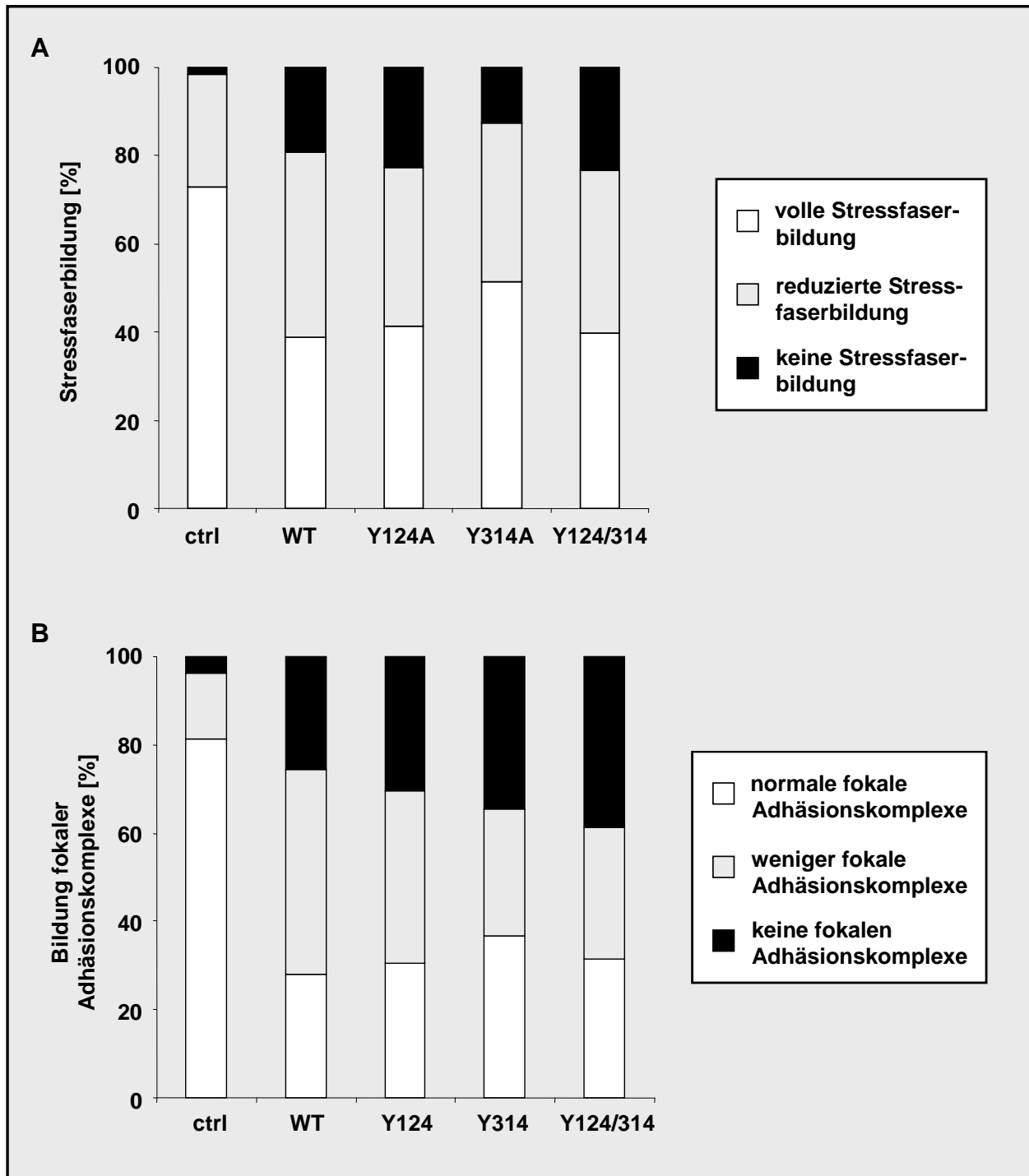


Abbildung 4.37: Einfluss der Tyrosinphosphorylierung von Nadrin5 auf Stressfaser- und fokale Adhäsionskomplexbildung. (A) Quantifizierung der Stressfaserbildung nach Überexpression der Nadrin5 Phosphomutanten. (B) Quantifizierung der fokalen Adhäsionskomplexe nach Überexpression der Nadrin5 Phosphomutanten.

Keine der getesteten Nadrin5 Phosphomutanten zeigte eine signifikant stärkere oder geringere Regulation der Stressfaser- und fokalen Adhäsionskomplexbildung im Vergleich mit der Nadrin5 WT Variante. Diese Beobachtung ist konsistent mit der Tatsache, dass die

Tyrosinphosphorylierung auf die GAP-Aktivität von Nadrin5 gegenüber RhoA keinen Einfluss hat (siehe vorheriger Abschnitt und **Abbildung 4.36**).

Tyrosinphosphorylierung von Nadrin5 reguliert die Zelladhäsion

RhoA spielt bei Adhäsionsprozessen eine zentrale Rolle, daher wurde auch für Nadrin5 analysiert, ob Tyrosinphosphorylierung dessen Regulationsvermögen bezüglich der Zelladhäsion beeinflussen kann. **Abbildung 4.38** zeigt repräsentative Aufnahmen der Zelladhäsionsversuche mit den Nadrin5 Phosphomutanten, sowie die Quantifizierung der adhärenierten Zellen.

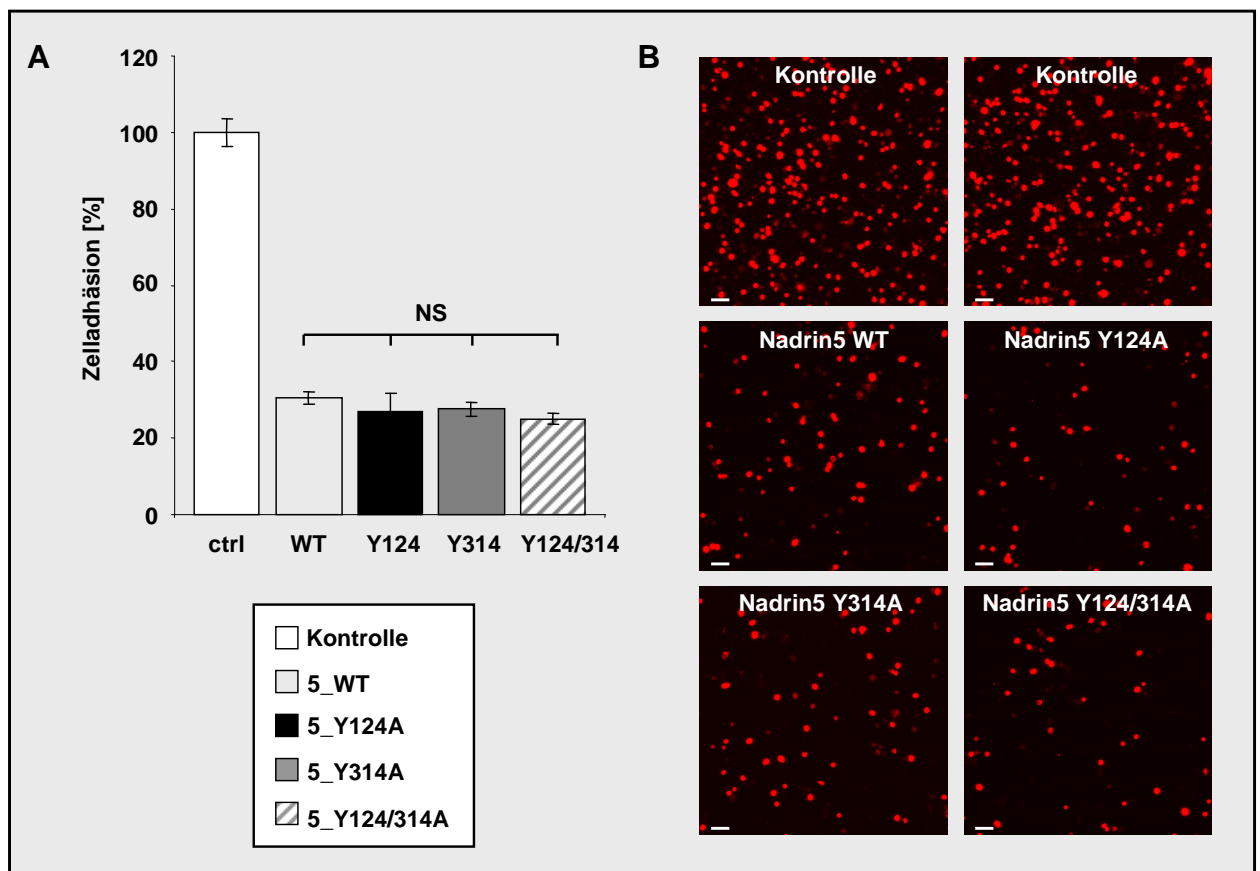


Abbildung 4.38: Tyrosinphosphorylierung von Nadrin5 hat keinen Einfluss auf die Zelladhäsion. (A) Quantifizierung adhärenierter transfizierter A5-CHO Zellen. (B) Repräsentative Übersichtsaufnahmen der Zelladhäsionsversuche. Maßstab = 20 µm, nicht signifikant NS

In Bezug auf die Zelladhäsion konnte für die Nadrin5 Phosphomutanten kein signifikanter Einfluss der Tyrosinphosphorylierung im Vergleich zur Nadrin5 WT Variante festgestellt werden. Alle getesteten Nadrin5 Phosphomutanten reduzierten die Zelladhäsion etwa auf 30 % verglichen mit der Leervektorkontrolle.

5. Diskussion

Während der Hämostase spielen die Zytoskelettveränderungen von Thrombozyten eine essentielle Rolle. Diese Umorganisation des Zytoskeletts wird durch RhoGTPasen vermittelt [Tomar und Schlaepfer, 2009]. In dieser Arbeit wurde das bereits in neuronalen Zellen beschriebene RhoGAP Nadrin untersucht und erstmals im Thrombozyten beschrieben. Im Zellkulturmodell wurden die beiden Nadrin Isoformen Nadrin2 WT und Nadrin5 WT einzeln überexprimiert und untersucht. Dadurch konnte eindeutig gezeigt werden, dass Nadrin die drei RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 Isoform-spezifisch reguliert. Außerdem konnte ein deutlich Isoform-spezifischer Effekt von Nadrin auf die Zelladhäsion nachgewiesen werden. Dieser Einfluss von Nadrin auf die Zelladhäsion wurde durch Deletion der Nadrin BAR-Domäne noch weiter verstärkt, was auf eine inhibitorische Funktion der Nadrin BAR-Domäne hinweist. Weiterhin wurde im Thrombozyten eine klar aktivierungsabhängige Tyrosinphosphorylierung von Nadrin gezeigt. Anhand von Nadrin Phosphomutanten konnte die Funktion dieser Tyrosinphosphorylierung im Zellkulturmodell für die beiden Nadrin Isoformen Nadrin2 und Nadrin5 gezeigt werden. Erneut ergab sich eine klare Isoform-abhängige Spezifität, wobei die Tyrosinphosphorylierung einen signifikanten, inhibitorischen Effekt auf Nadrin2 zeigte. Hierbei konnte ein Einfluss auf die GAP-Aktivität, sowie auf die Pseudopodien- und Stressfaserbildung gezeigt werden. Nadrin Tyrosinphosphorylierung beeinflusste weiterhin deutlich Isoform-abhängig die Zelladhäsion.

5. 1. Erstbeschreibung von Nadrin in Thrombozyten

Die gezielte Regulation der RhoGTPasen spielt für die Thrombozytenfunktion eine zentrale Rolle [Aslan *et al.*, 2013]. GAPs (GTPase-aktivierende Proteine) katalysieren die Umsetzung von GTP zu GDP und vermindern dadurch die Aktivität der GTPasen. Die drei Vertreter der RhoGTPasen (RhoA, Rac1 und Cdc42), die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind essentiell für eine korrekte Thrombozytenfunktion [Hart *et al.*, 1991] und demzufolge für eine erfolgreiche Blutstillung nach einer Verletzung. Zytoskelettveränderungen, die von RhoGTPasen kontrolliert werden, spielen auch in anderen Zellen eine wichtige Rolle. Es wurde gezeigt, dass RhoGTPasen an der Exozytose von Acetylcholin aus Neuronen beteiligt sind [Dousseau *et al.*, 2000]. Daraufhin konnten

Harada und Kollegen belegen, dass Nadrin in den Nervenenden von PC12 Zellen (Zellen eines Rattennebenierenphäochromozytoms, die durch NGF („*nerve growth factor*“) zu neuronalen Zellen differenziert werden können) lokalisiert und dort auch mit kortikalen Aktinfilamenten kolokalisiert ist [Harada *et al.*, 2000]. In derselben Arbeit zeigt die Arbeitsgruppe, dass überexprimiertes Nadrin die Exozytose der PC12 Zellen verstärkt, jedoch nach der Expression einer Nadrinmutante mit stark reduzierter GAP-Aktivität (Nadrin-R288A) diese verstärkte Exozytose ausbleibt [Harada *et al.*, 2000]. Somit deuten alle Befunde darauf hin, dass Nadrin die Exozytose beeinflussen kann, indem dessen GAP-Domäne die GTPase-Aktivität der RhoGTPasen katalysiert und die Umorganisation des Aktinzytoskeletts einleitet. Aufgrund dieser Tatsachen wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass Nadrin auch im Thrombozyten eine wichtige regulatorische Funktion hinsichtlich der Zytoskelettumorganisation hat. Überraschenderweise weisen Harada und Kollegen in ihrer Arbeit explizit darauf hin, dass Nadrin in der Ratte spezifisch in Neuronen exprimiert sei. Allerdings diskutiert die Arbeitsgruppe in dieser Publikation nur eine von vier in der Ratte bekannten Nadrin Isoformen [Harada *et al.*, 2000].

In meiner Arbeit konnte Nadrin erstmals in Thrombozyten nachgewiesen werden. Trotzdem RhoGTPasen in Thrombozyten eine zentrale Rolle spielen [Aslan *et al.*, 2013], sind nur sehr wenige der regulierenden RhoGAPs in Thrombozyten bekannt. Bereits 1991 konnte ein RhoGAP für Cdc42 in humanen Thrombozyten gezeigt und *in vitro* charakterisiert werden [Hart *et al.*, 1991]. Außerdem wurde in unserer Arbeitsgruppe ein dem Nadrin eng verwandtes RhoGAP in Thrombozyten nachgewiesen: Oligophrenin-1 [Elvers *et al.*, 2012]. Wie auch Nadrin spielt Oligophrenin-1 eine wichtige Rolle im zentralen Nervensystem. Verschiedene Mutationen (Leserastermutationen, „*nonsense*“ Mutationen, „*splice site*“ Mutationen [Billuart *et al.*, 1998; Zanni *et al.*, 2005]) können zum (Funktions-)Verlust von Oligophrenin-1 führen und haben eine „Oligophrenie“ genannte, geistige Retardierung zur Folge [Billuart *et al.*, 1998]. Weiterhin ist Oligophrenin-1 an der Bildung dendritischer Dornen beteiligt [Govek *et al.*, 2004]. Hier sah ich Parallelen zu Nadrin, denn auch Oligophrenin-1 ist in erheblichem Maße in Thrombozyten exprimiert und nimmt durch die Beeinflussung der RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 eine wichtige Rolle bei Zytoskelettveränderungen ein [Elvers *et al.*, 2012]. Da Nadrin mit 5 bekannten Isoformen in der Maus auftritt, gab mir das Anlass, diese Isoformen einzeln im Rahmen meiner Arbeit näher zu untersuchen, um die Funktion der einzelnen Isoformen besser zu verstehen und dadurch vielleicht einen neuen Angriffspunkt für eine sichere antithrombotische Therapie zu finden.

5. 2. Regulation von Nadrin durch die BAR-Domäne

Über die Regulation von Nadrin ist in der Literatur nichts bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass Nadrin durch seine BAR-Domäne reguliert wird. Dass dieser Regulationsmechanismus existiert, ist bereits beschrieben worden. Das verwandte RhoGAP Oligophrenin-1 besitzt genau wie Nadrin eine N-terminale BAR-Domäne. Fauchereau und Kollegen zeigten bereits 2003, dass durch die Oligophrenin-1-BAR-Domäne die katalytische Aktivität der Oligophrenin-1-GAP-Domäne vermindert wird [Fauchereau et al., 2003]. Hierbei scheint die zwischen BAR- und GAP-Domäne gelegene PH („pleckstrin homology“)-Domäne von Oligophrenin-1 notwendig zu sein [Elvers et al., 2012]. In einer weiteren Arbeit zeigen Eberth und Kollegen mittels teilweisem tryptischen Verdau Hinweise auf eine autoinhibitorische Proteinfaltung, in dem das Konstrukt bestehend aus Oligophrenin-1-BAR-PH-GAP deutlich weniger gespalten wurde, im Gegensatz zu dem Konstrukt Oligophrenin-1-BAR-PH, ohne die katalytische GAP-Domäne [Eberth et al., 2009]. Sowohl in der Arbeit von Fauchereau und Kollegen, als auch in der Arbeit von Eberth und Kollegen wurden Konstrukte verwendet, die keinen Oligophrenin-1-C-Terminus besitzen [Fauchereau et al., 2003; Eberth et al., 2009]. Ich hypothesierte, dass Nadrin durch einen Mechanismus, der dem der Oligophrenin-1-Regulation ähnlich ist, kontrolliert werden könnte, wenngleich sich in der Nadrin-Domänenstruktur keine PH-Domäne befindet (**Abbildung 5.1**).

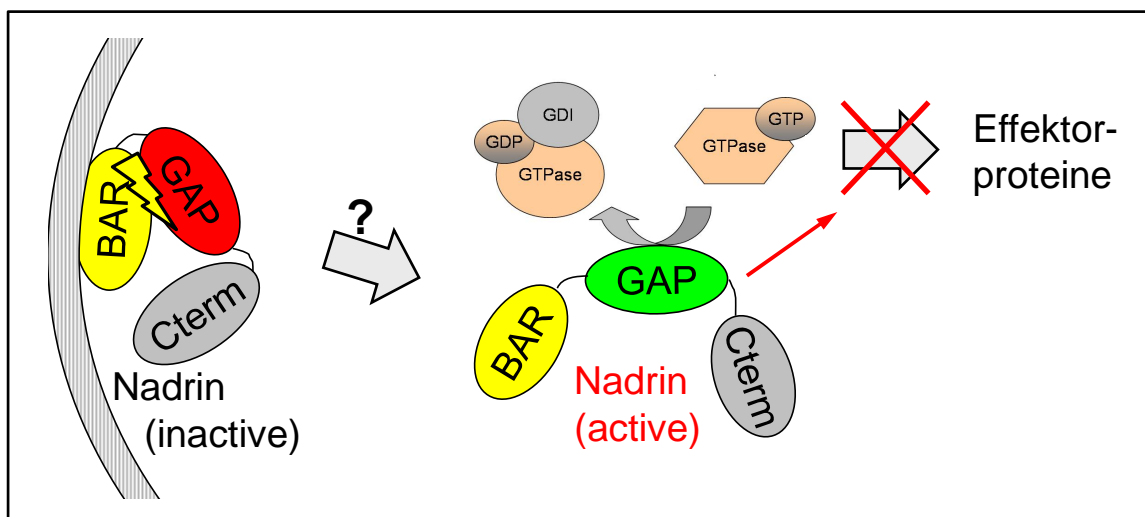


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Inhibition durch die BAR-Domäne. Die Nadrin-BAR-Domäne reguliert autoinhibitorisch die Nadrin-GAP-Aktivität. Auf einen Stimulus hin (Pfeil mit Fragezeichen) wird Nadrin aktiv, die BAR-Domäne gibt die GAP-Domäne frei und Nadrin kann die aktiven RhoGTPasen inaktivieren durch die Katalyse der GTP-Hydrolyse zu GDP. Nun können durch die RhoGTPasen keine Effektorproteine mehr aktiviert werden.

Um diese Hypothese zu bestätigen, verwendete ich allerdings Konstrukte mit C-Terminus um den verschiedenen Nadrin Isoformen gerecht zu werden, die sich ja ausschließlich im C-Terminus voneinander unterscheiden. Außerdem könnte jede (unnötig) deletierte Domäne eine Fehlfaltung der untersuchten Proteine zur Folge haben. Leider ist keine besonders konservierte und für die Aktivität der BAR-Domäne essentielle Aminosäure, oder Aminosäuregruppe bekannt, die ich mittels Aminosäureaustausches hätte mutieren können. Daher entschloss ich, den Nadrin „full length“ Isoformen (Nadrin2 WT und Nadrin5 WT) die jeweiligen Isoformen mit deletierter BAR-Domäne gegenüberzustellen. Tatsächlich konnte ich in der vorliegenden Arbeit eindeutig zeigen, dass die Nadrin-BAR-Domäne die Aktivität von Nadrin beeinflusst. In mehreren funktionellen Assays wurden die Nadrin Wildtyp Varianten den Nadrin Δ BAR-Mutanten gegenübergestellt, wobei sich ein deutlich verstärkter Einfluss der Mutanten mit fehlender BAR-Domäne auf Stressfaser- und fokale Adhäsionskomplexbildung, sowie auf die Zelladhäsion ergab [Beck *et al.*, 2013].

Entgegen meiner Ergebnisse, die eine eindeutige Regulation von Nadrin durch seine BAR-Domäne beweisen, steht die Arbeit von Eberth und Kollegen aus 2009. Sie postulieren anhand ihrer ausschließlich *in vitro* durchgeführten Versuche mit Bruchstücken des Nadrin-Proteins, dass die Nadrin-GAP-Aktivität nicht von der BAR-Domäne beeinflusst wird. Da der zu Grunde liegende Versuchsansatz allerdings eine Interaktion der Nadrin-GAP-Domäne mit der RhoGTPase voraussetzt, reicht der Einsatz von Nadrin-Bruchstücken meiner Meinung nach nicht aus, um eine Regulation durch die BAR-Domäne auszuschließen. Da die einzelnen Isoformen von Nadrin sich nur im C-Terminus unterscheiden – der C-Terminus also die Spezifität von Nadrin gegenüber der RhoGTPasen definiert – stellt der C-Terminus auch einen äußerst wichtigen Teil des Proteins dar. Die in meiner Arbeit verfolgte Strategie, so wenig wie möglich vom natürlich vorkommenden Nadrin-Protein abzuweichen, erscheint mir adäquater, um Aussagen über physiologische Funktionen von Nadrin treffen zu können [Eberth *et al.*, 2009; Beck *et al.*, 2013]. In weiterführenden Versuchen könnte nun noch eindeutig geklärt werden, ob es sich bei der Inhibition durch die BAR-Domäne um einen intra- oder intermolekularen Mechanismus handelt. Diese Frage konnte in den bisherigen Arbeiten weder für Oligophrenin-1, noch für Nadrin endgültig geklärt werden [Beck *et al.*, 2013; Elvers *et al.*, 2012; Eberth *et al.*, 2009].

Beim Vergleich der beiden Isoformen Nadrin2 und Nadrin5 hinsichtlich der Inhibition durch die BAR-Domäne stellte sich ein nennenswerter Unterschied dar. Die Deletion der BAR-Domäne von Nadrin2 ergab keine verstärkte Reduktion der Stressfaserbildung, wobei die fokalen Adhäsionskomplexe durch die Nadrin2 Δ BAR-

Mutante deutlich signifikant verringert wurden. Die Nadrin5 Δ BAR-Mutante zeigte einen gegenüber der Nadrin5 WT Variante klar verstärkten Einfluss auf alle getesteten Funktionen. Diese unterschiedlichen Befunde deuten auf die komplexe Regulation der einzelnen Nadrin Isoformen hin. Nimmt man die Tatsache, dass es 5 bekannte murine Nadrin Isoformen gibt und dass in der vorliegenden Arbeit eindeutig bewiesen wurde, dass zumindest zwei dieser 5 Isoformen durch die BAR-Domäne in unterschiedlicher Weise reguliert werden, scheint es gewagt, noch einen weiteren Regulationsmechanismus der GAPs zu untersuchen.

5. 3. Nadrin wird durch Tyrosinphosphorylierung reguliert

Für GAPs sind diverse Regulationsmechanismen untersucht, so auch die Src-Familie Kinase-vermittelte Tyrosinphosphorylierung. Bereits 1990 zeigten Ellis und Kollegen, dass die Tyrosinphosphorylierung von GAPs in Signaltransduktionswegen beteiligt ist [Ellis *et al.*, 1990]. Weiterhin ist bekannt, dass im Thrombozyten GAPs verstärkt nach Aktivierung mit Src-Familie Tyrosinkinase interagieren [Cichowski *et al.*, 1992]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nadrin in humanen und murinen Thrombozyten aktivierungsabhängig tyrosinphosphoryliert wird. In ruhenden Thrombozyten konnte nur wenig basale Tyrosinphosphorylierung von Nadrin detektiert werden. Nach Thrombin- bzw. CRP-Aktivierung war Nadrin deutlich stärker tyrosinphosphoryliert. Eine globale Hemmung der Src-Familie Tyrosinkinase durch PP2 reduzierte diese Nadrin Tyrosinphosphorylierung deutlich.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für Nadrin2 eine klar inhibitorische Wirkung der Tyrosinphosphorylierung an den Stellen Y124 und Y314 bewiesen werden. Die von mir gewählten Tyrosinphosphorylierungsstellen liegen in den beiden funktionellen Domänen: Y124 liegt in der Nadrin-BAR-Domäne, Y314 ist in der Nadrin-GAP-Domäne gelegen (siehe **Abbildung 5.2**). Eine regulatorische Funktion lag meiner Ansicht nach nahe, da für die BAR-Domäne bereits eine inter- bzw. intramolekulare Inhibition gezeigt wurde. Diese Funktion der BAR-Domäne könnte also durch die Tyrosinphosphorylierung an der Stelle Y124 bewirkt werden, indem sich durch die negative Ladung des Phosphoreses eine Konformationsänderung ergeben könnte. Die zweite Tyrosinphosphorylierungsstelle an Y314 ist in der katalytischen RhoGAP-Domäne gelegen. Eine Phosphorylierung, bzw. Dephosphorylierung könnte nun zu sterischer Hemmung, bzw. verstärkter Bindung direkt

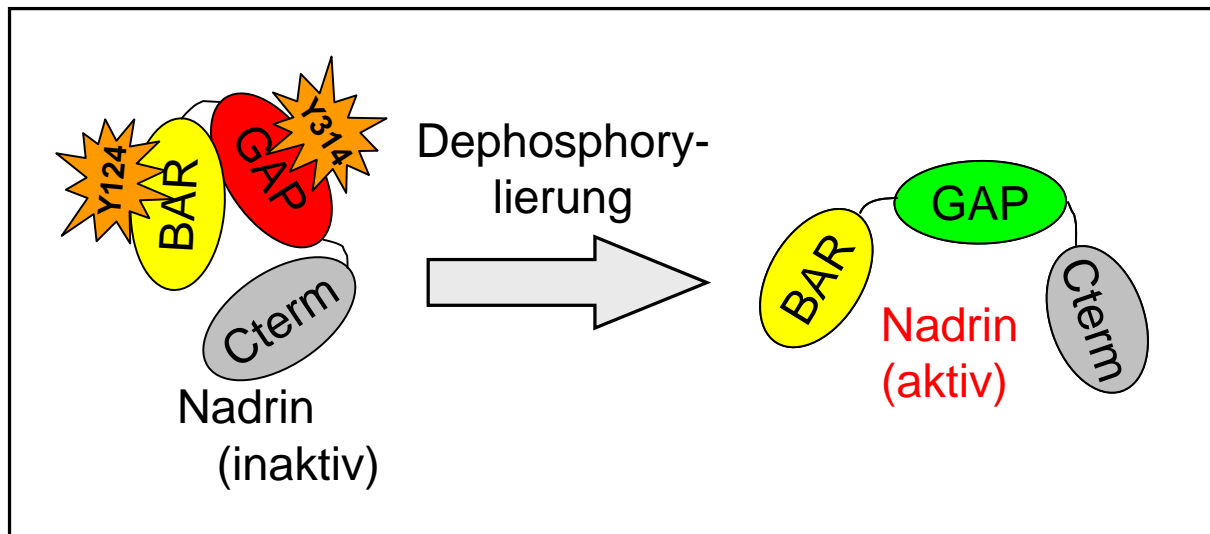


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der zur Mutation ausgewählten Tyrosinphosphorylierungsstellen. Die Tyrosinphosphorylierungsstelle Y124 ist in der BAR-Domäne (gelb) gelegen. Die zweite Tyrosinphosphorylierungsstelle Y314 liegt in der katalytisch aktiven GAP-Domäne (grün). Die Tyrosinphosphorylierung von Nadrin wirkt inhibierend auf die Isoform Nadrin2.

an der jeweiligen RhoGTPase, bzw. an einem potentiellen Multiproteinkomplex, führen [Beck *et al.*, 2014]. Dass Nadrin an Multiproteinkomplexen beteiligt ist, haben Wells und Kollegen 2006 gezeigt [Wells *et al.*, 2006]. Im Fall von Nadrin2 würde das bedeuten, dass Nadrin2 bei Aktivierung des Thrombozyten tyrosinphosphoryliert wird und daraufhin inaktiviert. In Folge dessen können Rac1 und RhoA in ihrem GTP-gebundenen Zustand verbleiben und mit ihren Effektorproteinen interagieren. Um den hier hypothetisierten Mechanismus, wie Nadrin durch Tyrosinphosphorylierung reguliert werden könnte, zu beweisen oder zu widerlegen, müssten allerdings noch weitere Versuche folgen, da dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht abschließend möglich war.

In der Literatur ist die Regulation von RhoGAPs durch Tyrosinphosphorylierung nicht unbekannt. Zwar wird die Aktivität von p190 RhoGAP nicht direkt durch die Phosphorylierung an Y1105 beeinflusst, doch kann die Regulation der Aktinorganisation nur stattfinden, wenn p190 RhoGAP phosphoryliert werden kann [Haskell *et al.*, 2001]. Durch den von mir gewählten Versuchsansatz, die Nadrin Isoformen in Säugetierzellen zu überexprimieren und darauf folgende Prozesse *in vivo* – also in der lebenden Zelle – ablaufen zu lassen, kann die Beteiligung weiterer, eventuell noch unbekannter Proteine oder Proteinkomplexe nicht ausgeschlossen werden. Dies müsste in weiteren Versuchen geklärt werden.

Minoshima und Kollegen zeigten 2003 in einer interessanten Arbeit, dass die Phosphorylierung des Cdc42/Rac1-spezifischen GAPs MgcRacGAP dazu führt, dass sich die Spezifität dieses GAPs auf RhoA ausweitet [Minoshima *et al.*, 2003]. Dieser Befund könnte eine Erklärung sein, warum sehr kontroverse Aussagen über die Spezifität von Nadrin veröffentlicht sind. So postulieren Richnau und Kollegen 2001, dass Nadrin spezifisch für Cdc42 und Rac1 sei, allerdings keine GAP-Aktivität gegenüber RhoA besitzt [Richnau *et al.*, 2001]. In meiner Arbeit konnte jedoch die Regulation von RhoA durch Nadrin eindeutig bewiesen werden. Eine weitere Erklärung für die kontroversen Befunde verschiedener Arbeitsgruppen könnte auch die Tatsache liefern, dass Nadrin in verschiedenen Isoformen auftritt, die sich teilweise nur gering voneinander unterscheiden [Furuta *et al.*, 2002].

5. 4. Isoform-Spezifität der Nadrin „full length“ Varianten

Die Tatsache, dass es „das Nadrin“, als das es in der Literatur oft bezeichnet wird, nicht gibt, sondern in der Maus allein 5 verschiedene Isoformen bekannt sind [Pruitt *et al.*, 2014], könnte die kontroversen Aussagen in der Literatur erklären. Diesem Umstand sollte die vorliegende Arbeit Rechnung tragen und einen Beginn zur Charakterisierung der Nadrin Isoformen darstellen. Da es mir im zeitlichen Umfang dieser Arbeit nicht möglich war, alle murinen Nadrin Isoformen einzeln zu analysieren, legte ich von Beginn an den Fokus auf zwei Nadrin Isoformen. Nadrin2 (Accession: NM_001122640.1, GI: 169790941) und Nadrin5 (Accession: NM_001122643.1, GI: 169790946) unterscheiden sich relativ stark in Sequenz und Größe voneinander. Alle murinen Nadrin Isoformen sind sequenzidentisch in den beiden funktionellen Domänen. BAR- und GAP-Domäne und unterscheiden sich nur im C-Terminus. Aus Thrombozyten der Maus konnte ich nur 4 der 5 bekannten Nadrin Isoformen isolieren. Eine Erklärung könnte die Arbeit von Furuta und Kollegen liefern, in der festgestellt wurde, dass die Nadrin Isoform 126 (*Rattus norvegicus*, Accession: AB060557, GI: 13702293) aus der Ratte im Gegensatz zu den drei anderen Isoformen ausschließlich im embryonalen Gehirn exprimiert wird [Furuta *et al.*, 2002]. In der Maus entspricht Nadrin1 (*Mus musculus*, Accession: NM_144529.2, GI: 169790938) der Nadrin Isoform 126 (benannt laut Furuta und Kollegen 2002) aus der Ratte aufgrund größter Sequenzhomologie. Eventuell wird also diese Nadrin Isoform 1 auch in der Maus nur während der Embryonalentwicklung benötigt.

Schultess und Kollegen zeigten 2005, dass Rap1GAP2 mit zwei der drei in der Literatur bekannten Spleißvarianten im Thrombozyten vertreten ist. Interessanterweise haben genau diese beiden Spleißvarianten dieses GAPs eine N-terminale Sequenz mit einer Serin-Phosphorylierungsstelle, die der dritten Variante fehlt. Es wird spekuliert, dass im Thrombozyten diese beiden Varianten also durch diesen N-Terminus reguliert werden könnten [Schultess *et al.*, 2005]. Dieser Befund bestärkte mich in dem Vorhaben die einzelnen Nadrin Isoformen auf ihre Funktion und Spezifität hin näher zu untersuchen.

Um die einzelnen Nadrin Isoformen untersuchen zu können, mussten diese im Zellkulturmodell getrennt voneinander überexprimiert werden. Die Analyse der Nadrin GAP-Aktivität wurde mittels Kotransfektion mit den konstitutiv aktivierten RhoGTPasen [Subauste *et al.*, 2000] durchgeführt. Die mutierten RhoGTPasen zeigen eine sehr große Aktivität und wurden im Maßstab 1:60 verglichen mit der jeweiligen Nadrin cDNA eingesetzt. Trotz der hohen Verdünnung zeigten die Lysate kotransfizierter Zellen sehr hohe Level an GTP-gebundenen, aktiven RhoGTPasen. Die Regulation durch die einzelnen Nadrin Isoformen war so besonders deutlich und ein Aktivierungsschritt der Modellzelle konnte entfallen, da ja die GTPasen bereits konstitutiv aktiviert exprimiert wurden. Dies war erfreulich, da ein Aktivator für Nadrin bisher nicht bekannt ist.

Trotzdem in der Literatur Nadrin generell als Cdc42-regulierendes RhoGAP bezeichnet wird [Richnau *et al.*, 2001; Wells *et al.*, 2006], konnte der Spiegel von aktivem GTP-gebundenem Cdc42 nur durch eine der beiden getesteten Nadrin „*full length*“ Isoformen, Nadrin5 WT, reduziert werden. Für RhoA hingegen konnte in der vorliegenden Arbeit überraschenderweise gezeigt werden, dass die beiden untersuchten murinen Nadrin „*full length*“ Isoformen Nadrin2 WT und Nadrin5 WT aktives, GTP-gebundenes RhoA vermindern können. Weiterhin werden stark RhoA-abhängige Parameter wie Stressfaser- und fokale Adhäsionskomplexbildung auch durch beide getesteten Nadrin Isoformen reguliert. Diese Tatsache überrascht einerseits, da laut Richnau und Kollegen Nadrin Cdc42/Rac1-spezifisch ist [Richnau *et al.*, 2001], aber andererseits wurde in Richnaus Arbeit die GAP-Aktivität immer nur anhand der isolierten, GST-gebundenen Nadrin-RhoGAP-Domäne untersucht und niemals mit dem Nadrin „*full length*“ Protein. Das könnte einen großen Einfluss auf die Konformation des Proteins und demnach auch auf dessen Funktionalität haben. Weiterhin haben Richnau und Kollegen zur Bestimmung der intrinsischen GAP-Aktivität ausschließlich *in vitro* mit gereinigten rekombinanten Proteinen gearbeitet [Richnau *et al.*, 2001]. Dies sind zwei Kritikpunkte, die ich in meiner Arbeit berücksichtigen wollte, indem ich immer auch Nadrin „*full length*“ Isoformen

verwendete und die katalytische GTP-Hydrolyse *in vivo* innerhalb lebender Zellen unter physiologischen Bedingungen ablaufen ließ.

Bedenkt man nun erneut die bereits unter 5. 3. „Nadrin wird durch Tyrosinphosphorylierung reguliert“ erwähnte Arbeit von Minoshima und Kollegen, die klar zeigt, dass die Spezifität des Cdc42/Rac1-spezifischen MgcRac1GAP durch Phosphorylierung auf RhoA ausgeweitet werden kann [Minoshima *et al.*, 2003], lässt das die Komplexität der beteiligten Regulationsmechanismen vermuten. Demnach könnte allerdings auch in meinem Versuchsansatz durch endogene Kinasen der zur Überexpression verwendeten Säugerzellen Nadrin phosphoryliert werden. Eine Veränderung der Versuchsergebnisse durch endogene Kinase-vermittelte Phosphorylierung kann nicht ausgeschlossen werden, sondern ist eher wahrscheinlich. Eine Herangehensweise an diese Problemstellung ist die sukzessive Mutation der Phosphorylierungsstellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde damit auch begonnen, indem zwei Tyrosinphosphorylierungsstellen mittels Einzelaminosäureaustausches zu Alanin mutiert wurden. Trotzdem zwei vielversprechende Tyrosinphosphorylierungsstellen ausgewählt wurden und auch eine wiederum Isoform-spezifische Regulation durch diese beiden Tyrosin-Reste gezeigt werden konnte, sind noch weiterführende Versuche in diesem Bereich notwendig. Nadrin besitzt allein 9 potentielle Tyrosinphosphorylierungsstellen und nahezu unzählige Serin/Threoninphosphorylierungsstellen (Nadrin2 und Nadrin5 WT jeweils > 40 Stellen, KinasePhos 2.0 [Wong *et al.*, 2007]).

5. 5. Fazit und Zukunftsperspektiven

Nadrin ist an der Bildung von „*tight junctions*“ beteiligt, bzw. sogar essentiell für deren stabiles Aufrechterhalten notwendig [Wells *et al.*, 2006]. Legt man nun zugrunde, dass die Bildung von „*tight junctions*“ dem initialen Adhäsionsprozess von Thrombozyten recht ähnlich ist, liegt es nahe, Nadrin eine wichtige Rolle im Thrombozyten zu unterstellen. In der Tat inhibieren die beiden getesteten Nadrin „*full length*“ Isoformen Nadrin2 WT und Nadrin5 WT, überexprimiert im Zellkulturmodell, die stabile Adhäsion von Säugerzellen deutlich.

Die bisher in meiner Arbeit diskutierten Ergebnisse lassen eine zentrale, bzw. gar essentielle Rolle von Nadrin im Thrombozyten vermuten. Ob die Resultate, die ich im Zellkulturmodell bei Überexpression von Nadrin erhalten habe, direkt auf die Funktion von

Nadrin in Thrombozyten übertragbar sind, muss sich in weiteren Studien unter zu Hilfenahme einer Nadrin „*knockout*“ Maus [Skarnes *et al.*, 2011] zeigen. Mit einer solchen Maus könnte nicht nur die globale Rolle von „Nadrin“ im Thrombozyten untersucht werden, d. h. die Funktion der Gesamtheit der ausgeschalteten Nadrin Isoformen. Es könnte sogar die Wirkung jeder einzelnen Isoform im Thrombozyten gesondert voneinander untersucht werden, indem die Nadrin „*knockout*“ Megakaryozyten mit der cDNA der jeweils zu untersuchenden Nadrin Isoform transfiziert werden. Eine anschließende Reifung und Kultivierung der transfizierten Megakaryozyten würde dann zur Bildung von Thrombozyten *in vitro* führen, die hinsichtlich ihrer Eigenschaften im Vergleich zu kompletten Nadrin „*knockout*“ Thrombozyten analysiert werden könnten. Sollten sich in diesen Versuchen die Ergebnisse dieser Arbeit erhärten, könnten so gezielt neue Medikamente entwickelt werden, die es erlauben z. B. nur eine Nadrin Isoform darzureichen und dementsprechend nur eine bestimmte Funktion der Thrombozyten zu modulieren. In dieser Konstellation wäre auch die Gefahr, dass eine Blutungsneigung unter der antithrombotischen Therapie entwickelt wird, als relativ gering zu erwarten.

Auch in anderen Bereichen, fernab von der Prävention von Herz-/Kreislaufkrankungen, könnten die Ergebnisse meiner Arbeit Anknüpfungspunkte für weitere Forschungsvorhaben bieten. RhoGTPasen und damit auch ihre GAPs sind in der Krebsforschung nicht unbekannt. RhoGTPasen sind wichtige Regulatoren für Zytoskelettveränderungen und kontrollieren damit auch Vorgänge wie Zellmotilität und Invasivität ins umliegende Gewebe [Kagawa *et al.*, 2013; Khalil *et al.*, 2014; Nasrallah *et al.*, 2014]. 2001 identifizierten Pinheiro und Kollegen das dem Nadrin eng verwandte Oligophrenin-1 als Tumormarker für kolorektale Karzinome [Pinheiro *et al.*, 2001]. Da Nadrin in dieser Arbeit als überaus wichtiger und in sich streng kontrollierter Regulator der RhoGTPasen herausgestellt werden konnte, liegt es also nahe, Nadrin im Kontext der Metastasierung, bzw. Malignität von Tumoren näher zu untersuchen. Vielleicht könnte eine spezifische Nadrin Isoform, wie beispielsweise das potente Nadrin5, in bestimmten Krebsarten stark überexprimiert sein und damit ein potentiell neuer Marker für die Einschätzung der Malignität von Tumoren.

6. Summary

In 2012 349,217 persons died from diseases concerning the circulatory system (according to the „statistisches Bundesamt“). Ischaemic heart failure, together with cerebrovascular diseases, are the major cause of death in Germany comprising 40.2 % of all fatal casualties. The chronic ischaemic heart disease (stable *Angina pectoris*) alone causes 8.2 % of all cases of death in Germany and is therefore sole lead in the causes of death statistics, closely followed by the acute myocardial infarction, that ranks second with 6 % of all fatal casualties. Among the top ten of causes of death, furthermore the roundly dreaded ischaemic stroke ranks with 2.3 %. But there is some hope, because the numbers of death from diseases concerning the circulatory system since 2003 are stably – albeit only slightly – declining. This pleasant fact is an achievement of potent and safe antithrombotic therapies. For the development of new antithrombotically active drugs, there is a need of new – so called – „targets“, which prospectively could serve as point of action for these anticoagulants.

During the activation of platelets, RhoGTPases regulate the essential cytoskeletal rearrangements [Tomar and Schlaepfer, 2009]. The activity of RhoGTPases is negatively controlled by RhoGAPs („RhoGTPase activating proteins“). Nadrin is such a RhoGAP, and it plays a central role during exocytosis events in neurons [Harada *et al.*, 2000]. Furthermore, it is well known that Nadrin is involved in the morphological differentiation of astrocytes. This is a process, where the tight regulation of RhoA is essential [Kobayashi *et al.*, 2013]. Within this thesis I hypothesized, that Nadrin is a crucial regulator of RhoGTPases in platelets and therefore influences various parameters of cytoskeletal rearrangements. This could uncover Nadrin as a promising new drug target for antiplatelet therapies

The first part of this work dealt with the proof of Nadrin in platelets and megakaryocytes. I isolated two Nadrin isoforms (namely Nadrin2 and Nadrin5) from murine platelet mRNA. This cloned Nadrin WT cDNA was then mutated. I deleted the BAR domain of the two Nadrin variants and furthermore mutated two tyrosine phosphorylation sites of Nadrin2 and Nadrin5. The second part of my work addressed the characterisation of the two Nadrin WT variants regarding inhibition of RhoGTPases and cytoskeletal rearrangements. Here I could show that the Nadrin variants have clear isoform-specific functions. Moreover, a definite inhibitory function of the Nadrin BAR domain could be shown [Beck *et al.*, 2013]. In the last chapter of this project I demonstrated the activation-dependent tyrosine

phosphorylation of Nadrin in platelets. Consistent with this finding I could also show that Nadrin interacts with Src family kinases in an activation-dependent manner. In a final step analysing the Nadrin phospho mutants revealed that Nadrin is isoform-specifically regulated by tyrosine phosphorylation [Beck *et al.*, 2014]. Taken together, my work provides a big step forward to a better understanding of the interesting and tightly regulated RhoGAP Nadrin.

7. Anhang

7. 1. Sequenzen

7. 1. 1. AS-Sequenzvergleich ncbi Reference Sequence NP_001116112.1 und klonierte cDNA von Nadrin2 WT

ncbi_Nadrin2: ncbi RefSeq NP_001116112.1

platelet_Nadrin2: Sequenzierung der klonierten cDNA aus murinen Thrombozyten

```

ncbi_Nadrin2      MKKQFNRMKQLANQTVGRAEKTEVLSEDLLQIERRLDTVRSMCHSHKRLIACFQGQHG 60
platelet_Nadrin2 MKKQFNRMKQLANQTVGRAEKTEVLSEDLLQIERRLDTVRSMCHSHKRLIACFQGQHG 60
*****

ncbi_Nadrin2      DAERRHKKLPLTALAQNMQEASQALESLLGKMLETCGDAENQLALELSQHEVFVEKEIM 120
platelet_Nadrin2 DAERRHKKLPLTALAQNMQEASQALESLLGKMLETCGDAENQLALELSQHEVFVEKEIM 120
*****

ncbi_Nadrin2      DPLYGIAEVEIPNIQQRKQLARLVLDWDSVRARWNQAHKSSGTNFQGLPSKIDTLKEEM 180
platelet_Nadrin2 DPLYGIAEVEIPNIQQRKQLARLVLDWDSVRARWNQAHKSSGTNFQGLPSKIDTLKEEM 180
*****

ncbi_Nadrin2      DEAGNKVEQCKDQLAADMYNFMAGEYEGKFFVTLLAQADYHRKALAVLEKALPEMRAH 240
platelet_Nadrin2 DEAGNKVEQCKDQLAADMYNFMAGEYEGKFFVTLLAQADYHRKALAVLEKALPEMRAH 240
*****

ncbi_Nadrin2      QDKWAEKPAFGTPLEEHLKRSGREIALPIEACVMLLLETGMKEEGLFRIGAGASKLKKLK 300
platelet_Nadrin2 QDKWAEKPAFGTPLEEHLKRSGREIALPIEACVMLLLETGMKEEGLFRIGAGASKLKKLK 300
*****

ncbi_Nadrin2      AALDCSTSHLDEFYSDPHAVAGALKSYLRELPEPLMTFSLYEETQVASVQDQDKKLQYL 360
platelet_Nadrin2 AALDCSTSHLDEFYSDPHAVAGALKSYLRELPEPLMTFSLYEETQVASVQDQDKKLQYL 360
*****

ncbi_Nadrin2      WTTCQKLPQNFVNFYLIKFLAKLAQTSVDNKMTPSNIAIVLGNLLWAKQEGTLAEIA 420
platelet_Nadrin2 WTTCQKLPQNFVNFYLIKFLAKLAQTSVDNKMTPSNIAIVLGNLLWAKQEGTLAEIA 420
*****

ncbi_Nadrin2      AATSVHVAVIEPIIQHADWFFPGEVEFNVSEAFVPLATPNSNHSSHTGNDSDSGTLERK 480
platelet_Nadrin2 AATSVHVAVIEPIIQHADWFFPGEVEFNVSEAFVPLATPNSNHSSHTGNDSDSGTLERK 480
*****

ncbi_Nadrin2      RPASMAVMEGDLVKKESFGVKLMDFQAHRGGTLNRKHIAPAFQPPLPPTDGNALAPAGP 540
platelet_Nadrin2 RPASMAVMEGDLVKKESFGVKLMDFQAHRGGTLNRKHIAPAFQPPLPPTDGNALAPAGP 540
*****

```

```

ncbi_Nadrin2      EPPSQSSRADSSSGGGPVFSSTGILEQGLSPGDSSPPKPKDSVSAAVPAAGRNSNQMTTV 600
platelet_Nadrin2 EPPSQSSRADSSSGGGPVFSSTGILEQGLSPGDSSPPKPKDSVSAAVPAAGRNSNQMTTV 600
*****

ncbi_Nadrin2      PNQAQTGGNSHQLSVSTPHSAAGPSPHTLRRAVKKPAPAPPKGNLPPGHPGGQSSPGTG 660
platelet_Nadrin2 PNQAQTGGNSHQLSVSTPHSAAGPSPHTLRRAVKKPAPAPPKGNLPPGHPGGQSSPGTG 660
*****

ncbi_Nadrin2      TSPKPSARSPSPPPQQQQQQQQQQQQQQQTPGMRRCSSSLPPIQAPSHPPPQPTQPRL 720
platelet_Nadrin2 TSPKPSARSPSPPPQQQQQQQQQQQQQQQTPGMRRCSSSLPPIQAPSHPPPQPTQPRL 720
*****

ncbi_Nadrin2      GEQGPEPGTPPTPTPTPPSTPLAKQNPQSSETTLHGTLPRPRPVKPRNRPSVPPPH 780
platelet_Nadrin2 GEQGPEPGTPPTPTPTPPSTPLAKQNPQSSETTLHGTLPRPRPVKPRNRPSVPPPH 780
*****

ncbi_Nadrin2      PPGTHTVDGGLTSSVPTASRIVTDALPGALTGGEQFN 818
platelet_Nadrin2 PPGTHTVDGGLTSSVPTASRIVTDALPGALTGGEQFN 818
*****

```

7. 1. 2. AS-Sequenzvergleich ncbi Reference Sequence NP_001116115.1 und klonierte cDNA von Nadrin5 WT

ncbi_Nadrin5: ncbi RefSeq NP_001116115.1

platelet_Nadrin5: Sequenzierung der klonierten cDNA aus murinen Thrombozyten

```

ncbi_Nadrin5      MKKQFNRMKQLANQTVGRAEKTEVLSEDLLQIERRLDTVRSMCHHSHKRLIACFQQHGHT 60
platelet_Nadrin2 MKKQFNRMKQLANQTVGRAEKTEVLSEDLLQIERRLDTVRSMCHHSHKRLIACFQQHGHT 60
*****

ncbi_Nadrin5      DAERRHKKLPLTALAQNMQEASAQLEESLLGKMLETCGDAENQLALELSQHEVFVEKEIM 120
platelet_Nadrin2 DAERRHKKLPLTALAQNMQEASAQLEESLLGKMLETCGDAENQLALELSQHEVFVEKEIM 120
*****

ncbi_Nadrin5      DPLYGIAEVEIPNIQQRKQLARLVLDWDSVRARWNQAHKSSGTNFQGLPSKIDTLKEEM 180
platelet_Nadrin2 DPLYGIAEVEIPNIQQRKQLARLVLDWDSVRARWNQAHKSSGTNFQGLPSKIDTLKEEM 180
*****

ncbi_Nadrin5      DEAGNKVEQCKDQLAADMYNFMAKEGEYKFFVTLLEAQADYHRKALAVLEKALPEMRAH 240
platelet_Nadrin2 DEAGNKVEQCKDQLAADMYNFMAKEGEYKFFVTLLEAQADYHRKALAVLEKALPEMRAH 240
*****

ncbi_Nadrin5      QDKWAEKPAFGTPLEEHLKRSGREIALPIEACVMLLLETGMKEEGLFRIGAGASKLKKLK 300
platelet_Nadrin2 QDKWAEKPAFGTPLEEHLKRSGREIALPIEACVMLLLETGMKEEGLFRIGAGASKLKKLK 300
*****

```

```

ncbi_Nadrin5      AALDCSTSHLDEFYSDPHAVAGALKSYLRELPEPLMTFSLYEETQVASVQDQDKKLQYL 360
platelet_Nadrin2 AALDCSTSHLDEFYSDPHAVAGALKSYLRELPEPLMTFSLYEETQVASVQDQDKKLQYL 360
*****

ncbi_Nadrin5      WTCQKLPQNFVNFYLIKFLAKLAQTSVKNMTPSNIAIVLGNLLWAKQEGTLAEIA 420
platelet_Nadrin2 WTCQKLPQNFVNFYLIKFLAKLAQTSVKNMTPSNIAIVLGNLLWAKQEGTLAEIA 420
*****

ncbi_Nadrin5      AATSVHVAVIEPIIQHADWFFPGEVEFNVSEAFVPLATPNSNHSSHTGNDSDSGTLERK 480
platelet_Nadrin2 AATSVHVAVIEPIIQHADWFFPGEVEFNVSEAFVPLATPNSNHSSHTGNDSDSGTLERK 480
*****

ncbi_Nadrin5      RPASMAVMEGDLVKKESPPKPKDSVSAAVPAAGRNSNQMTTVPNQAQTGGNSHQLSVSTP 540
platelet_Nadrin2 RPASMAVMEGDLVKKESPPKPKDSVSAAVPAAGRNSNQMTTVPNQAQTGGNSHQLSVSTP 540
*****

ncbi_Nadrin5      HSAAGPSPHTLRRVAVKPPAPAPKPGNLPPGHPGGQSSPGTGTSPKPSARSPSPQQQQQ 600
platelet_Nadrin2 HSAAGPSPHTLRRVAVKPPAPAPKPGNLPPGHPGGQSSPGTGTSPKPSARSPSPQQQQQ 600
*****

ncbi_Nadrin5      QQQQQQQQQQTPGMRRCSSSLPPIQAPSHPPPQPPTQPRLGEQGPEPGPTPPQTPTTP 660
platelet_Nadrin2 QQQQQQQQQQTPGMRRCSSSLPPIQAPSHPPPQPPTQPRLGEQGPEPGPTPPQTPTTP 660
*****

ncbi_Nadrin5      STPPLAKQNPQSSETTLHGTLRPRVVPKPRNRPSVPPPHPPGHTHTVDGGLTSSVPTA 720
platelet_Nadrin2 STPPLAKQNPQSSETTLHGTLRPRVVPKPRNRPSVPPPHPPGHTHTVDGGLTSSVPTA 720
*****

ncbi_Nadrin5      SRIVTDV 727
platelet_Nadrin2 SRIVTDV 727
*****

```

7. 1. 3. AS-Sequenzvergleich Nadrin2 WT und Nadrin5 WT

Nadrin2_WT: Sequenzierung der klonierten Nadrin2 cDNA aus murinen Thrombozyten

Nadrin5_WT: Sequenzierung der klonierten Nadrin5 cDNA aus murinen Thrombozyten

```

Nadrin2_WT      MKKQFNRMKQLANQTVGRAEKTEVLSEDLLQIERRLDTVRSMCHHSHKRLIACFQGQHG 60
Nadrin5_WT      MKKQFNRMKQLANQTVGRAEKTEVLSEDLLQIERRLDTVRSMCHHSHKRLIACFQGQHG 60
*****

Nadrin2_WT      DAERRHKKLPLTALAQNMQEASAQLEESLLGKMLETCGDAENQLALELSQHEVFVEKEIM 120
Nadrin5_WT      DAERRHKKLPLTALAQNMQEASAQLEESLLGKMLETCGDAENQLALELSQHEVFVEKEIM 120
*****

Nadrin2_WT      DPLYGIAEVEIPNIQQRKQLARLVLDWDSVRARWNQAHKSSGTFNQGLPSKIDTLKEEM 180
Nadrin5_WT      DPLYGIAEVEIPNIQQRKQLARLVLDWDSVRARWNQAHKSSGTFNQGLPSKIDTLKEEM 180
*****

```



```

Nadrin2_WT      DEAGNKVEQCKDQLAADMYNFMAKEGEYKFFVTLLLEAQADYHRKALAVLEKALPEMRAH 240
Nadrin5_WT      DEAGNKVEQCKDQLAADMYNFMAKEGEYKFFVTLLLEAQADYHRKALAVLEKALPEMRAH 240
*****

Nadrin2_WT      QDKWAEKPAFGTPLEEHLKRSGREIALPIEACVMLLLETGMKEEGLFRIGAGASKLKKLK 300
Nadrin5_WT      QDKWAEKPAFGTPLEEHLKRSGREIALPIEACVMLLLETGMKEEGLFRIGAGASKLKKLK 300
*****

Nadrin2_WT      AALDCSTSHLDEFYSDPHAVAGALKSYLRELPEPLMTFSLYEWTQVASVQDQDKKLQYL 360
Nadrin5_WT      AALDCSTSHLDEFYSDPHAVAGALKSYLRELPEPLMTFSLYEWTQVASVQDQDKKLQYL 360
*****

Nadrin2_WT      WTTQCQLPPQNFVNFYRLIKFLAKLAQTSVDNKMTPSNIAIVLGNLLWAKQEGTLAEIA 420
Nadrin5_WT      WTTQCQLPPQNFVNFYRLIKFLAKLAQTSVDNKMTPSNIAIVLGNLLWAKQEGTLAEIA 420
*****

Nadrin2_WT      AATSVHVAVIEPIIQHADWFFPGEVEFNVSEAFVPLATPNSNHSSTGNDSDSGTLERK 480
Nadrin5_WT      AATSVHVAVIEPIIQHADWFFPGEVEFNVSEAFVPLATPNSNHSSTGNDSDSGTLERK 480
*****

Nadrin2_WT      RPASMAVMEGDLVKKESFGVKLMDFAQHRRGGTLNRKHIAPAFQPPLPPTDGNALAPAGP 540
Nadrin5_WT      RPASMAVMEGDLVKKE----- 496
*****

Nadrin2_WT      EPPSQSSRADSSSGGPFVFSSTGILEQGLSPGDSSPPKPKDSVSAAVPAAGRNSNQMTTV 600
Nadrin5_WT      -----SPPKPKDSVSAAVPAAGRNSNQMTTV 522
*****

Nadrin2_WT      PNQAQTGGNSHQLSVSTPHSAAGPSPHTLRRVKKPAPAPPKPGNLPPGHPGGQSSPGTG 660
Nadrin5_WT      PNQAQTGGNSHQLSVSTPHSAAGPSPHTLRRVKKPAPAPPKPGNLPPGHPGGQSSPGTG 582
*****

Nadrin2_WT      TSPKPSARSPSPPPQQQQQQQQQQQQQQQTPGMRRCSSSLPPIQAPSHPPPQPTQPRL 720
Nadrin5_WT      TSPKPSARSPSPPPQQQQQQQQQQQQQQQTPGMRRCSSSLPPIQAPSHPPPQPTQPRL 642
*****

Nadrin2_WT      GEQGPEPGPTPPQTPTPPSTPPLAKQNPQSSETTLHGTLRPRPVKPRNRPSVPPPPH 780
Nadrin5_WT      GEQGPEPGPTPPQTPTPPSTPPLAKQNPQSSETTLHGTLRPRPVKPRNRPSVPPPPH 702
*****

Nadrin2_WT      PPGTHTVDGGLTSSVPTASRIVTDALPGALTGGEGFQN 818
Nadrin5_WT      PPGTHTVDGGLTSSVPTASRIVTDV----- 727
*****

```

7. 1. 4. Primerbindestelle zur Klonierung von Nadrin2 in den Vektor ptdTomato-N1

Nadrin2_WT: Ausschnitt der Sequenzierung der klonierten Nadrin2 cDNA aus murinen Thrombozyten

Nadrin_4_FL_oS_rev: invertierte, komplementäre Primersequenz ohne Restriktions-
endonukleaseschnittstelle (siehe auch *Tabelle 3.5*)

```
Nadrin2_WT          ATCGTCACTGATGCCCTTCCCAGGTGCCCTCACAGGTGGGAAGGTTTCCAGAACTAA 2457
Nadrin_4_FL_oS_rev -----CAGGTGGGAAGGTTTCCAGAACCCA 27
                    ***** .*
```

7. 1. 5. Primerbindestelle zur Klonierung von Nadrin5 in den Vektor ptdTomato-N1

Nadrin5_WT: Ausschnitt der Sequenzierung der klonierten Nadrin2 cDNA aus murinen
Thrombozyten

Nadrin_5_FL_oS_rev: invertierte, komplementäre Primersequenz ohne Restriktions-
endonukleaseschnittstelle (siehe auch *Tabelle 3.5*)

```
Nadrin5_WT          CCACATCCACCTGGCACCCACACGGTGGATGGTGGCCTTACATCCTCAGTGCCACAGCC 2160
Nadrin_5_FL_oS_rev -----GCC 3
                    ***
```

```
Nadrin5_WT          TCCAGAATCGTCACTGATGTATGA 2184
Nadrin_5_FL_oS_rev  TCCAGAATCGTCACTGATGTACC- 26
                    *****
```

7. 1. 6. Primerbindestelle zur Herstellung der Nadrin ΔBAR-Mutanten

Nadrin2_WT: Ausschnitt der Sequenzierung der klonierten Nadrin2 cDNA aus murinen
Thrombozyten

Nadrin_4_GAP_fw: Primersequenz ohne Restriktionsendonukleaseschnittstelle (siehe auch
Tabelle 3.5), Kozak-Sequenz und Start-Codon sind unterstrichen.

Nadrin5_WT: Ausschnitt der Sequenzierung der klonierten Nadrin5 cDNA aus murinen
Thrombozyten

```
Nadrin2_WT          CAAGATAAGTGGGCAGAGAAGCCAGCCTTCGGCACACCTCTGGAGGAACACCTGAAGAGG 780
BAR_fw             -----ACCATGGAGAAGCCAGCCTTCGGCACACCTC----- 31
Nadrin5_WT          CAAGATAAGTGGGCAGAGAAGCCAGCCTTCGGCACACCTCTGGAGGAACACCTGAAGAGG 780
                    *****
```

7. 1. 7. Punktmutation Y124A Primeranlagerungsstelle

Nadrin2_WT: Ausschnitt der Sequenzierung der klonierten Nadrin2 cDNA aus murinen Thrombozyten

Nadrin_Y124A_fw: Primersequenz (siehe auch *Tabelle 3.5*)

Nadrin5_WT: Ausschnitt der Sequenzierung der klonierten Nadrin5 cDNA aus murinen Thrombozyten

```

Nadrin2_WT      GAGAACCAGCTGGCTCTTGAACCTCTCACAAACATGAAGTCTTTGTGGAGAAGGAGATCATG 360
Nadrin_Y124A   -----GAGATCATG 9
Nadrin5_WT      GAGAACCAGCTGGCTCTTGAACCTCTCACAAACATGAAGTCTTTGTGGAGAAGGAGATCATG 360
                                     *****

Nadrin2_WT      GACCCCTCTCTACGGCATAGCAGAGGTGGAGATTCCCAATATCCAGAAGCAAAGGAAGCAG 420
Nadrin_Y124A   GACCCCTCTCGCTGGCATAGCAGAGGTGGAG----- 39
Nadrin5_WT      GACCCCTCTCTACGGCATAGCAGAGGTGGAGATTCCCAATATCCAGAAGCAAAGGAAGCAG 420
                                     ***** . *****

```

7. 1. 8. Punktmutation Y314A Primeranlagerungsstelle

Nadrin2_WT: Ausschnitt der Sequenzierung der klonierten Nadrin2 cDNA aus murinen Thrombozyten

Nadrin_Y314A_fw: Primersequenz (siehe auch *Tabelle 3.5*)

Nadrin5_WT: Ausschnitt der Sequenzierung der klonierten Nadrin5 cDNA aus murinen Thrombozyten

```

Nadrin2_WT      GCTGCTCTCGACTGCTCCACATCGCATCTGGATGAATTCTATTCTGATCCCCATGCTGTC 960
Nadrin_Y314A   -----CATCGCATCTGGATGAATTCGCCCTCTGATCCCCATGCTGTC 41
Nadrin5_WT      GCTGCTCTCGACTGCTCCACATCGCATCTGGATGAATTCTATTCTGATCCCCATGCTGTC 960
                                     ***** . *****

Nadrin2_WT      GCAGGTGCTTTAAAGTCCTATCTGCGGGAGTTGCCTGAGCCCTTAATGACTTTCAGTCTG 1020
Nadrin_Y314A   G----- 42
Nadrin5_WT      GCAGGTGCTTTAAAGTCCTATCTGCGGGAGTTGCCTGAGCCCTTAATGACTTTCAGTCTG 1020
                                     *

```

7. 1. 9. Punktmutationen Y124A und Y314A auf AS- und DNA-Ebene

Sequenzausschnitt von Nadrin2/5 WT und Primeranlagerungsstellen zur Mutation der Phosphorylierungsstellen Y124 und Y314. Primersequenzen siehe auch *Tabelle 3.5*. Die Einzelaminosäureaustausche und mutierten Basen sind fett gedruckt.

```
atgaagaagcaattcaaccgcatgaagcagctggccaatcagactgtcggcagagctgag
M K K Q F N R M K Q L A N Q T V G R A E
aagaccgaagtcctcagtggaagatctgctacagattgaacgtcgcctggacactgtgctg
K T E V L S E D L L Q I E R R L D T V R
tcaatgtgccaccattcacataagcgtttgatagcctgcttccaaggctcagcatggcact
S M C H H S H K R L I A C F Q G Q H G T
gatgccgagaggagacataaaaaagcttctctgacagctcttgcccagaacatgcaggag
D A E R R H K K L P L T A L A Q N M Q E
gcttcagcccagctggaagagtctctcttggggaagatgctggagacctgtggggacgct
A S A Q L E E S L L G K M L E T C G D A
```

GAGATCATG

|||||||

```
gagaaccagctggctcttgaactctcacaacatgaagtcttgggagaaggagatcatg
E N Q L A L E L S Q H E V F V E K E I M
```

GACCCTCTCGCTGGCATAGCAGAGGTGGAG

||||||| |||||||

```
gaccctctcttacggcatagcagaggtggagattcccaatatccagaagcaaaggaagcag
D P L Y G I A E V E I P N I Q K Q R K Q
```

A

```
cttgctagattgggtggtggactgggattcagtcagagcgagatggaaccaagcacacaag
L A R L V L D W D S V R A R W N Q A H K
tcttcaggaaccaactttcaggggcttccatccaaaatagataccctaaaggaagagatg
S S G T N F Q G L P S K I D T L K E E M
gatgaagctgggaataaagttgaacagtgcaaggatcaactgacagacatgtacaac
D E A G N K V E Q C K D Q L A A D M Y N
ttcatggccaaagaaggggagtgatggcaagttcttcgtgacgttattagaagcccaagca
F M A K E G E Y G K F F V T L L E A Q A
gattaccatagaaaagcatttagcagtccttagaaaaggcccttcccgaatgctgctccat
D Y H R K A L A V L E K A L P E M R A H
caagataagtgggcagagaagccagccttcggcacacctctggaggaacacctgaagagg
Q D K W A E K P A F G T P L E E H L K R
agtgggctgagatcgccctgcctattgaggcctgtgtcatggtgtgctggagactggc
S G R E I A L P I E A C V M L L L E T G
atgaaagaggaggcctttttcggattggagctggagcctccaagttgaagaagctgaaa
M K E E G L F R I G A G A S K L K K L K
```

CATCGCATCTGGATGAATT**CGCT**TCTGATCCCCATGCTGTC

||||||| |||||||

```
gctgctctcgactgctccacatcgcatctggatgaatttattctgatccccatgctgct
A A L D C S T S H L D E F Y S D P H A V
```

A

G

```
|
gcaggtgctttaaagtcctatctgctgggagttgctgagcccttaatgactttcagctctg
A G A L K S Y L R E L P E P L M T F S L
tatgaagaatggacacaagttgcaagtgctgagggatcaagacaaaaaacttcaatattta
Y E E W T Q V A S V Q D Q D K K L Q Y L
```

7. 1. 10. Abigramme der ptdTomato-N1-Nadrin-Konstrukte

Mutiertes Stop-Codon von ptdTomato-Nadrin2, das die Expression eines Nadrin2-„tandem“ Tomato-Fusionsproteins erlaubt: **Abbildung 7.1.**

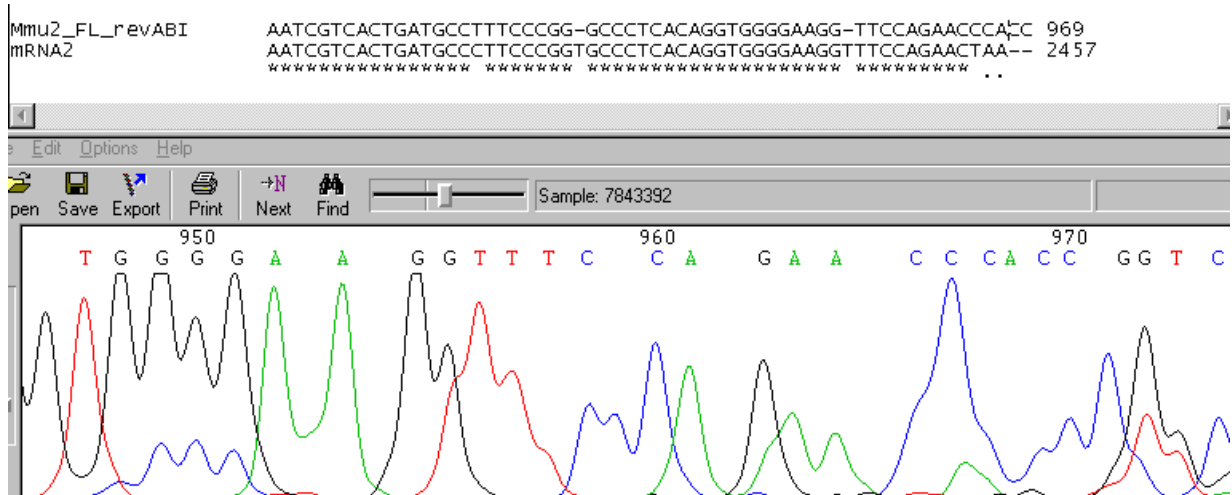


Abbildung 7.1: Abigramm zum Nachweis der Mutation in ptdTomato-Nadrin2. Dargestellt ist das Abigramm mit dem Programm Chromas Lite (Technelysium Pty. Ltd., South Brisbane, Australien) im Vergleich zum „alignment“ der Sequenzierung von ptdTomato-Nadrin2 und der ncbi RefSeq NP_001116112.1 (Nadrin2 WT).

Mutiertes Stop-Codon von ptdTomato-Nadrin5, das die Expression eines Nadrin5-„tandem“ Tomato-Fusionsproteins erlaubt: **Abbildung 7.2.**

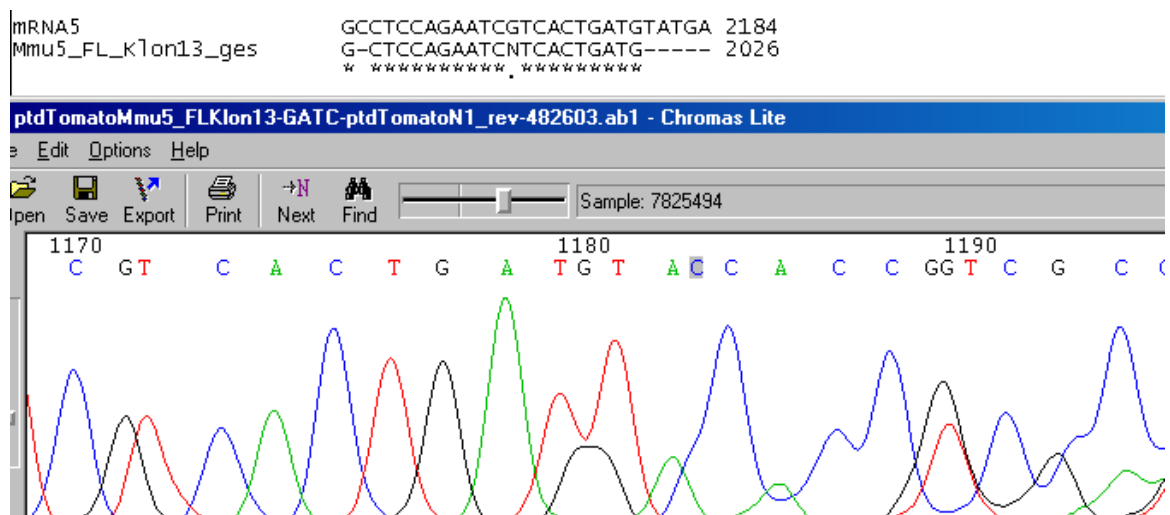


Abbildung 7.2: Abigramm zum Nachweis der Mutation in ptdTomato-Nadrin5. Dargestellt ist das Abigramm mit dem Programm Chromas Lite (Technelysium Pty. Ltd., South Brisbane, Australien) im Vergleich zum „alignment“ der Sequenzierung von ptdTomato-Nadrin5 und der ncbi RefSeq NP_001116115.1 (Nadrin5 WT).

Abbildung 7.4: Abigramm zum Nachweis der Mutation der Phosphorylierungsstelle Y314 (Bp 940) in pcDNATM3.1-Nadrin2 Y314A. Dargestellt ist das Abigramm mit dem Programm Chromas Lite (Technelysium Pty. Ltd., South Brisbane, Australien) im Vergleich zum „alignment“ der Sequenzierung von pcDNATM3.1-Nadrin2 Y314A und der ncbi RefSeq NP_001116112.1 (Nadrin2 WT).

Mutierte Phosphorylierungsstellen von pcDNATM3.1-Nadrin2 Y124/314A. Die Basenabfolgen TAC (Bp 370) und TAT (Bp 940) (Tyrosin) wurde gegen die Abfolge GCT (Bp 370), bzw. GCC (Bp 940) (Alanin) ersetzt. Das Ergebnis der erfolgreichen Mutagenese ist dem Abigramm und dem „alignment“ der **Abbildung 7.5** zu entnehmen.

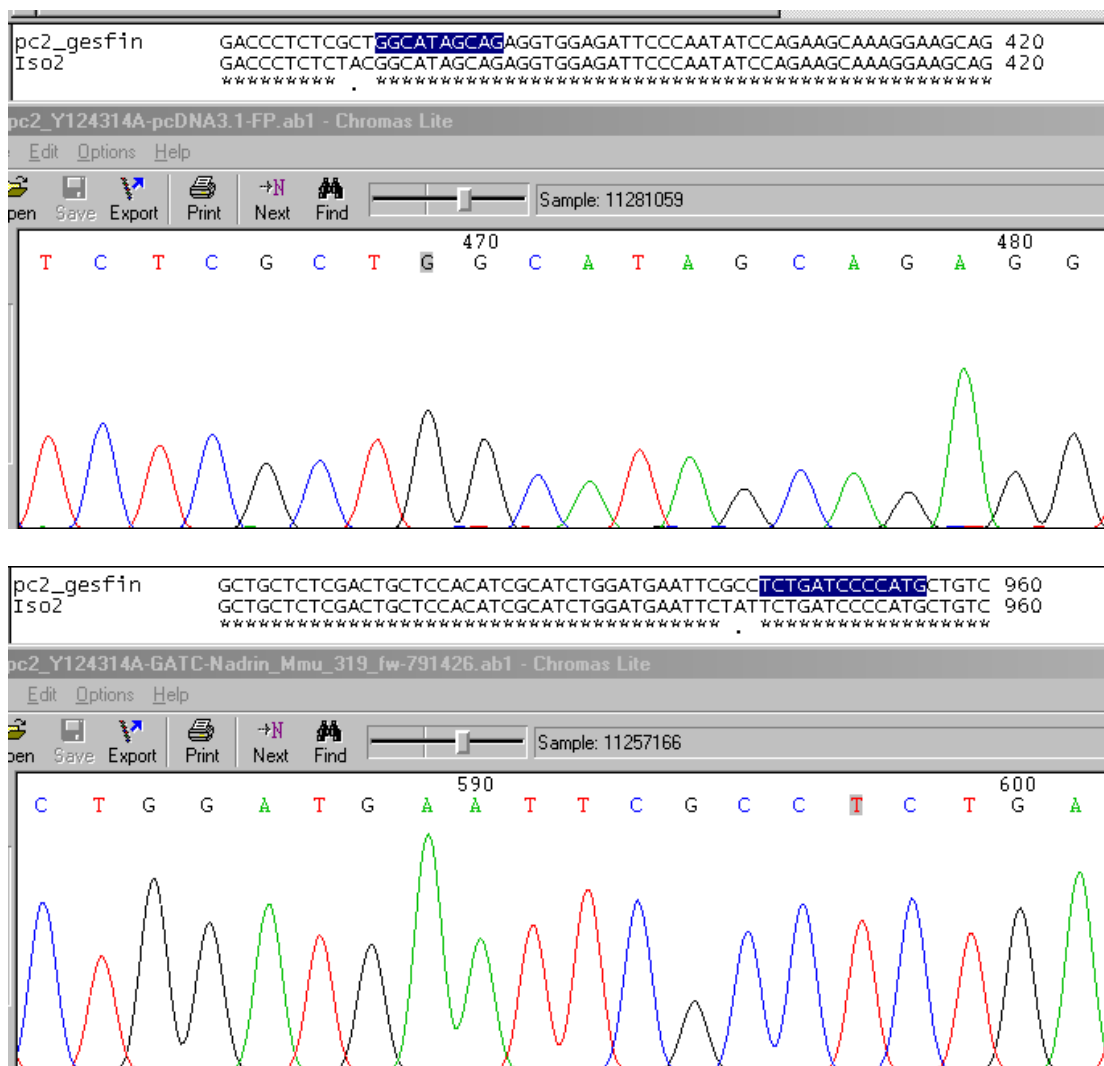


Abbildung 7.5: Abigramme zum Nachweis der Mutationen der Phosphorylierungsstellen Y124 (Bp 370) und Y314 (Bp 940) in pcDNATM3.1-Nadrin2 Y124/314A. Dargestellt sind die Abigramme mit dem Programm Chromas Lite (Technelysium Pty. Ltd., South Brisbane, Australien) im Vergleich zum „alignment“ der Sequenzierung von pcDNATM3.1-Nadrin2 Y124/314A und der ncbi RefSeq NP_001116112.1 (Nadrin2 WT). (A) Y124 (Bp 370). (B) Y314 (Bp 940).

Mutierte Phosphorylierungsstelle von pcDNATM3.1-Nadrin5 Y124A. Die Basenabfolge TAC (Tyrosin) wurde gegen die Abfolge GCT ersetzt. Das Ergebnis der erfolgreichen Mutagenese ist dem Abigramm und dem „alignment“ der **Abbildung 7.6** zu entnehmen.

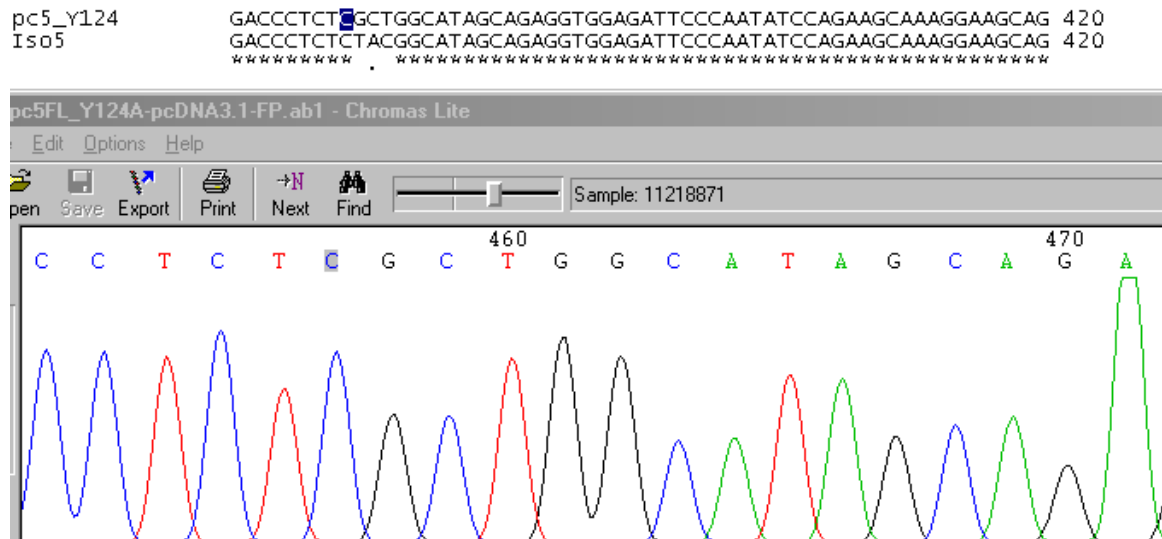


Abbildung 7.6: Abigramm zum Nachweis der Mutation der Phosphorylierungsstelle Y124 (Bp 370) in pcDNATM3.1-Nadrin5 Y124A. Dargestellt ist das Abigramm mit dem Programm Chromas Lite (Technelysium Pty. Ltd., South Brisbane, Australien) im Vergleich zum „alignment“ der Sequenzierung von pcDNATM3.1-Nadrin5 Y124A und der ncbi RefSeq NP_001116115.1 (Nadrin5 WT).

Mutierte Phosphorylierungsstelle von pcDNATM3.1-Nadrin5 Y314A. Die Basenabfolge TAC (Tyrosin) wurde gegen die Abfolge GCC ersetzt. Das Ergebnis der erfolgreichen Mutagenese ist dem Abigramm und dem „alignment“ der **Abbildung 7.7** zu entnehmen.

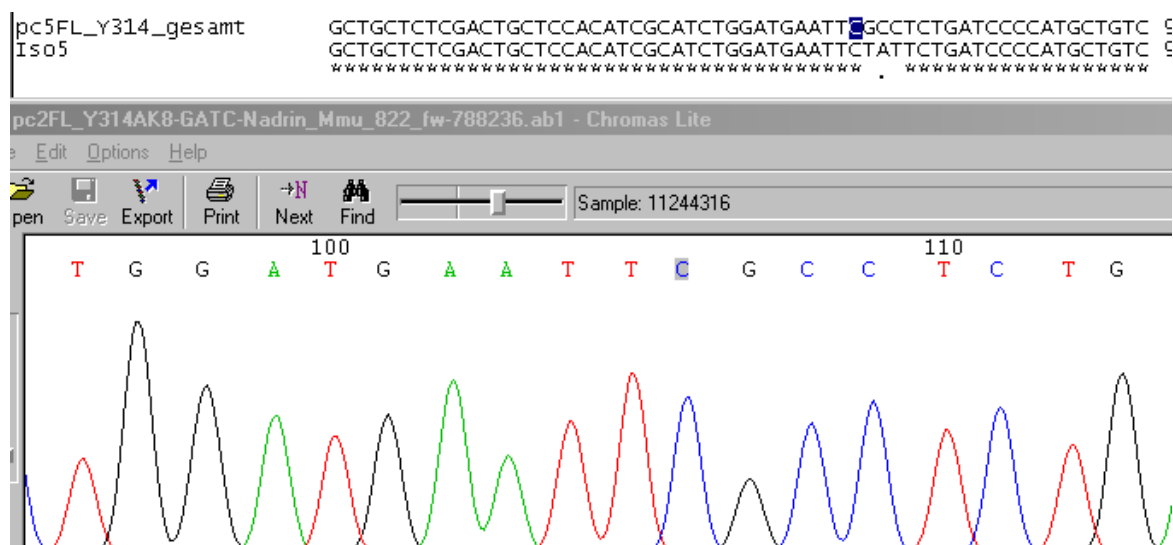


Abbildung 7.7: Abigramm zum Nachweis der Mutation der Phosphorylierungsstelle Y314 (Bp 940) in pcDNATM3.1-Nadrin5 Y314A. Dargestellt ist das Abigramm mit dem Programm Chromas Lite (Technelysium

Pty. Ltd., South Brisbane, Australien) im Vergleich zum „alignment“ der Sequenzierung von pcDNATM3.1-Nadrin5 Y314A und der ncbi RefSeq NP_001116115.1 (Nadrin5 WT).

Mutierte Phosphorylierungsstellen von pcDNATM3.1-Nadrin5 Y124/314A. Die Basenabfolgen TAC (Bp 370) und TAT (Bp 940) (Tyrosin) wurde gegen die Abfolge GCT (Bp 370), bzw. GCC (Bp 940) (Alanin) ersetzt. Das Ergebnis der erfolgreichen Mutagenese ist dem Abigramm und dem „alignment“ der **Abbildung 7.8** zu entnehmen.

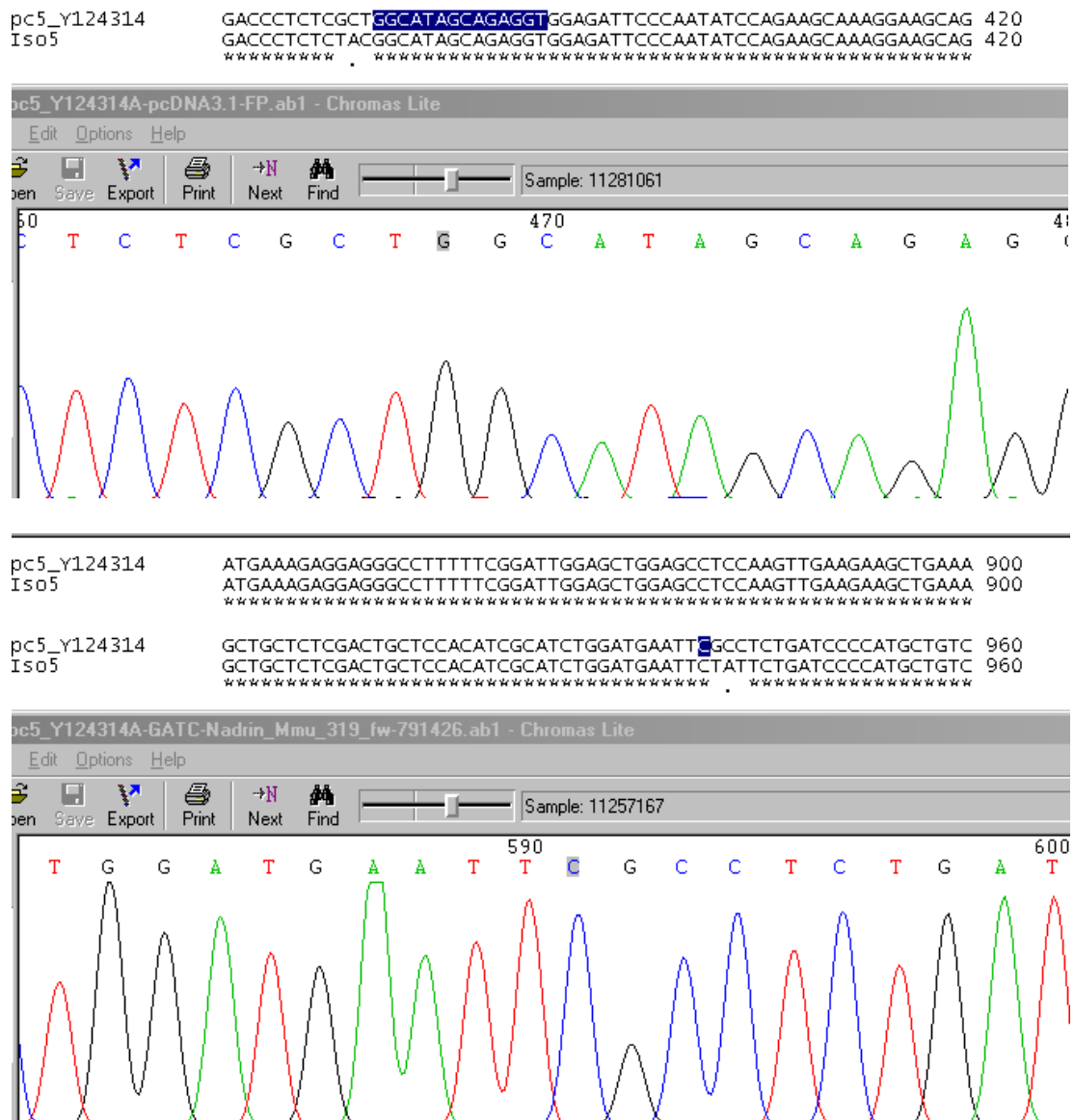


Abbildung 7.8: Abigramme zum Nachweis der Mutationen der Phosphorylierungsstellen Y124 (Bp 370) und Y314 (Bp 940) in pcDNATM3.1-Nadrin5 Y124/314A. Dargestellt sind die Abigramme mit dem Programm Chromas Lite (Technelysium Pty. Ltd., South Brisbane, Australien) im Vergleich zum „alignment“ der Sequenzierung von pcDNATM3.1-Nadrin5 Y124/314A und der ncbi RefSeq NP_001116115.1 (Nadrin5 WT). (A) Y124 (Bp 370). (B) Y314 (Bp 940).

7. 1. 12. Abigramme der ptdTomato-Nadrin Phosphomutanten

Mutierte Phosphorylierungsstelle von ptdTomato-Nadrin2 Y124A. Die Basenabfolge TAC (Tyrosin) wurde gegen die Abfolge GCT ersetzt. Das Ergebnis der erfolgreichen Mutagenese ist dem Abigramm und dem „alignment“ der **Abbildung 7.9** zu entnehmen.

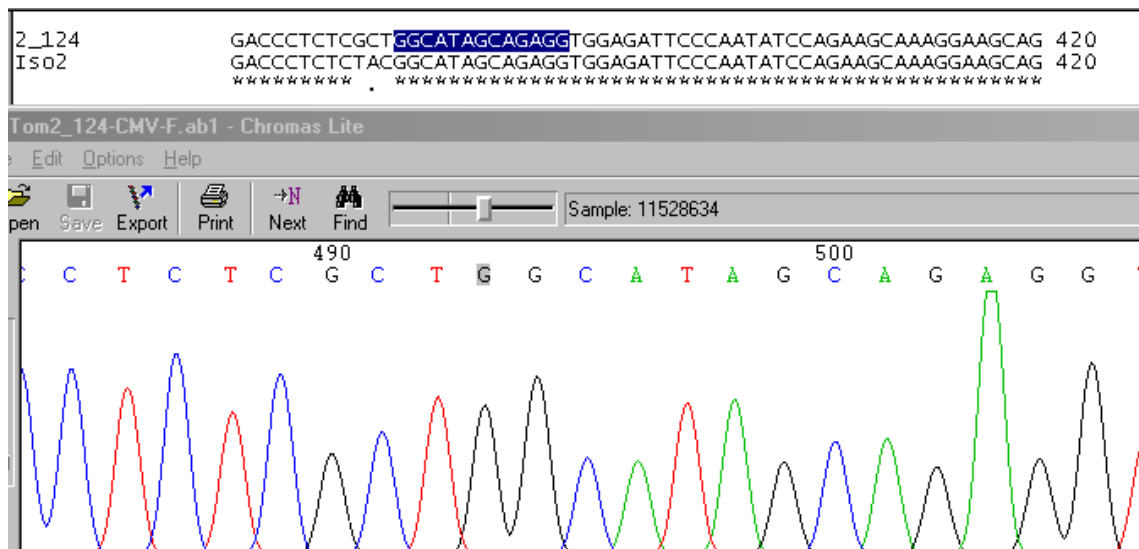


Abbildung 7.9: Abigramm zum Nachweis der Mutation der Phosphorylierungsstelle Y124 (Bp 370) in ptdTomato-Nadrin2 Y124A. Dargestellt ist das Abigramm mit dem Programm Chromas Lite (Technelysium Pty. Ltd., South Brisbane, Australien) im Vergleich zum „alignment“ der Sequenzierung von ptdTomato-Nadrin2 Y124A und der ncbi RefSeq NP_00116112.1 (Nadrin2 WT).

Mutierte Phosphorylierungsstelle von ptdTomato-Nadrin2 Y314A. Die Basenabfolge TAC (Tyrosin) wurde gegen die Abfolge GCC ersetzt. Das Ergebnis der erfolgreichen Mutagenese ist dem Abigramm und dem „alignment“ der **Abbildung 7.10** zu entnehmen.

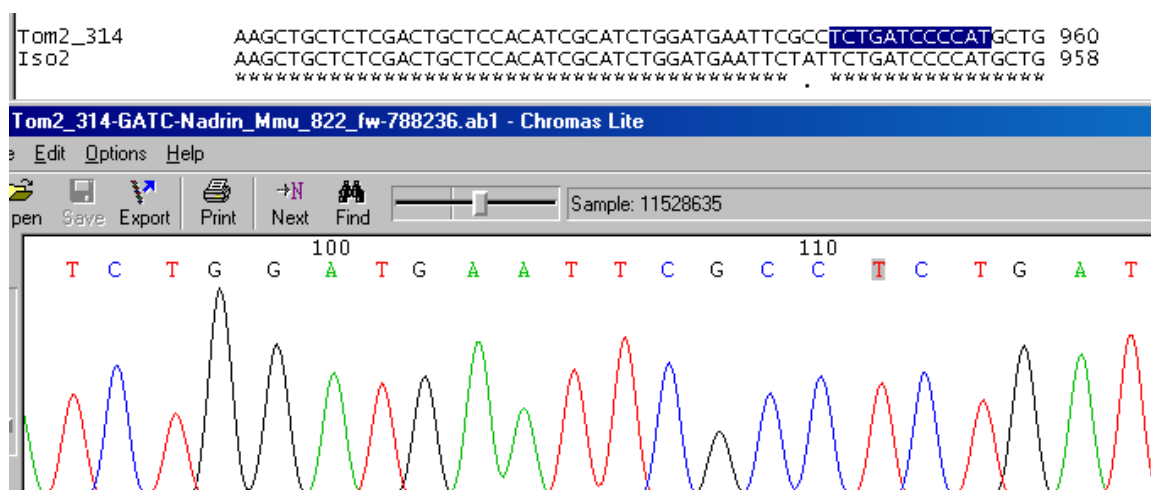


Abbildung 7.10: Abigramm zum Nachweis der Mutation der Phosphorylierungsstelle Y314 (Bp 940) in *ptdTomato-Nadrin2 Y314A*. Dargestellt ist das Abigramm mit dem Programm Chromas Lite (Technelysium Pty. Ltd., South Brisbane, Australien) im Vergleich zum „alignment“ der Sequenzierung von *ptdTomato-Nadrin2 Y314A* und der *ncbi RefSeq NP_001116112.1 (Nadrin2 WT)*.

Mutierte Phosphorylierungsstellen von *ptdTomato-Nadrin2 Y124/314A*. Die Basenabfolgen TAC (Bp 370) und TAT (Bp 940) (Tyrosin) wurde gegen die Abfolge GCT (Bp 370), bzw. GCC (Bp 940) (Alanin) ersetzt. Das Ergebnis der erfolgreichen Mutagenese ist dem Abigramm und dem „alignment“ der **Abbildung 7.11** zu entnehmen.

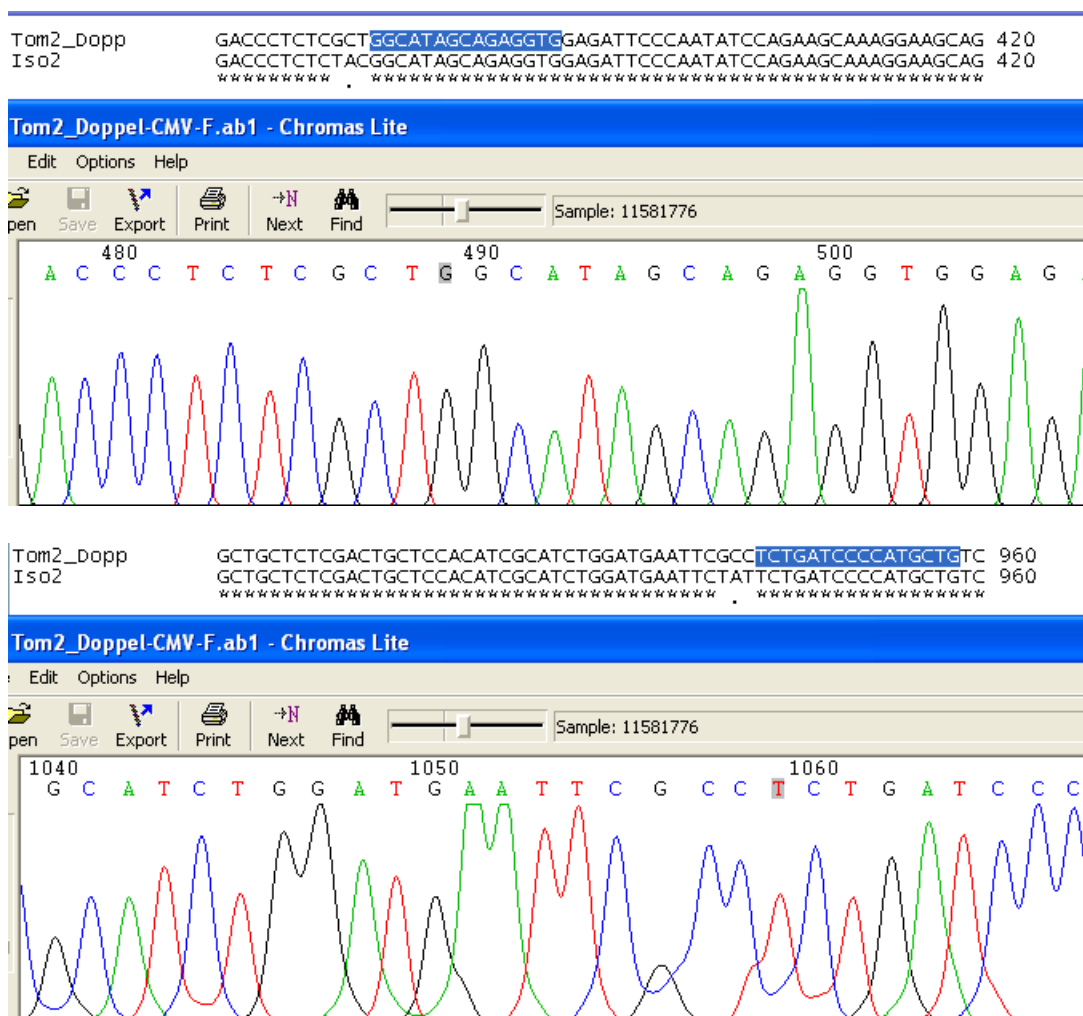


Abbildung 7.11: Abigramme zum Nachweis der Mutationen der Phosphorylierungsstellen Y124 (Bp 370) und Y314 (Bp 940) in *ptdTomato-Nadrin2 Y124/314A*. Dargestellt sind die Abigramme mit dem Programm Chromas Lite (Technelysium Pty. Ltd., South Brisbane, Australien) im Vergleich zum „alignment“ der Sequenzierung von *ptdTomato-Nadrin2 Y124/314A* und der *ncbi RefSeq NP_001116112.1 (Nadrin2 WT)*. (A) Y124 (Bp 370). (B) Y314 (Bp 940).

Mutierte Phosphorylierungsstelle von ptdTomato-Nadrin5 Y124A. Die Basenabfolge TAC (Tyrosin) wurde gegen die Abfolge GCT ersetzt. Das Ergebnis der erfolgreichen Mutagenese ist dem Abigramm und dem „alignment“ der **Abbildung 7.12** zu entnehmen.

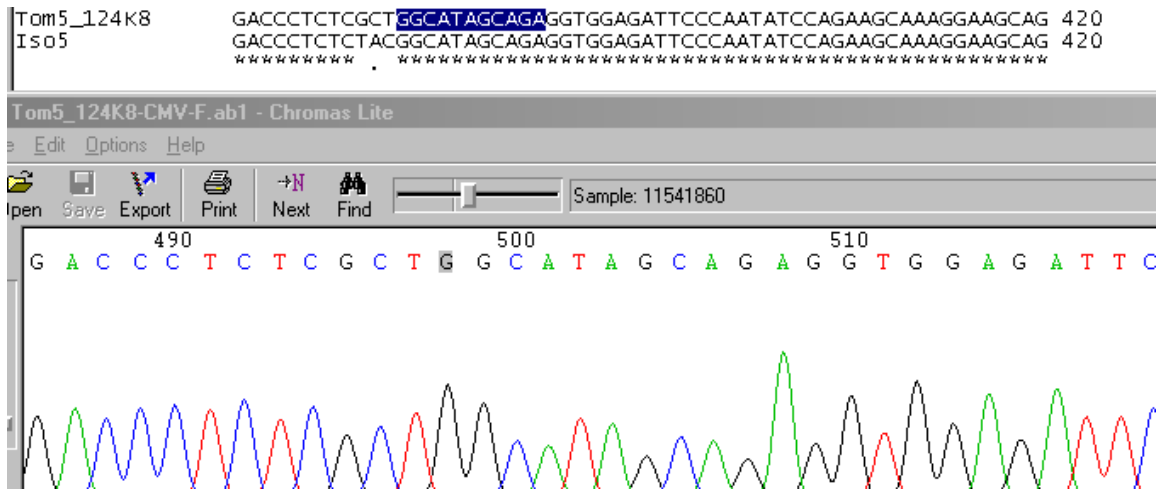


Abbildung 7.12: Abigramm zum Nachweis der Mutation der Phosphorylierungsstelle Y124 (Bp 370) in ptdTomato-Nadrin5 Y124A. Dargestellt ist das Abigramm mit dem Programm Chromas Lite (Technelysium Pty. Ltd., South Brisbane, Australien) im Vergleich zum „alignment“ der Sequenzierung von ptdTomato-Nadrin5 Y124A und der ncbi RefSeq NP_001116115.1 (Nadrin5 WT).

Mutierte Phosphorylierungsstelle von ptdTomato-Nadrin5 Y314A. Die Basenabfolge TAC (Tyrosin) wurde gegen die Abfolge GCC ersetzt. Das Ergebnis der erfolgreichen Mutagenese ist dem Abigramm und dem „alignment“ der **Abbildung 7.13** zu entnehmen.

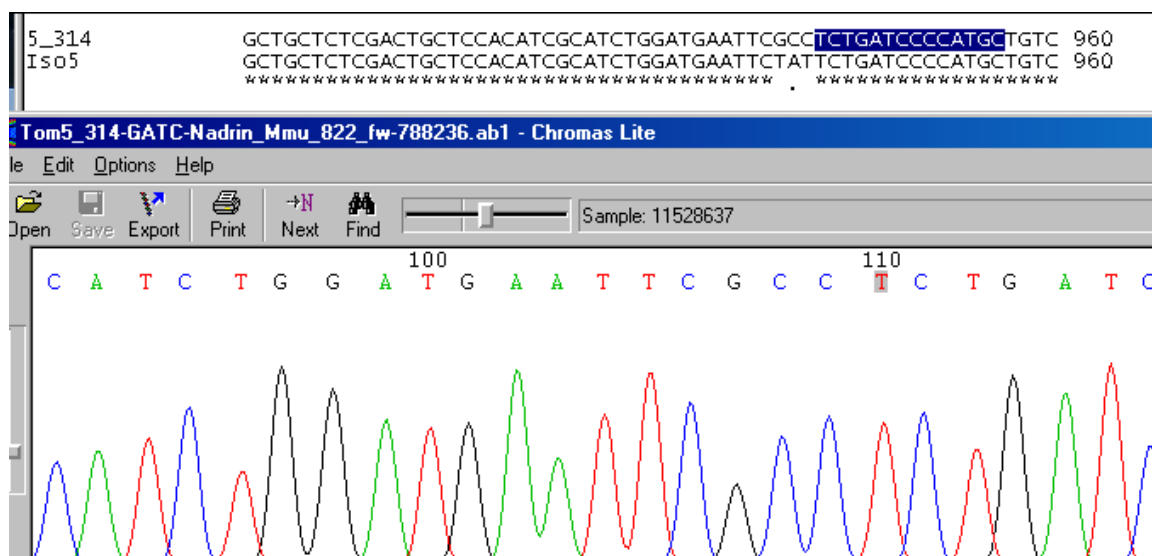


Abbildung 7.13: Abigramm zum Nachweis der Mutation der Phosphorylierungsstelle Y314 (Bp 940) in ptdTomato-Nadrin5 Y314A. Dargestellt ist das Abigramm mit dem Programm Chromas Lite (Technelysium

Pty. Ltd., South Brisbane, Australien) im Vergleich zum „alignment“ der Sequenzierung von *ptdTomato-Nadrin5 Y314A* und der *ncbi RefSeq NP_001116115.1 (Nadrin5 WT)*.

Mutierte Phosphorylierungsstellen von *ptdTomato-Nadrin5 Y124/314A*. Die Basenabfolgen TAC (Bp 370) und TAT (Bp 940) (Tyrosin) wurde gegen die Abfolge GCT (Bp 370), bzw. GCC (Bp 940) (Alanin) ersetzt. Das Ergebnis der erfolgreichen Mutagenese ist dem Abigramm und dem „alignment“ der **Abbildung 7.14** zu entnehmen.



Abbildung 7.14: Abigramme zum Nachweis der Mutationen der Phosphorylierungsstellen Y124 (Bp 370) und Y314 (Bp 940) in *ptdTomato-Nadrin5 Y124/314A*. Dargestellt sind die Abigramme mit dem Programm Chromas Lite (Technelysium Pty. Ltd., South Brisbane, Australien) im Vergleich zum „alignment“ der Sequenzierung von *ptdTomato-Nadrin5 Y124/314A* und der *ncbi RefSeq NP_001116115.1 (Nadrin5 WT)*. (A) Y124 (Bp 370). (B) Y314 (Bp 940).

7. 2. Einbuchstabencode der Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

7. 3. Software

„nucleotide blast“	(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) [Altschul <i>et al.</i> , 1990]
„Chromas Lite“	Version 2.01, Technelysium Pty Ltd (http://www.technelysium.com.au)
„ClustalW“	(http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)
„Manipulate“	(http://www.vivo.colostate.edu/molkit/manip/)
„Merger“	(http://mobyline.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::merger) [Rice <i>et al.</i> , 2000]

„NEBcutter“	V2.0 (http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php) [Vincze <i>et al.</i> , 2003]
„OligoCalc“	(http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html)
„Phosphosite“	(http://www.phosphosite.org/) [Hornbeck <i>et al.</i> , 2004]
„Primer3“	(http://frodo.wi.mit.edu/)
„PrimerX“	(http://www.bioinformatics.org/primerx/)
„Translate“	(http://web.expasy.org/translate/)

7. 4. Literaturverzeichnis

Ahmadian MR, Stege P, Scheffzek K, Wittinghofer A. Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nat Struct Biol.* 1997 Sep;4(9):686-9.

Alcaraz C, De Diego M, Pastor MJ, Escribano JM. Comparison of a radioimmunoprecipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to African swine fever virus. *J Vet Diagn Invest.* 1990 Jul;2(3):191-6.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5;215(3):403-10.

Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem.* 1996 Aug 23;271(34):20246-9.

Aslan JE, McCarty OJ. Rho GTPases in platelet function. *J Thromb Haemost.* 2013 Jan;11(1):35-46.

Azim AC, Barkalow K, Chou J, Hartwig JH. Activation of the small GTPases, rac and cdc42, after ligation of the platelet PAR-1 receptor. *Blood.* 2000 Feb 1;95(3):959-64.

Beck S, Fotinos A, Gawaz M, Elvers M. Nadrin GAP activity is isoform- and target-specific regulated by tyrosine phosphorylation. *Cell Signal.* 2014 Sep;26(9):1975-84.

Beck S, Fotinos A, Lang F, Gawaz M, Elvers M. Isoform-specific roles of the GTPase activating protein Nadrin in cytoskeletal reorganization of platelets. *Cell Signal.* 2013 Jan;25(1):236-46.

Billuart P, Bienvenu T, Ronce N, des Portes V, Vinet MC, Zemni R, Roest Crollius H, Carrié A, Fauchereau F, Cherry M, Briault S, Hamel B, Fryns JP, Beldjord C, Kahn A, Moraine C, Chelly J. Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature.* 1998 Apr 30;392(6679):923-6.

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov 24;7(6):1513-23.

Bregeon J, Loirand G, Pacaud P, Rolli-Derkinderen M. Angiotensin II induces RhoA activation through SHP2-dependent dephosphorylation of the RhoGAP p190A in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009 Nov;297(5):C1062-70.

Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, Hamm HE. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev.* 2003 Dec;24(6):765-81.

Carrier MF, Ducruix A, Pantaloni D. Signalling to actin: the Cdc42-N-WASP-Arp2/3 connection. *Chem Biol.* 1999 Sep;6(9):R235-40.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.

Cichowski K, McCormick F, Brugge JS. p21rasGAP association with Fyn, Lyn, and Yes in thrombin-activated platelets. *J Biol Chem.* 1992 Mar 15;267(8):5025-8.

Doussau F, Gasman S, Humeau Y, Vitiello F, Popoff M, Boquet P, Bader MF, Poulain B. A Rho-related GTPase is involved in Ca(2+)-dependent neurotransmitter exocytosis. *J Biol Chem.* 2000 Mar 17;275(11):7764-70.

Dráber P, Sulimenko V, Dráberová E. Cytoskeleton in mast cell signaling. *Front Immunol.* 2012 May 25;3:130.

Durfee T, Nelson R, Baldwin S, Plunkett G 3rd, Burland V, Mau B, Petrosino JF, Qin X, Muzny DM, Ayele M, Gibbs RA, Csörgo B, Pósfai G, Weinstock GM, Blattner FR. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J Bacteriol.* 2008 Apr;190(7):2597-606.

Dwivedi S, Pandey D, Khandoga AL, Brandl R, Siess W. Rac1-mediated signaling plays a central role in secretion-dependent platelet aggregation in human blood stimulated by atherosclerotic plaque. *J Transl Med.* 2010 Dec 6;8:128.

Eberth A, Lundmark R, Gremer L, Dvorsky R, Koessmeier KT, McMahon HT, Ahmadian MR. A BAR domain-mediated autoinhibitory mechanism for RhoGAPs of the GRAF family. *Biochem J.* 2009 Jan 1;417(1):371-7.

Egot M, Kauskot A, Lasne D, Gaussem P, Bachelot-Loza C. Biphasic myosin II light chain activation during clot retraction. *Thromb Haemost.* 2013 Dec;110(6):1215-22.

Ellis C, Moran M, McCormick F, Pawson T. Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature.* 1990 Jan 25;343(6256):377-81.

Elvers M, Beck S, Fotinos A, Ziegler M, Gawaz M. The GRAF family member oligophrenin1 is a RhoGAP with BAR domain and regulates Rho GTPases in platelets. *Cardiovasc Res.* 2012 Jun 1;94(3):526-36.

Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002 Dec 12;420(6916):629-35.

Fauchereau F, Herbrand U, Chafey P, Eberth A, Koulakoff A, Vinet MC, Ahmadian MR, Chelly J, Billuart P. The RhoGAP activity of OPHN1, a new F-actin-binding protein, is negatively controlled by its amino-terminal domain. *Mol Cell Neurosci.* 2003 Aug;23(4):574-86.

Fidyk NJ, Cerione RA. Understanding the catalytic mechanism of GTPase-activating proteins: demonstration of the importance of switch domain stabilization in the stimulation of GTP hydrolysis. *Biochemistry*. 2002 Dec 31;41(52):15644-53.

Frojmovic MM, O'Toole TE, Plow EF, Loftus JC, Ginsberg MH. Platelet glycoprotein IIb-IIIa (alpha IIb beta 3 integrin) confers fibrinogen- and activation-dependent aggregation on heterologous cells. *Blood*. 1991 Jul 15;78(2):369-76.

Furuta B, Harada A, Kobayashi Y, Takeuchi K, Kobayashi T, Umeda M. Identification and functional characterization of nadrin variants, a novel family of GTPase activating protein for rho GTPases. *J Neurochem*. 2002 Sep;82(5):1018-28.

Gale AJ. Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. *Toxicol Pathol*. 2011 Jan;39(1):273-80.

Govek EE, Newey SE, Akerman CJ, Cross JR, Van der Veken L, Van Aelst L. The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci*. 2004 Apr;7(4):364-72.

Greenhalgh J, Bagust A, Boland A, Martin Saborido C, Oyee J, Blundell M, Dundar Y, Dickson R, Proudlove C, Fisher M. Clopidogrel and modified-release dipyridamole for the prevention of occlusive vascular events (review of Technology Appraisal No. 90): a systematic review and economic analysis. *Health Technol Assess*. 2011 Sep;15(31):1-178.

Hall A. Ras-related GTPases and the cytoskeleton. *Mol Biol Cell*. 1992 May;3(5):475-9.

Harada A, Furuta B, Takeuchi K, Itakura M, Takahashi M, Umeda M. Nadrin, a novel neuron-specific GTPase-activating protein involved in regulated exocytosis. *J Biol Chem*. 2000 Nov 24;275(47):36885-91.

Hart MJ, Shinjo K, Hall A, Evans T, Cerione RA. Identification of the human platelet GTPase activating protein for the CDC42Hs protein. *J Biol Chem*. 1991 Nov 5;266(31):20840-8.

Haskell MD, Nickles AL, Agati JM, Su L, Dukes BD, Parsons SJ. Phosphorylation of p190 on Tyr1105 by c-Src is necessary but not sufficient for EGF-induced actin disassembly in C3H10T1/2 fibroblasts. *J Cell Sci.* 2001 May;114(Pt 9):1699-708.

Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Sep;9(9):690-701.

Hornbeck PV, Chabra I, Kornhauser JM, Skrzypek E, Zhang B. PhosphoSite: A bioinformatics resource dedicated to physiological protein phosphorylation. *Proteomics.* 2004 Jun;4(6):1551-61.

Jackson SP. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med.* 2011 Nov 7;17(11):1423-36.

Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:247-69.

Jelen F, Lachowicz P, Apostoluk W, Mateja A, Derewenda ZS, Otlewski J. Dissecting the thermodynamics of GAP-RhoA interactions. *J Struct Biol.* 2009 Jan;165(1):10-8.

Johnson DI, Pringle JR. Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J Cell Biol.* 1990 Jul;111(1):143-52.

Kagawa Y, Matsumoto S, Kamioka Y, Mimori K, Naito Y, Ishii T, Okuzaki D, Nishida N, Maeda S, Naito A, Kikuta J, Nishikawa K, Nishimura J, Haraguchi N, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Yamamoto H, Sekimoto M, Ishii H, Doki Y, Matsuda M, Kikuchi A, Mori M, Ishii M. Cell cycle-dependent Rho GTPase activity dynamically regulates cancer cell motility and invasion in vivo. *PLoS One.* 2013 Dec 30;8(12):e83629.

Katoh K, Masuda M, Kano Y, Jinguji Y, Fujiwara K. Focal adhesion proteins associated with apical stress fibers of human fibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1995;31(3):177-95.

Kato H, Yasui H, Yamaguchi Y, Aoki J, Fujita H, Mori K, Negishi M. Small GTPase RhoG is a key regulator for neurite outgrowth in PC12 cells. *Mol Cell Biol.* 2000 Oct;20(19):7378-87.

Khalil BD, Hanna S, Saykali BA, El-Sitt S, Nasrallah A, Marston D, El-Sabban M, Hahn KM, Symons M, El-Sibai M. The regulation of RhoA at focal adhesions by StarD13 is important for astrocytoma cell motility. *Exp Cell Res.* 2014 Feb 15;321(2):109-22.

Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science.* 1996 Jul 12;273(5272):245-8.

Kobayashi Y, Harada A, Furuta B, Asou H, Kato U, Umeda M. The role of NADRIN, a Rho GTPase-activating protein, in the morphological differentiation of astrocytes. *J Biochem.* 2013 Apr;153(4):389-98.

Lammers M, Meyer S, Kühlmann D, Wittinghofer A. Specificity of interactions between mDia isoforms and Rho proteins. *J Biol Chem.* 2008 Dec 12;283(50):35236-46.

Li J, Ning Y, Hedley W, Saunders B, Chen Y, Tindill N, Hannay T, Subramaniam S. The Molecule Pages database. *Nature.* 2002 Dec 12;420(6916):716-7.

Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Dec;30(12):2341-9.

Lim KB, Bu W, Goh WI, Koh E, Ong SH, Pawson T, Sudhaharan T, Ahmed S. The Cdc42 effector IRSp53 generates filopodia by coupling membrane protrusion with actin dynamics. *J Biol Chem.* 2008 Jul 18;283(29):20454-72.

Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science.* 1999 Aug 6;285(5429):895-8.

Malacombe M, Ceridono M, Calco V, Chasserot-Golaz S, McPherson PS, Bader MF, Gasman S. Intersectin-1L nucleotide exchange factor regulates secretory granule exocytosis by activating Cdc42. *EMBO J.* 2006 Aug 9;25(15):3494-503.

Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* 1996 May 1;15(9):2208-16.

McCarty OJ, Larson MK, Auger JM, Kalia N, Atkinson BT, Pearce AC, Ruf S, Henderson RB, Tybulewicz VL, Machesky LM, Watson SP. Rac1 is essential for platelet lamellipodia formation and aggregate stability under flow. *J Biol Chem.* 2005 Nov 25;280(47):39474-84.

Miki H, Takenawa T. Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. *J Biochem.* 2003 Sep;134(3):309-13.

Minoshima Y, Kawashima T, Hirose K, Tonozuka Y, Kawajiri A, Bao YC, Deng X, Tatsuka M, Narumiya S, May WS Jr, Nosaka T, Semba K, Inoue T, Satoh T, Inagaki M, Kitamura T. Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev Cell.* 2003 Apr;4(4):549-60.

Moon SY, Zheng Y. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol.* 2003 Jan;13(1):13-22.

Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris).* 1990;48(8):579-82.

Nakai K, Suzuki Y, Kihira H, Wada H, Fujioka M, Ito M, Nakano T, Kaibuchi K, Shiku H, Nishikawa M. Regulation of myosin phosphatase through phosphorylation of the myosin-binding subunit in platelet activation. *Blood.* 1997 Nov 15;90(10):3936-42.

Nasrallah A, Saykali B, Al Dimassi S, Khoury N, Hanna S, El-Sibai M. Effect of StarD13 on colorectal cancer proliferation, motility and invasion. *Oncol Rep.* 2014 Jan;31(1):505-15.

Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H, Fässler R. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J.* 2001 May 1;20(9):2120-30.

Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood.* 2003 Jul 15;102(2):449-61.

Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 1995 Apr 7;81(1):53-62.

Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res.* 2006 Dec 8;99(12):1293-304.

Ohashi K, Nagata K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya S, Mizuno K. Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J Biol Chem.* 2000 Feb 4;275(5):3577-82.

Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Dec;5(12):993-6.

Paterson HF, Self AJ, Garrett MD, Just I, Aktories K, Hall A. Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol.* 1990 Sep;111(3):1001-7.

Pellegrin S, Mellor H. The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr Biol.* 2005 Jan 26;15(2):129-33.

Penz S, Reininger AJ, Brandl R, Goyal P, Rabie T, Bernlochner I, Rother E, Goetz C, Engelmann B, Smethurst PA, Ouwehand WH, Farndale R, Nieswandt B, Siess W. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *FASEB J.* 2005 Jun;19(8):898-909.

Pinheiro NA, Caballero OL, Soares F, Reis LF, Simpson AJ. Significant overexpression of oligophrenin-1 in colorectal tumors detected by cDNA microarray analysis. *Cancer Lett.* 2001 Oct 22;172(1):67-73.

Pleines I, Eckly A, Elvers M, Hagedorn I, Eliautou S, Bender M, Wu X, Lanza F, Gachet C, Brakebusch C, Nieswandt B. Multiple alterations of platelet functions dominated by increased secretion in mice lacking Cdc42 in platelets. *Blood.* 2010 Apr 22;115(16):3364-73.

Polakis PG, Snyderman R, Evans T. Characterization of G25K, a GTP-binding protein containing a novel putative nucleotide binding domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 Apr 14;160(1):25-32.

Pruitt KD, Brown GR, Hiatt SM, Thibaud-Nissen F, Astashyn A, Ermolaeva O, Farrell CM, Hart J, Landrum MJ, McGarvey KM, Murphy MR, O'Leary NA, Pujar S, Rajput B, Rangwala SH, Riddick LD, Shkeda A, Sun H, Tamez P, Tully RE, Wallin C, Webb D, Weber J, Wu W, DiCuccio M, Kitts P, Maglott DR, Murphy TD, Ostell JM. RefSeq: an update on mammalian reference sequences. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(Database issue):D756-63.

Reininger AJ, Bernlochner I, Penz SM, Ravanat C, Smethurst P, Farndale RW, Gachet C, Brandl R, Siess W. A 2-step mechanism of arterial thrombus formation induced by human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol.* 2010 Mar 16;55(11):1147-58.

Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* 2000 Jun;16(6):276-7.

Richnau N, Aspenström P. Rich, a rho GTPase-activating protein domain-containing protein involved in signaling by Cdc42 and Rac1. *J Biol Chem.* 2001 Sep 14;276(37):35060-70.

Riddick N, Ohtani K, Surks HK. Targeting by myosin phosphatase-RhoA interacting protein mediates RhoA/ROCK regulation of myosin phosphatase. *J Cell Biochem.* 2008 Mar 1;103(4):1158-70.

Rittinger K, Walker PA, Eccleston JF, Nurmahomed K, Owen D, Laue E, Gamblin SJ, Smerdon SJ. Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature.* 1997 Aug 14;388(6643):693-7.

Roy M, Kung HJ, Ghosh PM. Statins and prostate cancer: role of cholesterol inhibition vs. prevention of small GTP-binding proteins. *Am J Cancer Res.* 2011;1(4):542-61.

Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res.* 2007 Jun 22;100(12):1673-85.

Scheffzek K, Ahmadian MR, Wittinghofer A. GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site. *Trends Biochem Sci.* 1998 Jul;23(7):257-62.

Schultess J, Danielewski O, Smolenski AP. Rap1GAP2 is a new GTPase-activating protein of Rap1 expressed in human platelets. *Blood.* 2005 Apr 15;105(8):3185-92.

Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, Mujica AO, Thomas M, Harrow J, Cox T, Jackson D, Severin J, Biggs P, Fu J, Nefedov M, de Jong PJ, Stewart AF, Bradley A. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature.* 2011 Jun 15;474(7351):337-42.

Smrcka AV. G protein $\beta\gamma$ subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Jul;65(14):2191-214.

Soulet C, Gendreau S, Missy K, Benard V, Plantavid M, Payrastre B. Characterisation of Rac activation in thrombin- and collagen-stimulated human blood platelets. *FEBS Lett.* 2001 Nov 2;507(3):253-8.

Steffen A, Rottner K, Ehinger J, Innocenti M, Scita G, Wehland J, Stradal TE. Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J.* 2004 Feb 25;23(4):749-59.

Stradal TE, Rottner K, Disanza A, Confalonieri S, Innocenti M, Scita G. Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol.* 2004 Jun;14(6):303-11.

Subauste MC, Von Herrath M, Benard V, Chamberlain CE, Chuang TH, Chu K, Bokoch GM, Hahn KM. Rho family proteins modulate rapid apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes and Fas. *J Biol Chem.* 2000 Mar 31;275(13):9725-33.

Suzuki Y, Yamamoto M, Wada H, Ito M, Nakano T, Sasaki Y, Narumiya S, Shiku H, Nishikawa M. Agonist-induced regulation of myosin phosphatase activity in human platelets through activation of Rho-kinase. *Blood.* 1999 May 15;93(10):3408-17.

Suzuki-Inoue K, Yatomi Y, Asazuma N, Kainoh M, Tanaka T, Satoh K, Ozaki Y. Rac, a small guanosine triphosphate-binding protein, and p21-activated kinase are activated during platelet spreading on collagen-coated surfaces: roles of integrin alpha(2)beta(1). *Blood.* 2001 Dec 15;98(13):3708-16.

Tomar A, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Oct;21(5):676-83.

Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Mar;28(3):403-12.

Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul 1;31(13):3688-91.

Virchow R (1856) Phlogose und thrombose in Gefasystem. Staatsdruckeri, Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medizin, Frankfurt

Watanabe N, Kato T, Fujita A, Ishizaki T, Narumiya S. Cooperation between mDial and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol.* 1999 Jul;1(3):136-43.

Wells CD, Fawcett JP, Traweger A, Yamanaka Y, Goudreault M, Elder K, Kulkarni S, Gish G, Virag C, Lim C, Colwill K, Starostine A, Metalnikov P, Pawson T. A Rich1/Amot complex regulates the Cdc42 GTPase and apical-polarity proteins in epithelial cells. *Cell.* 2006 May 5;125(3):535-48.

Wheeler AP, Ridley AJ. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res.* 2004 Nov 15;301(1):43-9.

Wong YH, Lee TY, Liang HK, Huang CM, Wang TY, Yang YH, Chu CH, Huang HD, Ko MT, Hwang JK. KinasePhos 2.0: a web server for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites based on sequences and coupling patterns. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jul;35(Web Server issue):W588-94.

Wraith KS, Magwenzi S, Aburima A, Wen Y, Leake D, Naseem KM. Oxidized low-density lipoproteins induce rapid platelet activation and shape change through tyrosine kinase and Rho kinase-signaling pathways. *Blood.* 2013 Jul 25;122(4):580-9.

Wu S, Ma L, Wu Y, Zeng R, Zhu X. Nudel is crucial for the WAVE complex assembly in vivo by selectively promoting subcomplex stability and formation through direct interactions. *Cell Res.* 2012 Aug;22(8):1270-84.

Yang B, Radel C, Hughes D, Kelemen S, Rizzo V. p190 RhoGTPase-activating protein links the β 1 integrin/caveolin-1 mechanosignaling complex to RhoA and actin remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Feb;31(2):376-83.

Ylä-Herttuala S, Bentzon JF, Daemen M, Falk E, Garcia-Garcia HM, Herrmann J, Hoefler I, Jukema JW, Krams R, Kwak BR, Marx N, Naruszewicz M, Newby A, Pasterkamp G, Serruys PW, Waltenberger J, Weber C, Tokgözoğlu L. Stabilisation of

atherosclerotic plaques. Position paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on atherosclerosis and vascular biology. *Thromb Haemost.* 2011 Jul;106(1):1-19.

Zahedi RP, Begonja AJ, Gambaryan S, Sickmann A. Phosphoproteomics of human platelets: A quest for novel activation pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Dec;1764(12):1963-76.

Zanni G, Saillour Y, Nagara M, Billuart P, Castelnau L, Moraine C, Faivre L, Bertini E, Durr A, Guichet A, Rodriguez D, des Portes V, Beldjord C, Chelly J. Oligophrenin 1 mutations frequently cause X-linked mental retardation with cerebellar hypoplasia. *Neurology.* 2005 Nov 8;65(9):1364-9.

8. Anlagen

8. 1. Aus dieser Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen

Beck S., Fotinos A., Lang F., Gawaz M., Elvers M. Isoform-specific roles of the GTPase activating protein Nadrin in cytoskeletal rearrangements of platelets. *Cell Signal.* 2013 Jan;25(1):236-46.

Beck S., Fotinos A., Gawaz M., Elvers M. Nadrin GAP activity is isoform- and target-specific regulated by tyrosine phosphorylation. *Cell Signal.* 2014 Apr 2;26(9):1975-1984.

8. 2. Kongressbeiträge

Vorträge

Beck S., Fotinos A., Lang F., Gawaz M., Elvers M. Isoform-specific roles of the GTPase activating protein Nadrin in cytoskeletal rearrangements of platelets.

(79. Jahrestagung der Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 2013)

Poster

Beck S., Fotinos A., Gawaz M., Elvers M. Nadrin GAP activity is isoform- and target-specific regulated by tyrosine phosphorylation.

(80. Jahrestagung der Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 2014)

9. Lebenslauf

Name Sandra Beck
Geburtsdatum: 23.12.1982
Geburtsort: Neu-Ulm

Schulbildung

September 1993 bis Juni 2002 Lessing-Gymnasium Neu-Ulm, allgemeine

28. Juni 2002 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Hochschulbildung

September 2002 bis März 2008 Studium der Biologie an der Universität Ulm
Vertiefung: Mikrobiologie, Genetik, Pharmakologie,
Informatik

26. März 2008 Diplom Biologie

Promotion

Juli 2010 bis März 2014 Doktorarbeit zum Dr. rer. nat. in der Experimentellen
Kardiologie, Medizinische Klinik III, Universitäts-
klinikum Tübingen

Wissenschaftliche Tätigkeit

Mai 2008 bis Januar 2009 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Medizinischen
Klinik IV, Universitätsklinikum Tübingen

seit April 2014 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Experimentellen
Kardiologie, Medizinische Klinik III, Universitäts-
klinikum Tübingen

Danksagung

Zu allererst bedanke ich mich bei Prof. Dr. Meinrad Gawaz, der mir die Möglichkeit gab, diese Dissertation anzufertigen. Auch für diverse Denkanstöße und für die Übernahme der Gutachterschaft möchte ich mich bedanken.

Prof. Dr. Thilo Stehle danke ich sehr herzlich für die Übernahme der Gutachterschaft.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Erhard Stupperich bedanken. Ich konnte die tiefen Abgründe der Molekularbiologie, die ich in von Ihnen gelernt habe, sehr gut gebrauchen.

Im Kollegenkreis möchte ich mich bedanken bei:

- Jadwiga und Lydia, die einen immer daran erinnern, was wirklich wichtig ist.
- Qifeng und Toby: jeder auf seine Art besonders.
- Klaudi und Tina: Ihr wart für mich immer eine höchst willkommene Aufmunterung
- Anna „Bushido-Tsatsiki“: Von Anfang an hast Du die Höhen (gab's die?) und Tiefen mit mir durchgestanden. Danke für alle Unterstützung, sei es moralisch oder sonstwie gewesen!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!! Du packst das auch!
TSCHAKKAAAA

Ohne die Aufmunterung durch meine „Mäuse“ wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen:

Mupfel (aka. Meins), Whiskey (aka. das Dicke), Kabumba, Chili (aka. das Verrückte/Klein-Weiß) und last but not least Alpha, das musikalische Kätzchen.

Dani und Rosi danke ich dafür, dass ihr immer da seid. Ein kurzes „Bier jetzt“ hätte genügt.



Meinen Eltern gilt größter Dank für all ihre Unterstützung und gutes Zureden. Die Sicherheit immer ein warmes und liebendes Zuhause im Rücken zu haben, gab mir die Kraft diese Doktorarbeit durchzustehen. Ich hab Euch lieb!

Winnie, Licht meines Lebens. Viele Gespräche haben wir geführt, unermüdlich hast Du mich vom Rande der Verzweiflung immer wieder weggetost. Danke für's geduldig sein. Ich liebe Dich! Ja, Du kriegst ein Flugzeug.

Und jetzt noch, wer sich angesprochen fühlt: „Ein Glas auf uns! Und eins auf die See!“